

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología - Microbiología

**“INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE COBRE EN LA
BIOXIDACIÓN DEL FIERRO Y EN EL CRECIMIENTO
CELULAR DE UN CULTIVO MICROBIANO
BIOLIXIVIANTE DE COBRE”**

TESIS

Presentada por

Bach. PAOLA DEL ROSARIO EYZAGUIRRE LIENDO

Para optar por 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°: 245

**TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO – MICROBIÓLOGO**

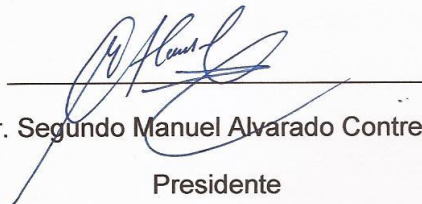
El Secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias, certifica que por Resolución de Facultad N° 8046-2015-FACI-UN/JBG, se designó como jurado calificador para la sustentación de tesis: **“INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE COBRE EN LA BIOXIDACIÓN DEL FIERRO Y EN EL CRECIMIENTO CELULAR DE UN CULTIVO MICROBIANO BIOLIXIVIANTE DE COBRE”**, conformado por:

Presidente : Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras
Secretario : Mgr. Roberto Castellanos Cabrera
Miembro : Mgr. Isabel Ancco Oliva

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 14 de abril del 2015 a las 10: 00 horas; presentado por la Bachiller Paola del Rosario Eyzaguirre Liendo, 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 17 (DIECISIETE).

Para ratificar lo detallado firman:


Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras
Presidente


MSc. Roberto Castellanos Cabrera
Secretario


MSc. Isabel Ancco Oliva
Miembro

DEDICATORIA

A mis padres Renzo y Charo, por su amor incondicional, su sacrificio y apoyo en todas las etapas de mi vida, por hacer posible que hoy cumpla uno de mis sueños. A mi hermana Fabiola por ser un motivo de alegría en todo momento.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la vida, por estar siempre conmigo y por darme la fuerza que me ha permitido llegar hasta esta etapa de mi formación profesional.

A mis padres por el amor que me demuestran día a día, la confianza que tienen en mí, el apoyo durante toda mi vida y por darme los consejos que me han guiado por el camino correcto.

A mi hermana quien con sus locuras y ocurrencias ha sabido sacarme una sonrisa aun en los momentos más difíciles.

A mi asesor MSc. Daladier Miguel Castillo Cotrina, por confiar en mí y apoyarme desde el inicio de mi proyecto de tesis, porque sus conocimientos, paciencia, esfuerzo, tiempo y dedicación han sido indispensables para realizar este trabajo, por todos los consejos recibidos, porque más que un asesor, se convirtió en un gran amigo.

A mis co-asesores Mgr. Albert Saavedra Olaya y MSc. Raúl Soto Pérez, por la confianza, el apoyo y los conocimientos brindados en favor de esta investigación.

A mi gran amiga Sandra Delgado Cruz por su cariño, confianza y ayuda en todos mis años de estudio y en llevar a cabo este trabajo, por apoyarme en todas las circunstancias, por darme ánimo y ser positiva

frente a las adversidades, ya que sin ella este trabajo y muchos de mis logros no se hubieran alcanzado.

A mis familiares y amigos quienes confiaron en mí y me apoyan en cada paso que doy.

A mis profesores de la Facultad de Ciencias por todas las enseñanzas que me brindaron, especialmente al Docente Alfredo Quispe Rivera por su ayuda desinteresada sin la cual no hubiera sido posible realizar este trabajo.

A Southern Copper Corporation por brindar las facilidades desde el inicio de la investigación, especialmente al Ing. Noé Rojas por su amabilidad y buen trato que contribuyeron a realizar este trabajo.

A la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, especialmente a la Facultad de Ciencias y a la Facultad de Ingeniería donde se realizó el trabajo de investigación.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento del Problema.....	4
1.1.1 Antecedentes y origen del Problema.....	4
1.1.2 Fundamento del Problema.....	10
1.2. Hipótesis.....	11
1.3. Justificación.....	12
1.4. Objetivos.....	13
1.4.1 Objetivo General.....	13
1.4.2 Objetivos Específicos.....	13
1.5. Marco teórico.....	14
1.5.1 Aspectos Generales de biohidrometalurgia.....	14
1.5.2 Calcopirita.....	18
1.5.3 Bioxidación.....	19
1.5.4 Biolixiviación.....	22
1.5.5 Tipos de biolixiviación.....	23

	Pág.
1.5.5.1	Procesos basados en el riego..... 24
1.5.5.2	Procesos basados en la agitación... 30
1.5.6	Mecanismos de oxidación bacteriana de minerales..... 31
1.5.6.1	Mecanismo directo..... 33
1.5.6.2	Mecanismo indirecto..... 35
1.5.7	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y otros microorganismos de biolixiviación..... 36
1.5.8	Factores que afectan el crecimiento microbiano..... 41
1.5.9	Influencia de la concentración de metales en el proceso de biooxidación..... 46
1.5.10	Influencia de la concentración de metales en el crecimiento microbiano..... 48
II.	MATERIALES Y MÉTODOS..... 50
2.1.	Ubicación y determinación del área de estudio..... 50
2.2.	Material biológico..... 50
2.3.	Operacionalización de Variables..... 51
2.4.	Población..... 51

	Pág.
2.5. Muestra.....	51
2.6. Muestreo y toma de muestra.....	52
2.6.1 Diseño muestral de mineral de baja ley en botaderos de lixiviación.....	52
2.6.2 Toma de muestra de mineral calcopirita de baja ley en los botaderos de lixiviación de Toquepala.....	53
2.7. Tipo de investigación.....	53
2.8. Diseño de investigación.....	54
2.9. Método.....	56
2.9.1. Pre – enriquecimiento de mineral lixiviado.....	56
2.9.2. Aislamiento de microorganismos biolixivantes en medio sólido.....	57
2.9.3. Obtención de inóculo.....	57
2.9.4. Preparación de soluciones de cobre.....	58
2.9.5. Instalación de biorreactores para la biooxidación de Fe.....	60
2.9.6. Evaluación del proceso de biooxidación de Fe....	61
2.4.6.1 Determinación de Fe total y Fe III por espectrofotometría.....	61

	Pág.
2.9.7. Determinación de la concentración de células.....	66
2.9.8. Procesamiento de datos.....	67
III. RESULTADOS.....	69
3.1. Bioxidación de fierro en función del tiempo.....	69
3.2. Crecimiento microbiano en función del tiempo.....	80
3.3. Bioxidación de fierro en función de la concentración de cobre.....	100
3.4. Crecimiento microbiano en función de la concentración de cobre.....	103
3.5. Correlación entre la bioxidación de fierro y el crecimiento microbiano.....	106
3.6. Pruebas estadísticas.....	107
3.6.1 Análisis de varianza en la bioxidación de fierro.....	107
3.6.2 Análisis de varianza en el crecimiento microbiano.....	109
3.6.2.1 Prueba de Tukey en el crecimiento microbiano.....	110

	Pág.
IV. DISCUSIÓN.....	111
V. CONCLUSIONES.....	116
VI. RECOMENDACIONES.....	117
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
VIII. ANEXOS.....	127

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Sistema de tratamientos a diferentes concentraciones de cobre	55
Tabla 2. Sulfato de cobre en gramos para obtención de diferentes concentraciones de cobre en cada tratamiento.....	59
Tabla 3. Concentración de fierro en función del tiempo, a 0 g/L de cobre.....	69
Tabla 4. Concentración de fierro en función del tiempo, a 5 g/L de cobre.....	72
Tabla 5. Concentración de fierro en función del tiempo, a 10 g/L de cobre.....	74
Tabla 6. Concentración de fierro en función del tiempo, a 15 g/L de cobre.....	76
Tabla 7. Concentración de fierro en función del tiempo, a 20 g/L de cobre.....	78
Tabla 8. Concentración microbiana en función del tiempo, a 0 g/L de cobre.....	80

	Pág.
Tabla 9. Concentración microbiana en función del tiempo, a 5 g/L de cobre.....	84
Tabla 10. Concentración microbiana en función del tiempo, a 10 g/L de cobre.....	88
Tabla 11. Concentración microbiana en función del tiempo, a 15 g/L de cobre.....	92
Tabla 12. Concentración microbiana en función del tiempo, a 20 g/L de cobre.....	96
Tabla 13. Producción máxima de fierro III en función de la concentración de cobre.....	100
Tabla 14. Producción máxima microbiana en función de la concentración de cobre.....	103
Tabla 15. Grado de correlación entre la bioxidación de fierro y el crecimiento microbiano, a diferentes concentraciones de cobre.....	106
Tabla 16. Análisis de varianza de un factor en función de la producción máxima de fierro III.....	107
Tabla 17. Análisis de varianza de un factor en función de la producción máxima microbiana.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Observación de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> en microscopio electrónico de transmisión, 500 nm.....	39
Figura 2. Esquema de zonas de recuento microbiano en cámara Neubauer.....	66

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Curva de concentración de fierro en función del tiempo, a 0 g/L de cobre.....	71
Gráfico 2. Curva de concentración de fierro en función del tiempo, a 5 g/L de cobre.....	73
Gráfico 3. Curva de concentración de fierro en función del tiempo, a 10 g/L de cobre.....	75
Gráfico 4. Curva de concentración de fierro en función del tiempo, a 15 g/L de cobre.....	77
Gráfico 5. Curva de concentración de fierro en función del tiempo, a 20 g/L de cobre.....	79
Gráfico 6. Curva de crecimiento microbiano en función del tiempo, a 0 g/L de cobre.....	82
Gráfico 7. Curva de crecimiento microbiano en función del tiempo, a 5 g/L de cobre.....	86
Gráfico 8. Curva de crecimiento microbiano en función del tiempo, a 10 g/L de cobre.....	90
Gráfico 9. Curva de crecimiento microbiano en función del tiempo, a 15 g/L de cobre.....	94

	Pág.
Gráfico 10. Curva de crecimiento microbiano en función del tiempo, a 20 g/L de cobre.....	98
Gráfico 11. Curva de producción máxima de hierro III en función de la concentración de cobre.....	102
Gráfico 12. Curva de producción máxima microbiana en función de la concentración de cobre.....	105

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Botaderos de lixiviación donde se realizó el muestreo.....	127
Anexo 2. Composición del medio de cultivo 9K líquido modificado (Silverman y Lundgren, 1959).....	127
Anexo 3. Preparación de medio de cultivo 9K sólido.....	128
Anexo 4. Caracterización morfológica de microorganismos biolixivantes en medio de cultivo sólido.....	130
Anexo 5. Curva de calibración para determinación de fierro total, fierro II y fierro III (Cabaña, 2005).....	132
Anexo 6. Registro de absorbancia y concentración de fierro a 0 g/L de cobre.....	133
Anexo 7. Registro de absorbancia y concentración de fierro a 5 g/L de cobre.....	134

	Pág.
Anexo 8. Registro de absorbancia y concentración de fierro a 10 g/L de cobre.....	135
Anexo 9. Registro de absorbancia y concentración de fierro a 15 g/L de cobre.....	136
Anexo 10. Registro de absorbancia y concentración de fierro a 20 g/L de cobre.....	137
Anexo 11. Tratamiento con mayor grado de correlación entre la bioxidación de fierro y el crecimiento microbiano.....	138
Anexo 12. Prueba de Tukey.....	139
Anexo 13. Tabla de valores de la amplitud total (q) de la prueba de Tukey para α (Nivel de error de 5 y 1%).....	142
Anexo 14. Fotografías de muestreo.....	143
Anexo 15. Fotografía de preparación de medio de cultivo.....	144
Anexo 16. Fotografía de control de pH.....	144

	Pág.
Anexo 17. Fotografía de pre- enriquecimiento de mineral.....	144
Anexo 18. Fotografías de recuento microscópico en cámara Neubauer.....	145
Anexo 19. Fotografía de aislamiento en medio de cultivo 9K sólido.....	145
Anexo 20. Fotografías de ensayos piloto.....	146
Anexo 21. Fotografías de preparación de soluciones de cobre.....	147
Anexo 22. Fotografías de sistema de tratamientos a diferentes concentraciones de cobre.....	148
Anexo 23. Fotografías de determinación de fierro total, fierro II y fierro III por espectrofotometría.....	149

RESUMEN

La biolixiviación de cobre es un proceso en el cual el mineral de baja ley es oxidado por microorganismos para solubilizar el metal de interés. El proceso tiene como primera etapa la oxidación de hierro presente en el mineral que puede ser calcopirita, por parte de los microorganismos. Este proceso es más rentable frente a otros métodos convencionales de minería.

En este trabajo se estudió la influencia de la concentración de cobre en la biooxidación del hierro, en el crecimiento microbiano y en el grado de correlación entre estos procesos. Se instaló un sistema de 5 tratamientos, cada uno con dos repeticiones experimentales y una repetición control. La concentración de cobre de cada tratamiento fue 0, 5, 10, 15 y 20 g/L. Se adicionó medio de cultivo 9K líquido (Silverman y Lundgren, 1959) a pH 1,8. Sólo para los tratamientos experimentales se utilizó un inóculo microbiano de un cultivo biolixivante nativo de los botaderos de lixiviación de Toquepala. Durante 15 días, se midió la oxidación de hierro mediante espectrofotometría cada 48 horas y el crecimiento microbiano en cámara Neubauer, cada 24 horas.

El incremento de la concentración de cobre causó la disminución de la concentración de fierro oxidado, la concentración microbiana y el grado de correlación entre ambos procesos. En los tratamientos de 0, 5, 10, 15 y 20 g/L de cobre, las concentraciones máximas de fierro oxidado fueron 9,6565; 7,1938; 6,3399; 6,063 y 6,7644 g/L, las concentraciones máximas microbianas fueron 8×10^8 ; 6×10^7 , $1,6 \times 10^7$; $1,1 \times 10^7$ y 1×10^7 cel/ml. El mayor grado de correlación entre la oxidación de fierro y el crecimiento microbiano fue 0,910595214, obtenido en el tratamiento de 0 g/L de cobre.

ABSTRACT

Bioleaching of copper is a process in which the low grade ore is oxidized by microorganisms to solubilize the metal of interest. The first stage process is the oxidation of iron present in the ore can be chalcopyrite by microorganisms. This process is more cost effective over conventional mining methods.

In this work the influence we studied of the concentration of copper in the bio-oxidation of iron, in microbial growth and the degree of correlation between these processes is studied. We installed a system of 5 treatments, each with two experimental repetitions and repeat monitoring. The copper concentration of each treatment was 0, 5, 10, 15 and 20 g/L. We place 9K liquid culture medium (Silverman and Lundgren, 1959) at pH 1.8 and only for experimental treatments we added a microbial inoculum of a leaching native culture of Toquepala leach dump. For 15 days, we measured the oxidation of iron by spectrophotometry every 48 hours and microbial growth in a Neubauer chamber every 24 hours.

Increasing copper concentration caused the decrease of the concentration of oxidized iron, the microbial concentration and the degree of correlation between the two processes. In the treatments of 0, 5, 10, 15 and 20 g/L of copper, the maximum concentrations of oxidized iron were 9.6565; 7.1938; 6.3399; 6.063 and 6.7644 g/L, the maximum microbial concentrations were 8×10^8 ; 6×10^7 , 1.6×10^7 ; 1.1×10^7 and 1×10^7 cells/ml. The highest degree of correlation between iron oxidation and microbial growth was 0.910595214, obtained in the treatment of 0 g/L copper.

I. INTRODUCCIÓN

La gran cantidad de mineral de baja ley, acumulada cerca de los yacimientos, así como la presencia de relaves mineros, impulsó a los investigadores a buscar técnicas rentables y eficientes de recuperación del cobre. Esto los llevó a encontrar que ciertas bacterias eran responsables de la lixiviación de los minerales sulfurados. El proceso de biolixiviación es más rentable que los métodos convencionales cuando el mineral sulfurado de un yacimiento de cobre es de baja ley o tiene menos de un 0,5% de cobre, por ser más barato, eficiente y por reducir los impactos en el medio ambiente (Cochilco, 2009; CIIMM, 2005).

La biolixiviación es un proceso en el cual se emplean microorganismos para disolver minerales, liberando el metal de interés presente en un mineral o en un concentrado, que con métodos convencionales sería muy difícil de extraer (COCHILCO, 2009). La lixiviación bacteriana es un excelente ejemplo de cómo la actividad biológica controlada puede servir al hombre en la explotación de los recursos naturales sin el uso intensivo de energía (Acevedo, 2005). La lixiviación bacteriana para la recuperación de cobre a partir de minerales

de baja ley ha sido comercialmente bien explotada (Rivera et al, 2000); sin embargo, en nuestro país, este proceso es aún incipiente.

El uso de los microorganismos a nivel industrial está asociado directamente a su capacidad de crecimiento en medio ácido, a los escasos requerimientos de nutrientes e infraestructura necesarios. Otras ventajas de la tecnología microbiana sobre los métodos convencionales son que requiere poca inversión de capital, es de bajo costo, no se emiten gases ni polvo y permite el ahorro de energía (COCHILCO, 2009).

Los microorganismos que intervienen en los procesos de lixiviación son generalmente quimiolitioautótrofos y aerobios. Tienen la capacidad de 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 son 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 la solubilización de mineral convirtiendo el sulfuro de cobre en sulfato de cobre.

Los microorganismos biolixiviantes se caracterizan por vivir en condiciones extremas que son las condiciones normales de los minerales: pH ácido y altas concentraciones de metales. Uno de microorganismos más conocido y estudiado en el área de biolixiviación es la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, aislada por primera vez desde las aguas de una mina de carbón en 1947 (Colmer & Hinkle, 1947). No obstante, existen otros microorganismos que intervienen en el proceso de biolixiviación, ya que cada uno tiene diferentes necesidades de nutrientes como fuente de energía, una mezcla de bacterias podría resultar más beneficiosa que una especie pura, en la biolixiviación de un mineral.

En el presente trabajo se determinó la influencia de la concentración de cobre, en el proceso de biooxidación de fierro, en el crecimiento microbiano de un cultivo biolixivante y en el grado de correlación entre estos dos procesos, utilizando microorganismos nativos aislados a partir de mineral lixiviado del yacimiento minero de Toquepala.

1.1. Planteamiento del Problema

1.1.1 Antecedentes y origen del Problema

La lixiviación bacteriana de sulfuros metálicos se ha desarrollado rápidamente en el curso de la última década. La recuperación de metales pesados por la aplicación de microorganismos es ahora una técnica biotecnológica establecida. La movilización de cationes metálicos desde minerales insolubles por oxidación biológica y procesos de complejación es referido a la biolixiviación. Los metales en los cuales esta técnica es empleada son: cobre, cobalto, níquel, zinc y uranio (Càrdenas, 2003).

La biooxidación se refiere al pre tratamiento que realizan los microorganismos para catalizar la degradación de minerales sulfurados, comúnmente pirita y calcopirita, los cuales ocuyen los metales, para luego llevar a cabo el proceso químico convencional (Hurtado, 1997).

