

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología – Microbiología

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOLIXIVIANTE DE CULTIVOS
MICROBIANOS PUROS Y EN CONSORCIO
SOBRE LA CALCOPIRITA**

TESIS

Presentada por:

Bach. FRANCISCO EDUARDO ZEA GAMBOA

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA – PERÚ

2023



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N°385

En la ciudad de Tacna, a través de la plataforma Google Meet, de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; siendo las 18:00 horas del día 10 de enero del 2022. Estando presente el jurado calificador nominado por Resolución de Facultad N°10431-2022-FACI-UN/JBG, conformado por los siguientes docentes:

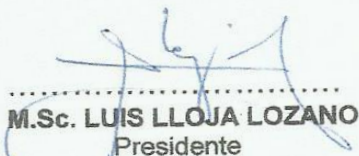
| | |
|-------------------------------------|------------|
| MSc. LUIS LLOJA LOZANO | Presidente |
| MSc. ANGELA VERONICA CHOQUE MIRANDA | Secretario |
| Dr. CESAR JULIO CÁCEDA QUIROZ | Miembro |

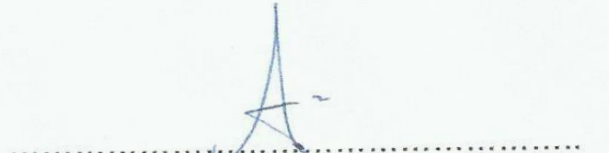
Acto seguido, se dio lectura a la resolución correspondiente, y del mismo modo se dio lectura al Artículo 22 del reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

A continuación, el Presidente del Jurado instó al Bachiller: FRANCISCO EDUARDO ZEA GAMBOA, a exponer la tesis: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOLIXIVIANTE DE CULTIVOS MICROBIANOS PUROS Y EN CONSORCIO SOBRE LA CALCOPIRITA.

Siendo las 19:00 horas, el tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador. Terminado el proceso, se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo a reglamento. El promedio de calificación dio el siguiente resultado: Aprobado (por unanimidad), con el calificativo de BUENO nota (16) de acuerdo al reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

Siendo las 19:55 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis firmando los señores miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.


M.Sc. LUIS LLOJA LOZANO
Presidente


M.Sc. ANGELA VERONICA CHOQUE MIRANDA
Secretario

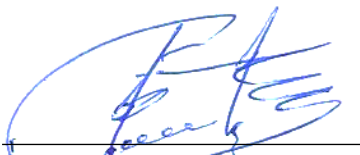

Dr. CESAR JULIO CÁCEDA QUIROZ
Miembro

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Daladier Miguel Castillo Cotrina en mi condición de asesor acreditado por la **RESOLUCIÓN DE FACULTAD N° 9896-2021-FACI-UN/JBG**, de la tesis titulada: **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOLIXIVIANTE DE CULTIVOS MICROBIANOS PUROS Y EN CONSORCIO SOBRE LA CALCOPIRITA**, presentado por el Bach. Francisco Eduardo Zea Gamboa, para optar el Título profesional de Biólogo Microbiólogo.

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y similitud de trabajos de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual **TURNITIN** cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es 5%. Por lo que **CERTIFICO QUE LA SIMILARIDAD** de la tesis está de acuerdo al nivel **PERMITIDO**, para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado con fines de continuar con los trámites respectivos para la obtención del título profesional.



Firma del asesor

DNI: 18867330

Nombre y apellido del asesor: Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina

DEDICATORIA

A mi mami, a mis hermanas y a Minne.

A Berta y Moisés.

AGRADECIMIENTO

A papá Dios, por permitirme continuar paso a paso superando cada adversidad y por su infinita bendición.

A mi casa de estudios, la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, que incentivó la realización de este estudio con el financiamiento de tesis.

A mi asesor Dr. Daladier Castillo Cotrina, con mucha gratitud por darme la oportunidad y confianza en la participación del proyecto de investigación que dirige y por su asesoramiento, dedicación y apoyo constante en la ejecución del presente trabajo de investigación.

A mis profesores universitarios de la Escuela Profesional de Biología Microbiología, quienes con sus conocimientos forjaron mi desarrollo profesional.

Al Dr. Roberto Castellanos y su equipo de trabajo del proyecto de biotecnología de enzimas; de igual forma al equipo de trabajo del proyecto de investigación de bacterias biolixiviantes dirigido por mi asesor; quienes me orientaron y apoyaron en todo momento durante el desarrollo de la presente tesis.

A mis familiares y amistades quienes en diversas situaciones de la vida me demostraron su estima y apoyo.

CONTENIDO

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| DEDICATORIA..... | iv |
| AGRADECIMIENTO..... | v |
| CONTENIDO | vi |
| ÍNDICE DE TABLAS | x |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xiii |
| RESUMEN..... | xvi |
| ABSTRACT | xviii |
| I. INTRODUCCIÓN | 20 |
| 1.1. Planteamiento del problema..... | 21 |
| 1.2. Hipótesis..... | 24 |
| 1.3. Justificación | 24 |
| 1.4. Objetivos | 26 |
| 1.4.1. Objetivo general..... | 26 |
| 1.4.2. Objetivos específicos..... | 26 |
| 1.5. Antecedentes..... | 27 |
| 1.6 Marco teórico..... | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 1.6.1. Biominería..... | 31 |
| 1.6.2. Biooxidación..... | 32 |
| 1.6.3. Biolixiviación | 34 |
| 1.6.4. Microorganismos utilizados en el proceso de biolixiviación..... | 39 |
| 1.6.5. Biolixiviación bacteriana a nivel de laboratorio..... | 42 |
| 1.6.6. Factores que influyen en el proceso de biolixiviación..... | 43 |
| 1.6.7. Calcopirita | 43 |
| 1.6.8. Biolixiviación de la calcopirita..... | 44 |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 47 |
| 2.1. Materiales..... | 47 |
| 2.1.1. Material biológico..... | 47 |
| 2.1.2. Mineral..... | 47 |
| 2.1.3. Reactivos | 48 |
| 2.1.4. Equipos..... | 49 |
| 2.1.5. Material de vidrio y otros..... | 50 |
| 2.2. Diseño de la investigación..... | 51 |
| 2.2.1. Variables operacionales..... | 53 |
| 2.3. Población y muestra..... | 53 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.1. Población | 53 |
| 2.3.2. Muestra..... | 54 |
| 2.4. Métodos..... | 54 |
| 2.4.1. Reactivación de cultivos microbianos..... | 54 |
| 2.4.2. Caracterización de los cultivos microbianos..... | 54 |
| 2.4.3. Conformación de consorcios microbianos..... | 55 |
| 2.4.4. Instalación de matraces para biooxidación..... | 56 |
| 2.4.5. Evaluación de biomasa y biooxidación de Hierro por espectrometría..... | 57 |
| 2.4.6. Evaluación de la biooxidación de azufre por turbidimetría..... | 60 |
| 2.4.7. Preparación del mineral a lixiviar..... | 61 |
| 2.4.8. Instalación de matraces para biolixiviación..... | 61 |
| 2.4.9. Análisis de Biolixiviación del cobre a partir de la calcopirita..... | 62 |
| III. RESULTADOS | 64 |
| 3.1. Capacidad biooxidativa de cultivos microbianos..... | 64 |
| 3.2. Capacidad biooxidativa de consorcios constituidos por dos cultivos microbianos | 71 |
| 3.3. Capacidad biooxidativa del consorcio constituido por tres cultivos microbianos | 78 |

| | |
|---|------------|
| 3.4. Capacidad biolixivante de los cultivos microbianos sobre la calcopirita..... | 81 |
| IV. DISCUSIÓN | 91 |
| V. CONCLUSIONES..... | 97 |
| VI. RECOMENDACIONES | 98 |
| VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 100 |
| VIII. ANEXOS | 109 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|----------------|---|----|
| Tabla 1 | Clasificación de los microorganismos lixiviantes de hierro y azufre | 41 |
| Tabla 2 | Composición de la calcopirita | 48 |
| Tabla 3 | Modelo de diseño experimental de la biolixiviación sobre la calcopirita | 52 |
| Tabla 4 | Variables e indicadores..... | 53 |
| Tabla 5 | Tratamientos que se instalaron en los matraces para la biolixiviación de la calcopirita..... | 62 |
| Tabla 6 | Concentración de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe total, SO_4^{2-} y biomasa en el cultivo microbiano <i>Leptospirillum ferriphilum</i> M1D-2020 (L ₁), registrado en el proceso de biooxidación durante 168 horas | 65 |
| Tabla 7 | Concentración promedio de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe total, SO_4^{2-} y biomasa en el cultivo microbiano <i>Leptospirillum</i> sp. M3E-2020 (L ₂), registrado en el proceso de biooxidación durante 168 horas..... | 67 |
| Tabla 8 | Concentración promedio de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe total, SO_4^{2-} y biomasa en el cultivo microbiano <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DSM 14882 (Af), registrado en el proceso de biooxidación durante 168 horas | 69 |
| Tabla 9 | Concentración promedio de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe total, SO_4^{2-} y biomasa en el consorcio constituido por <i>Leptospirillum ferriphilum</i> M1D-2020 y <i>Leptospirillum</i> sp. M3E-2020 (CL), registrado en el proceso de biooxidación durante 168 horas..... | 72 |

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabla 10 | Concentración promedio de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe total, SO_4^{2-} y biomasa en el consorcio constituido por <i>Leptospirillum ferriphilum</i> M1D-2020 y <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DSM 14882 (CL ₁), registrado en la biooxidación durante 168 horas..... | 74 |
| Tabla 11 | Concentración promedio de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe total, SO_4^{2-} y biomasa en el consorcio constituido por <i>Leptospirillum</i> sp. M3E-2020 y <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DSM 14882 (CL ₂), registrado en la biooxidación durante 168 horas..... | 76 |
| Tabla 12 | Concentración promedio de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe total, SO_4^{2-} y biomasa en el consorcio constituido por <i>Leptospirillum ferriphilum</i> M1D-2020, <i>Leptospirillum</i> sp. M3E-2020 y <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DSM 14882 (consorcio), registrado en el proceso de biooxidación durante 168 horas | 79 |
| Tabla 13 | Concentración promedio de Fe^{3+} , SO_4^{2-} , *Cu diluido 1:100 y biomasa en: el cultivo microbiano <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DSM 14882 (Af), el consorcio constituido por <i>Leptospirillum ferriphilum</i> M1D-2020 y <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DSM 14882 (CL ₁), el consorcio constituido por <i>Leptospirillum ferriphilum</i> , M1D-2020, <i>Leptospirillum</i> sp. M3E-2020 y <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DSM 14882 (Consorcio) y un cultivo control; registrado en el proceso de biolixiviación sobre la calcopirita durante 648 horas..... | 82 |

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabla 14 | Concentración promedio del cobre biolixiviado en suspensión y en mineral sólido en los experimentos de biolixiviación..... | 86 |
| Tabla 15 | Productividad de la biolixiviación del cobre (mg/hora)..... | 86 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|-----|
| Figura 1 | Oxidación del ion ferroso a férrico | 33 |
| Figura 2 | Mecanismos para la biolixiviación | 35 |
| Figura 3 | Mecanismo indirecto, por contacto y cooperativo para la biolixiviación | 36 |
| Figura 4 | Mecanismo del tiosulfato en la biolixiviación de sulfuros | 38 |
| Figura 5 | Mecanismo del polisulfuro en la biolixiviación de sulfuros | 39 |
| Figura 6 | Estructura de la calcopirita | 44 |
| Figura 7 | Evolución de la biooxidación de hierro por el cultivo microbiano L ₁ | 66 |
| Figura 8 | Evolución de la biooxidación de hierro por el cultivo microbiano L ₂ | 68 |
| Figura 9 | Evolución de la biooxidación de hierro por el cultivo microbiano Af | 70 |
| Figura 10 | Evolución de la biooxidación de azufre por los cultivos microbianos..... | 70 |
| Figura 11 | Evolución de la biomasa de los cultivos microbianos | 71 |
| Figura 12 | Evolución de la biooxidación de hierro por el consorcio CL..... | 73 |
| Figura 13 | Evolución de la biooxidación de hierro por el consorcio CL ₁ | 75 |
| Figura 14 | Evolución de la biooxidación de hierro por el consorcio CL ₂ | 77 |
| Figura 15 | Evolución de la biooxidación de azufre por consorcios constituidos por dos cultivos microbianos | 77 |
| Figura 16 | Evolución de la biomasa de los consorcios constituidos por dos cultivos microbianos..... | 788 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Figura 17 | Evolución de la biooxidación de hierro y azufre por el consorcio microbiano..... | 80 |
| | 0 | |
| Figura 18 | Evolución de la biomasa del consorcio en el experimento de biooxidación de hierro y azufre..... | 80 |
| Figura 19 | Evolución de la concentración de Fe^{3+} en la biolixiviación de la calcopirita...833 | |
| Figura 20 | Evolución de la concentración de SO_4^{2-} ppm en suspensión evaluado durante el experimento de biolixiviación de la calcopirita..... | 833 |
| Figura 21 | Evolución de la biomasa de los cultivos microbianos en el proceso de biolixiviación sobre la calcopirita..... | 84 |
| Figura 22 | Evolución de la concentración de cobre de las muestras diluidas 1:100 en función de los cultivos microbianos registrado en el proceso de biolixiviación sobre la calcopirita durante 648 horas | 844 |
| Figura 23 | Concentración de cobre (mg) inicial y final en la biolixiviación de la calcopirita por el consorcio constituido por <i>Leptospirillum ferriphilum</i> M1D-2020, <i>Leptospirillum</i> sp. M3E-2020 y <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DSM 14882 durante 648 horas | 877 |
| Figura 24 | Porcentaje de cobre recuperado, en función de los cultivos microbianos, registrado en el proceso de biolixiviación sobre la calcopirita durante 648 horas..... | 88 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 25 | Producción de cobre en suspensión lixiviado por el Consorcio constituido por <i>L. ferriphilum</i> M1D-2020, <i>Leptospirillum</i> sp. M3E-2020 y <i>A. ferrooxidans</i> DSM 14882 en la biolixiviación durante 648 horas..... | 89 |
| Figura 26 | Medias de la productividad de cobre (mg/hora) al 95 % de confianza de la mínima diferencia significativa (LSD)..... | 90 |

RESUMEN

La biolixiviación es una alternativa rentable y eficiente para la recuperación de metales a partir del aprovechamiento de un mineral sulfurado de baja ley por acción bacteriana.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad biolixivante sobre la calcopirita de dos cultivos microbianos nativos identificados como *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 y *Leptospirillum* sp. M3E-2020 aislados del mineral de los botaderos de Toquepala y un cultivo microbiano adquirido *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 de la colección microbiana del *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures – DSMZ*.

Se realizó el análisis de cada cultivo microbiano por separado y en consorcios para determinar su capacidad oxidativa sobre el hierro y el azufre en el medio de cultivo 9K modificado suplementado con azufre elemental. Para la biolixiviación de la calcopirita se trabajó con tres tratamientos cada uno con tres repeticiones: Mejor cultivo oxidante de hierro y azufre, mejor consorcio de dos cultivos oxidante de hierro y azufre, consorcio de tres cultivos y tratamiento control. Cada matraz tuvo 180 ml de medio de cultivo, 20 ml de inóculo microbiano y calcopirita en porcentaje del 10 %; en el caso del experimento control se le adicionó medio de cultivo extra para reemplazar el volumen del inóculo microbiano. Todos los tratamientos fueron incubados a 30 °C con 120 rpm durante 648 horas.

El análisis de los resultados fue realizado con el programa Statgraphics Centurion, utilizando la prueba de ANOVA y la realización de gráficos fue a través de Excel. El

tratamiento que fue más eficiente en la biolixiviación de cobre fue el consorcio de tres cultivos microbianos. Se concluyó que la acción cooperativa de los microorganismos en consorcio de tres tuvo mejor rendimiento, recuperándose el 37,09 % de cobre (17,07 mg de Cu) con una productividad de 0,0216 mg/hora a través del proceso de biolixiviación de la calcopirita de baja ley.

Palabras clave: Biolixiviación, cepa lixivante, consorcio, calcopirita.

ABSTRACT

Bioleaching is a profitable and efficient alternative for the recovery of metals from the use of a low-grade sulfide ore caused by bacterial action.

In the present work, bioleaching capacity on chalcopyrite of two native microbial cultures identified as *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 and *Leptospirillum* sp. M3E-2020 isolated from the mineral of the Toquepala dumps and a microbial culture acquired *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 from the microbial collection of the *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures – DSMZ*.

Each strain was evaluated separately and in consortia to determine its oxidative capacity on iron and sulfur in the modified 9K culture medium supplemented with elemental sulfur. For the bioleaching of chalcopyrite, three treatments were used, each with three repetitions: best iron and sulfur oxidizing culture, best consortium of two iron and sulfur oxidizing cultures, consortium of three cultures and control treatment. Each flask had 180 ml of culture medium, 20 ml of microbial inoculum and 10% chalcopyrite; in case of control experiment, extra culture medium was added to replace the volume of the microbial inoculum. All treatments were incubated at 30 °C with 120 rpm for 648 hours.

The analysis of the results was carried out using Statgraphics Centurion program with ANOVA test and the graphs were made through Excel program. The treatment that had the highest bioleaching of copper was the consortium of three microbial cultures. It was concluded that the cooperative action of the microorganisms in a consortium of three

had efficient performance, recovering 37,09% of copper (17,07 mg of Cu) with a productivity of 0,0216 mg/hour through the bioleaching process of low-grade chalcopyrite.

Keywords: bioleaching, leaching strain, consortium, chalcopyrite.

I. INTRODUCCIÓN

La explotación minera ocasiona el empobrecimiento de los ricos yacimientos de minerales haciéndolos más abundantes de menas de más baja ley, esta situación sirvió de incentivo para el desarrollo de nuevas tecnologías rentables para el aprovechamiento de estos minerales. La biolixiviación surge como una alternativa de aprovechamiento de minerales de baja ley para la recuperación de un mineral de interés producto de la acción bacteriana (Sotillo, 1977).

El 70 % de las reservas de cobre a nivel mundial se hallan en forma de Calcopirita (Cortés, 2010). El Perú es un país que solventa gran parte de su economía con la actividad minera. Figura en el puesto número dos en el ranking mundial de países productores de cobre del año 2021, produciendo 2,4 millones de toneladas de este mineral y siendo solo superado por su vecino país del sur, Chile (Statista, 2021).

El Perú es un país con gran potencial para la aplicación de la lixiviación bacteriana por la condiciones y particulares que presenta su territorio (Machaca y Sotillo, 1975); siendo un proceso incipiente en nuestro país (Eyzaguirre, 2016).

Los microorganismos implicados en el proceso de biolixiviación pueden resistir condiciones extremas, sin embargo, cada microorganismo tiene su peculiar mecanismo de acción lixivante frente a un mineral y esto depende según sus necesidades nutricionales y los factores de crecimiento que requiera (Alpaca, 1998).

Los cultivos microbianos empleados en esta investigación fueron constituidos por los cultivos microbianos nativos aislados del mineral de los botaderos de la mina de Toquepala y una cepa adquirida del *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures – DSMZ*.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad biolixivante de cultivos microbianos por separado y en consorcio sobre la calcopirita para determinar la concentración de cobre lixiviado, biooxidación de hierro y azufre y el crecimiento microbiano.

1.1. Planteamiento del problema

La contaminación ambiental originada a partir de desechos mineros es un problema que está presente en la industria minera a nivel global, lo cual constituye una amenaza biológica. Sin embargo, existen microorganismos que aprovechan estos residuos metálicos y que toleran condiciones extremas para existir en estos ambientes de alta contaminación (Marrero y col., 2010).

En la minería actual, las formas más sencillas a partir de las cuales se obtienen los metales se tornan en procedimientos más complejos debido a que los yacimientos minerales se agotan o están próximos a hacerlo, lo que origina yacimientos empobrecidos o con predominio de compuestos minerales de muy baja ley; esta situación es el resultado de la sobreexplotación de los yacimientos minerales (Bernardelli y col., 2017).

Los problemas ambientales y la rentabilidad económica alientan el estudio y la práctica de nuevas alternativas para la extracción de diversos metales. Dentro de las

ciencias mineras se implementan otras alternativas extractivas de metales, otorgándose así la denominación de “biominería” a la rama que comprende una serie de procesos microbiológicos que pueden ser utilizados para la recuperación de metales a partir de los minerales de muy baja ley (Bernardelli y col., 2017).

La recuperación de cobre a partir de minerales de baja ley se realiza aplicando agentes microbianos a través de procesos extractivos de biolixiviación, donde los microorganismos solubilizan los metales esencialmente a través de ataques oxidantes y/o ácidos (Bernardelli y col., 2017).

La biolixiviación es en la actualidad una de las tecnologías dentro de la hidrometalurgia que va tomando mayor protagonismo debido a que estudia la recuperación de metales a partir de minerales de desecho, el cual es posible con utilización de microorganismos que actúan como catalizadores en las reacciones de disolución (Misari, 2016).

En los botaderos de las minas de Toquepala existen microorganismos nativos capaces de realizar el proceso de biolixiviación, ya que este proceso es parte de su ecología. La fisiología y el metabolismo de estas bacterias les brinda la capacidad de adaptarse de manera natural a su entorno (Castillo y Eyzaguirre, 2019).

Una de las principales características de los yacimientos de la mina de Toquepala es su mineralización primaria compuesta de minerales de baja ley como la calcopirita y la molibdenita (Gagliuffi y Vera, 2018).

Teniendo en cuenta que utilizar microorganismos en los procesos de biolixiviación es una tecnología que en la actualidad forma parte de las principales opciones a implementar en la biominería para la extracción de metales se planteó la siguiente pregunta: **¿Cuál es la capacidad biolixivante de consorcios microbianos y cultivos microbianos puros sobre la calcopirita?**

1.2. Hipótesis

El consorcio constituido por dos cultivos microbianos nativos y uno no nativo tiene mayor capacidad biolixivante sobre la calcopirita que un cultivo microbiano nativo.

1.3. Justificación

La industria minera desde tiempos remotos tiene como objetivo tener procedimientos más rentables en la recuperación de metales a partir de rocas de baja ley. Hoy en día la industria minera intenta generar procedimientos que sean capaces de minimizar el impacto de contaminación ambiental; por ello, en nuestro país cada vez se da mayor énfasis en comenzar a llevar a la práctica tecnologías que cumplan estos requisitos (Misari, 2016).

La biolixiviación es importante, ya que este proceso implica menor impacto ambiental, con mejor rentabilidad y ahorro de energía. (Lagos y Guzmán, 2009).

La utilización de agentes microbianos para la recuperación de metales es una alternativa eficiente, rentable y sobre todo genera menor cantidad de productos de desecho, por consiguiente, la biolixiviación bacteriana es una tecnología importante en la recuperación de metales, ya que mitiga el impacto ambiental negativo (Mishra y Rhee, 2010).

El éxito de la recuperación del cobre a partir de un mineral de baja ley depende de las capacidades metabólicas y fisiológicas de los microorganismos nativos presente en los botaderos de desecho de las minas (Deloya, 2012).