A las bacterias pertenecientes al género *Acidithiobacillus* se les atribuye la mayor responsabilidad en procesos de oxidación de compuestos sulfurados, en la generación de acidez y en la solubilización de elementos metálicos. Estas bacterias pueden obtener su energía de la oxidación quimiolitotrófica del fierro y sulfuros inorgánicos y usar esa energía para mantener su crecimiento autotrófico fijando el CO₂ (Delgado, 2001).

La contaminación ambiental con metales pesados constituye un creciente problema mundial. Estos elementos químicos representan una amenaza biológica, pues no son biodegradables. Sólo los microorganismos que portan sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos de los metales son capaces de sobrevivir en ambientes con elevadas concentraciones de esos elementos (Marrero, 2010).

Se ha señalado que la presencia de metales pesados en el medio ambiente ejerce una fuerte presión de selección sobre los organismos que allí habitan, un incremento en su

concentración puede ejercer una presión selectiva capaz de modificar la flora microbiana (Moraga, 2003).

Estudios han demostrado que la muerte de especies que carecen de suficiente resistencia al estrés impuesto por la contaminación por metales como el cobre provoca el enriquecimiento de especies particulares más tolerantes que generan una disminución en la diversidad bacteriana (Altimira, 2010).

El empleo de los niveles de resistencia bacteriana a metales como bioindicadores del efecto de la contaminación metálica a corto y medio plazo sobre las comunidades biológicas de suelo, se ha descrito ampliamente; en función de esto se planteó relacionar la evolución de la contaminación metálica de algunos terrenos con las frecuencias de resistencia bacteriana a metales (De Vicente, 2001).

El estudio de los metales es de gran importancia en términos de contaminación ambiental debido a sus efectos

tóxicos sobre los organismos vivos. Específicamente, las bacterias han sido objeto de numerosos estudios por su participación en los ciclos biogeoquímicos de los elementos esenciales para la vida (C, N, P y S), así como por su capacidad para transformar compuestos no esenciales, que eventualmente pueden representar una amenaza para el ambiente. Las interacciones entre las bacterias y los metales son conocidas y pueden ocurrir a nivel extracelular, en la superficie bacteriana o intracelularmente (Suárez, 2002).

La toxicidad de los metales pesados es muy alta. Su acción directa sobre los seres vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos -SH (Sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos. Para que los metales pesados puedan ejercer su toxicidad sobre un ser vivo, éstos deben encontrarse disponibles para ser captados por éste, es decir que el metal debe estar biodisponible. El concepto de biodisponibilidad se encuentra íntimamente relacionado con las condiciones fisicoquímicas

del ambiente, que determinan la especiación y por lo tanto la concentración de metal libre y lábil (Vullo, 2003).

El cobre es un elemento traza indispensable para todas las células, ya que actúa como cofactor en una serie de importantes reacciones celulares. Sin embargo, a concentraciones superiores a las requeridas fisiológicamente, se vuelve tóxico pues cataliza la formación de especies reactivas de oxígeno. Por ello las células han desarrollado sistemas para evitar que las concentraciones intracelulares del metal alcancen valores elevados, los que se conocen como mecanismos de resistencia.

En general los niveles de resistencia al cobre de los microorganismos corresponden a valores de concentración mínima inhibitoria mayores a 13 g/L. Sin embargo, se han descrito especies capaces de crecer en concentraciones del metal de hasta dos órdenes de magnitud superiores.

Estos microorganismos se han aislado desde drenajes ácidos de minas, un ambiente extremo que tiene un pH muy

bajo y altas concentraciones de metales pesados. Dentro de estas especies resistentes se encuentra la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, una especie gram negativa y quimilitoautótrofa que utiliza ion ferroso, azufre elemental o sus especies reducidas como fuentes de energía. *A. ferrooxidans* ha sido interesantemente estudiada debido a que participa en procesos de biolixiviación del cobre, donde los microorganismos están expuestos a altas concentraciones del metal, las que probablemente son un factor limitante para su desarrollo (Navarro, 2010).

1.1.2. Fundamento del Problema

El cobre es el tercer metal más usado en el mundo y un componente importante en la minería de nuestra región. La recuperación de cobre por aplicación de microorganismos es un proceso que comprende la biooxidación del ión ferroso a ión férrico. Para ello, los microorganismos biolixivantes que ejercen acción oxidativa sobre el Fe, necesitan crecer poblacionalmente, es decir, es necesario haber obtenido una cantidad suficiente de biomasa para que la actividad biolixivante se vea incrementada.

El cobre es un metal pesado, por ello cuando se encuentra en elevadas concentraciones puede afectar el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, el grado de influencia puede depender de factores como la concentración del metal presente en el medio.

Es de gran importancia conocer en qué forma afecta la concentración de cobre a los microorganismos nativos aislados de los botaderos de lixiviación de la mina

Southern,Copper Corporation, principal productora de cobre en nuestra región.

Por lo tanto se plantea la siguiente pregunta:

¿En qué medida la concentración de cobre influye en la oxidación del Fe, en el crecimiento microbiano de un cultivo biolixivante del cobre y en el grado de correlación entre estos dos procesos?

1.2 Hipótesis

A un aumento de la concentración de cobre disminuye la oxidación del Fe y el crecimiento microbiano del cultivo biolixivante de cobre con un grado de correlación (Coeficiente de correlación de Pearson) entre estos dos procesos igual a 1.

1.3 Justificación

El cobre juega un papel importante, formando parte esencial de objetos, energía eléctrica, iluminación, suministro de agua y transporte. La empresa minera Southern Peru Copper Corporation se ocupa de extraer este mineral y procesarlo para que, a partir de él, se fabriquen estos productos que utilizamos diariamente. Como empresa minera se interesa por usar los recursos naturales de manera eficiente. La biolixiviación de cobre es un proceso natural en el que los microorganismos se adhieren al mineral generando ión férrico y una solución ácida que contiene el cobre en forma soluble.

Este trabajo propone determinar la influencia de la concentración de cobre en el crecimiento de microorganismos biolixivantes aislados a partir de los botaderos de mineral lixiviado de la mina Southern Perú, en la capacidad de estos para oxidar el ión ferroso a ión férrico y en el grado de correlación entre ambos procesos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar la influencia de la concentración del cobre en la biooxidación de Fe, en el crecimiento celular de un cultivo microbiano biolixivante de cobre y el grado de correlación entre estos dos procesos.

1.4.2 Objetivos específicos

- Establecer la concentración microbiana y de Fe oxidado máxima a diferentes concentraciones de cobre.
- Determinar la concentración de cobre a la cual se obtiene mayor concentración microbiana y de Fe oxidado.
- Establecer el grado de correlación entre la curva de crecimiento microbiano y el de Fe oxidado.

1.5 Marco Teórico

1.5.1 Aspectos Generales de Biohidrometalurgia

La biohidrometalurgia o comúnmente denominada biominería, es la rama de la biotecnología aplicada a la industria minero – metalúrgica, que busca la solución a los problemas productivos que se presentan en la recuperación de metales y en la biorremediación; de tal manera que se ocupa de la extracción de metales utilizando microorganismos a partir de minerales, especialmente minerales sulfurados, haciéndolos más susceptibles a la disolución en soluciones acuosas. Es un campo multidisciplinario que involucra la microbiología, la química, la hidrometalurgia, el procesamiento de minerales y el medio ambiente (Sekhar et al., 2012; Ly, 2009).

La biohidrometalurgia se ha aplicado a nivel mundial para la recuperación de metales como el cobre y el oro, actualmente es una tecnología industrial

establecida para el pre-tratamiento de minerales refractarios. Se caracteriza por los bajos costos de operación, menor impacto ambiental, simplicidad de operación y mantenimiento de la planta, esto hace que hoy en día sea una alternativa para los proyectos mineros (Sekhar et al., 2012).

La biohidrometalurgia consiste en utilizar microorganismos que están presentes en zonas mineras y que han hecho un trabajo durante millones de años en solubilizar minerales para su alimentación. Ese proceso significa un beneficio para la industria minera porque a través de esos microorganismos podemos recuperar metales de interés y ayudar en la remediación ambiental (Aguirre, 2013).

La biominería se enfoca tanto a la recuperación de minerales como al tratamiento para recuperación de espacios contaminados en la extracción de minerales. Además, estudia los microorganismos para conocer su

identidad y cómo actúan en esos procesos de regeneración. (Aguirre, 2013).

Los microorganismos utilizados son usualmente oxidantes del hierro y/o del azufre y resistentes a altas 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 zinc y de níquel. También es utilizada para el beneficio de minerales como el oro.

La biominería ofrece una amplitud de ventajas como el desarrollo científico y tecnológico, que engloba el conocimiento de microorganismos, genoma, desarrollo de procesos y diseño de reactores, la intervención e interés de la industria, además de ser un proceso amigable con el medio ambiente, eficiente y económico que da más oportunidades en investigación, desarrollo y obtención de patentes (Ly, 2009).

Actualmente es difícil encontrar el cobre en la naturaleza bajo forma metálica; ya que se localiza formando parte de diferentes minerales sulfurados como calcopirita, calcocita o bomita. La explotación clásica de este tipo de metales recurre a la pirometalurgia: el mineral se tuesta a altas temperaturas y se reduce a metal. Pero, desde el punto de vista económico, esta metodología no sólo es inviable para minerales con bajo contenido metálico sino que es muy contaminante, ya que libera enormes cantidades de dióxido de azufre. El uso de metodologías que funcionen a bajas temperaturas y con soluciones acuosas, capaces de extraer el metal de los minerales, es claramente preferible por su rentabilidad e impacto ambiental. La presencia de los microorganismos es esencial para que el proceso de recuperación de cobre sea eficaz (Rabe, 2005).

1.5.2 Calcopirita

La calcopirita químicamente es un disulfuro de hierro y cobre. La mayoría de las veces se la encuentra en forma masiva y las pocas veces que se ven los cristales están muy aplanados.

La calcopirita tiene el aspecto de una masa compacta recubriendo otros minerales, de cristalización tetragonal, cristales pseudocúbicos y se funde decrepitando. Es buen conductor del calor y la electricidad.

La fórmula química de la calcopirita es FeCuS_2 , de la clase de sulfuros, de un sistema tetragonal, su etimología proviene del griego khalcos (cobre) y phyr (fuego). Su composición es de un 34% de Cu, 30,5% de Fe, y 35% de S. En ocasiones con Tl, Se, Te y a veces con Ag y Au.

Entre las características físicas, el peso específico es de: 4,2 - 4,3 g/cm³, la dureza es de: 3,5 – 4, de color amarillo latón o amarillo miel con irisaciones verdosas azuladas o pátina abirragada. Posee raya negra verdosa lustre metálico, brillo metálico, transparencia opaca, fractura desigual a concoidea, exfoliación muy imperfecta o poco marcada, de tenacidad frágil y quebradiza.

La calcopirita es recalcitrante a la acción bacteriana en el rango de las mesófilas, pero su disolución aumenta considerablemente a altas temperaturas (60-70°C) donde se favorece el desarrollo y la actividad de los microorganismos termófilos (Petersen y Dixon, 2006).

1.5.3 Bioxidación

La posibilidad de aprovechar millones de toneladas de mineral cuprífero de descarte acumulado por decenas de años de operación minera, fue lo que

impulsó a los investigadores a buscar nuevos procesos más baratos y eficientes. Las bacterias lixiviantes desarrollan un proceso a través del cual permiten separar el cobre de los minerales sólidos, con los que se encuentra mezclado, haciendo rentable su procesamiento (COCHILCO, 2009).

Los microorganismos desencadenan reacciones químicas que permiten la liberación o disolución de los metales que se encuentran dentro de los minerales a través de la generación de ácido sulfúrico (Aguirre, 2005).

La oxidación bacteriana es el conjunto de procesos para promover la movilización de constituyentes metálicos, que a su vez son la base de la biolixiviación de sulfuros minerales (Cárdenas, 2003).

La oxidación bacteriana o biooxidación, que es parte del proceso de biolixiviación, es empleada para el tratamiento de minerales sulfurados y se fundamenta

en la acción efectiva de las bacterias para oxidar formas reducidas de azufre a sulfato y para oxidar el ion ferroso a ion férrico. El sulfuro de cobre, CuS, es uno de los minerales que pueden ser convertidos en una forma soluble del metal, que en este caso es cobre; mediante una reacción de oxidación, las bacterias extraen los electrones y disuelven el CuS que es sólido, obteniendo una solución de Sulfato de cobre (CuSO₄) a partir de la cual se puede recuperar el cobre como metal (CODELCO, 2002).

De igual manera es importante la reacción de oxidación del fierro para la lixiviación de metales pues permite la acumulación de biomasa bacteriana en minerales y soluciones, además de obtener una fuerte oxidación de sulfuros y producir un alto potencial redox en el medio. El hierro férrico es generado como producto en la solución. (Valencia, 2010).

1.5.4 Biolixiviación

Se denomina biolixiviación 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 para obtener la energía que necesitan a expensas de sustancias inorgánicas, liberando a la vez cobre en mayor cantidad que con métodos convencionales (CIMM, 2005)

Se puede señalar que la biolixiviación es una tecnología que emplea bacterias específicas para lixiviar o extraer un metal de valor como uranio, cobre, zinc y cobalto, presente en las menas o en un concentrado mineral. El producto final de la biolixiviación es una solución ácida que contiene el metal de valor en su forma soluble (Cortéz, 2008)

Si bien la lixiviación bacteriana es más lenta que la pirometalurgia en cuanto a la velocidad de obtención

del metal, demanda menores inversiones de capital y menores costos de operación. Además se presenta como una tecnología más limpia que las practicadas comúnmente, debido a que no se emite SO_2 al ambiente en su periodo de operación (Ballester 2005).

La investigación en el área de biolixiviación de calcopirita todavía continúa resolviendo los problemas de precipitación de jarosita y la formación de capa de pasivación, que inhibe la recuperación de cobre en una pila de lixiviación de la calcopirita por métodos biológicos.

1.5.5 Tipos de biolixiviación

Las diferencias entre las tecnologías de biolixiviación dependen del lugar de aplicación, la metodología, 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.

1.5.5.1 Procesos basados en el riego

A. Biolixiviación en pilas

En 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.

Generalmente las pilas se construyen con material previamente chancado, de 19 mm o menos, que es llevado por correas transportadoras al área o patio de acopio, lugar donde se forma la pila.

En el trayecto el mineral es curado, irrigado con una solución de ácido sulfúrico concentrado o puede ser previamente aglomerado en tambores rotativos con agua acidificada para acondicionar el mineral a los microorganismos y también para fijar las partículas finas a las partículas más grandes de mineral. Luego el mineral es apilado en las áreas o canchas de acopio que están especialmente diseñadas. Los patios son revestidos con polietileno de alta densidad (HDPE) y se instala un sistema de drenaje con tuberías de plástico perforadas, que permiten capturar la solución lixiviada desde la base. También se instala una red de líneas de aire de plástico perforado, mediante la cual el aire es forzado por ventiladores externos a la pila, lo que asegura la disponibilidad de aire a los microorganismos. Una vez preparada la base, el mineral se apila ordenadamente con apiladores automatizados, formando un terraplén o pila de 6-8 m de altura.

Las pilas pueden ser dinámicas si después de la lixiviación, el mineral se remueve para enviarlo al botadero y la base de la pila se reutiliza; o pilas permanentes si las nuevas pilas se cargan sobre las anteriores. El sistema de pilas permanentes permite no trasladar el material ya lixiviado a un botadero final, ya que el área de lixiviación se convierte en botadero al terminar los ciclos de riego.

Sobre la pila se instala un sistema de riego por goteo o aspersores los que riegan la pila con una solución de ácido sulfúrico, agua y microorganismos. Los microorganismos crecen naturalmente en la pila pero a objeto de mejorar el rendimiento de la operación, es que en una etapa previa de laboratorio se aíslan los microorganismos más adecuados a las condiciones existentes en la pila y se hacen crecer para luego introducirlos en el mineral o inocular, sembrándolos mediante aspersores.

La solución ácida que se infiltra a través de la pila va disolviendo el cobre contenido en los minerales sulfurados, formando una solución de sulfato de cobre (CuSO_4) que es recogida por el sistema de drenaje y llevada fuera del sector de las pilas en canaletas impermeabilizadas hasta la planta de extracción por solvente. Aquí se recupera el cobre de la solución para luego formar los cátodos en la etapa de electroobtención, y el ácido es refinado y recirculado para el riego de las pilas.

Se estima que para lograr un máximo de recuperación de cobre de 80-90% se requieren de 250-350 días de biolixiviación. Las principales ventajas de la biolixiviación en pila son el bajo capital y costos de operación, la ausencia de emisiones tóxicas y la minimización o la completa eliminación de cualquier descarga de agua porque se reciclan todas las soluciones.

B. Biolixiviación en botaderos

Con esta tecnología se procesa lastre, minerales de baja ley de cobre (menor a 0,5 %), mineral recién extraído 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. Debido al gran tamaño de las partículas de mineral, el área de contacto entre microorganismo - mineral disminuye, y sumado a una baja aireación, pues no se instalan líneas de aire, la acción microbiana disminuye afectando la eficiencia del proceso.

Es por ello que la biolixiviación de cobre en los botaderos se mide en décadas, debido a la baja tecnología aquí aplicada. Sin embargo, por esto último es un método muy económico. Los minerales son lixiviados donde fueron colocados para su eliminación, y desde la base la solución de lixiviación es dirigida a los procesos de extracción con solvente y electroobtención para la posterior producción de cátodos de cobre. Al igual que la biolixiviación en pilas, el ácido también es refinado y recirculado a la parte superior del botadero.

C. Biolixiviación in situ

La biolixiviación in situ, trata el mineral en la mina, previa fractura de esta por tronadura permitiendo a la solución fluir libremente. 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. Por las implicancias ambientales que conlleva la utilización de soluciones acidas en un área de suelo no impermeabilizado, es que su aplicación es mínima.

1.5.5.2 Procesos basados en la agitación

A. Biolixiviación 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. 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. Es necesario inocular estos reactores con los microorganismos, para lograr la biolixiviación que opera en un proceso continuo (COCHILCO, 2009).

1.5.6 Mecanismos de oxidación bacteriana de minerales sulfurados

La lixiviación de metales es conocida principalmente como un proceso químico en el que el hierro férrico y los protones son responsables de llevar a cabo las reacciones de lixiviación. El papel de los microorganismos es generar los productos químicos de lixiviación y crear espacio en el que las reacciones de lixiviación tienen lugar. Los microorganismos típicamente forman una capa de exopolisacáridos (EPS) que se adhieren a la superficie de un mineral. Es dentro de esta capa de EPS que las reacciones de biooxidación se llevan a cabo más rápidamente y de manera eficiente y por lo tanto la EPS sirve como el espacio de reacción (Mishra, 2010).

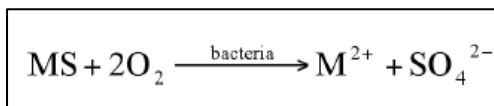
Es bien sabido que la base de biolixiviación de sulfuros minerales está constituida por la movilización de los constituyentes metálicos y que esta acción se realiza a través de la oxidación promovida por microorganismos. Dicha oxidación es realizada por las bacterias a través de dos mecanismos: Directo e indirecto (Acevedo, 2005; Cárdenas 2003).

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. Por otro lado, 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 (Rossi, 1990; Acevedo, 2005).

- **Mecanismo Directo:**

Las bacterias atacan el sulfuro metálico de forma directa, mediante su adherencia a la superficie mineral y la posterior oxidación enzimática de éste por transporte de electrones desde la parte reducida del mineral, generalmente un sulfuro, al oxígeno disuelto (Saavedra, 2009).

La reacción general sería:

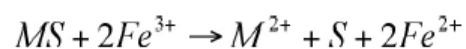


La adherencia de bacterias al mineral es, por lo tanto, un requisito del mecanismo directo y la principal evidencia presentada en defensa del mismo, esta teoría ha sido apoyada por diferentes estudios experimentales que confirman la

adhesión de las bacterias lixiviantes a la superficie de los minerales (Acevedo, 2005).

- **Mecanismo Indirecto:**

En contraste con el mecanismo directo, el indirecto considera básicamente la acción de iones férricos sobre el mineral sulfurado disolviéndolo, a través de esta reacción química de lixiviación, se producen iones ferrosos y azufre elemental. Finalmente, estas especies químicas son oxidadas biológicamente a hierro férrico e ión sulfato, respectivamente. Este mecanismo, en principio, no necesita la adherencia de las células al sulfuro mineral. Las ecuaciones que toman parte son las siguientes (Acevedo, 2005):



1.5.7 *Acidithiobacillus ferrooxidans* y otros microorganismos de biolixiviación

A través de los años se ha investigado acerca de la gran diversidad de los microorganismos involucrados en los procesos de biolixiviación, la mayor parte de ellos se caracterizan por ser aerobios estrictos, crecer quimilitotróficamente, ya que utilizan la oxidación de compuestos inorgánicos para generar todos sus componentes celulares, esta capacidad metabólica es la que se aprovecha para solubilizar el cobre y otros minerales (Suzuki, 1999; Rawling, 1998; Waiting, 2006).

Los microorganismos lixiviantes se desarrollan en ambientes ácidos con pH menor a 3, con alta concentración de iones metálicos, por presentarse como bacilos Gram negativos, aunque se ha descrito que algunos termófilos presentan tinción Gram positiva (Suzuki, 1999) y por ser capaces de utilizar el ión ferroso o los compuestos de azufre reducido como

fuelle de energía (Rawling, 1998; Waiting, 2006). Sin embargo también se pueden encontrar microorganismos heterotróficos cuyo trabajo consiste en eliminar del ambiente los compuestos orgánicos presentes producto de muerte celular o de desechos metabólicos de los microorganismos quimilitotróficos (Brietley, 2000).

Los microorganismos se clasifican según la temperatura a la que se desarrollan de forma óptima, encontrándose de esta manera, los mesófilos (temperaturas menores a 40°C), termófilos moderados (temperaturas entre los 40°C y 55°C) e hipertermófilos (temperaturas entre los 55°C y 85°C) (Brietley, 2000; Menadier, 2009). El uso de los termófilos extremos en biolixiviación de calcopirita está haciendo un movimiento revolucionario para poder ampliar el proceso.

Entre todos los microorganismos quimiolitotróficos destaca la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que fue aislada en 1957 de agua obtenida de filtraciones que presentaba una mina de carbón abandonada en Virginia Oeste, Estados Unidos (CIMM, 2005).

Dentro de las bacterias mesófilas se encuentran también *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Lestospirillum ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum*. En el rango de las termófilas aparecen *Acidithiobacillus caldus*, *Leptospirillum thermoferrooxidans* y las del género *Sulfolobus* entre otras (Rowerder, 2003).

Acidithiobacillus ferrooxidans (Kelly y Wood, 2000), antes llamado *Thiobacillus ferrooxidans* (Temple y Colmer, 1951), es una bacteria mesófila del género *Acidithiobacilli*, con forma de bacilo, gram negativa, no forman esporas y tienen dimensiones de 0,5 a 0,6 um de ancho y 1,0 a 2,0 um de largo con extremos redondeados. Normalmente se encuentra aislada o en pares y sólo ocasionalmente forman

cadenas cortas. Es móvil y posee un flagelo (Kelly y Wood, 2000), encontrándose usualmente en aguas ácidas de minas de carbón y fierro (Maruane, 2002).

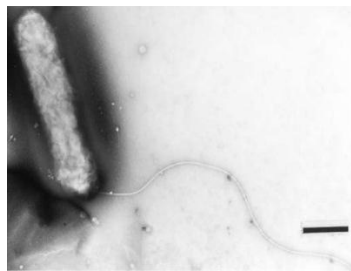


Figura 1. Observación de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en microscopio electrónico de transmisión, 500 nm

A. ferrooxidans se desarrolla en condiciones de temperatura entre 10 y 45 °C, encontrándose el óptimo entre 28 y 33°C dependiendo de la concentración total de fierro disuelto y el pH, Posee un pH óptimo de crecimiento entre 1,8 y 2,5 en la oxidación de sulfato ferroso.

La fuente de carbono de *A. ferrooxidans* para la síntesis celular es el dióxido de carbono. Además, requiere nitrógeno en forma de amonio, azufre en forma de sulfato o compuestos reducidos y fósforo en forma de fosfato, como nutrientes para el crecimiento celular y síntesis, junto con trazas de metales como: Fe, K, Mg, Na, Ca y Co (Meruane, 2002).

La energía para mantenimiento y crecimiento de *A. ferrooxidans* es obtenida a partir de la oxidación de compuestos reducidos de azufre y oxidación de ión ferroso. Además tiene capacidad para oxidar el ión ferroso en soluciones de ácido sulfúrico obteniendo la energía necesaria para el crecimiento y fijación de CO₂. *A. ferrooxidans* es útil principalmente para aplicaciones en la lixiviación de minerales debido a que esta bacteria puede oxidar sulfuros metálicos a sulfatos solubles en soluciones ácidas. La oxidación de materiales sulfurados es mediada por el ión férrico el cual en la reacción es reducido químicamente a Fe²⁺ y reoxidado por *A. ferrooxidans*. De esta forma durante el proceso

de biolixiviación, *A. ferrooxidans* mantiene favorable la razón $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (Grishin y Tuovinen, 1988).

A. ferrooxidans es útil principalmente para aplicaciones en la lixiviación de minerales debido a que esta bacteria puede oxidar sulfuros metálicos a sulfatos solubles en soluciones ácidas.

1.5.8 Factores que afectan 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, fuentes 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) y el ITGE (1991) son:

- **pH:** Los microorganismos son bacterias acidófilas, es decir crecen en medios ácidos, siendo incapaces de desarrollarse a un pH mayor de 3.0. El pH define qué especies de bacterias se desarrollarán en el medio.
- **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. El oxígeno es utilizado como oxidante por los microorganismos en ambientes de lixiviación. El dióxido de carbono es utilizado

como fuente de carbono para la fabricación de su arquitectura celular o generación de biomasa.

- **Nutrientes:** Como todos los seres vivos estos microorganismos requieren de fuentes nutricionales para su óptimo desarrollo, que pueden obtener del mismo mineral, como amonio, fosfato, azufre, iones metálicos (como Mg^+), etc. El magnesio, es necesario para la fijación de CO_2 y el fósforo es requerido para el metabolismo energético.
- **Fuente de Energía:** Los microorganismos utilizan como fuente primaria de energía el ion ferroso y el azufre inorgánico. En la lixiviación de mineral el ión ferroso (Fe^{+2}) 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 entre 40 - 55 °C, y las extremadamente termófilas sobre los 55°C. Si la temperatura del medio en que se encuentren 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 (miliVolt).
- **Tamaño de partícula:** a menor tamaño de la partícula de mineral, mayor es el área de

contacto que tiene el microorganismo, haciendo más efectiva la lixiviación.

1.5.9 Influencia de la concentración de metales en el proceso de bioxidación.

Algunos metales son necesarios para los seres vivos, tales como el magnesio, cobre, manganeso, hierro, zinc, y selenio, pero pueden llegar a ser tóxicos si rebasan ciertos límites de concentración en el organismo. Químicamente se entiende por metal pesado aquel cuya densidad es mayor de 5 g/cm^3 , pero la costumbre ha hecho que la connotación se emplee para aquellos que son tóxicos y que en realidad abarcan los grupos de transición y postransición (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, y Zn) al igual que el de los metaloides (As, Hg y Se) (Jiménez, 2001).

Los organismos vivos se encuentran expuestos en la naturaleza a los metales pesados, comúnmente presentes en sus formas ionizadas. Estos iones ejercen

diversos efectos tóxicos sobre los microorganismos. A la vez, la exposición a los metales selecciona y mantiene variantes microbianas capaces de tolerar sus efectos nocivos (Cervantes, 2008).

La resistencia de los microorganismos lixiviantes a los iones metálicos depende del grado de adaptación y del hábitat de las cepas silvestres. Sus mecanismos de resistencia se deben a los plásmidos que poseen, sin embargo es posible construir tolerancia creciente por subcultivos continuos, lo que determinaría la velocidad de reacción (Ly, 2009).

A. ferrooxidans, puede desarrollarse presentando tolerancia a altas concentraciones de metales pesados 0,4 g/L de cromo, 10 g/L de cobre, 10 g/L cadmio, 30 g/L de zinc y 30 g/L de níquel (Cabrera 2004).

1.5.10 Influencia de la concentración de metales en el crecimiento microbiano.

El estudio de los metales es de gran importancia en términos de contaminación ambiental debido a sus efectos tóxicos sobre los organismos vivos. Específicamente, las bacterias han sido objeto de numerosos estudios por su participación en los ciclos biogeoquímicos de los elementos esenciales para la vida (C, N, P y S), así como por su capacidad para transformar compuestos no esenciales, que eventualmente pueden representar una amenaza para el ambiente. Las interacciones entre las bacterias y los metales son conocidas y pueden ocurrir a nivel extracelular, en la superficie bacteriana o intracelularmente.

La toxicidad de los metales depende principalmente de tres factores: la concentración en que se encuentran, ya que muchos metales en cantidades traza se consideran necesarios para el

funcionamiento adecuado de los organismos pero al aumentar la concentración pueden llegar a ser tóxicos a los mismos; el tipo de especie que forman en un medio específico, ya que sólo ciertas especies de metales con determinadas cargas son tóxicas, es decir, presentan características físicas o químicas que los hace estar biodisponibles y la persistencia del contaminante, ya que los metales no pueden ser degradados o descompuestos únicamente se distribuyen en el entorno de distintas maneras (Kiely, 1999).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación y determinación del área de estudio

El mineral calcopirita fue muestreado en la planta de lixiviación de Toquepala, asiento minero operado por Southern Copper Corporation, ubicado en el Sur del Perú. De acuerdo a la división política del Perú, se encuentra en la Región Tacna, Provincia de Jorge Basadre, Distrito de Ilabaya. El área de estudio dentro de la mina, fueron los botaderos de lixiviación en los cuales se encuentra el mineral lixiviado.

2.2. Material biológico

Cultivo microbiano biolixivante nativo de los botaderos de lixiviación de Toquepala.

2.3. Operacionalización de Variables

TIPO DE VARIABLE	VARIABLE	INDICADOR	UNIDAD
Independiente	Concentración de cobre	5 Niveles de concentración	g/L
Dependiente	Bioxidación de hierro	Determinación de hierro por espectrofotometría	g/L
	Crecimiento microbiano	Recuento microscópico en cámara Neubauer	cel/ml

2.4. Población

Botaderos de mineral calcopirita de baja ley de Planta de Lixiviación de Toquepala

2.5. Muestra

25 kg de mineral calcopirita (5 kg por cada uno de los 5 botaderos de Lixiviación de Toquepala).

2.6. Muestreo y toma de muestra

2.6.1 Diseño muestral de mineral de baja ley en botaderos de lixiviación

Se realizó un levantamiento de información de la zona de estudio (Botaderos de Planta de lixiviación de Toquepala), en relación a la distribución del número de botaderos. Luego se seleccionaron 5 botaderos ubicados entre los 2980 y 3450 m.s.n.m. (anexo 01), los 4 primeros en actividad y el último inactivo, porque en ellos se evidenció mayor actividad microbiana (coloración anaranjado rojiza), cada uno de ellos fue una unidad poblacional en donde se determinó una unidad muestral por cada botadero. Las muestras fueron tomadas de forma dirigida considerando zonas con actividad microbiana donde se determinó un área estándar de 1 m², formando una unidad muestral final de 5 kg por botadero.

2.6.2 Toma de muestra de mineral calcopirita de baja ley en los botaderos de lixiviación de Toquepala

Dentro del área muestral se ubicó el área de mayor actividad microbiana (presencia de mineral oxidado de color anaranjado rojizo). Se excavó aproximadamente 30 cm con una lampa mediana limpia y se tomó cada muestra de mineral de 5 kg, en un balde de polietileno de 5 litros. La muestra tuvo un tamaño máximo de 20 cm para facilitar su transporte y procesamiento (Saavedra, 2009).

Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias para su procesamiento y estudio.

2.7. Tipo de investigación

El tipo de investigación fue experimental y aplicada.

Experimental porque consiste en la manipulación de una variable experimental, en condiciones controladas, con el fin de describir de qué modo se produce una situación o acontecimiento particular.

Aplicada porque consiste en un avance científico a través de la investigación básica, pero se caracteriza por su interés en la aplicación, utilización y consecuencias prácticas de los conocimientos. La investigación aplicada busca conocer para hacer, actuar, construir o modificar.

2.8. Diseño de investigación

La investigación tuvo un diseño experimental unifactorial, porque se trabajó con un factor (concentración de cobre) que se presentó en 05 niveles o tratamientos, con concentraciones de cobre: 0, 5, 10, 15 y 20 g/L; utilizando sulfato de cobre pentahidratado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; cada tratamiento tuvo 02 repeticiones experimentales y 01 repetición control.

Tabla 1. Sistema de tratamientos a diferentes concentraciones de cobre

CONCENTRACIÓN DE COBRE (g/L)	TRATAMIENTO	REPETICION	INOCULO MICROBIANO (ml)	MEDIO DE CULTIVO 9K (ml)
0	T.E.	R1	30	300
		R2	30	300
	T.C.	R1	0	330
5	T.E.	R1	30	300
		R2	30	300
	T.C.	R1	0	330
10	T.E.	R1	30	300
		R2	30	300
	T.C.	R1	0	330
15	T.E.	R1	30	300
		R2	30	300
	T.C.	R1	0	330
20	T.E.	R1	30	300
		R2	30	300
	T.C.	R1	0	330

Fuente: Elaboración propia.

2.9. Método

2.9.1 Pre – enriquecimiento de mineral lixiviado

Se tomó una muestra de 500 gramos aproximadamente de mineral lixiviado proveniente de cada botadero y fue sumergida en 3 litros de medio 9K líquido modificado (Silverman y Lundgren), a pH 1,8 (anexo 2), en un biorreactor utilizando un balde de polietileno de 5 litros de capacidad con tapa, con un sistema de aireación utilizando motores de aireación marca Rokasd modelo SB-348A y mangueras de silicona insuflando 1 vvm por biorreactor. No fue necesaria la esterilización, debido a que la acidez del medio inhibe el crecimiento de microorganismos contaminantes.

Cada muestra fue incubada durante 15 días a temperatura ambiente (25 °C) con aireación constante y agitación diaria.

2.9.2 Aislamiento de microorganismos biolixiviantes en medio sólido

Se preparó 200 ml de medio 9K sólido modificado (anexo 3), se vertió 16 ml del mismo en placas Petri, se dejó solidificar, luego se incorporó 0,1 ml del cultivo de enriquecimiento, realizando diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Se sembró con ayuda de un asa de Drigalsky por extensión, las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 15 días, tiempo en que aparecieron las colonias microbianas a las cuales se les caracterizó morfológicamente (anexo 4).

2.9.3 Obtención del inóculo

Se tomó volúmenes de 0,5 L de los cultivos de enriquecimiento donde se observó mayor grado de bioxidación de Fe en el menor tiempo de incubación e incremento de biomasa agregando en 3L medio 9K líquido, a pH 1,8, en 04 bioreactores, hechos de baldes de polietileno de 5 litros de capacidad que fueron

agitados diariamente por 15 minutos, aireados con motores de marca Rokasd modelo SB-348A y mangueras de silicona proporcionando 1 vvm de aireación. Se realizaron subcultivos sucesivos, cada 15 días con la finalidad de incrementar la capacidad biolixivante de las bacterias y que su crecimiento fuese cada vez más rápido. La observación de turbidez en cada balde fue el indicativo de la biomasa incrementada de inóculo.

2.9.4 Preparación de las soluciones de cobre

Para la preparación de las soluciones de cobre de 0, 5, 10, 15 y 20 g/L se pesó las siguientes cantidades de sulfato de cobre en una balanza analítica en el Laboratorio de Química Orgánica.

Tabla 2. Cantidad de sulfato de cobre en gramos para obtener las diferentes concentraciones de cobre en cada tratamiento.

CONCENTRACIÓN DE COBRE (g/L)	TRATAMIENTO	REPETICION	INOCULO MICROBIANO (ml)	MEDIO DE CULTIVO 9K (ml)	SULFATO DE COBRE (g)
0	T.E.	R1	30	300	0
		R2	30	300	0
	T.C.	R1	0	330	0
5	T.E.	R1	30	300	19,6456
		R2	30	300	19,6456
	T.C.	R1	0	330	19,6456
10	T.E.	R1	30	300	39,2913
		R2	30	300	39,2913
	T.C.	R1	0	330	39,2913
15	T.E.	R1	30	300	58,937
		R2	30	300	58,937
	T.C.	R1	0	330	58,937
20	T.E.	R1	30	300	78,5827
		R2	30	300	78,5827
	T.C.	R1	0	330	78,5827

2.9.5 Instalación de los biorreactores para la bioxidación de Fe

Se realizaron 05 tratamientos, cada uno con 02 repeticiones experimentales y 01 control.

Un tratamiento experimental contenía 300 ml de medio de cultivo 9K líquido, 30 ml de inóculo microbiano y la solución de cobre a una concentración específica. Un tratamiento control contenía 330 ml de medio de cultivo 9K líquido, 0 ml de inóculo microbiano y la solución de cobre a una concentración específica.

Se consideró un biorreactor por cada experimento, es decir, que se instaló 15 biorreactores tipo cilíndrico de polietileno transparente de 1 L de capacidad, con tapa desmontable, con 1 vvm de aireación bajo un sistema de motores eléctricos marca Rokasd modelo SB-348A y mangueras de silicona.

El biorreactor fue diseñado de modo que funcione asépticamente para evitar la aparición de contaminantes; las características del mismo debían permitir una mayor área de contacto entre las fases biótica y abiótica del sistema, es decir, que debió proporcionar un sistema adecuado de aireación para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos.

El biorreactor mantuvo las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo con ayuda del suministro de oxígeno a una velocidad tal que proporcionó a los microorganismos el consumo de oxígeno y nutrientes.