La calcopirita de baja ley es un mineral que abunda en los yacimientos de Toquepala y puede ser aprovechado utilizando los microorganismos propios del lugar, considerando su capacidad biolixivante. Esto genera una alternativa de práctica minera rentable, eficiente y ecoamigable (Ly, 2009).

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad biolixivante de los cultivos microbianos puros y en consorcio sobre la calcopirita.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar la capacidad oxidativa de tres cultivos microbianos sobre el hierro y el azufre.
- Determinar la capacidad oxidativa de tres consorcios constituidos por dos cultivos microbianos y un consorcio constituido por tres cultivos microbianos sobre el hierro y el azufre.
- Establecer la capacidad biolixivante sobre la calcopirita del cultivo microbiano y de los consorcios que presenten mayor capacidad oxidativa de hierro y azufre.

1.5. Antecedentes

En Tacna, Delgado (2015), estudió el efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo microbiano biolixivante; teniendo como objetivo principal la determinación del efecto de la temperatura y el grado de correlación en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo microbiano biolixivante. La metodología empleada se basó en la técnica de espectrofotometría colorimétrica de Cabaña (2005), para obtener las concentraciones de hierro, la absorción atómica para la concentración de cobre y en el recuento bacteriano. La experimentación fue llevada a cabo en el medio de cultivo 9k modificado, con una doble repetición de tratamientos a diferentes temperaturas. Los datos obtenidos demostraron que a mayor temperatura el rendimiento mejoraba en la determinación del crecimiento microbiano, de hierro oxidado y de cobre lixiviado.

En Tacna, Eyzaguirre (2015), estudió la influencia de la concentración de cobre en la biooxidación del fierro y en el crecimiento celular de un cultivo microbiano biolixivante de cobre; teniendo como objetivo principal determinar la influencia de la concentración del cobre en la biooxidación de hierro, en el crecimiento celular y el grado de correlación entre ambos. La metodología empleada se basó en la técnica de espectrofotometría colorimétrica de Cabaña (2005), para obtener las concentraciones de hierro, la absorción atómica para la concentración de cobre y en el recuento bacteriano. Se realizaron experimentos por triplicado de biooxidación de hierro y biolixiviación de cobre con cultivos microbianos nativos de los botaderos de biolixiviación de la minera de Toquepala

sometidos a diferentes concentraciones de cobre en el medio líquido 9k. Los datos obtenidos demostraron que el mayor grado de correlación del crecimiento microbiano y la concentración de hierro se daba mientras disminuía las concentraciones de cobre.

En Tacna, Tirado (2015), estudió la biooxidación de arsenopirita por un cultivo microbiano puro y mixto; teniendo como objetivo principal evaluar el grado de biooxidación de concentrado de arsenopirita por un cultivo microbiano puro y un cultivo microbiano mixto. La metodología empleada se basó en la determinación colorimétrica de Cabaña (2005), para obtener las concentraciones de hierro total, hierro ferroso y hierro férrico en solución de los tratamientos llevados a cabo en el medio de cultivo 0k (cero k) con diferentes concentraciones de arsenopirita, luego del cual se evaluó el crecimiento microbiano, pH. Los datos obtenidos demostraron que el cultivo microbiano mixto con arsenopirita al 8 % fue el que tuvo mayor grado de biooxidación, logrando una concentración de hierro férrico en solución de 6465,1 mg/L.

En Arequipa, Tapia (2016), estudió la biolixiviación de cobre a partir de calcopirita utilizando un consorcio nativo aislado del mineral comparado con una cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882; teniendo como objetivo principal comparar el rendimiento de los microorganismos nativos con el de la cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans* en la oxidación de mineral sulfurado. La metodología empleada consistió en el análisis fisicoquímico del mineral experimental; el aislamiento de microorganismos presentes en el mineral utilizando el medio de cultivo 9K-Fe, su caracterización microbiológica y su posterior extracción y purificación de ADN para la caracterización

molecular utilizando el protocolo de Kit MOBIO. Se realizaron ensayos de biolixiviación durante 18 días comparando los resultados de recuperación de cobre del consorcio nativo con la cepa bacteriana codificada en condiciones mesófilas, pH ácido y agitación de 120 rpm/min. Las concentraciones de cobre y de hierro fueron realizadas a través de la espectroscopía por absorción atómica utilizando la técnica empleada por Álvarez y Hernández (2011). Los datos obtenidos demostraron que el consorcio nativo tuvo mayor potencial biolixivante en la recuperación de cobre de un mineral sulfurado.

En Nuevo Chimbote, De los Santos y Sánchez (2018), investigaron el efecto del pH en el proceso de biolixiviación de cobre a través de un consorcio bacteriano aislado a partir de drenajes ácidos de la empresa minera Huinac S.A.C. del departamento de Áncash en condiciones de laboratorio; teniendo como objetivo principal evaluar el efecto de diferentes valores de pH en el proceso de biolixiviación de cobre por un consorcio microbiano aislado a partir de drenajes ácidos de mina. La metodología consistió en el aislamiento de microorganismos presentes en el drenaje ácido de la mina en condiciones mesófilas fue realizado en un medio de enriquecimiento líquido a pH ácido, posteriormente fueron caracterizados microbiológica y molecularmente. Las bacterias identificadas fueron sometidas a ensayos de biolixiviación de cobre a diferentes escalas de pH. La concentración del hierro ferroso se obtuvo aplicando la técnica de Akcil y col. (2007) y la concentración de cobre fue obtenida por espectroscopia por absorción atómica con la técnica de Sugio y col. (2008). Los resultados obtenidos demostraron que los ensayos a nivel de pH 2 indicaban mayor recuperación del mineral, siendo lo óptimo para tener

resultados de mayor recuperación de cobre en el proceso de biolixiviación con cepas nativas de drenaje minero.

En Santiago de Chile, Gonzales (2010), estudió la influencia de la acción química del oxígeno en la lixiviación química y biológica de calcopirita a 70 °C; teniendo como objetivo principal esclarecer la acción química del oxígeno en la lixiviación de calcopirita (CuFeS_2) promovida por ion ferroso a 70 °C. La metodología consistió en la biolixiviación de calcopirita en una serie de tratamientos bajo distinta presión parcial de oxígeno, utilizando el medio de cultivo Norris con diversas concentraciones de ion ferroso inicial. Para cada condición se tomó muestras periódicamente para medición de cobre, fierro, Eh y pH utilizando la técnica de espectroscopia por absorción atómica y análisis mineralógico residual por difracción de rayos x de Mikhlin y col. (2004). Como resultado obtuvo que el agente oxidante dominante en la lixiviación de calcopirita con ion ferroso inicial fue el ion férrico. Los resultados indicaron que se alcanzan mayores porcentajes de recuperación en la lixiviación férrica aireada. Los resultados obtenidos demostraron que el aire es un buen agente para la lixiviación férrica a 70 °C y pH 1,5.

En España, Zepeda (2018), estudió la biolixiviación de minerales sulfurados de cobre de baja ley; teniendo como objetivo principal investigar a escala de laboratorio, los parámetros operacionales relevantes del sistema, así como los cambios mineralógicos y la dinámica microbológica en el proceso de biolixiviación para minerales sulfurados de cobre de baja ley. La metodología consistió en medir la disponibilidad de ácido, el efecto de la temperatura del sistema y la actividad microbiana en el desarrollo de la biolixiviación.

Para ello se utilizó la técnica de Galleguillos y col. (2008), para determinación de hierro ferroso, la técnica Skoog y col., (2001), para la valoración potenciométrica, la técnica de Ospina y col. (2010), para la determinación de sulfatos y para el análisis secuencial de cobre; utilizó el método de Carmona y Adaros (2000). Los resultados demostraron que el aumento de la temperatura favorece la actividad bacteriana y la recuperación de cobre, por lo que trabajar a 50 °C sería lo óptimo ideal para obtener mayor eficacia y que la utilización de un cultivo microbiano mixto produce mayor recuperación de cobre en los ensayos de biolixiviación de este mineral sulfurado de baja ley.

1.6. Marco teórico

1.6.1. *Biominería*

Se define como biominería a la utilización de agentes microbianos en minería para la recuperación de metales y las acciones de remediación ambiental que involucran estos procesos. Es considerada una rama de la biotecnología aplicada a la industria minero – metalúrgica (hidrometalurgia) para buscar solución a diferentes problemas productivos que se engloban en la obtención de mayor producción de metal a costos más rentables y que se realicen a través de procesos de menor impacto ambiental (Ly, 2009).

La biominería es una ciencia antigua que en las últimas décadas ha tomado protagonismo, ya que nace a partir de la utilización de microorganismos que suplantando el rol de agentes químicos y que realizan la función de separar el metal requerido de otros metales, los cuales están agrupados en un mineral compuesto de baja ley. La

hidrometalurgia agrupa procesos como la biooxidación, la biolixiviación, la bioadsorción y la bioprecipitación (Bernardelli y col., 2017).

1.6.2. Biooxidación

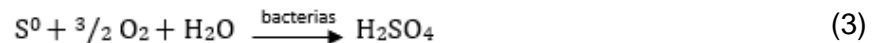
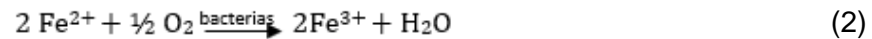
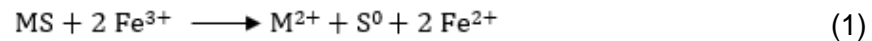
La biooxidación u oxidación bacteriana es un proceso que consta de tratamientos que utilizan microorganismos capaces de promover la oxidación de una matriz de sulfuros. La biooxidación permite la fácil liberación del cobre y otros metales refractarios contenidos en minerales sulfurosos como la calcopirita; a través de mecanismos de acción directa o indirecta para obtener minerales reducidos como el hierro, azufre y dióxido de carbono, los cuales se utilizan como fuente primaria de energía para la síntesis celular. Este procedimiento es usado cuando el elemento requerido no puede ser solubilizado por los microorganismos, pero su presencia beneficia para poder recuperarlo (Rodríguez y col., 2001).

Se conoce básicamente dos procesos de oxidación bacteriana, la oxidación de sulfuros y la oxidación de hierro ferroso.

1.6.2.1. Oxidación de Sulfuros. El ion Fe^{3+} es un buen agente lixiviante de los sulfuros metálicos; los microorganismos son capaces de regenerar el ion Fe^{3+} para mantener alta su concentración en la disolución. El ataque oxidante del ion férrico produce S^0 como subproducto, el cual permanece en la superficie del sulfuro, formando una barrera de difusión para cualquier agente oxidante (oxígeno y pH ácido) o agente microbiano capaz de generar un ataque directo al sulfuro (Misari, 2016). La oxidación de la película

de S^0 favorece la disolución facilitando la difusión en la interface del sulfuro con la solución.

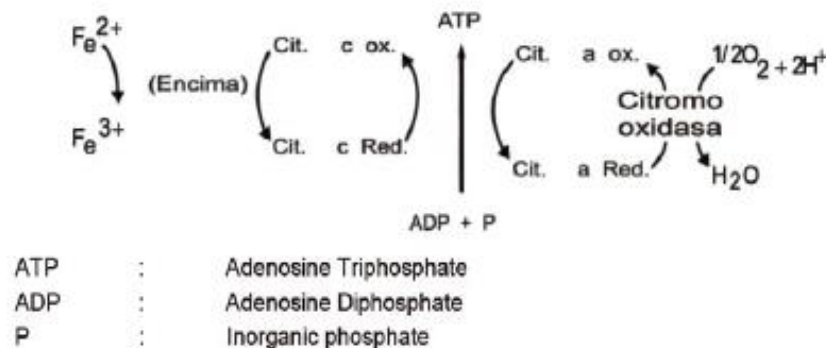
Se podría representar a través de las siguientes reacciones:



1.6.2.2. Oxidación de hierro ferroso (Fe^{2+}). Ocurre en la membrana celular y se complementa en solución con el oxígeno y/o sulfato, indispensable para que ocurra la oxidación. La enzima hierro citocromo-c reductasa cataliza la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} , favorece el ingreso de electrones para reducir la cadena transportadora de electrones compuesta por citocromos c, a y enzima citocromo – oxidasa, quienes cumplen ciclos de óxido – reducción. Se sintetiza una molécula de ATP por cada electrón que atraviesa la cadena de electrones. Es representado a través de la Figura 1.

Figura 1

Oxidación del ion ferroso a férrico.



Nota: Tomado de Misari (2016).

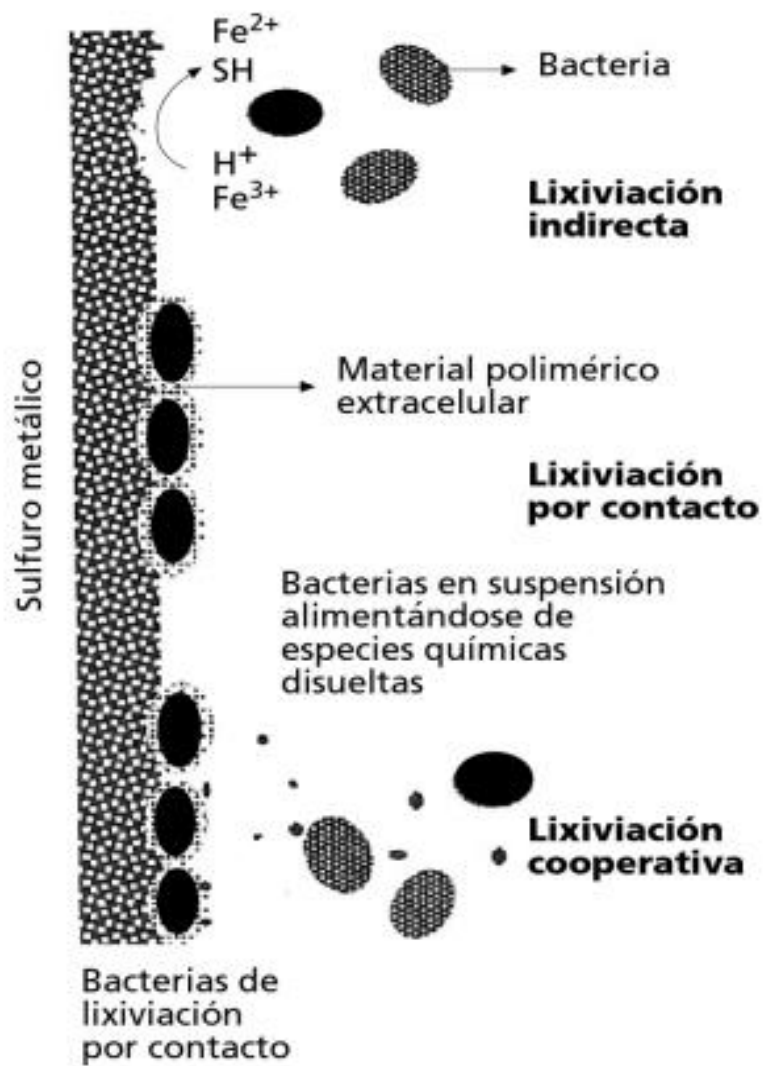
1.6.3. Biolixiviación

La biolixiviación es el proceso convencional de lixiviación, catalizado biológicamente, pero aplicado a los minerales sulfurados ante la necesidad de aumentar la cinética de su disolución. De esta manera la biolixiviación es un proceso químico, mediado por el agua y oxígeno atmosférico y un proceso biológico, mediado por microorganismos (Lagos y Guzmán, 2009).

Los mecanismos del proceso de lixiviación bacteriana tuvieron un primer intento de explicación en el año 1964 por los investigadores Silverman y Ehrlich (Rodríguez y col., 2003), en el cual se plantearon la lixiviación bacteriana directa e indirecta. La lixiviación tiene tres mecanismos (Tributsch, 2001).

Figura 2

Mecanismos para la biolixiviación.



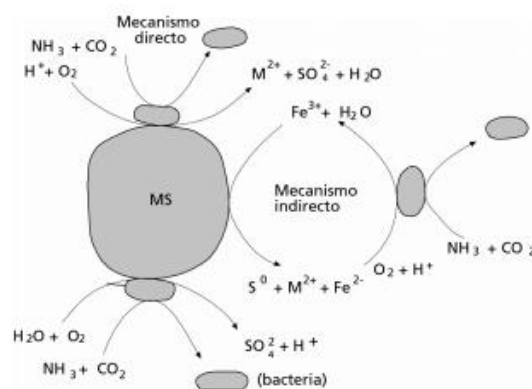
Nota: Tomado de Tributsch (2001).

Las bacterias se adaptan a diferentes sulfuros y ambientes de lixiviación, algunos de estos sulfuros se disuelven en una solución ácida o pueden ser disueltos con la extracción de un electrón de Fe^{3+} , situación que es favorable para una lixiviación bacteriana indirecta porque no hay unión bacteriana a la superficie del sulfuro.

Muchos de los minerales de baja ley no pueden ser disueltos fácilmente por lo que depende del tamaño de las partículas y la unión bacteriana a estas. Es en este contacto donde se rompe la estructura cristalina, ya sea por extracción o la disolución electroquímica de un componente de este mineral. También se ha demostrado que cuando existe cooperación entre diferentes especies bacterianas en el proceso de lixiviación, en donde uno cumple la función de adherirse al sulfuro y otra queda libre en la solución, podría favorecer la sobrevivencia de las bacterias proveyendo de energía química de una limitada superficie del sulfuro (Tributsch, 2001).

Figura 3

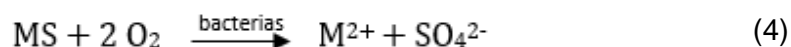
Mecanismo indirecto, por contacto y cooperativo para la biolixiviación.



Nota: Tomado de Rodríguez (2000).

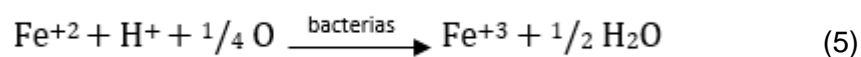
El mecanismo por contacto está mediado por acción enzimática directamente sobre el mineral, gracias a la adherencia de la bacteria generando contacto físico con el mineral. En la oxidación enzimática se realiza el transporte de electrones desde la parte reducida del mineral, generalmente un sulfuro, al oxígeno disuelto (Saavedra y Cortón 2014).

Se representa con la siguiente reacción:



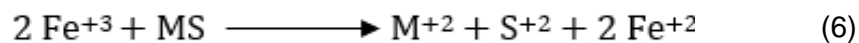
El mecanismo de catálisis bacteriana en la disolución de minerales sulfurados es el indirecto, a través de reacciones químicas, enzimáticas o no enzimáticas y se basa en la oxidación bacteriana del ion ferroso con oxígeno disuelto (Gautier, 2009).

Se representa con la siguiente reacción:



Luego de producirse el ion férrico, este ataca el sulfuro por la siguiente reacción, liberando el metal que se quiere recuperar.

Se representa con la siguiente reacción:



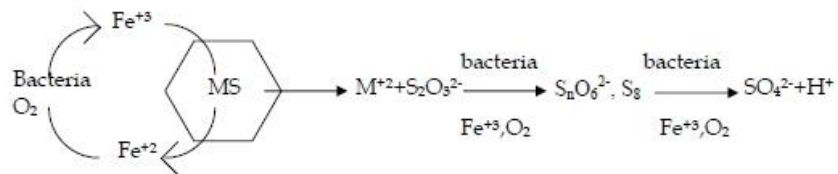
Fueron propuestos dos diferentes mecanismos de control para la disolución de minerales sulfurados que se determinan según la estructura del mineral, estos mecanismos son el mecanismo tiosulfato y el mecanismo polisulfuro (Sand y col., 2001).

En el mecanismo de tiosulfato solo las bacterias hierro – oxidantes son capaces de oxidar estos sulfuros. En este mecanismo los minerales son degradados por ataque químico del ion férrico y/o por protones en la estructura del cristal. Es aplicable a minerales como la pirita, molibdenita y tungstenita (Ho-Lock, 2009).

Se representa en la Figura 4.

Figura 4

Mecanismo del tiosulfato en la biolixiviación de sulfuros.



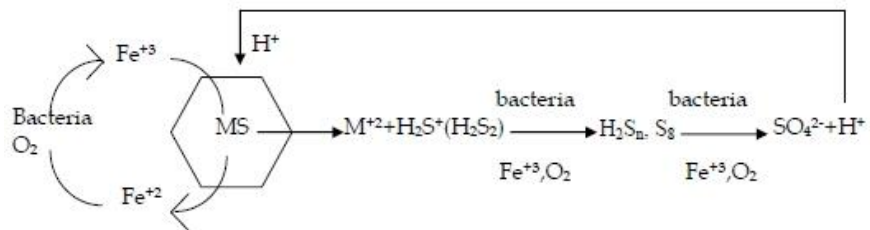
Nota: Tomado de Gautier (2009).

En el mecanismo polisulfuro, los iones férricos son entregados por sustancias poliméricas extracelulares de las bacterias (exopolisacáridos), que están acomplejadas con residuos de ácido glucurónico. Es aplicable al resto de minerales sulfurados como la galena, esfalerita, calcopirita y otros (Ho-Lock, 2009).

Se representa en la Figura 5.

Figura 5

Mecanismo del polisulfuro en la biolixiviación de sulfuros.



Nota: Tomado de Gautier (2009).

1.6.4. Microorganismos utilizados en el proceso de biolixiviación

Las bacterias que intervienen en los procesos de lixiviación son generalmente autótrofas, aeróbicas y quimiosintéticas. Esta última característica, las hace ser capaces de oxidar minerales para producir el ion férrico y ácido sulfúrico, necesarios para las reacciones de biolixiviación. El ion férrico, es un agente fuertemente oxidante, que permite oxidar los minerales de sulfuro de cobre a sulfato de cobre que es soluble. Debido a esto, también se les llama microorganismos sulfo y ferro-oxidantes (Lagos y Guzmán, 2009).

Los agentes microbianos que realizan procesos de biolixiviación se caracterizan por vivir en condiciones extremas (extremófilos); viven en entornos ácidos, adaptándose a medios con valores de pH menores a 3,0 y con altas concentraciones de metales. La capacidad autótrofa les permite sintetizar sus componentes celulares a partir de compuestos inorgánicos como azufre y/o hierro ferroso, los cuales son su principal fuente de energía.

El género *Acidithiobacillus* es usualmente el más utilizado en los procesos de biolixiviación (Kelly y col., 2005).

Todas las características mencionadas les confieren la clasificación de bacterias y arqueas quimiolitotróficas ferro-sulfo oxidantes. Siendo la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, la principal exponente utilizada en estos procesos de biominería; aislada por primera vez en el año 1947 a partir de drenajes mineros de carbón (Colmer & Hinkle, 1947).

Cada especie bacteriana difiere de otras según sus necesidades de nutrientes como la fuente energética, es por ello que la conformación de un consorcio microbiano podría resultar más eficaz y beneficioso que aplicando un cultivo microbiano constituido por una sola cepa en la biolixiviación de un mineral. De tal forma, los compuestos que no sean oxidados por una especie, pueden ser oxidados por otra del mismo consorcio y así se evitaría una posible acumulación de minerales que podría resultar tóxica (Lagos y Guzmán, 2009).

La resistencia a la temperatura es el factor que clasifica a los microorganismos en mesófilos (21 – 40 °C), termófilos moderados (40 – 60 °C) y termófilos extremos (60 – 85 °C), en donde solo se encuentran clasificadas las arqueas (Gonzales, 2010).