2.9.6 Evaluación del proceso de bioxidación de Fe

2.9.6.1 Determinación de Fe total y Fe III por espectrofotometría

La determinación se realizó mediante el método de Cabaña 2005 a las 0, 48, 96, 144, 192, 240, 288 y

336 horas (cada 48 horas, 15 días) desde el inicio hasta el término del proceso de biooxidación de Fe.

Se tomó 5 ml de muestra de medio fermentativo contenido en el biorreactor para la determinación de fierro total y fierro III, en viales con tapa, previamente rotulados y sellados. La determinación de se hizo considerando la preparación de la curva de calibración.

- Preparación de la curva de calibración

Para esta operación:

- ✓ Se preparó una solución madre de 0,2 g/L de Fe III. Se pesó 0,0488 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y se introdujo en una fiola de 50 ml de capacidad al cual se enrazó a 50 ml con agua destilada; a partir de la solución madre se preparó diluciones en tubos de ensayos de 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,12 y 0,14 g/L.

- ✓ De cada uno de los 5 tubos de ensayo se tomó 0,5 ml de cada dilución preparada a partir de la solución madre. En un sexto tubo se agregó 0,5 ml de agua destilada, este fue tomado como blanco. Luego a cada uno de los 6 tubos se le agregó 0,5 ml de H_2SO_4 3M, luego 1-2 gotas de $KMnO_4$ 0,1N, y finalmente 3 ml de KSCN 2M, para ser completados hasta 10 ml con agua destilada y proceder a la lectura en el espectrofotómetro a 477 nm de longitud de onda. El espectrofotómetro utilizado fue de la marca H.W. KESSEL modelo UNICO 1200.

- ✓ Las lecturas de las diluciones de la solución madre en el espectrofotómetro fueron llevadas al programa Microsoft Office Excel 2010, para establecer la curva de calibración dentro de un gráfico, en el eje X se colocó la concentración de hierro en g/L de los tubos evaluados y en el eje Y se colocó la lectura

de absorbancia de cada una de las concentraciones (Anexo 5).

- Preparación de las muestras

Cada una de las muestras colectadas en viales, fue diluida a 1/100. Se realizó diluciones agregando 1 ml de cada muestra en una fiola de 100 ml de capacidad, que fue enrazada con agua destilada. De esta manera las muestras estaban listas para ser procesadas.

- Determinación de Fe total en muestras:

En un tubo de ensayo, se colocó 0,5 ml de la muestra y se le adicionó 0,5 ml de H_2SO_4 3M, 1-2 gotas de $KMnO_4$ 0,1N y 3 ml de $KSCN$ 2M de manera similar a las diluciones de la solución madre, luego se enrazó a 10 ml con agua destilada y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 477 nm de longitud de onda.

- Determinación de Fe III en muestras:

En un tubo de ensayo, se colocó 0,5 ml de la muestra y se le agregó 0,5 ml de H₂SO₄ 3M y 3 ml de KSCN 2M, luego se enrazó a 10 ml con agua destilada y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 477 nm de longitud de onda.

- Determinación de Fe II en muestras:

Se realizó por diferencia de la concentración de Fe total con Fe III.

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

2.9.7 Determinación de la concentración de células

El crecimiento bacteriano fue evaluado a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312 y 336 horas (cada 24 horas durante 15 días), mediante el recuento microbiano en cámara Neubauer y observado en el microscopio óptico de campo claro. Se adicionó una cantidad de muestra que recubrió totalmente la cámara y se cuantificaron las bacterias en 5 campos de la cámara de Neubauer, el valor resultante y recalculado permitió obtener el número aproximado de bacterias por mililitro de cultivo.

$$\text{Número de células por mililitro} = (X_{400})(400)(10^4)$$

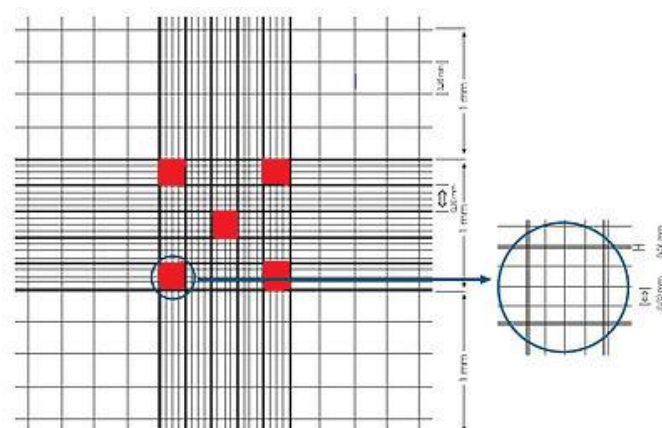


Figura 2.Esquema de cámara Neubauer

2.9.8 Procesamiento de datos

El registro de datos obtenidos fue llevado al programa MS Office Excel, donde fueron tabulados.

Se obtuvieron las siguientes determinaciones:

- ❖ Determinación de la curva de bioxidación de fierro en función del tiempo (Fe total, Fe II y Fe III vs tiempo).
- ❖ Determinación de la curva de crecimiento microbiano en función del tiempo (Concentración de células vs tiempo).
- ❖ Determinación de la curva de bioxidación de fierro en función de la concentración de cobre (Producción máxima de Fe III vs concentración de cobre).
- ❖ Determinación de la curva de crecimiento microbiano en función de la concentración de cobre (Producción máxima microbiana vs concentración de cobre).

- ❖ Determinación del grado de correlación entre la bioxidación de Fe III y el crecimiento microbiano en función de la concentración de cobre.

Además se realizó el análisis de varianza para determinar si hubo diferencia entre los tratamientos y prueba de Tukey para determinar el orden de los tratamientos.

III. RESULTADOS

3.1 Bioxidación de hierro en función del tiempo

Tabla 3. Concentración de hierro total, hierro II y hierro III (g/L) en el tratamiento 1, a una concentración de 0 g/L de cobre, registrada en el proceso de bioxidación de hierro durante 336 horas (15 días).

CONCENTRACIÓN DE FIERRO (g/L) EN EL TRATAMIENTO EXPERIMENTAL (0 g/L DE COBRE)			
Tiempo (Horas)	Fe Total	Fe II	Fe III
0	3,773566282	2,531832988	1,241733294
48	6,754515842	1,761918863	4,99259698
96	7,331951436	1,855690455	5,476260981
144	7,223373803	0,922909881	6,300463923
192	7,56884809	0,63172441	6,93712368
240	9,829236995	0,172737143	9,656499852
288	6,542295923	0,537952818	6,004343105
336	6,848287435	1,26344882	5,584838614

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

En la Tabla 3 se muestra que la concentración de Fe III (g/L), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 1 a una concentración de 0 g/L de cobre. El valor máximo de Fe III obtenido fue 9,656499852 g/L, registrado a las 240 horas.

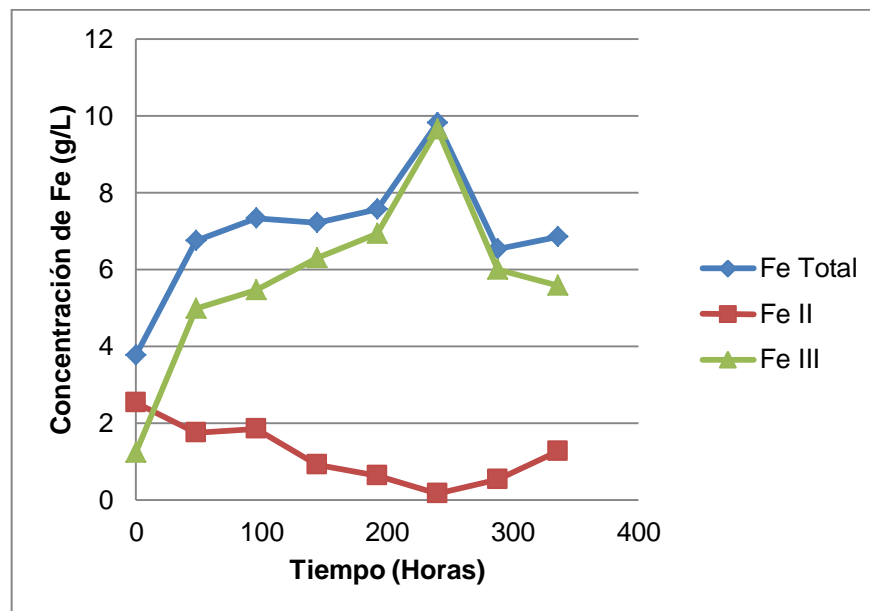


Gráfico 1. Concentración de fierro total, fierro II y fierro III (g/L) en el tratamiento 1 a una concentración de 0 g/L de cobre en función del tiempo, registrada en el proceso de bioxidación de fierro durante 336 horas (15 días).

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

En el Gráfico 1 se muestra que la concentración de Fe III (g/L), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 1 a una concentración de 0 g/L de cobre. El valor máximo de Fe III obtenido fue 9,656499852 g/L, registrado a las 240 horas.

Tabla 4. Concentración de fierro total, fierro II y fierro III (g/L) en el tratamiento 2, a una concentración de 5 g/L de cobre, registrada en el proceso de bioxidación de fierro durante 336 horas (15 días).

CONCENTRACIÓN DE FIERRO (g/L) EN EL TRATAMIENTO EXPERIMENTAL (5 g/L DE COBRE)			
Tiempo (Horas)	Fe Total	Fe II	Fe III
0	3,709406771	2,744052907	0,965353864
48	6,473201066	2,087651762	4,385549304
96	6,177080249	1,658276577	4,518803672
144	6,853222782	1,006810779	5,846412003
192	7,045701313	1,233836739	5,811864574
240	8,560852828	2,724311519	5,836541309
288	7,924193071	1,307866943	6,616326128
336	8,279538052	1,08577633	7,193761721

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

En la Tabla 4 se muestra que la concentración de Fe III (g/L), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 2 a una concentración de 5 g/L de cobre. El valor máximo de Fe III obtenido fue 7,193761721 g/L, registrado a las 336 horas.

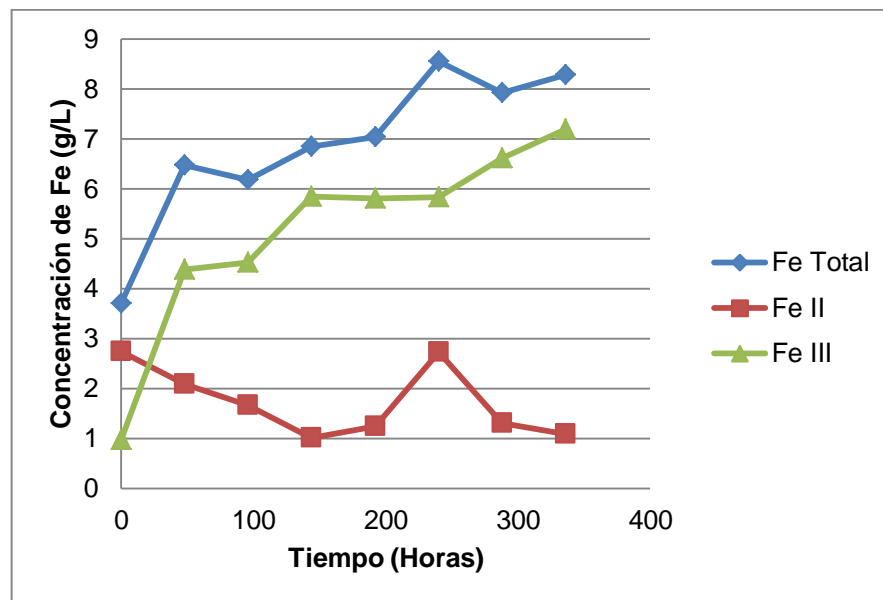


Gráfico 2. Concentración de hierro total, hierro II y hierro III (g/L) en el tratamiento 2 a una concentración de 5 g/L de cobre en función del tiempo, registrada en el proceso de bioxidación de hierro durante 336 horas (15 días).

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En el Gráfico 2 se muestra que la concentración de Fe III (g/L), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 2 a una concentración de 5 g/L de cobre. El valor máximo de Fe III obtenido fue 7,193761721 g/L, registrado a las 336 horas.

Tabla 5. Concentración de fierro total, fierro II y fierro III (g/L) en el tratamiento 3, a una concentración de 10 g/L de cobre, registrada en el proceso de bioxidación de fierro durante 336 horas (15 días).

CONCENTRACIÓN DE HIERRO (g/L) EN EL TRATAMIENTO EXPERIMENTAL (10 g/L DE COBRE)			
Tiempo (Horas)	Fe Total	Fe II	Fe III
0	2,357121706	0,577435594	1,779686112
48	6,478136413	1,510216168	4,967920245
96	6,290593229	2,023492252	4,267100977
144	7,558977396	3,316553154	4,242424242
192	6,581778699	2,349225151	4,232553549
240	7,825486132	1,579311026	6,246175106
288	7,124666864	0,784720166	6,339946698
336	7,667555029	1,584246373	6,083308657

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En la Tabla 5 se muestra que la concentración de Fe III (g/L), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 3 a una concentración de 10 g/L de cobre. El valor máximo de Fe III obtenido fue 6,339946698 g/L, registrado a las 288 horas.

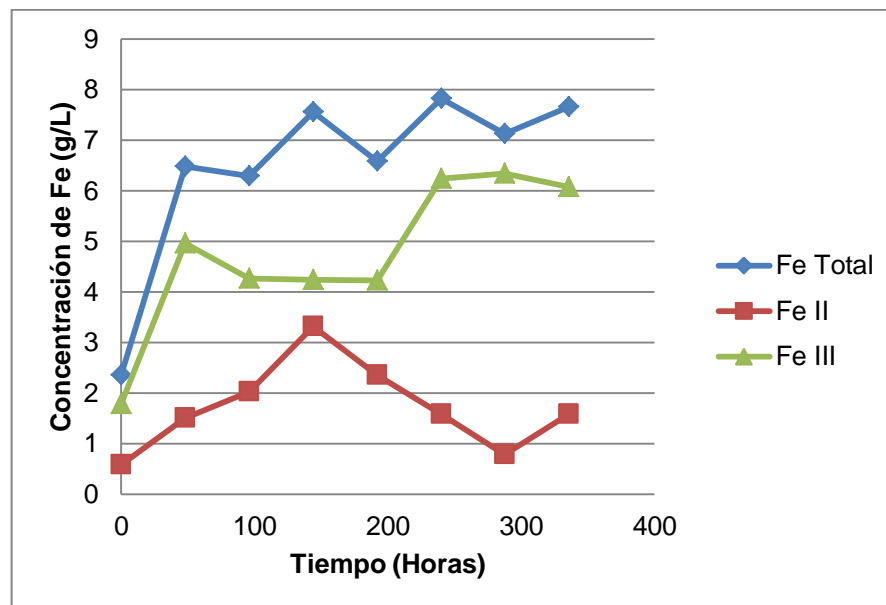


Gráfico 3. Concentración de hierro total, hierro II y fierro III (g/L) en el tratamiento 3 a una concentración de 10 g/L de cobre en función del tiempo, registrada en el proceso de bioxidación de hierro durante 336 horas (15 días).

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En el Gráfico 3 se muestra que la concentración de Fe III (g/L), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 3 a una concentración de 10 g/L de cobre. El valor máximo de Fe III obtenido fue 6,339946698 g/L, registrado a las 288 horas.

Tabla 6. Concentración de fierro total, fierro II y fierro III (g/L) en el tratamiento 4, a una concentración de 15 g/L de cobre, registrada en el proceso de bioxidación de fierro durante 336 horas (15 días).

CONCENTRACIÓN DE HIERRO (g/L) EN EL TRATAMIENTO EXPERIMENTAL (15 g/L DE COBRE)			
Tiempo (Horas)	Fe Total	Fe II	Fe III
0	3,541604975	0,148060409	3,393544566
48	6,448524331	0,557694206	5,890830125
96	6,601520087	2,097522456	4,503997631
144	5,412101471	1,668147271	3,7439542
192	5,071562531	0,942651268	4,128911262
240	7,213503109	1,924785312	5,288717797
288	7,6330076	1,801401639	5,831605962
336	7,021024578	0,957457309	6,063567269

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En la Tabla 6 se muestra que la concentración de Fe III (g/L), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 4 a una concentración de 15 g/L de cobre. El valor máximo de Fe III obtenido fue 6,063567269 g/L, registrado a las 336 horas.

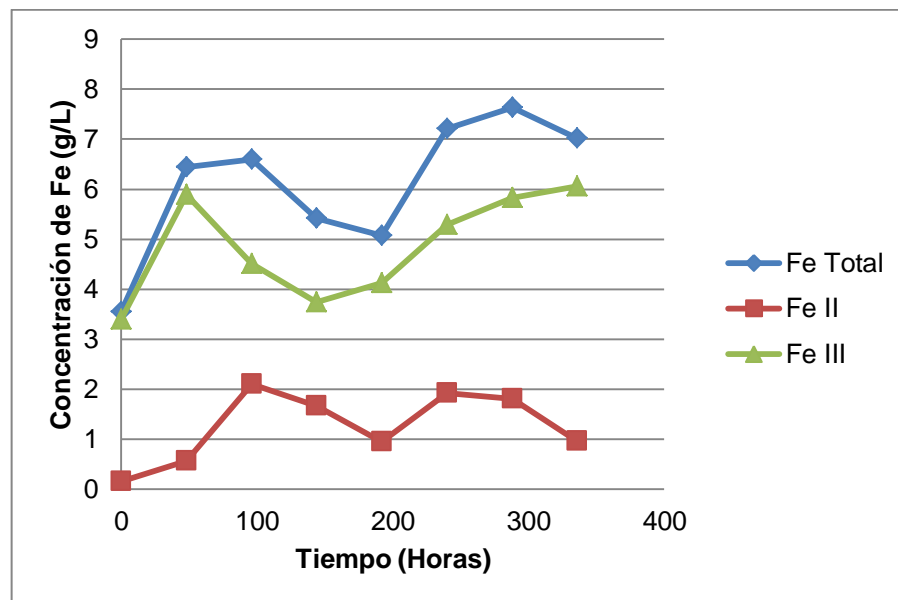


Gráfico 4. Concentración de hierro total, hierro II y hierro III (g/L) en el tratamiento 4 a una concentración de 15 g/L de cobre en función del tiempo, registrada en el proceso de bioxidación de hierro durante 336 horas (15 días).

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En el Gráfico 4 se muestra que la concentración de Fe III (g/L), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 4 a una concentración de 15 g/L de cobre. El valor máximo de Fe III obtenido fue 6,063567269 g/L, registrado a las 336 horas.

Tabla 7. Concentración de fierro total, fierro II y fierro III (g/L) en el tratamiento 5, a una concentración de 20 g/L de cobre, registrada en el proceso de bioxidación de fierro durante 336 horas (15 días).