Los organismos mejor conocidos y utilizados en el proceso de biolixiviación se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

Clasificación de los microorganismos lixiviantes de hierro y azufre.

| | Microorganismo | Dominio | Metaboliza | CuFeS ₂ |
|----------------------------------|---|----------------|--|--------------------|
| Mesófilos | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | Bacteria | Fe ²⁺ , S ⁰ , MS | Si |
| | <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> | Bacteria | S ⁰ , MS | Si |
| | <i>Acidithiobacillus albertus</i> | Bacteria | S ⁰ | |
| | <i>Thiobacillus plumbophilus</i> | Bacteria | Fe ²⁺ , MS | |
| | <i>Thiobacillus prosperus</i> | Bacteria | S ⁰ , MS | Si |
| | <i>Thiobacillus cuprina</i> | Bacteria | S ⁰ , MS | Si |
| | <i>Sulfobacillus disulfidooxidans</i> | Bacteria | Fe ²⁺ , S ⁰ , MS | |
| | <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> | Bacteria | Fe ²⁺ , MS | Si |
| | <i>Acidiphilium acidophilum</i> | Bacteria | S ⁰ | |
| | <i>Ferromicrobium acidiphilum</i> | Bacteria | Fe ²⁺ , MS | |
| | <i>Ferroplasma acidiphilum</i> | Arquea | Fe ²⁺ , MS | |
| Termófilos moderados | <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> | Bacteria | Fe ²⁺ , S ⁰ , MS | Si |
| | <i>Sulfobacillus acidophilum</i> | Bacteria | Fe ²⁺ , S ⁰ , MS | Si |
| | <i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> | Bacteria | Fe ²⁺ , MS | Si |
| | <i>Leptospirillum thermoferrooxidans</i> | Bacteria | Fe ²⁺ | |
| | <i>Acidithiobacillus caldus</i> | Bacteria | Fe ²⁺ | |
| | <i>Sulfobacillus-like stain</i> | Bacteria | S ⁰ , MS | |
| | <i>Ferroplasma acidarmanus</i> | Arquea | Fe ²⁺ , MS | |
| Termófilos extremos | <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> | Arquea | Fe ²⁺ , S ⁰ , MS | |
| | <i>Sulfolobus metallicus</i> | Arquea | Fe ²⁺ , S ⁰ , MS | Si |
| | <i>Sulfolobus yangmingensis</i> | Arquea | S ⁰ | |
| | <i>Sulfolobus solfataricus</i> | Arquea | S ⁰ | |
| | <i>Sulfolobus hakonensis</i> | Arquea | S ⁰ | |
| | <i>Sulfolobus shibitae</i> | Arquea | S ⁰ , MS | |
| | <i>Acidianus brierleyi</i> | Arquea | S ⁰ | |
| | <i>Acidianus infernus</i> | Arquea | Fe ²⁺ , S ⁰ , MS | Si |
| | <i>Acidianus ambivalens</i> | Arquea | S ⁰ | |
| | <i>Metallosphaera sedula</i> | Arquea | Fe ²⁺ , S ⁰ , MS | Si |
| | <i>Metallosphaera prunae</i> | Arquea | S ⁰ , MS | Si |
| | <i>Sulfurococcus yellowstonii</i> | Arquea | Fe ²⁺ , S ⁰ , MS | Si |
| | <i>Sulfurococcus mirabilis</i> | Arquea | S ⁰ | |
| <i>Sulfurococcus ohwakuensis</i> | Arquea | S ⁰ | | |

Nota: Tomado de Gómez (2007).

1.6.4.1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Son bacterias que utilizan el hierro ferroso, los minerales sulfurados, el azufre y el tiosulfato como fuente de energía. La asimilación del dióxido de carbono por parte del microorganismo es a través del ciclo de Calvin, catalizado por la enzima ribulosa-bifosfato carboxilasa. El requerimiento de nitrógeno se cubre a través del amonio que compone el medio de cultivo (Mishra y Rhee, 2010).

Su morfología es de tipo bacilar con un flagelo polar, Gram negativas que no forman esporas y llegan a medir entre 0,5 a 1 μm . El pH óptimo para su desarrollo es de 1,7 a 3,5 y la temperatura en que prolifera es de 28 °C a 37 °C (Misari, 2016).

1.6.4.2. *Leptospirillum ferriphilum*. Son bacterias cuya principal fuente de energía es el hierro ferroso, carece de capacidad oxidativa de azufre a sulfatos. Son células en forma de espiral con un flagelo polar, gramnegativas. El pH óptimo para su desarrollo es de 3,0; son bacterias mesófilas y termófilas moderadas, ya que se desarrollan entre 28-60 °C (Misari, 2016).

1.6.5. *Biolixiviación bacteriana a nivel de laboratorio*

Se conocen técnicas para la aplicación de la lixiviación tanto a nivel industrial como a nivel de investigación. La biolixiviación bacteriana a nivel de laboratorio se lleva a cabo con la utilización de matraces de Erlenmeyer. Mediante esta técnica se obtiene información muy valiosa en cuanto a las propiedades del mineral frente al proceso bacteriano y otros parámetros, con el fin de definir la máxima extracción del mineral y otros elementos como las condiciones requeridas para acelerar el proceso y el efecto de

transferencias sucesivas de inóculos bacterianos. Siendo la simplicidad de este método su principal ventaja (Misari, 2016).

1.6.6. Factores que influyen en el proceso de biolixiviación

La actividad metabólica bacteriana está influenciada por los siguientes factores: potencial redox (Eh), temperatura, substrato, pH, oxígeno, dióxido de carbono, nutrientes, luz, inhibidores de crecimiento, metales pesados, sustrato mineral y el tamaño de partículas que componen el mineral (Misari, 2016).

1.6.7. Calcopirita

La calcopirita (CuFeS_2) es el mineral más abundante de los sulfuros de cobre, por ello la hidrometalurgia se basa principalmente en la extracción de este mineral. En su composición, el cobre está principalmente en estado cuproso y el hierro se puede presentar en estado férrico dominante y en estado ferroso (Ferreira, 1972).

La calcopirita es de color dorado con una densidad de 4,1 a 4,3 g/cm^3 y una dureza de 3,5 a 4,0 en la escala de Mohr. Su punto de fusión es aproximadamente 880 °C.

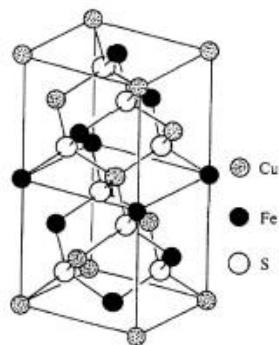
Existen 3 tipos de calcopiritas variable según la temperatura ambiente α (CuFeS_2) calcopirita alfa α (CuFeS_2), calcopirita beta β ($\text{CuFeS}_{1.82}$) y calcopirita gama γ (CuFeS_{2-x}), donde x puede tener valores distintos; las calcopiritas beta y gamma son formas de calcopirita alfa con deficiencia de azufre (Gautier, 2009).

La calcopirita tiene una estructura cristalográfica tetragonal relativamente simple, centrada en la cara, donde los iones de azufre están rodeados por cuatro átomos de cobre

y cuatro átomos de hierro localizado en los ángulos de un tetraedro. Cuando se oxida sufre una destrucción asociada a la pérdida de electrones y a la ruptura de enlaces en su estructura cristalina (Bravo, 2010).

Figura 6

Estructura de la calcopirita.

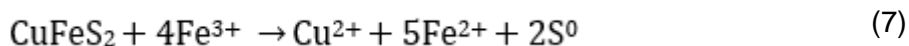


Nota: Tomado de Sand y col. (2001).

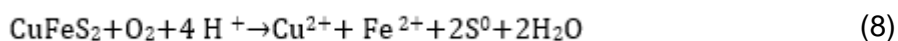
1.6.8. Biolixiviación de la calcopirita

La lixiviación bacteriana de la calcopirita se da a partir de tratamientos hidrometalúrgicos que están dados por la oxidación férrica en presencia de ácido. El incremento en la concentración del ion férrico en solución dará lugar a la liberación de cantidades más altas de cobre. De tal manera que el incremento del potencial de redox, representa una acumulación de Fe^{3+} , lo que debe favorecer la lixiviación de calcopirita (Bravo, 2010).

Se representa de acuerdo a la ecuación (7):



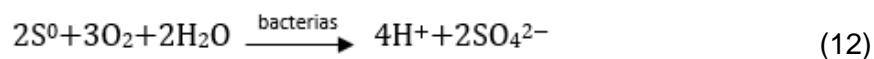
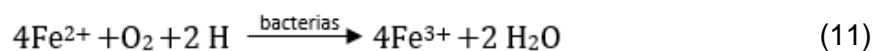
La calcopirita puede ser oxidada por el oxígeno disuelto con el relacionado consumo de ácido, según la ecuación (8):



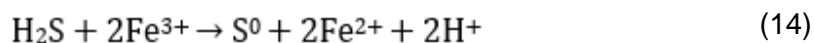
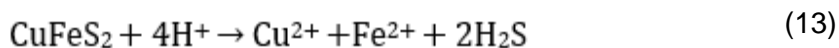
El azufre elemental liberado de la oxidación de la calcopirita puede ser oxidado tanto por iones férrico como por oxígeno disuelto:



La oxidación de ion ferroso a ion férrico como la oxidación de azufre elemental pueden ser catalizadas biológicamente según las ecuaciones (11) y (12):



La lixiviación bacteriana a través del mecanismo del polisulfuro sobre la calcopirita corresponde a las ecuaciones (13) y (14):



La oxidación de la calcopirita va acompañada con la formación de sulfato férrico y ácido sulfúrico. Es destacable el notable incremento de sulfatos con las reacciones que utilizan oxígeno, lo cual podría causar concentraciones excesivas de sulfatos en un circuito cerrado, originando “bleed-off” o sangrías para controlar su nivel. Parcialmente se puede ejercer este control limitando la aireación de soluciones lixiviantes y asegurando la presencia de férrico (Misari, 2016).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. *Material biológico*

Se utilizaron los cultivos microbianos constituidos por las cepas nativas identificadas como *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 y *Leptospirillum* sp. M3E-2020 provenientes de los cultivos aislados a partir de la calcopirita del botadero minero de Toquepala, y la cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 de la colección microbiana de German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ); las cuales fueron cedidas por el Laboratorio de investigación de Biotecnología Microbiana del proyecto de investigación “Aislamiento y aplicación de microorganismos biolixiviantes para la recuperación de minerales provenientes de la actividad minera en la región Tacna”.

2.1.2. *Mineral*

El mineral de estudio fue la Calcopirita (CuFeS_2) de baja ley recolectada a partir de los botaderos de la Mina de Toquepala, la cual fue donada por la empresa Southern Perú Cooper Corporation - Tacna, Perú.

Tabla 2*Composición de la calcopirita.*

| | Estado físico a 20 °C | Sólido |
|----------------|--|--|
| FÍSICA | Apariencia | Forma no definida, menos a 9 pulgadas de diámetro. |
| | Olor | Azufrado (vapores de óxidos de azufre) |
| | Densidad aparente | 1,7 – 1,9 kg/L |
| QUÍMICA | Cobre (Cu) | 0,23 % |
| | Hierro (Fe) | 5,38 % |
| | Azufre (S) | 5,37 % |
| | Sílica (SiO ₂) | ~ 75 % |
| | Óxido de Aluminio (Al ₂ O ₃) | < 9,0 % |
| | Humedad | < 5 % |

Nota: Los valores descritos son indicados en el envase del mineral donado por Southern Perú Cooper Corporation, 2022.

2.1.3. Reactivos

- Sulfato de hierro heptahidratado, FeSO₄ .7H₂O.
- Sulfato de magnesio heptahidratado, MgSO₄ .7H₂O.
- Sulfato de amonio, (NH₄)₂SO₄.
- Fosfato monopotásico, KH₂PO₄.

- Cloruro de potasio, KCl.
- Nitrato de calcio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.
- Azufre elemental, S^0 .
- Ácido sulfúrico concentrado 10N, H_2SO_4 .
- Ácido clorhídrico, HCl.
- Cloruro de bario, BaCl_2 .
- Cloruro de sodio, NaCl.
- Glicerol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$.
- Fluoruro de sodio, NaF.
- Reactivo o-fenantrolina, $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$.
- Hidroxilamina, NH_2OH .
- Etanol 96 %, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.
- Acetato de sodio trihidratado, $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.
- Ácido acético, CH_3COOH .
- Azul de tripano, $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2$.
- Agua destilada
- Agua ultrapura

2.1.4. Equipos

- Microscopio óptico (Micros modelo mc50lea).
- Balanza analítica (Ohaus modelo ex224).
- Incushaker 10L (Benchmark scientific).

- Autoclave (Alp modelo clg-40m).
- Vórtex (Labnet modelo mixer 230v euplug).
- Potenciómetro (Hanna modelo hi3220).
- Agitador c/Calefacción (Arex/velp científica).
- Compresor (Pall life science modelo doa-p730-bn).
- Espectrofotómetro (Biotek modelo epoch/2 microplate reader).

2.1.5. Material de vidrio y otros

- Matraces de 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml y 500 ml.
- Vasos precipitados de 50 ml, 100 ml, 250 ml.
- Matraz de Kitasato de 250 ml y 500 ml.
- Fiolas de 100 ml.
- Probetas de 50 ml, 100 ml y 500 ml.
- Cámara de Petroff-Hausser.
- Pipetas de 1 ml, 5 ml y 10 ml.
- Barillas / baguetas.
- Tubos de ensayo 16 x 125 mm.
- Tubos eppendorf.
- Tubos falcón de 50 ml.
- Micropipetas de 0,1-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l, 5000 μ l y 10000 μ l,
- Puntas compatibles para micropipetas de 0,1-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l, 5000 μ l y 10000 μ l.

- Bombillas de succión.
- Filtro de membrana millipore 0,45 μm y papel filtro 5 - 11 μm de porosidad.
- Funel graduado y tapón de goma.
- Rejillas de tubos de ensayo.
- Manguerillas para el matraz de Kitasato.
- Imanes de homogenización.
- Espátula y pinzas metálicas.
- Papel Kraft e hilo.

2.2. Diseño de la investigación

El análisis estadístico se realizó aplicando el análisis de comparación de varias muestras, donde se realizó la prueba anova.

Se consideró en el experimento de biolixiviación lo siguiente:

El efecto constante: La biolixiviación de la calcopirita.

Tiempo de experimentación: 648 horas.

Variable de respuesta: La productividad de la concentración de cobre en suspensión recuperado en mg/hora.

Los tratamientos fueron el cultivo microbiano con mejor rendimiento biooxidante de hierro y azufre, el consorcio constituido por dos cultivos microbianos puros que tuvo mejor

rendimiento biooxidante de hierro y azufre, el consorcio constituido por tres cultivos y un control.

Tabla 3

Modelo de diseño experimental de la biolixiviación sobre la calcopirita.

| Productividad de la biolixiviación del cobre (mg/horas) | | | | |
|--|-------------------------------|--|---|-------------------------------|
| Repetición | Cultivo microbiano | Consortio de dos cultivos microbianos | Consortio de tres cultivos microbianos | Control |
| R1 | 1,1 | 2,1 | 3,1 | 4,1 |
| R2 | 1,2 | 2,2 | 3,2 | - |
| R3 | 1,3 | 2,3 | 3,3 | - |
| \bar{X} | $\bar{X} 1$ | $\bar{X} 2$ | $\bar{X} 3$ | $\bar{X} 4$ |

Los datos fueron procesados aplicando el Statgraphics Centurion para la aplicación del diseño experimental aplicando el análisis de varianza (ANOVA) y se utilizó Excel 2016 para la realización de gráficos en función de los datos que se obtuvieron.

2.2.1. Variables operacionales

Las variables e indicadores se muestran en el siguiente cuadro:

Tabla 4

Variables e indicadores

| Tipo de variable | Variable | Indicador | Unidad |
|-------------------------|---------------------------------|---|---------------|
| Independiente | Cultivos microbianos | - Cultivo microbiano - Cultivo microbiano en consorcio | Cultivo |
| Dependiente | Biooxidación de hierro y azufre | Concentración de hierro y azufre | g/L |
| | Biomasa | Concentración de células | cel/ml |
| | Biolixiviación de cobre | Producción de cobre | mg/hora |

2.3. Población y muestra

2.3.1. Población

La componen los aislados microbianos obtenidos de una muestra de calcopirita de los botaderos de Toquepala y que forman parte de las muestras de respaldo aisladas y trabajadas por el proyecto de investigación "Aislamiento y aplicación de microorganismos

biolixiviantes para la recuperación de minerales provenientes de la actividad minera en la región Tacna”.

2.3.2. Muestra

La investigación experimental tuvo como muestras a los siguientes cultivos microbianos con capacidad biolixivante seleccionados: Cultivos microbianos nativos *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 (L₁) y *Leptospirillum* sp. M3E-2020 (L₂) y el cultivo microbiano de *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (Af), adquirida del German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.

2.4. Métodos

2.4.1. Reactivación de cultivos microbianos (Zhao y col., 2013).

Se extrajo 7 ml de cada uno de los tres cultivos microbianos que estuvieron en estado de conservación. Lo extraído fue inoculado en matraces de 100 ml de capacidad con 63 ml de medio de cultivo líquido 9k modificado (Anexo 1) pH 2 – 2,2 e incubados a 30°C, con agitación constante de 120 rpm, hasta que se alcanzó una biomasa de 10⁸ cel/ml en los conteos utilizando la cámara Petroff-Hausser con ayuda de un microscopio de campo claro.

2.4.2. Caracterización de los cultivos microbianos.

Para la visualización microscópica, se realizó la técnica de coloración Gram de los cultivos microbianos y se observó la morfología de las bacterias en un microscopio electrónico con un aumento de 1000X. *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 (L₁) y

Leptospirillum sp. M3E-2020 (L₂) se caracterizaron por tener formar espiralada muy móvil y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (Af) se caracterizó por tener forma de bacilos.

2.4.3. Conformación de consorcios microbianos

Se conformó consorcios utilizando los cultivos microbianos para desarrollar el proceso de biooxidación sobre el hierro y azufre utilizando el medio de cultivo 9k modificado suplementado con azufre elemental. Se utilizó el 10 % del inóculo microbiano en suspensión según (Zhao y col., 2013); el volumen total fue 70 ml. Para tal fin, se distribuyó proporcionalmente igual la cantidad entre los cultivos microbianos para la conformación del inóculo total de la siguiente manera:

2.4.3.1. Consorcios de dos cultivos microbianos. Los consorcios de dos cultivos diferentes formados fueron tres: Consorcio *L. ferriphilum* M1D-2020 y *Leptospirillum* sp. M3E-2020 (CL), consorcio *L. ferriphilum* M1D-2020 y *A. ferrooxidans* DSM 14882 (CL₁) y consorcio *Leptospirillum* sp. M3E-2020 y *A. ferrooxidans* DSM 14882 (CL₂). Los consorcios fueron incubados a 30 °C y a 120 rpm.

2.4.3.2. Consorcio de tres cultivos microbianos. El consorcio fue constituido con tres cultivos microbianos, *L. ferriphilum* M1D-2020, *Leptospirillum* sp. M3E-2020 y *A. ferrooxidans* DSM 14882 (C), e incubado a 30 °C y a 120 rpm.

De manera anticipada a las experimentaciones, los cultivos microbianos y los consorcios formados fueron resembrados cada siete días en medio de cultivo 9k modificado suplementado con azufre elemental e incubados a 30°C y a 120 rpm para su

adaptación y la conformación definitiva como cultivo microbiano, y además para evitar el letargo metabólico al cual hace referencia (Misari, 2016).

2.4.4. Instalación de matraces para biooxidación

2.4.4.1. Cultivos puros. Se instalaron 10 matraces, de 100 ml de capacidad, con agitación constante a 120 rpm, considerando que se empleó tres cultivos puros (tres tratamientos), cada uno con tres repeticiones, y un control (sin repeticiones). Cada matraz tuvo 7 ml de inóculo microbiano y 63 ml del medio de cultivo líquido 9k - S (anexo 1) para la biooxidación de hierro y azufre.

2.4.4.2. Consorcios formados por dos cultivos microbianos. Se instalaron 10 matraces, de 100 ml de capacidad, con agitación constante a 120 rpm, considerando que se formó tres consorcios formados por dos cultivos microbianos (tres tratamientos), cada uno con tres repeticiones y un control (sin repeticiones). Cada matraz tuvo 7 ml de inóculo microbiano y 63 ml del medio de cultivo líquido 9k – S modificado (anexo 1) para la biooxidación de hierro y azufre.

2.4.4.3. Consorcio formado por tres cultivos microbianos. Se instalaron 4 matraces, de 100 ml de capacidad, con agitación constante a 120 rpm, considerando que el consorcio formado por tres cultivos microbianos constituyó un solo tratamiento con tres repeticiones teniendo un solo control (sin repeticiones). Cada matraz tuvo 7 ml de inóculo microbiano y 63 ml del medio de cultivo líquido 9k – S modificado (anexo 1) para la biooxidación de hierro y azufre.

2.4.5. Evaluación de biomasa y biooxidación de Hierro por espectrometría (Bravo, 2010).

2.4.5.1. Recuento de biomasa. De cada matraz incubado se extrajo 50 µl del matraz previo homogenizado, se diluyó a 10^{-2} ; para ello se colocó en un tubo eppendorf la muestra junto con 900 µl de H₂O destilada y 50 µl de azul de tripán al 0.4 % (Genómica, 2013).

Se realizó el recuento celular con un volumen de 10 µl en cada muestreo de las repeticiones de cada experimento, utilizando la cámara de Petroff-Hausser y un microscopio de campo claro. Para el recuento se hizo uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento bacteriano (cel/ml)} = (\sum \text{n}^\circ \text{ cel en campo de conteo} / 5) \cdot (1/0,8) \cdot (20) \cdot (10^6)$$

En donde:

- $\sum \text{n}^\circ \text{ cel en campo de conteo} / 5$ = promedio de la sumatoria de los campos contabilizados
- $1/0,8$ = volumen en nanolitros de cada cuadrícula central de la cámara Petroff-Hausser.
- 20 = factor de dilución
- 10^6 = factor de conversión nanolitros a mililitros.

2.4.5.2. Preparación de soluciones. Se prepararon las siguientes soluciones:

Agua pH 2.00, al agua destilada se le agregó H₂SO₄ 10N hasta llegar al pH deseado.

Buffer acetato, se pesó 25 g de acetato de sodio trihidratado y se le disolvió en 20 ml de agua destilada. Se agregó 60 ml de ácido acético glacial y se aforó a 100 ml con agua destilada.

Reactivo o – fen, se pesó 2 g de o – fenantrolina y se mezcló con 60 ml de agua destilada y 2 gotas de HCl 37 %. Se agregó 100 ml de buffer acetato y se aforó a 200 ml con agua destilada. La solución, que es sensible a la luz, se guardó en un frasco oscuro.

Reactivo de trabajo, se diluyó 40 ml de reactivo de o – fen con agua pH 2 hasta 100 ml. Esta solución sensible a la luz se guardó en un frasco oscuro.