CONCENTRACIÓN DE HIERRO (g/L) EN EL TRATAMIENTO EXPERIMENTAL (20 g/L DE COBRE)			
Tiempo (Horas)	Fe Total	Fe II	Fe III
0	4,429967427	0,537952818	3,892014609
48	6,581778699	0,458987267	6,122791432
96	7,415852334	0,651465798	6,764386536
144	7,272727273	1,337479025	5,935248248
192	6,532425229	0,819267595	5,713157635
240	8,432533807	1,905043925	6,527489883
288	5,431842859	0,128319021	5,303523838
336	6,557101964	1,643470536	4,913631428

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

En la Tabla 7 se muestra que la concentración de Fe III (g/L), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 5 a una concentración de 20 g/L de cobre. El valor máximo de Fe III obtenido fue 6,764386536 g/L, registrado a las 96 horas.

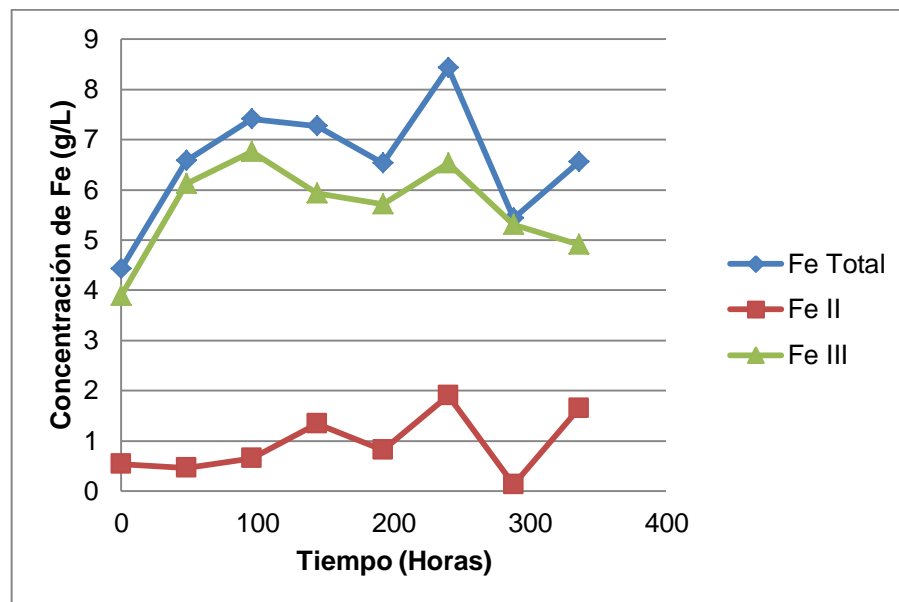


Gráfico 5. Concentración de hierro total, fierro II y fierro III (g/L) en el tratamiento 5 a una concentración de 20 g/L de cobre en función del tiempo, registrada en el proceso de bioxidación de hierro durante 336 horas (15 días).

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En el Gráfico 5 se muestra que la concentración de Fe III (g/L), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 5 a una concentración de 20 g/L de cobre. El valor máximo de Fe III obtenido fue 6,764386536 g/L, registrado a las 96 horas.

3.2 Crecimiento microbiano en función del tiempo

Tabla 8. Concentración de células microbianas (logaritmo de cel/ml) en el tratamiento 1 a una concentración de 0 g/L de cobre, registrada en el proceso de biooxidación de fierro durante 336 horas (15 días).

CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS EN EL TRATAMIENTO 1 (0 g/L DE COBRE)		
Tiempo (Horas)	Promedio (cel/ml)	Logaritmo de cel/ml
0	4 000 000	6,602059991
24	5 000 000	6,698970004
48	9 000 000	6,954242509
72	12 000 000	7,079181246
96	14 000 000	7,146128036
120	16 000 000	7,204119983
144	18 000 000	7,255272505
168	40 000 000	7,602059991
192	100 000 000	8
216	800 000 000	8,903089987
240	800 000 000	8,903089987
264	800 000 000	8,903089987
288	800 000 000	8,903089987
312	700 000 000	8,84509804
336	800 000 000	8,903089987

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En la Tabla 8 se muestra que la concentración de células microbianas (logaritmo de cel/ml), se incrementó en el proceso de bioxidación de fierro durante 336 horas, en el tratamiento 1 a una concentración de 0 g/L de cobre. El valor máximo de logaritmo de células microbianas por mililitro obtenido fue **8,903089987**; registrado a las 216 horas.

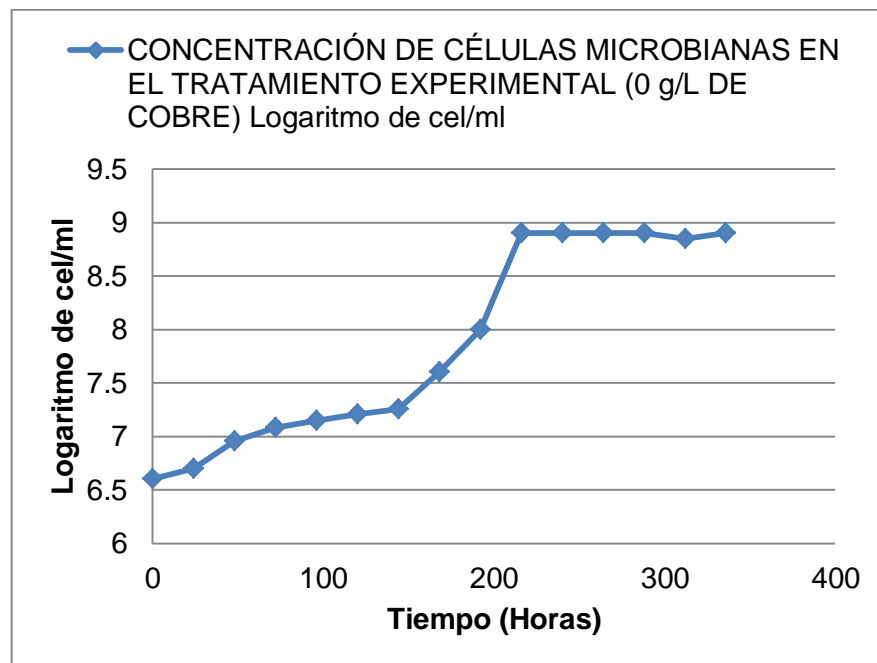


Gráfico 6. Curva de crecimiento microbiano (cel/ml) en el tratamiento 1 a una concentración de 0 g/L de cobre, en función del tiempo, registrada en el proceso de bioxidación de hierro durante 336 horas (15 días).

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

En el Gráfico 6 se muestra que la concentración microbiana (logaritmo de cel/ml), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 1 a una concentración de 0 g/L de cobre. El valor máximo de logaritmo

de células microbianas obtenido fue **8,903089987**; registrado a las 216 horas.

Tabla 9. Concentración de células microbianas (cel/ml) en el tratamiento 2 a una concentración de 5 g/L de cobre, registrada en el proceso de biooxidación de fierro durante 336 horas (15 días).

CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS EN EL TRATAMIENTO 2 (5 g/L DE COBRE)		
Tiempo (Horas)	Promedio (cel/ml)	Logaritmo de cel/ml
0	4 000 000	6,602059991
24	8 000 000	6,903089987
48	10 000 000	7
72	10 000 000	7
96	11 000 000	7,041392685
120	7 000 000	6,84509804
144	10 000 000	7
168	16 000 000	7,204119983
192	16 000 000	7,204119983
216	60 000 000	7,77815125
240	60 000 000	7,77815125
264	60 000 000	7,77815125
288	60 000 000	7,77815125
312	50 000 000	7,698970004
336	60 000 000	7,77815125

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En la Tabla 9 se muestra que la concentración de células microbianas (logaritmo de cel/ml), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 2 a una concentración de 5 g/L de cobre. El valor máximo obtenido de logaritmo de células microbianas por mililitro fue **7,77815125**, registrado a las 216 horas.

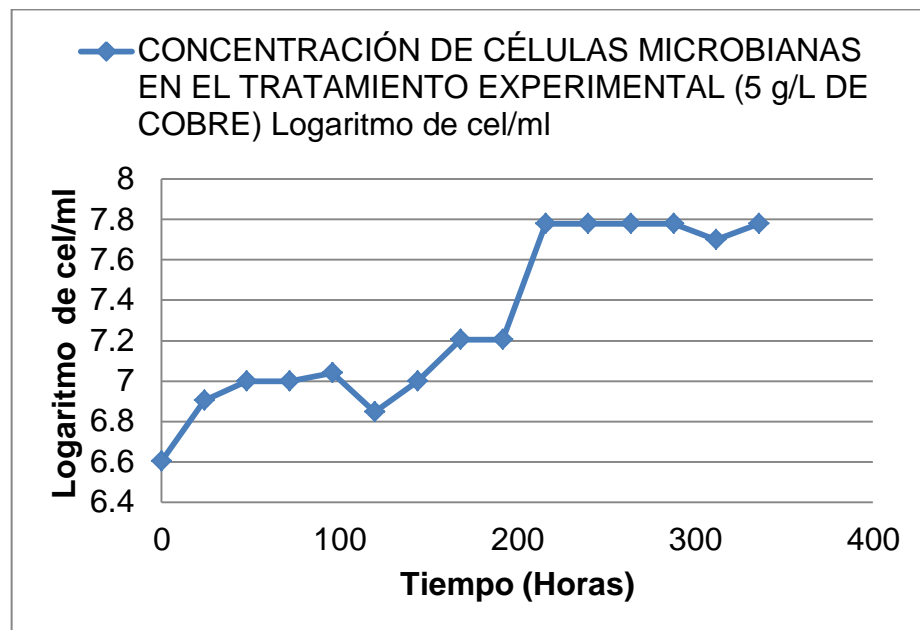


Gráfico 7. Curva de crecimiento microbiano (cel/ml) en el tratamiento 2 experimental a una concentración de 5 g/L de cobre, en función del tiempo, registrada en el proceso de bioxidación de hierro durante 336 horas (15 días).

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

En el Gráfico 7 se muestra que la concentración microbiana (logaritmo de cel/ml), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 2 a una

concentración de 5 g/L de cobre. El valor máximo obtenido de logaritmo de células microbianas fue 7,77815125; registrado a las 216 horas.

Tabla 10. Concentración de células microbianas (logaritmo de cel/ml) en el tratamiento 3 a una concentración de 10 g/L de cobre, registrada en el proceso de biooxidación de hierro durante 336 horas (15 días).

CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS EN EL TRATAMIENTO 3 (10 g/L DE COBRE)		
Tiempo (Horas)	Promedio (cel/ml)	Logaritmo de cel/ml
0	4 000 000	6,602059991
24	6 000 000	6,77815125
48	8 000 000	6,903089987
72	10 000 000	7
96	11 000 000	7,041392685
120	9 000 000	6,954242509
144	11 000 000	7,041392685
168	14 000 000	7,146128036
192	14 000 000	7,146128036
216	16 000 000	7,204119983
240	16 000 000	7,204119983
264	14 000 000	7,146128036
288	12 000 000	7,079181246
312	12 000 000	7,079181246
336	12 000 000	7,079181246

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En la Tabla 10 se muestra que la concentración de células microbianas (logaritmo de cel/ml), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 3 a una concentración de 10 g/L de cobre. El valor máximo obtenido de logaritmo de células microbianas por mililitro fue 7,204119983; registrado a las 216 horas.

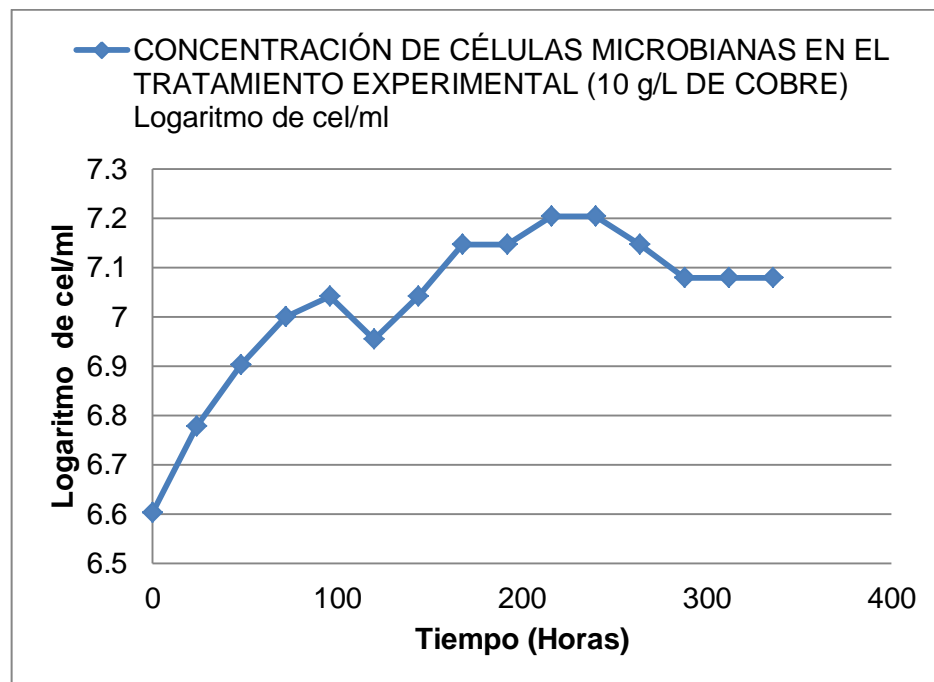


Gráfico 8. Curva de crecimiento microbiano (logaritmo de cel/ml) en el tratamiento 3 a una concentración de 10 g/L de cobre, en función del tiempo, registrada en el proceso de bioxidación de fierro durante 336 horas (15 días).

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En el Gráfico 8 se muestra que la concentración microbiana (logaritmo de cel/ml), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 3 a una

concentración de 10 g/L de cobre. El valor máximo obtenido de logaritmo de células microbianas por mililitro obtenido fue 7,204119983; registrado a las 216 horas.

Tabla 11. Concentración de células microbianas (logaritmo de cel/ml) en el tratamiento 4 a una concentración de 15 g/L de cobre, registrada en el proceso de biooxidación de Fierro durante 336 horas (15 días).

CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS EN EL TRATAMIENTO 4 (15 g/L DE COBRE)		
Tiempo (Horas)	Promedio (cel/ml)	Logaritmo de cel/ml
0	4 000 000	6,602059991
24	4 000 000	6,602059991
48	5 000 000	6,698970004
72	6 000 000	6,77815125
96	6 000 000	6,77815125
120	7 000 000	6,84509804
144	8 000 000	6,903089987
168	9 000 000	6,954242509
192	10 000 000	7
216	11 000 000	7,041392685
240	11 000 000	7,041392685
264	11 000 000	7,041392685
288	10 000 000	7
312	11 000 000	7,041392685
336	10 000 000	7

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En la Tabla 11 se muestra que la concentración de células microbianas (logaritmo de cel/ml), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 4 a una concentración de 15 g/L de cobre. El valor máximo obtenido de logaritmo de células microbianas por mililitro fue 7,041392685; registrado a las 216 horas.

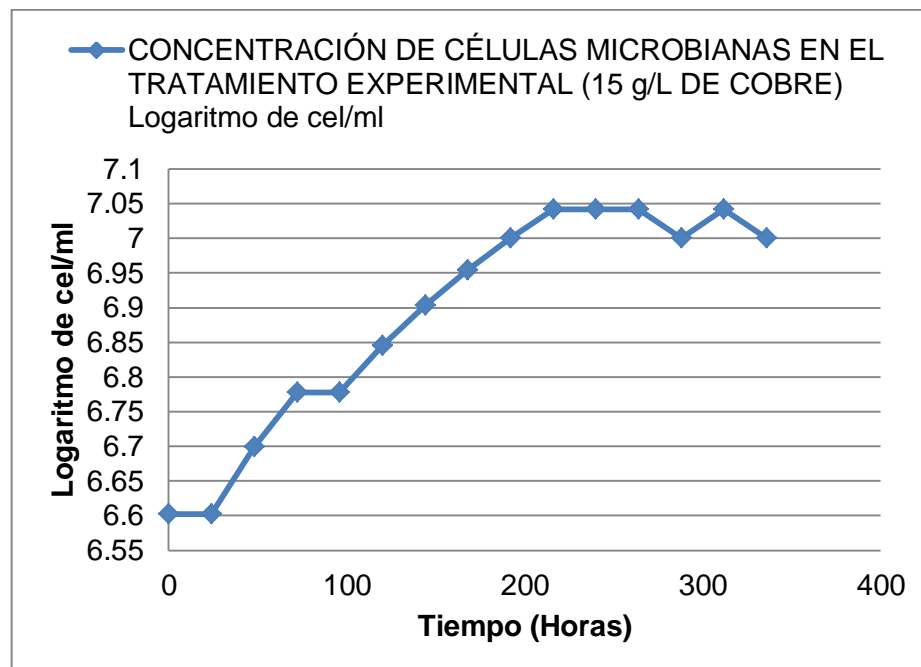


Gráfico 9. Curva de crecimiento microbiano (logaritmo de cel/ml) en el tratamiento 4 a una concentración de 15 g/L de cobre, en función del tiempo, registrada en el proceso de bioxidación de hierro durante 336 horas (15 días).

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En el Gráfico 9 se muestra que la concentración microbiana (logaritmo de cel/ml), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 4 a una concentración de 15 g/L de cobre. El valor máximo obtenido de

logaritmo de células microbianas por mililitro fue 7,041392685;
registrado a las 216 horas.

Tabla 12. Concentración de células microbianas (logaritmo de cel/ml) en el tratamiento 5 a una concentración de 20 g/L de cobre, registrada en el proceso de biooxidación de hierro durante 336 horas (15 días).

CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS EN EL TRATAMIENTO 5 (20 g/L DE COBRE)		
Tiempo (Horas)	Promedio (cel/ml)	Logaritmo de cel/ml
0	4 000 000	6,602059991
24	4 000 000	6,602059991
48	7 000 000	6,84509804
72	7 000 000	6,84509804
96	8 000 000	6,903089987
120	8 000 000	6,903089987
144	9 000 000	6,954242509
168	9 000 000	6,954242509
192	8 000 000	6,903089987
216	10 000 000	7
240	10 000 000	7
264	10 000 000	7
288	10 000 000	7
312	9 000 000	6,954242509
336	8 000 000	6,903089987

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En la Tabla 12 se muestra que la concentración de células microbianas (logaritmo de cel/ml), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 5 a una concentración de 20 g/L de Cobre. El valor máximo obtenido de logaritmo de células microbianas por mililitro fue 7; registrado a las 216 horas.

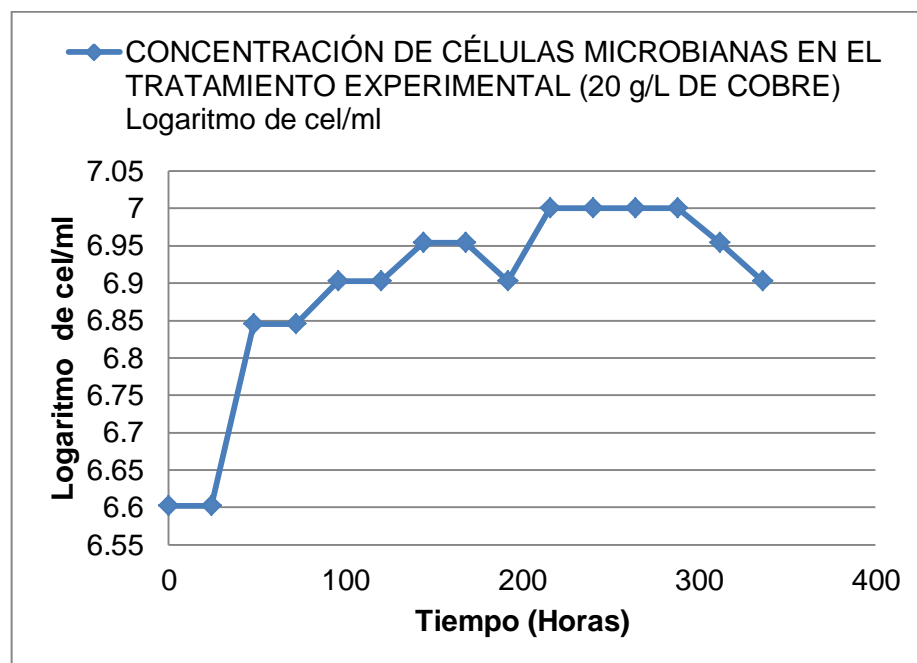


Gráfico 10. Curva de crecimiento microbiano (cel/ml) en el tratamiento 5 a una concentración de 20 g/L de cobre, en función del tiempo, registrada en el proceso de bioxidación de hierro durante 336 horas (15 días).

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En el Gráfico 10 se muestra que la concentración microbiana (logaritmo de cel/ml), se incrementó en el proceso de bioxidación de Fe durante 336 horas, en el tratamiento 5 a una concentración de 20 g/L de cobre. El valor máximo

obtenido de logaritmo de células microbianas fue 7; registrado a las 216 horas.

3.3 Bioxidación de fierro en función de la concentración de cobre

Tabla 13. Producción máxima de fierro III (g/L) en función de la concentración de cobre, registrada en el proceso de bioxidación de fierro a diferentes horas.

PRODUCCIÓN MÁXIMA DE FIERRO III OBTENIDAS EN EL PROCESO DE BIOXIDACIÓN DE FIERRO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COBRE		
Concentración de cobre (g/L)	Tiempo (Horas)	Producción máxima de fierro III (g/L)
0	240	9,656499852
5	336	7,193761721
10	288	6,339946698
15	336	6,063567269
20	96	6,764386536

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

En la Tabla 13 se muestra que la producción máxima de Fe III por tratamiento fue disminuyendo a medida que la

concentración de cobre se incrementó. La producción máxima de Fe III obtenida fue 9,65649985, en el tratamiento 1 a una concentración de 0 g/L de cobre

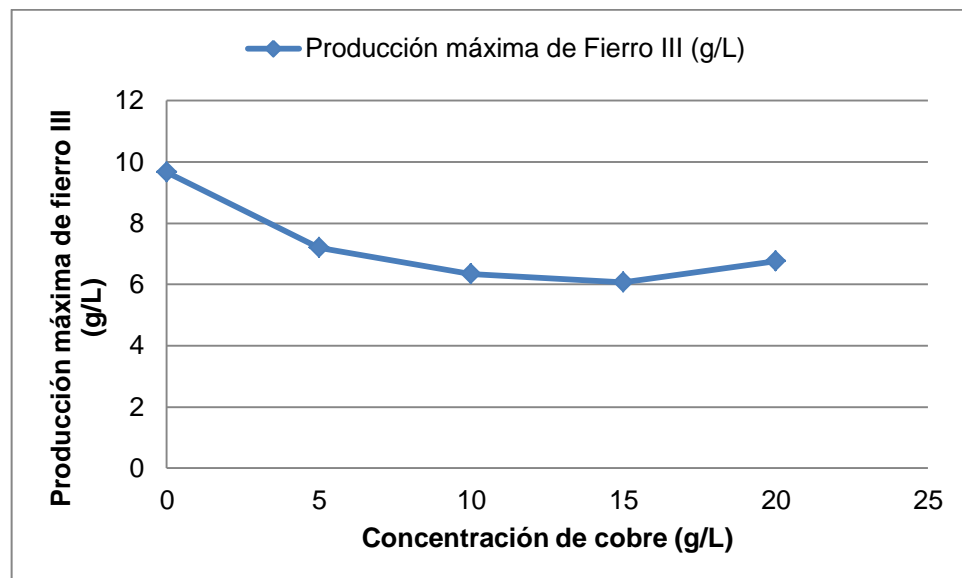


Gráfico 11. Producción máxima de Fe III (g/L) obtenida en función de la concentración de cobre, registrada en el proceso de bioxidación de fierro en 336 horas.

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

En el Gráfico 11 se muestra la curva de producción máxima de Fe III por cada tratamiento, esta curva fue disminuyendo a medida que la concentración de cobre se incrementó. La producción máxima de Fe III obtenida fue 9,65649985, en el tratamiento 1 a una concentración de 0 g/L de cobre.

3.4 Crecimiento microbiano en función de la concentración de cobre

Tabla 14. Producción máxima microbiana (Logaritmo de cel/ml) en función de la concentración de cobre, registrada en el proceso de bioxidación de hierro a las 216 horas.

PRODUCCIÓN MÁXIMA MICROBIANA OBTENIDA EN EL PROCESO DE BIOXIDACIÓN DE FIERRO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COBRE		
Concentración de cobre (g/L)	Tiempo (Horas)	Producción máxima microbiana (Logaritmo de cel/ml)
0	216	8,903089987
5	216	7,77815125
10	216	7,204119983
15	216	7,041392685
20	216	7

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En la Tabla 14 se muestra que la producción máxima microbiana por cada tratamiento, fue disminuyendo a medida que la concentración de cobre se incrementó. La producción

máxima microbiana fue 8,903089987, obtenida en el tratamiento 1, a una concentración de 0 g/L de cobre.

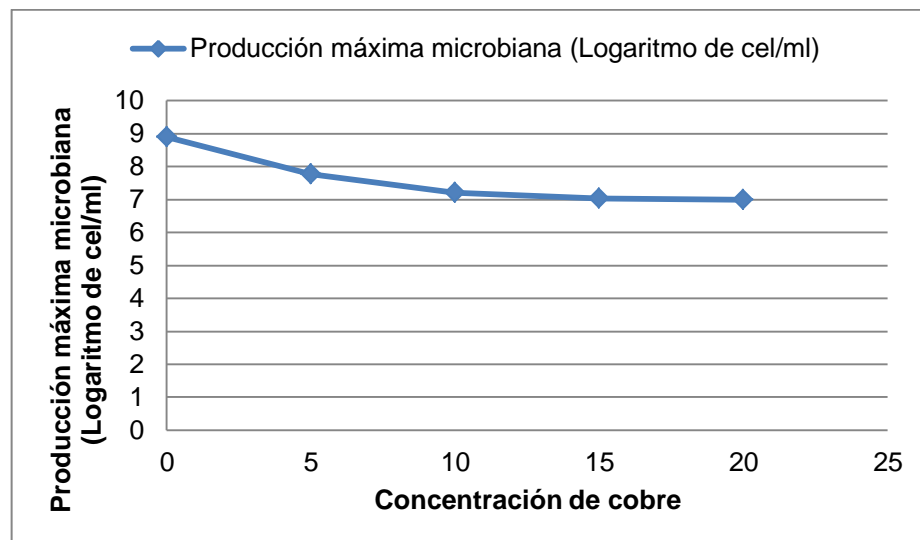


Gráfico 12. Producción máxima microbiana (Logaritmo de cel/ml) en función de la concentración de cobre, registrada en el proceso de bioxidación de fierro a las 216 horas.

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

En el Gráfico 12 se muestra la curva de producción máxima microbiana por cada tratamiento, que fue disminuyendo a medida que la concentración de cobre se incrementó. La producción máxima microbiana obtenida fue 8,903089987, en el tratamiento 1 a una concentración de 0 g/L de cobre.

3.5 Correlación entre la bioxidación de fierro y el crecimiento microbiano

Tabla 15. Grado de correlación entre la bioxidación de fierro y el crecimiento microbiano, obtenido en función de diferentes concentraciones de cobre.

Concentración de cobre (g/L)	Grado de correlación
0	0,910595214
5	0,736542303
10	0,839929828
15	0,696507583
20	0,889649073

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En la Tabla 15 se muestra el grado de correlación entre la bioxidación de Fe y el crecimiento microbiano obtenidos en función de la concentración de cobre. El mayor grado de correlación se obtuvo en el tratamiento 1, a 0 g/L de cobre.

Anexo 12

3.6 Pruebas estadísticas

3.6.1 Análisis de varianza en la bioxidación de hierro

Tabla 16. Análisis de varianza de un factor en función de la producción máxima de hierro III (ANOVA)

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	Razón F	Valor P	Valor crítico para F
Entre grupos	16,51058918	4	4,127647295	1,7099	0,2833	5,1922
Dentro de los grupos	12,06950765	5	2,41390153			
Total	28,58009683	9				

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

En la Tabla 16 se muestra que la razón F, es igual a 1,7099485 y es el cociente entre los cuadrados medios entre grupos y dentro de los grupos. Debido a que el valor P de la prueba F es mayor a 0,05; no existe una diferencia estadísticamente significativa en la bioxidación de hierro a

diferentes niveles de concentración de cobre, con un nivel de 95% de confianza. Es decir que estadísticamente la concentración de cobre no afecta a la bioxidación de fierro.

3.6.2 Análisis de varianza en el crecimiento microbiano

Tabla 17. Análisis de varianza de un factor en función de la producción máxima microbiana (ANOVA)

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	Razón F	Valor P	Valor crítico para F
Entre grupos	5,12084115	4	1,28021028	100,0971	5,861x 10 ⁻⁰⁵	5,1922
Dentro de los grupos	0,06394843	5	0,01278968			
Total	28,5800968	9				

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

En la Tabla 17 se muestra que la razón F, es igual a 100,0970855 y es el cociente entre los cuadrados medios entre grupos y dentro de los grupos. Debido a que el valor P de la prueba F es menor a 0,05; existe diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento microbiano a diferentes niveles de concentración de cobre, con un nivel de 95% de confianza. Es decir que la concentración de cobre afecta al crecimiento microbiano.

3.6.2.1 Prueba de Tukey en el crecimiento microbiano

Conclusión: Se puede afirmar que para un nivel de significancia de 5%, el tratamiento de 0 g/L de cobre difiere de todos los demás, el tratamiento de 5 g/L de cobre difiere de todos los demás, pero los demás tratamientos no presentan diferencia entre sí (Ver anexo 12).

Por lo tanto se establece el siguiente orden en los tratamientos:

Nivel 1	Tratamiento 0 g/L de cobre
Nivel 2	Tratamiento 5 g/L de cobre
Nivel 3	Tratamiento 10, 15 y 20 g/L de cobre

IV. DISCUSIÓN

Obtención de inóculo microbiano biolixivante

El mineral de baja ley, sumergido en medio de cultivo 9K (Silverman y Lundgren, 1958); mostró desde el inicio hasta el final de la fermentación un cambio de color de verde claro a anaranjado rojizo a los 8 días, lo que fue un indicativo de presencia de microorganismos que oxidan el ión ferroso a férrico (CODELCO, 2002) y que desarrollaron debido a los minerales presentes en el medio de cultivo. El medio líquido 9K modificado fue el ideal para el crecimiento de los microorganismos y su adaptación fue proporcional al número de cultivos sucesivos que se realizaron para la obtención de un inóculo en fase logarítmica (Arias, 2013).

Además se observó una disminución del pH debido a la producción de H_2SO_4 en el medio de cultivo (Cortéz, 2008), como producto de las reacciones químicas que son desencadenadas por las bacterias (Aguirre, 2005).

Las colonias caracterizadas macroscópicamente en medio de cultivo 9K sólido, fueron compatibles con las colonias *Acidithiobacillus ferrooxidans* que presentan forma circular, color anaranjado rojizo y brillo en el anverso y color marrón más oscuro en el reverso, la mayor parte de estos microorganismos crecieron aprovechando los compuestos inorgánicos presentes en el medio de cultivo, ya que son quimiolitautótrofos y a partir de estos minerales generaron sus componentes celulares para poder desarrollarse. Debido a esta capacidad de desarrollo, es que son capaces de llevar a cabo las reacciones de oxidación de hierro y solubilización de cobre (Suzuki, 1999; Rawling, 1998; Waiting, 2006).

Bioxidación de hierro

Los resultados en la oxidación de hierro en los 5 tratamientos mostraron que en los tratamientos experimentales hubo mayor concentración de ión férrico obtenido (9,6565 g/L), respecto a los tratamientos controles; que fue generado como producto de la reacción de oxidación (Valencia, 2010; Acevedo, 2005; Cárdenas 2003).

La alta concentración de fierro oxidado obtenida en los tratamientos experimentales se debió a la capacidad de los microorganismos biolixiviantes inoculados en los tratamientos experimentales, ya que son los responsables del proceso de oxidación de fierro, y por ende de llevar a cabo el proceso de biolixiviación (Mishra, 2010; Rossi, 1990).

Crecimiento microbiano

La mayor concentración microbiana fue 8×10^8 cel/ml a 0 g/L de cobre alcanzada a las 216 horas, esto posiblemente se debió a que en ese tiempo también se alcanzaron los máximos valores de ión férrico, que pudo ser inhibitorio para el incremento la población microbiana (Muñoz, 2003). Los microorganismos que desarrollaron en todos los tratamientos llegaron a la fase estacionaria alrededor de las 216 horas, manteniéndose los valores de concentración de células de forma constante después de este tiempo.

Según la bibliografía, los microorganismos lixiviantes pueden tolerar alrededor de 10 a 15 g/L de cobre (CODELCO, 2002; Cabrera, 2004), en este estudio se observó que hubo crecimiento bacteriano

aun a 20 g/L lo que reafirma que existen microorganismos capaces de tolerar los efectos nocivos de los metales pesados (Cervantes, 2008), debido a su alta capacidad de resistencia, al grado de adaptación al hábitat en el que han desarrollado por millones de años, a la vez es posible construir esta resistencia mediante cultivos sucesivos continuos (Ly, 2009).

La resistencia que presentan los microorganismos que han desarrollado en altas concentraciones de cobre también es determinada a nivel de especie (Kiely, 1999) ya que los factores genéticos influyen en gran medida, porque un metal que es tóxico para algunas especies puede no serlo para otras.

Grado de correlación entre bioxidación de fierro y crecimiento microbiano

Todos los resultados de fierro oxidado y crecimiento microbiano fueron correlacionados y se obtuvieron valores de coeficiente de correlación mayores a 0,6%. Es difícil comparar los valores del grado de correlación con los de otros trabajos de investigación realizados ya que este depende fundamentalmente del crecimiento de los

microorganismos nativos de Toquepala que por primera vez han sido aislados con la finalidad de ser utilizados en la biooxidación de Fierro a distintas concentraciones de cobre.

La mayor concentración microbiana fue 8×10^8 cel/ml y la mayor concentración de fierro oxidado fue 9,6565 g/L ambas obtenidas a 0 g/L de cobre. Ambos resultados tuvieron un factor $R=0,9106\%$ lo que significa que los procesos presentan relación uno respecto al otro, mientras uno se incrementa lo mismo ocurre con el otro, porque la reacción de oxidación del fierro permite la acumulación de biomasa bacteriana en minerales y soluciones (Valencia, 2010).

V. CONCLUSIONES

1. El incremento de la concentración de cobre causó la disminución de la concentración de Fierro oxidado, crecimiento celular de un cultivo microbiano y grado de correlación entre ambos procesos.
2. En los tratamientos de 0, 5, 10, 15 y 20 g/L de cobre, la concentración máxima de fierro oxidado fue 9,6565; 7,1938; 6,3399; 6,063 y 6,7644 g/L y la concentración máxima microbiana fue 8×10^8 ; 6×10^7 , $1,6 \times 10^7$; $1,1 \times 10^7$ y 1×10^7 cel/ml respectivamente.
3. La concentración máxima de fierro oxidado fue 9,6565 g/L y la concentración máxima microbiana fue 8×10^8 cel/ml, que se obtuvieron a las 240 y 216 horas respectivamente, ambos a 0 g/L de cobre.
4. El mayor grado de correlación entre la oxidación de Fierro y el crecimiento microbiano fue 0,910595214, obtenido en el tratamiento de 0 g/L de cobre.

VI. RECOMENDACIONES

Se sugiere lo siguiente:

1. Que cuando se trabaje con microorganismos biolixiviantes, se utilicen consorcios microbianos en lugar de una sola cepa, ya que cada proceso implicado en la biolixiviación puede ser acelerado por diferentes especies de microorganismos, así como el desarrollo de los mismos. Además, se realice la caracterización molecular de los consorcios microbianos que permitan diseñar medios de cultivo mixtos, que hagan más factible el proceso de biolixiviación.
2. Que la evaluación del crecimiento microbiano de microorganismos biolixiviantes se realice por recuento directo utilizando la cámara de Petroff Hauser en un microscopio de contraste de fases para mayor facilidad del investigador.
3. Que en investigaciones posteriores en el área, se logre disminuir la pasivación y formación de jarosita, que disminuye la eficacia de los microorganismos en la biooxidación de hierro.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Acevedo, F. & Gentina, J.** (2005). “Fundamentos y Perspectivas de las tecnología Biomineras” pag, 25-35. Edición universitaria de Valparaíso.
2. **Aguirre, P.** (2005). “La biominería aspira a proteger el ambiente y la rentabilidad” Revista perspectivas de investigación. Pag 6-7.
3. **Altimira, F.** (2010). “Efectos de la exposición a cobre en altas concentraciones sobre la diversidad de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas de la región de Valparaíso”.
4. **Arana, J.** (1997). “Evaluación de la lixiviabilidad del Cobre contenido en el Mineral Sulfurado de baja ley de la Mina Toquepala a nivel de Vasos agitados y columnas”.

5. **Arias, V.; Anaya, F.; Quiñones, J; Salazar, D.; Gil, J. & Jamanca, G.** (2013). “*Thiobacillus Ferrooxidans* Adaptation substrates formed with pyritic mineral species”.
6. **Ballester, A.** (2005). “Mecanismo de biolixiviación” EN: “Fundamentos y perspectivas de tecnologías biomineras”. Editado por Acevedo y Gentina J.C. 1º Edición Ediciones Universitarias de Valparaíso, Valparaíso 9-24.
7. **Brietley, J.** (2000). “2000 Wadsworth award lecture: Expanding role of microbiology in metallurgical processes” *Mining Engineering* 52: 49-53.
8. **Cabrera, G.; Gómez, J. & Cantero, D.** (2005). “Influence of heavy metals on growth and ferrous sulphate oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures”. *Process Biochemistry* 2683–2687.
9. **Cárdenas, J.; Guerrero, J. & Zárate, G.** (2003). “Mecanismos de oxidación bacterial de minerales sulfurados”.