Reactivo NaF, se pesó 0,5 g de NaF y se mezcló con 5 ml de agua destilada y 0,5 ml de H₂SO₄ concentrado. La solución se aforó a 25 ml con agua destilada y se almacenó por no más de 24 horas en un frasco de polietileno.

Reactivo Hidroxilamina al 10 % (m/v), se añadió 10 g de clorhidrato de hidroxilamina en un vaso precipitado y se mezcló con agua destilada hasta 100 ml.

2.4.5.3. Preparación de la curva de calibración. La curva de calibración para lecturas de hierro se determinó de la siguiente manera:

Se preparó una solución madre de 100 ppm de FeSO₄·7H₂O y diluciones de esta de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ppm en tubos de ensayo.

A cada tubo se agregó 0,1 ml de Reactivo Hidroxilamina, se agitó y agregó 1 ml de NaF, se agitó y se agregó 1 ml de reactivo de trabajo, nuevamente se agitó y se agregó 0,8 ml de agua destilada pH 2,0, se agitó y se llevó a reposo 3 a 5 minutos y se realizó la lectura en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 510 nm.

Las lecturas de absorbancia fueron procesados en el software del espectrofotómetro Gen5 y en Excel para establecer el gráfico de la curva de calibración.

2.4.5.4. Preparación de las muestras. Estas fueron diluidas agregando 0,1 ml a 9.9 ml de agua destilada a pH 2,0 en un primer tubo de ensayo y de este a otro tubo de ensayo y así sucesivamente hasta que se consiguió diluciones que sirvieron para obtener la curva patrón. Este procedimiento se realizó en cada muestreo para evaluar la oxidación del hierro.

2.4.5.5. Determinación de Fe^{2+} en muestras. Se obtuvo 0,1 ml de cada muestra diluida a ppm se mezcló en tubos de ensayo con 1 ml de NaF y se agitó. Se agregó 1 ml de reactivo de trabajo y se agitó. Se añadió 0,9 ml de agua destilada pH 2,0 y se agitó. El tubo de ensayo se dejó en reposo durante 3 a 5 minutos y se procedió a la lectura en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 510 nm.

2.4.5.6. Determinación de hierro total en muestras. Se obtuvo 0,1 ml de la muestra diluida se mezcló en tubos de ensayo con 0,1 de Hidroxilamina y agitó. Se agregó 1 ml de NaF y agitó. Se agregó 1 ml de reactivo de trabajo y agitó. Se agregó 0,8 ml de agua destilada pH 2,0 y agitó. La solución se puso en reposo durante 3 a 5 minutos y se efectuó la lectura en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 510 nm.

2.4.5.7. Determinación del Fe^{3+} en muestras. Se obtuvo a partir de la diferencia entre el hierro total y el hierro ferroso.

2.4.6. Evaluación de la biooxidación de azufre por turbidimetría (Severiche y González, 2012)

2.4.6.1. Preparación de reactivos. Se utilizaron las siguientes soluciones:

Solución acondicionadora para sulfato, se mezcló 300 ml de H₂O destilada, 30 ml de HCl concentrado 37 %, 100 ml de alcohol isopropílico, 75 g de NaCl, y 50 ml de glicerina. La mezcla se aforó a un volumen 500 ml con agua destilada.

Agua destilada pH 2,0 ajustado con HCl concentrado 37 % y BaCl₂ al 0.4 %, se mezcla 0,4 g del reactivo con 100 ml de agua destilada.

2.4.6.2. Curva de calibración. La curva de calibración para lecturas de sulfatos se determinó de la siguiente manera:

Se preparó una solución madre de 1000 ppm de CuSO₄·5H₂O y diluciones de esta en tubos de ensayo de 0, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm.

Se vertió 5 ml de cada dilución en tubos de ensayo y 0,25 ml de solución acondicionadora para sulfatos y se procedió a agitar. Se agregó 0,5 ml de agua solución de bario 0,4 % y agitó durante unos segundos. Finalmente se procedió a realizar las lecturas en el espectrofotómetro a 420 nm antes de los 3 minutos de duración.

2.4.6.3. Medición de azufre. En tubos de ensayo se agregó 0,5 ml de cada muestra y 4,5 ml de agua pH 2,0 c/HCl, se agitó y agregó 0,25 ml de solución acondicionadora para sulfatos y agitó, se agregó 0,5 ml de cloruro de bario 0,4 % y agitó durante unos segundos. La lectura en el espectrofotómetro se hizo a 420 nm, 3 minutos después de preparadas las muestras.

2.4.7. Preparación del mineral a lixiviar (Acevedo y Gentina, 2005) citado por (Delgado & Castillo, 2015).

El mineral se homogenizó, chancó en la molienda, y se tamizó en una malla 100 hasta que se obtuvo partículas finas menores de 0,15 mm.

2.4.8. Instalación de matraces para biolixiviación

Se instalaron 10 matraces de 250 ml de capacidad con 180 ml de medio líquido 9K modificado suplementado con azufre elemental. El número de tratamientos fueron tres cada uno con tres repeticiones y un control sin repetición ni inóculo. En los tratamientos con repeticiones cada matraz tuvo 20 g de mineral a lixiviar y 20 ml de inóculo microbiano. Los inóculos considerados fueron el cultivo microbiano con mayor rendimiento de biooxidación, el consorcio de dos cultivos microbianos con mayor rendimiento de biooxidación y el consorcio de tres cultivos microbianos. Los matraces fueron incubados a 30 °C y agitados a 120 rpm. La toma de muestra, 5 ml, fue cada 72 horas durante 648 horas. Se evaluó la biomasa, a través del recuento de células por mililitro, la oxidación de hierro (Fe_{TOTAL} y Fe^{2+}), la oxidación del S y la recuperación del cobre lixiviado.

Tabla 5

Tratamientos que se instalaron en los matraces para la biolixiviación de la calcopirita.

| Tratamiento | | Medio de cultivo 9k-S modificado | Inóculo microbiano | Mineral calcopirita |
|---|----|---|---------------------------|----------------------------|
| Cultivo microbiano puro | R1 | 180 ml | 20 ml | 20 g |
| | R2 | 180 ml | 20 ml | 20 g |
| | R3 | 180 ml | 20 ml | 20 g |
| Consorcio de dos cultivos microbianos | R1 | 180 ml | 20 ml | 20 g |
| | R2 | 180 ml | 20 ml | 20 g |
| | R3 | 180 ml | 20 ml | 20 g |
| Consorcio de tres cultivos microbianos | R1 | 180 ml | 20 ml | 20 g |
| | R2 | 180 ml | 20 ml | 20 g |
| | R3 | 180 ml | 20 ml | 20 g |
| Control | - | 200 ml | - | 20 g |

2.4.9. Análisis de Biolixiviación del Cobre a partir de la calcopirita (Bravo, 2015).

2.4.9.1. Filtración de la muestra. Se extrajo 5 ml de muestra biolixiviada y se filtró con papel filtro de celulosa en matraces de 25 ml con el fin de retener los excesos del mineral durante 10 minutos.

2.4.9.2. Determinación de cobre en solución por absorción atómica. Se extrajo 1 ml de filtrado y se vertió en matraces aforados de 100 ml y se aforó con agua ultra pura para luego medir la concentración de cobre mediante la técnica de absorción atómica.

2.4.9.3. Porcentaje de recuperación de cobre. Los valores se obtuvieron utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cu recuperado} = \frac{[\text{Cu}^{+2}]_{\text{final}}}{\text{Cu}_{\text{inicial}}} \cdot 100 \quad (15)$$

2.4.9.4. Productividad de biolixiviación de cobre. Según (Misari, 2016) la productividad está mecanizada como una función de la velocidad de dilución en la biolixiviación y puede ser calculada realizando la primera derivada de la ecuación lineal igual a cero.

2.4.9.5. Visualización por microscopia electrónica de barrido (MEB). Se extrajo 2,5 ml de muestra biolixiviada y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min. El pellet obtenido pasó por un proceso de congelado en nitrógeno líquido (-196 °C) por 5 minutos, luego a la liofilización a -125 °C por 24 horas. Posteriormente las muestras liofilizadas pasaron por un proceso de metalizado en oro para poderse observar en MEB (Ccorahua y Peceros, 2018).

III. RESULTADOS

3.1. Capacidad biooxidativa de cultivos microbianos.

La biooxidación por el cultivo microbiano puro *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 (**L₁**) (Tabla 6) se evidencia en el incremento del Fe³⁺ a través del tiempo hasta el consumo completo del Fe²⁺ como fuente de energía; siendo 6,96 g/L de hierro férrico la concentración más alta obtenida a las 72 horas (Figura 7). asimismo, la concentración de azufre oxidado a sulfato se mantuvo constante, siendo la concentración máxima 1900,31 ppm de SO₄²⁻ formado a las 96 horas (Figura 10). Todo esto paralelo a un crecimiento de biomasa hasta de 3,56 x 10⁹ cel/ml a las 96 horas (Figura 11).

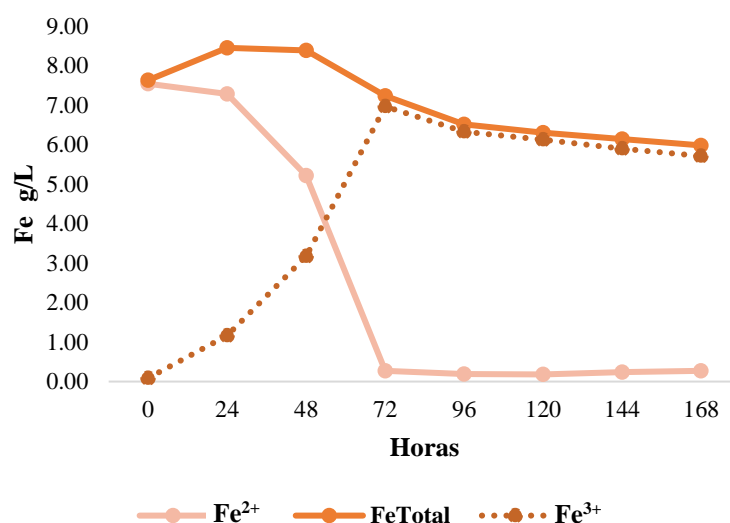
Tabla 6

Concentración promedio de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe total, SO_4^{2-} y biomasa en el cultivo microbiano *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 (L_1), registrado en el proceso de biooxidación durante 168 horas.

| TIEMPO (HORAS) | L_1 | | | | BIOMASA (cel/ml) |
|-------------------|--------------|----------|-----------|----------------------|---------------------|
| | Hierro (g/L) | | | SO_4^{2-} (ppm) | |
| | Fe^{2+} | Fe Total | Fe^{3+} | | |
| 0 | 7,54 | 7,62 | 0,09 | 1508,68 | 1,07E+08 |
| 24 | 7,28 | 8,44 | 1,17 | 1326,21 | 6,28E+08 |
| 48 | 5,21 | 8,38 | 3,17 | 1134,85 | 1,36E+09 |
| 72 | 0,27 | 7,23 | 6,96 | 1886,96 | 2,89E+09 |
| 96 | 0,19 | 6,51 | 6,32 | 1900,31 | 3,56E+09 |
| 120 | 0,18 | 6,30 | 6,12 | 1829,11 | 3,40E+09 |
| 144 | 0,24 | 6,13 | 5,89 | 1717,85 | 2,45E+09 |
| 168 | 0,27 | 5,98 | 5,71 | 1473,08 | 1,36E+09 |

Figura 7

Evolución de la biooxidación de hierro por el cultivo microbiano L₁.