- 10. Cervantes, C.; Espino, A.; Acevedo, F.; León, I.; Rivera, M.; Avila, M.; Wrobel, K.; Gutiérrez, J.; Rodríguez, J. & Moreno, M. (2008). "Interacciones microbianas con metales pesados".**
- 11. Chandra, S.; Srichandan, H.; Kim, D. & Akcil, A. (2012).**
"Biohydrometallurgy and Biomineral Processing Technology: A Review on its Past, Present and Future" Research Journal of Recent Sciences ISSN 2277-2502.
- 12. CIMM, Centro de Investigación Minera y Metalúrgica. (2005).**
"Biolixiviación: La nueva minería". Área de innovación y desarrollo estratégico.
- 13. COCHILCO, Comisión chilena del Cobre. (2009).**
"Biolixiviación, desarrollo actual y expectativas".
- 14. CODELCO. (2002). Alianza Codelco-BHP Billiton**
"Biolixiviación de cobre".

- 15. Colmer, A. & Hincle, M.** (1947). "The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report". *Science* 106: 253-256, 1947.
- 16. Cortéz, E.** (2008). "Lixiviación de minerales sulfurados de cobre". Tacna – Perú.
- 17. De Vicente, A.; Olea, F.; Codina, J. C.; Arrebola, E.; Cazorla, F.M. & Pérez – García, A.** (2001). "Resistencia bacteriana a metales y toxicidad como bioindicadores de la restauración de los suelos contaminados". Málaga, España.
- 18. Delgado, F.** (2001). "Aislamiento de *Thiobacillus* sp. e influencia de cuatro fuentes nitrogenadas en la producción de su biomasa y en la oxidación del ión ferroso".
- 19. Grishin, S & Tuovinen, O.** (1988). "Microbiological Oxidation of Ferrous Iron at Low Temperatures".

- 20. Hurtado, J.** (1997). “Biotecnologías aplicadas al drenaje ácido. Primer Simposium Nacional de Medio Ambiente y Seguridad Minera”.
- 21. INCONTEC Instituto Colombiano de Normas Técnicas.** (1978). “Norma: Agua potable: Determinación de hierro”.
- 22. Jiménez, A.; Loera, O. & Fernández, L.** (2001). “Aislamiento de microorganismos termófilos con capacidad de degradar hidrocarburos”.
- 23. Kelly D. & Wood, A.** (2000). “Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 511–516.
- 24. Kiely, G.** (1999). “Ingeniería ambiental, fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión”. Mc Graw Hill.

- 25. Ly, M.** (2009), “Perspectivas de la biominería en el Perú. Conferencia nacional de Biotecnología”.
- 26. Marrero, J.; Díaz, A.; & Colo, O.** (2010). “Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación”. pp. 67-78.
- 27. Maruane, G.** (2002). “Oxidación bacteriana de sulfato ferroso con *Acidithiobacillus ferrooxidans*”.
- 28. Mishra, D. & Rhee, Y.** (2010). “Current Research Trends of Microbiological Leaching for Metal Recovery from Industrial Wastes”.
- 29. Moraga, R.; Merino, C. & Mondaca, M.** (2003). “Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique”. pp. 91-95.
- 30. Muñoz, A.; Márquez, M.; Montoya, O.; Ruiz, O. & Lemehsko, V.** (2003). “Evaluación de oxidación bacteriana de sulfuros con *Acidithiobacillus ferrooxidans* mediante pruebas

de FTIR y difracción de rayos X” Revista Colombiana de Biotecnología, vol. V, núm. 1, pp. 73-81.

- 31. Navarro, C.** (2010). “Caracterización de los determinantes de resistencia a cobre de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270”.
- 32. Petersen, J. & Dixon, D.** (2006). “Competitive bioleaching of pyrite and chalcopyrite”. *Hydrometallurgy* 83: 40-49.
- 33. Pradhan, N.; Nathsarma, K.; Srinivasarao, K.; Sukla, L. & Mishra, B.** (2008). “Heap Bioleaching of chalcopyrite: a review”. 21: 355-365.
- 34. Rabe, E.** (2005). “Biominería: A favor nuestro y del medio ambiente”.
- 35. Rawling, D.** (1998). “Industrial practice and the biology of leaching of metals from ores. The 1997 Pan labs lecture”. *Journal of Industrial Microbiology and Biotecnology* 20: 268-274.

- 36. Rivera-Santillán, R.; Ballester, A.; Blázquez, M. & González F.** (2000). "Lixiviación microbiológica de un concentrado de Calcopirita a 35° y 68°C".
- 37. Rossi, G.** (1990). "Biohidrometallurgy". McGraw-Hill Book Co GmbH, Hamburg, pp. 99-100.
- 38. Ruíz, H.; Rodríguez, R.; Rodríguez, J.; Contreras, J. & Aguilar, C.** (2007). "Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido". pp. 33-40. México.
- 39. Saavedra, A.** (2009). "Solubilización del Zinc a partir del mineral esfarelita del yacimiento minero Maria Grimanesa por lixiviación microbiana con cepas nativas".
- 40. Silverman, M. & Lundgren** (1958). "Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferroxidans*". 77, 642-647.
- 41. Suárez, P. & Reyes, R.** (2002). "La incorporación de metales pesados en las baterías y su importancia para el ambiente".

- 42. Suzuki, I.; Lee, D.; MacKay, B; Harahuc, L. & Key Oh, J.** (1999). "Effect of Various Ions, pH and Osmotic Pressure on Oxidation of Elemental Sulfur by Thiobacillus thiooxidans". Applied and environmental microbiology. 199: 5163 – 5168.
- 43. Valencia, J.** (2010). "Biohidrometalurgia: Procesos microbiológicos en la biohidrometalurgia y la importancia de las bacterias".
- 44. Vullo, D.** (2003). "Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente". pp. 103 – 104.
- 45. Watling H.** (2006). "The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – A review" Hydrometallurgy 84: 81 - 108

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Botaderos de lixiviación donde se realizó la toma de muestra

BOTADERO	ALTITUD m.s.n.m.	TEMPERATURA	ACTIVIDAD
1	3270	55 ° C	SI
2	3250	23 ° C	SI
3	2980	43 ° C	SI
4	3280	38 ° C	SI
5	3450	27 ° C	NO

Anexo 2. Composición del Medio 9K líquido modificado (Silverman y Lundgren, 1958).

K_2HPO_4	0,50 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50 g/l
$(NH_4)SO_4$	3,00 g/l
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	33,00 g/l
Agua destilada	1000 ml

Se ajustó el pH a 1,8 con H_2SO_4 10 N

Anexo 3. Preparación de medio de cultivo 9K sólido (150 ml).

Solución 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	
Solución C = 1,5 ml	
Reactivo	Cantidad
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,3 g
H ₂ O destilada	1,5 ml
Ajustar pH con H ₂ SO ₄ (10N). No se autoclava	
Solución D = 1,5 ml	
Reactivo	Cantidad
NaSO ₃ 5H ₂ O	0,3g
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



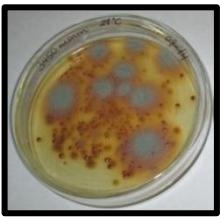








Plaquear la solución resultante en placas Petri.



Realizar la siembra por diseminación y e incubar por 15 días.

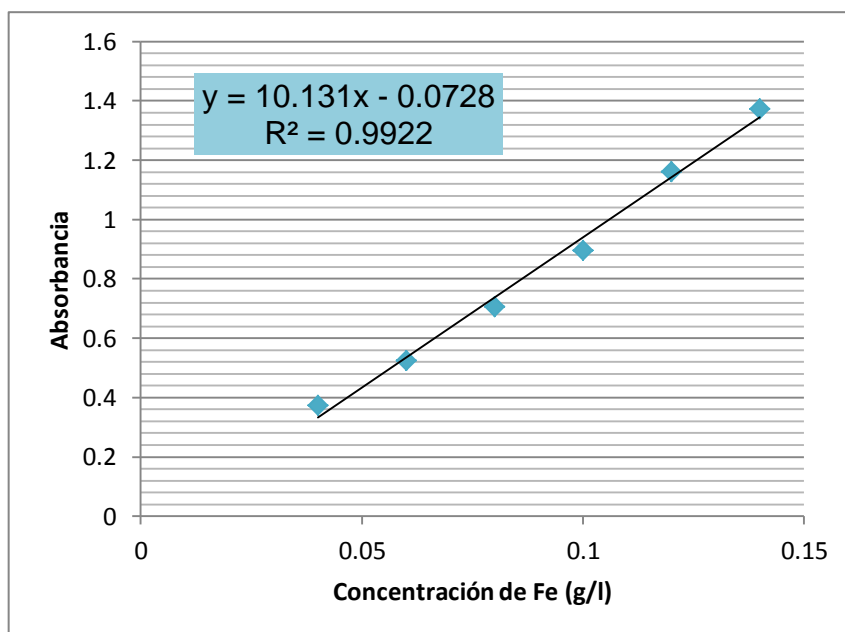
Anexo 4. Caracterización de microorganismos aislados en medio sólido.

Nº PLACA	Nº COLONIA	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	AISLAMIENTO EN VIALES
<p>A1</p> 	01	<p>Micelio de crecimiento plano circular</p> <p>Anverso: Color plomo Reverso: Color anaranjado – marrón</p>	
<p>B1</p> 	02	<p>Micelio de crecimiento plano circular</p> <p>Anverso: Color plomo Reverso: Color anaranjado – marrón</p>	
	03	<p>Colonia pequeña de color marrón con brillo metálico.</p>	

	04	<p>Colonia pequeña</p> <p>Anverso: Color marrón oscuro Reverso: Color ladrillo</p>	
A2	05	<p>Micelio de crecimiento plano circular</p> <p>Anverso: Color plomo Reverso: color anaranjado marrón</p>	
C2	06	<p>Micelio de crecimiento plano circular</p> <p>Anverso: Color plomo Reverso: Color anaranjado marrón</p>	
D1	07	<p>Colonia redonda pequeña</p> <p>Anverso: Color mostaza verdoso Reverso: Color marrón</p>	

Anexo 5. Curva de calibración para determinación de Fierro total, Fierro II y Ferro III (Cabaña, 2005).

	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 6. Registro de absorbancia y concentración de hierro (g/L) en el tratamiento 1 a una concentración de 0 g/L de cobre obtenido durante 336 horas (15 días) en el proceso de biooxidación de Fe.

TIEMPO (HORAS)	TRATAMIENTO	REPETICIÓN	Fe TOTAL			Fe 3+		
			ABS	CONCENTRACIÓN (g/l)	PROMEDIO DE ABS	ABS	CONCENTRACIÓN (g/l)	PROMEDIO DE ABS
0	T.E.	R1	0,283	3,511992893	0,3095	0,056	1,271345376	0,053
		R2	0,336	4,03513967		0,05	1,212121212	
	TC.	R1	0,298	3,660053302	0,298	0,046	1,172638436	0,046
48	T.E.	R1	0,598	6,621261475	0,6115	0,536	6,009278452	0,433
		R2	0,625	6,88777021		0,33	3,975915507	
	TC.	R1	0,476	5,417036818	0,476	0,175	2,445957951	0,175
96	T.E.	R1	0,649	7,124666864	0,67	0,48	5,456519593	0,482
		R2	0,691	7,539236008		0,484	5,496002369	
	TC.	R1	0,529	5,940183595	0,529	0,413	4,795183101	0,413
144	T.E.	R1	0,67	7,331951436	0,659	0,603	6,670614944	0,5655
		R2	0,648	7,11479617		0,528	5,930312901	
	TC.	R1	0,537	6,019149146	0,537	0,43	4,962984898	0,43
192	T.E.	R1	0,7	7,628072253	0,694	0,529	5,940183595	0,63
		R2	0,688	7,509623927		0,731	7,934063765	
	TC.	R1	0,546	6,107985391	0,273	0,415	4,814924489	0,112
240	T.E.	R1	1,427	14,80406673	0,923	1,116	11,73428092	0,9055
		R2	0,419	4,854407265		0,695	7,578718784	
	TC.	R1	0,571	6,354752739	0,774	0,468	5,338071266	0,874
288	T.E.	R1	0,557	6,216563024	0,59	0,5	5,653933472	0,5355
		R2	0,623	6,868028822		0,571	6,354752739	
	TC.	R1	0,54	6,048761228	0,54	0,452	5,180140164	0,452
336	T.E.	R1	0,567	6,315269963	0,621	0,448	5,140657388	0,493
		R2	0,675	7,381304906		0,538	6,02901984	
	TC.	R1	0,572	6,364623433	0,572	0,427	4,933372816	0,427

Anexo 7. Registro de absorbancia y concentración de hierro (g/L) en el tratamiento 2 a una concentración de 5 g/L de cobre obtenido durante 336 horas (15 días) en el proceso de biooxidación de Fe.

TIEMPO (HORAS)	TRATAMIENTO	REPETICIÓN	Fe TOTAL			Fe 3+		
			ABS	CONCENTRACIÓN (g/l)	PROMEDIO DE ABS	ABS	CONCENTRACIÓN (g/l)	PROMEDIO DE ABS
0	TE.	R1	0,283	3,511992893	0,303	0,047	1,18250913	0,025
		R2	0,323	3,906820649		0,003	0,748198598	
	TC.	R1	0,28	3,482380811	0,28	0,114	1,843845622	0,114
48	TE.	R1	0,598	6,621261475	0,583	0,413	4,795183101	0,3715
		R2	0,568	6,325140657		0,33	3,975915507	
	TC.	R1	0,583	6,473201066	0,583	0,341	4,08449314	0,341
96	TE.	R1	0,649	7,124666864	0,553	0,286	3,541604975	0,385
		R2	0,457	5,229493633		0,484	5,496002369	
	TC.	R1	0,493	5,584838614	0,493	0,303	3,709406771	0,303
144	TE.	R1	0,67	7,331951436	0,6215	0,603	6,670614944	0,5195
		R2	0,573	6,374494127		0,436	5,022209061	
	TC.	R1	0,648	7,11479617	0,648	0,35	4,173329385	0,35
192	TE.	R1	0,7	7,628072253	0,641	0,56	6,246175106	0,516
		R2	0,582	6,463330372		0,472	5,377554042	
	TC.	R1	0,61	6,739709802	0,61	0,313	3,80811371	0,313
240	TE.	R1	0,782	8,437469154	0,7945	0,511	5,762511105	0,5185
		R2	0,807	8,684236502		0,526	5,910571513	
	TC.	R1	0,677	7,401046294	0,677	0,485	5,505873063	0,485
288	TE.	R1	0,837	8,980357319	0,73	0,624	6,877899516	0,5975
		R2	0,623	6,868028822		0,571	6,354752739	
	TC.	R1	0,485	5,505873063	0,485	0,263	3,314579015	0,263
336	TE.	R1	0,857	9,177771197	0,766	0,774	8,358503603	0,656
		R2	0,675	7,381304906		0,538	6,02901984	
	TC.	R1	0,582	6,463330372	0,582	0,351	4,183200079	0,351

Anexo 8. Registro de absorbancia y concentración de hierro (g/L) en el tratamiento 3 a una concentración de 10 g/L de cobre obtenido durante 336 horas (15 días) en el proceso de biooxidación de Fe.

TIEMPO (HORAS)	TRATAMIENTO	REPETICIÓN	Fe TOTAL			Fe 3+		
			ABS	CONCENTRACIÓN (g/l)	PROMEDIO DE ABS	ABS	CONCENTRACIÓN (g/l)	PROMEDIO DE ABS
0	T.E.	R1	0,156	2,258414767	0,166	0,147	2,169578521	0,1075
		R2	0,176	2,455828645		0,068	1,389793702	
	TC.	R1	0,28	3,482380811	0,293	0,114	1,843845622	0,226
48	T.E.	R1	0,598	6,621261475	0,5835	0,413	4,795183101	0,4305
		R2	0,569	6,335011351		0,448	5,140657388	
	TC.	R1	0,583	6,473201066	0,615	0,341	4,08449314	0,304
96	T.E.	R1	0,649	7,124666864	0,5645	0,235	3,038199585	0,3595
		R2	0,48	5,456519593		0,484	5,496002369	
	TC.	R1	0,493	5,584838614	0,55	0,303	3,709406771	0,331
144	T.E.	R1	0,67	7,331951436	0,693	0,278	3,462639424	0,357
		R2	0,716	7,786003356		0,436	5,022209061	
	TC.	R1	0,648	7,11479617	0,587	0,35	4,173329385	0,472
192	T.E.	R1	0,7	7,628072253	0,594	0,24	3,087553055	0,356
		R2	0,488	5,535485145		0,472	5,377554042	
	TC.	R1	0,61	6,739709802	0,538	0,313	3,80811371	0,285
240	T.E.	R1	0,782	8,437469154	0,72	0,511	5,762511105	0,56
		R2	0,678	7,410916987		0,609	6,729839108	
	TC.	R1	0,677	7,401046294	0,7	0,485	5,505873063	0,54
288	T.E.	R1	0,615	6,789063271	0,49	0,624	6,877899516	0,5695
		R2	0,365	4,321389794		0,515	5,80199388	
	TC.	R1	0,485	5,505873063	0,428	0,263	3,314579015	0,249
336	T.E.	R1	0,857	9,177771197	0,704	0,549	6,137597473	0,5435
		R2	0,551	6,157338861		0,538	6,02901984	
	TC.	R1	0,582	6,463330372	0,623	0,351	4,183200079	0,446

Anexo 9. Registro de absorbancia y concentración de hierro (g/L) en el tratamiento 4 a una concentración de 15 g/L de cobre obtenido durante 336 horas (15 días) en el proceso de biooxidación de Fe.

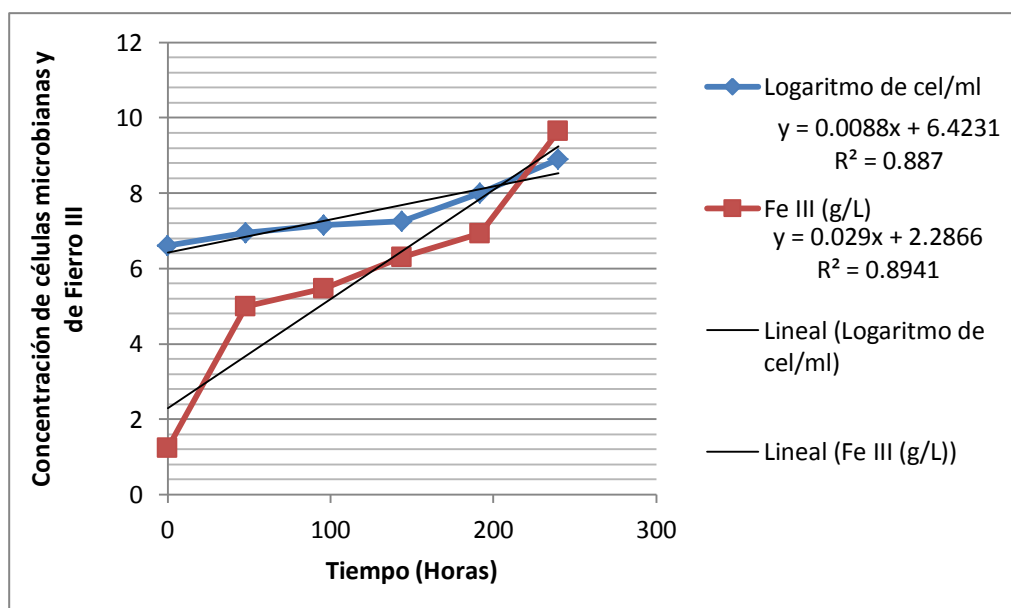
TIEMPO (HORAS)	TRATAMIENTO	REPETICIÓN	Fe TOTAL			Fe 3+		
			ABS	CONCENTRACIÓN (g/l)	PROMEDIO DE ABS	ABS	CONCENTRACIÓN (g/l)	PROMEDIO DE ABS
0	T.E.	R1	0,318	3,85746718	0,286	0,257	3,255354851	0,271
		R2	0,254	3,22574277		0,285	3,531734281	
	TC.	R1	0,257	3,255354851	0,257	0,219	2,880268483	0,219
48	T.E.	R1	0,524	5,890830125	0,5805	0,478	5,436778206	0,524
		R2	0,637	7,006218537		0,57	6,344882045	
	TC.	R1	0,458	5,239364327	0,458	0,332	3,995656895	0,332
96	T.E.	R1	0,668	7,312210048	0,596	0,383	4,499062284	0,3835
		R2	0,524	5,890830125		0,384	4,508932978	
	TC.	R1	0,44	5,061691837	0,44	0,092	1,626690356	0,092
144	T.E.	R1	0,458	5,239364327	0,4755	0,323	3,906820649	0,3065
		R2	0,493	5,584838614		0,29	3,58108775	
	TC.	R1	0,34	4,074622446	0,34	0,257	3,255354851	0,257
192	T.E.	R1	0,211	2,801302932	0,441	0,107	1,774750765	0,3455
		R2	0,671	7,34182213		0,584	6,48307176	
	TC.	R1	0,475	5,407166124	0,475	0,427	4,933372816	0,427
240	T.E.	R1	0,805	8,664495114	0,658	0,73	7,924193071	0,463
		R2	0,511	5,762511105		0,196	2,653242523	
	TC.	R1	0,787	8,486822624	0,787	0,592	6,562037311	0,592
288	T.E.	R1	0,545	6,098114697	0,7005	0,389	4,558286448	0,518
		R2	0,856	9,167900503		0,647	7,104925476	
	TC.	R1	0,548	6,127726779	0,548	0,479	5,446648899	0,479
336	T.E.	R1	0,654	7,174020334	0,6385	0,52	5,85134735	0,5415
		R2	0,623	6,868028822		0,563	6,275787188	
	TC.	R1	0,454	5,199881552	0,454	0,306	3,739018853	0,306

Anexo 10. Registro de absorbancia y concentración de hierro (g/L) en el tratamiento 5 a una concentración de 20 g/L de Cobre obtenido durante 336 horas (15 días) en el proceso de biooxidación de Fe.

TIEMPO (HORAS)	TRATAMIENTO	REPETICIÓN	Fe TOTAL			Fe 3+		
			ABS	CONCENTRACIÓN (g/l)	PROMEDIO DE ABS	ABS	CONCENTRACIÓN (g/l)	PROMEDIO DE ABS
0	T.E.	R1	0,428	4,94324351	0,376	0,28	3,482380811	0,3215
		R2	0,324	3,916691343		0,363	4,301648406	
	T.C.	R1	0,373	4,400355345	0,373	0,354	4,212812161	0,354
48	T.E.	R1	0,636	6,996347843	0,594	0,527	5,920442207	0,5475
		R2	0,552	6,167209555		0,568	6,325140657	
	T.C.	R1	0,81	8,713848584	0,81	0,354	4,212812161	0,354
96	T.E.	R1	0,698	7,608330866	0,6785	0,596	6,601520087	0,6125
		R2	0,659	7,223373803		0,629	6,927252986	
	T.C.	R1	0,707	7,697167111	0,707	0,518	5,831605962	0,518
144	T.E.	R1	0,658	7,213503109	0,664	0,512	5,772381798	0,5285
		R2	0,67	7,331951436		0,545	6,098114697	
	T.C.	R1	0,64	7,035830619	0,64	0,425	4,913631428	0,425
192	T.E.	R1	0,565	6,295528576	0,589	0,429	4,953114204	0,506
		R2	0,613	6,769321883		0,583	6,473201066	
	T.C.	R1	0,69	7,529365314	0,69	0,572	6,364623433	0,572
240	T.E.	R1	0,849	9,098805646	0,7815	0,611	6,749580496	0,5885
		R2	0,714	7,766261968		0,566	6,30539927	
	T.C.	R1	0,73	7,924193071	0,73	0,516	5,811864574	0,516
288	T.E.	R1	0,42	4,864277959	0,4775	0,389	4,558286448	0,4645
		R2	0,535	5,999407758		0,54	6,048761228	
	T.C.	R1	0,212	2,811173626	0,212	0,16	2,297897542	0,16
336	T.E.	R1	0,571	6,354752739	0,5915	0,322	3,896949956	0,425
		R2	0,612	6,759451189		0,528	5,930312901	
	T.C.	R1	0,619	6,828546047	0,619	0,432	4,982726286	0,432

Anexo 11. Tratamiento 1, a una concentración de 0 g/L de cobre en el cual se obtuvo el mayor grado de correlación entre la bioxidación de fierro y el crecimiento microbiano.

Tiempo (Horas)	Logaritmo de cel/ml	Fe III (g/L)
0	6,602059991	1,241733294
48	6,954242509	4,99259698
96	7,146128036	5,476260981
144	7,255272505	6,300463923
192	8	6,93712368
240	8,903089987	9,656499852
288	8,903089987	6,004343105
336	8,903089987	5,584838614



Anexo 12. Prueba de Tukey en el crecimiento microbiano.

- A.** Determinación de la diferencia mínima significativa (DMS) de la prueba de Tukey para la producción máxima microbiana. DMS= 0,451734211.

$$DMS = q\sqrt{CME / n}$$

- Donde:

DMS = Valor crítico al 0,05.

CME = Valor del cuadrado medio del error (0,012789686).

q = Dato de Tabla (Anexo 13).

n = Número de repeticiones (2).

En la tabla con 5 tratamientos, grados de libertad 5, el valor “q” es 5,67

$$DMS = q\sqrt{CME / n}$$

$$DMS = 5,67\sqrt{0,012789686 / 2}$$

$$DMS = 0,451734211$$

B. La diferencia entre las medias de los tratamientos de 0,5, 10, 15 y 20 g/L de cobre fue comparada con la DMS:

Media de 0 restada con 5, 10, 15 y 20.

$$8,903089987 - 7,77815125 = 1,1249 > \text{DMS (Sí) (0 vs 5)}$$

$$8,903089987 - 7,204119983 = 1,6990 > \text{DMS (Sí) (0 vs 10)}$$

$$8,903089987 - 7,041392685 = 1,8617 > \text{DMS (Sí) (0 vs 15)}$$

$$8,903089987 - 7,00 = 1,9031 > \text{DMS (Sí) (0 vs 20)}$$

Media de 5 restada con 10, 15 y 20.

$$7,77815125 - 7,204119983 = 0,5740 > \text{DMS (Sí) (5 vs 10)}$$

$$7,77815125 - 7,041392685 = 0,7368 > \text{DMS (Sí) (5 vs 15)}$$

$$7,77815125 - 7,00 = 0,7782 > \text{DMS (Sí) (5 vs 20)}$$

Media de 10 restada con 15 y 20.

$$7,204119983 - 7,041392685 = 0,1627 < \text{DMS (No) (10 vs 15)}$$

$$7,204119983 - 7,00 = 0,2041 < \text{DMS (No) (10 vs 20)}$$

Media de 15 restada con 20.

$$7,041392685 - 7,00 = 0,0414 < \text{DMS (No) (15 vs 20)}$$

C. Conclusión: Se puede afirmar que para un nivel de significancia de 5%, el tratamiento de 0 g/L de cobre difiere de todos los demás, el tratamiento de 5 g/L de cobre difiere de todos los demás, pero los demás tratamientos no presentan diferencia entre sí.

D. Por lo tanto se establece el siguiente orden en los tratamientos:

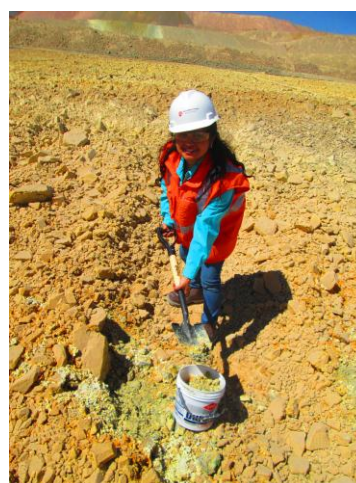
Nivel 1	Tratamiento 0 g/L de cobre
Nivel 2	Tratamiento 5 g/L de cobre
Nivel 3	Tratamiento 10, 15 y 20 g/L de cobre

Anexo 13. Tabla de valores de la amplitud total (q) de la prueba de Tukey para α (Nivel de error del 5 y 1%) utilizado para establecer el orden de los tratamientos.

Tabla 13. Valores de la amplitud total (q) de la prueba de Tukey para α (nivel de error del 5% y 1%), según el número de muestras o tratamientos (t) y los grados de libertad del error (n').

n'	α	t										
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	0,05	3,64	4,60	5,22	5,67	6,03	6,33	6,58	6,80	6,99	7,17	7,32
	0,01	5,70	6,98	7,80	8,42	8,91	9,32	9,67	9,97	10,24	10,48	
6	0,05	3,46	4,34	4,90	5,31	5,63	5,90	6,12	6,32	6,49	6,65	6,79
	0,01	5,24	6,33	7,03	7,56	7,97	8,32	8,61	8,87	9,10	9,30	
7	0,05	3,34	4,16	4,68	5,06	5,36	5,61	5,82	6,00	6,16	6,30	6,43
	0,01	4,95	5,92	6,54	7,01	7,37	7,68	7,94	8,17	8,37	8,55	
8	0,05	3,26	4,04	4,53	4,89	5,17	5,40	5,60	5,77	5,92	6,05	6,18
	0,01	4,75	5,64	6,20	6,62	6,96	7,24	7,47	7,68	7,86	8,03	
9	0,05	3,20	3,95	4,41	4,76	5,02	5,24	5,43	5,59	5,74	5,87	5,98
	0,01	4,60	5,43	5,96	6,35	6,66	6,91	7,13	7,33	7,49	7,65	
10	0,05	3,15	3,88	4,33	4,65	4,91	5,12	5,30	5,46	5,60	5,72	5,83
	0,01	4,48	5,27	5,77	6,14	6,43	6,67	6,87	7,05	7,21	7,36	
11	0,05	3,11	3,82	4,26	4,57	4,82	5,03	5,20	5,35	5,49	5,61	5,71
	0,01	4,39	5,15	5,62	5,97	6,25	6,48	6,67	6,84	6,99	7,13	
12	0,05	3,08	3,77	4,20	4,51	4,75	4,95	5,12	5,27	5,39	5,51	5,62
	0,01	4,32	5,05	5,50	5,84	6,10	6,32	6,51	6,67	6,81	6,94	
13	0,05	3,06	3,73	4,15	4,45	4,69	4,88	5,05	5,19	5,32	5,43	5,53
	0,01	4,26	4,96	5,40	5,73	5,98	6,10	6,37	6,53	6,67	6,79	
14	0,05	3,03	3,70	4,11	4,41	4,64	4,83	4,99	5,13	5,25	5,36	5,46
	0,01	4,21	4,89	5,32	5,63	5,88	6,08	6,26	6,41	6,54	6,66	
15	0,05	3,01	3,67	4,08	4,37	4,59	4,78	4,94	5,08	5,20	5,31	5,40
	0,01	4,17	4,84	5,25	5,56	5,80	5,99	6,16	6,31	6,44	6,55	
16	0,05	3,00	3,65	4,05	4,33	4,56	4,74	4,90	5,03	5,15	5,26	5,35
	0,01	4,13	4,79	5,19	5,49	5,72	5,92	6,08	6,22	6,35	6,46	
17	0,05	2,98	3,63	4,02	4,30	4,52	4,70	4,86	4,99	5,11	5,21	5,31
	0,01	4,10	4,74	5,14	5,43	5,66	5,85	6,01	6,15	6,27	6,38	
18	0,05	2,97	3,61	4,00	4,28	4,49	4,67	4,82	4,96	5,07	5,17	5,27
	0,01	4,07	4,70	5,09	5,38	5,60	5,79	5,94	6,08	6,20	6,31	
19	0,05	2,98	3,59	3,98	4,25	4,47	4,65	4,79	4,92	5,04	5,14	5,23
	0,01	4,05	4,67	5,05	5,33	5,55	5,73	5,89	6,02	6,14	6,25	
20	0,05	2,95	3,58	3,96	4,23	4,45	4,62	4,77	4,90	5,01	5,11	5,20
	0,01	4,02	4,64	5,02	5,29	5,51	5,69	5,84	5,97	6,09	6,19	
24	0,05	2,92	3,53	3,90	4,17	4,37	4,54	4,68	4,81	4,92	5,01	5,10
	0,01	3,96	4,55	4,91	5,17	5,37	5,54	5,69	5,81	5,92	6,02	
30	0,05	2,89	3,49	3,85	4,10	4,30	4,46	4,60	4,72	4,82	4,92	5,00
	0,01	3,89	4,45	4,80	5,05	5,24	5,40	5,54	5,65	5,76	5,85	
40	0,05	2,86	3,44	3,79	4,04	4,23	4,39	4,52	4,63	4,73	4,82	4,90
	0,01	3,82	4,37	4,70	4,93	5,11	5,26	5,39	5,50	5,60	5,69	
60	0,05	2,83	3,40	3,74	3,98	4,16	4,31	4,44	4,55	4,65	4,73	4,81
	0,01	3,76	4,28	4,59	4,82	4,99	5,13	5,25	5,36	5,45	5,53	
120	0,05	2,80	3,36	3,68	3,92	4,10	4,24	4,36	4,47	4,56	4,64	4,71
	0,01	3,70	4,20	4,50	4,71	4,87	5,01	5,12	5,21	5,30	5,37	
∞	0,05	2,77	3,31	3,63	3,86	4,03	4,17	4,29	4,39	4,47	4,55	
	0,01	3,64	4,12	4,40	4,60	4,76	4,88	4,99	5,08	5,16	5,23	

Anexo 14. Muestreo en botaderos de lixiviación.



Anexo 15. Preparación de medio de cultivo 9K líquido



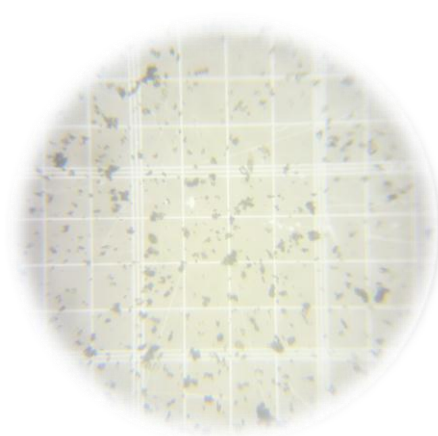
Anexo 16. Control de pH



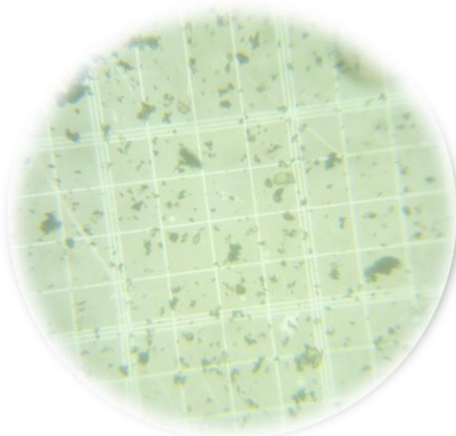
Anexo 17. Pre – enriquecimiento de mineral



Anexo 18. Recuentos microbianos en cámara de Neubauer

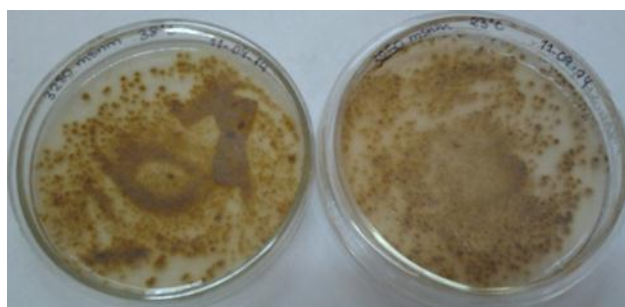


40x



40x

Anexo 19. Aislamiento en medio de cultivo 9K sólido



Anexo 20. Ensayos piloto (Del inicio al final de la fermentación)



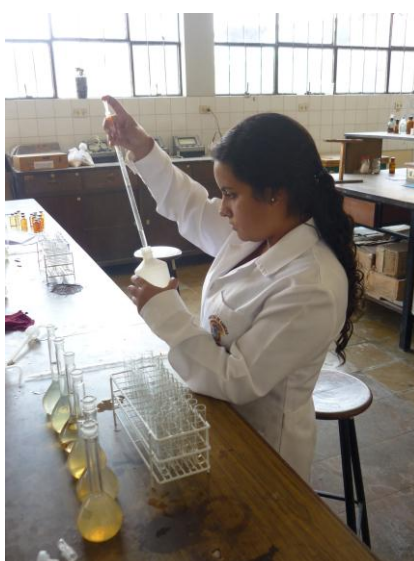
Anexo 21. Preparación de soluciones de cobre

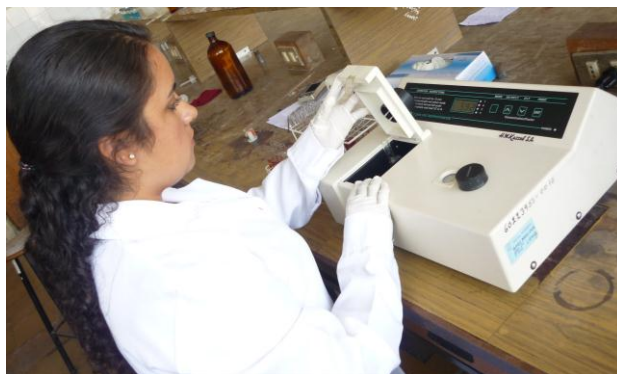


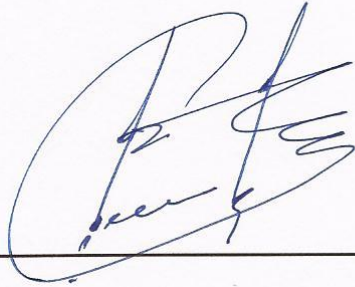
Anexo 22. Sistema de tratamientos a diferentes concentraciones de cobre (del inicio al final de la fermentación).



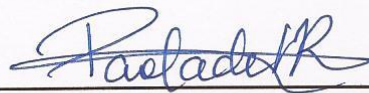
Anexo 23. Determinación de Fe total, Fe II y Fe III por espectrofotometría.







MSc. Daladier Miguel Castillo Cotrina
ASESOR



Bach. Paola del Rosario Eyzaguirre Liendo
TESISTA