La biooxidación del hierro ferroso a hierro férrico por el cultivo microbiano puro *Leptospirillum sp.* M3E-2020 (L₂) (Tabla 7) se evidencia en el incremento del Fe³⁺ a través del tiempo hasta el consumo completo del Fe²⁺ como fuente de energía; siendo 7,85 g/L de hierro férrico la concentración más alta obtenida a las 96 horas (Figura 8). Asimismo, la concentración de azufre oxidado a sulfato se evidenció que fue constante, siendo la concentración máxima 1944,82 ppm de SO₄²⁻ formado a las 48 horas (Figura 10). Mostrándose un incremento de biomasa de hasta 3,02 x 10⁹ cel/ ml 96 horas (Figura 11).

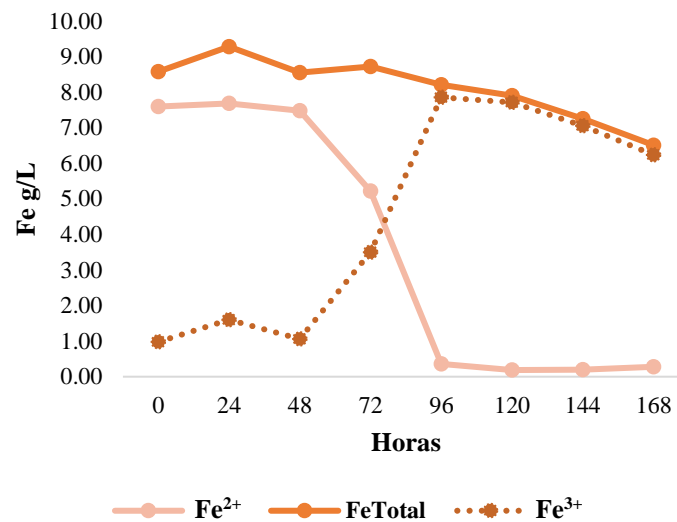
Tabla 7

Concentración promedio de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe total, SO_4^{2-} y biomasa en el cultivo microbiano *Leptospirillum* sp M3E-2020 (L_2), registrado en el proceso de biooxidación durante 168 horas.

| TIEMPO (HORAS) | L_2 | | | | |
|-------------------|--------------|----------|-----------|----------------------|---------------------|
| | Hierro (g/L) | | | SO_4^{2-} (ppm) | BIOMASA (cel/ml) |
| | Fe^{2+} | Fe Total | Fe^{3+} | | |
| 0 | 7,59 | 8,57 | 0,98 | 1726,75 | 9,83E+07 |
| 24 | 7,68 | 9,28 | 1,60 | 1228,30 | 5,25E+08 |
| 48 | 7,48 | 8,55 | 1,07 | 1944,82 | 8,55E+08 |
| 72 | 5,22 | 8,72 | 3,50 | 1068,09 | 1,79E+09 |
| 96 | 0,36 | 8,21 | 7,85 | 1308,41 | 3,02E+09 |
| 120 | 0,19 | 7,90 | 7,71 | 1900,31 | 2,88E+09 |
| 144 | 0,20 | 7,25 | 7,06 | 1637,74 | 2,09E+09 |
| 168 | 0,27 | 6,51 | 6,23 | 1317,31 | 1,30E+09 |

Figura 8

Evolución de la biooxidación de hierro por el cultivo microbiano L₂.



La biooxidación del hierro ferroso a hierro férrico como del azufre a sulfato por el cultivo microbiano puro *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (Af) (Tabla 8) evidenció que se incrementa en el tiempo al igual que la biomasa; siendo el mayor valor de 5,70 g/L de hierro férrico formado a las 48 horas (Figura 9), 3159,77 ppm de SO_4^{2-} formado a las 120 horas (Figura 10) y $4,28 \times 10^9$ cel/ ml formadas a las 48 horas (Figura 11).

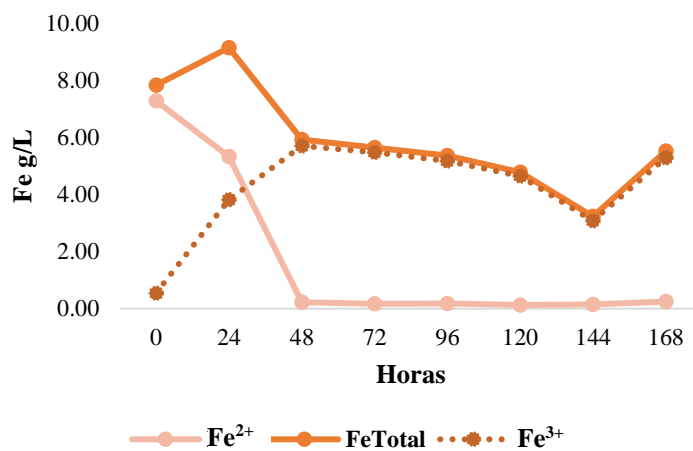
Tabla 8

Concentración promedio de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe total, SO_4^{2-} y biomasa en el cultivo microbiano *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (Af), registrado en el proceso de biooxidación durante 168 horas.

| TIEMPO (HORAS) | Af | | | | |
|-------------------|--------------|----------|-----------|----------------------|---------------------|
| | Hierro (g/L) | | | SO_4^{2-} (ppm) | BIOMASA (cel/ml) |
| | Fe^{2+} | Fe Total | Fe^{3+} | | |
| 0 | 7,27 | 7,82 | 0,55 | 1833,56 | 1,55E+08 |
| 24 | 5,32 | 9,13 | 3,82 | 1388,52 | 1,52E+09 |
| 48 | 0,22 | 5,92 | 5,70 | 1829,11 | 4,28E+09 |
| 72 | 0,17 | 5,64 | 5,46 | 1700,04 | 2,37E+09 |
| 96 | 0,19 | 5,36 | 5,17 | 2963,95 | 2,31E+09 |
| 120 | 0,13 | 4,77 | 4,64 | 3159,77 | 2,37E+09 |
| 144 | 0,15 | 3,23 | 3,08 | 2839,34 | 2,29E+09 |
| 168 | 0,24 | 5,52 | 5,28 | 2785,94 | 2,21E+09 |

Figura 9

Evolución de la biooxidación de hierro por el cultivo microbiano Af.

**Figura 10**

Evolución de la biooxidación de azufre por los cultivos microbianos.

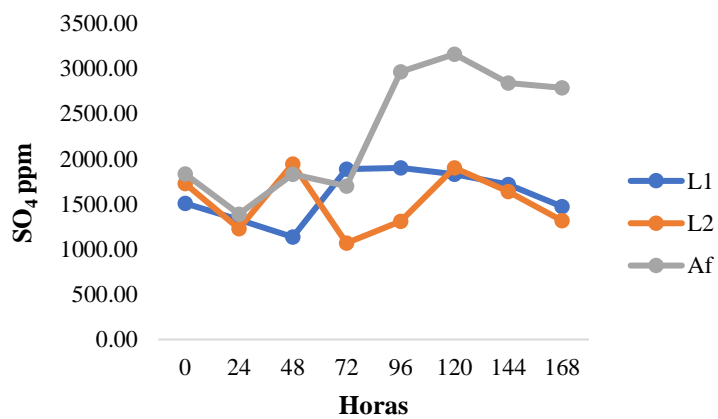
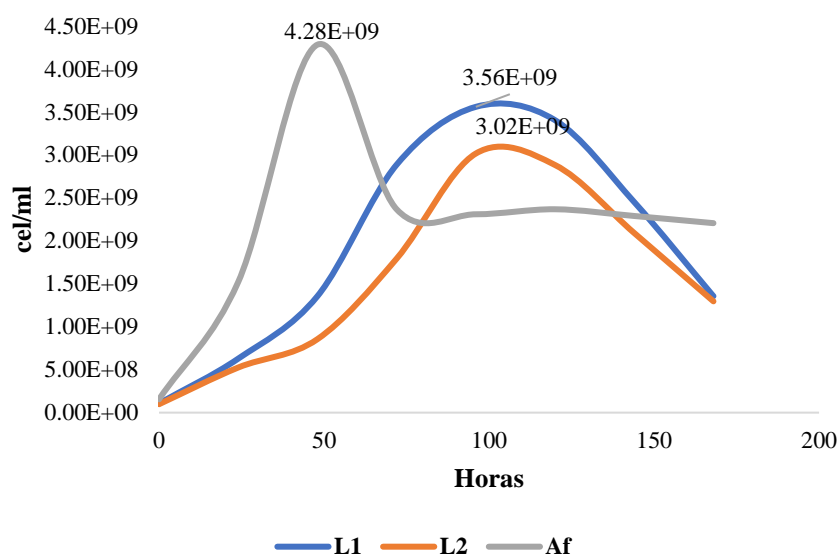


Figura 11

Evolución de la biomasa de los cultivos microbianos.



3.2. Capacidad biooxidativa de consorcios constituidos por dos cultivos microbianos.

La biooxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} se evidenció en el incremento del Fe^{3+} a través del tiempo por la acción oxidativa del cultivo microbiano constituido por dos cultivos puros *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 y *Leptospirillum sp.* M3E-2020 (CL) (Tabla 9), siendo 5,64 g/L la mayor concentración de hierro férrico registrado a las 72 horas (Figura 12). La biooxidación del azufre tiene tendencia a permanecer constante, siendo 961,28 ppm de SO_4^{2-} formado a las 96 horas (Figura 15). La biomasa logró incrementarse hasta $3,61 \times 10^9$ cel/ml a las 48 horas (Figura 16).

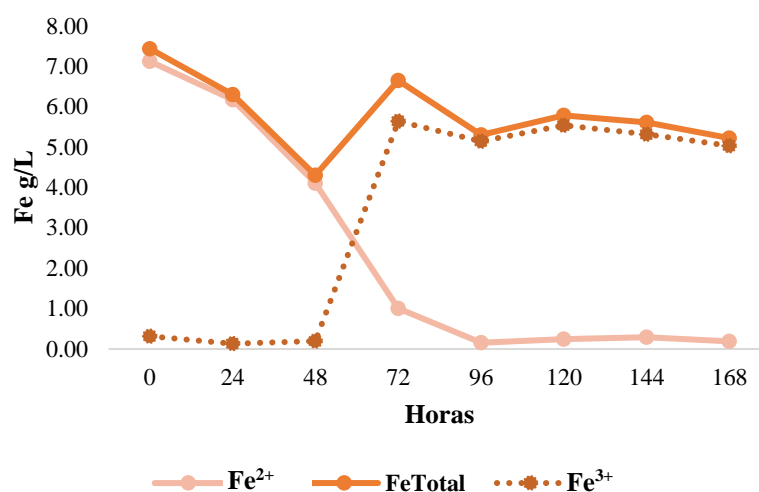
Tabla 9

Concentración promedio de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe total, SO_4^{2-} y biomasa en el consorcio constituido por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 y *Leptospirillum* sp. M3E-2020 (CL), registrado en el proceso de biooxidación durante 168 horas.

| TIEMPO (HORAS) | CL | | | | |
|-------------------|--------------|----------|-----------|----------------------|---------------------|
| | Hierro (g/L) | | | SO_4^{2-} (ppm) | BIOMASA (cel/ml) |
| | Fe^{2+} | Fe Total | Fe^{3+} | | |
| 0 | 7,12 | 7,44 | 0,31 | 529,60 | 2,08E+08 |
| 24 | 6,17 | 6,30 | 0,13 | 667,56 | 7,65E+08 |
| 48 | 4,11 | 4,30 | 0,20 | 841,12 | 3,61E+09 |
| 72 | 1,01 | 6,65 | 5,64 | 605,25 | 2,01E+09 |
| 96 | 0,16 | 5,30 | 5,14 | 961,28 | 2,50E+09 |
| 120 | 0,24 | 5,78 | 5,54 | 850,02 | 2,15E+09 |
| 144 | 0,29 | 5,61 | 5,31 | 600,80 | 1,91E+09 |
| 168 | 0,19 | 5,22 | 5,03 | 547,40 | 1,56E+09 |

Figura 12

Evolución de la biooxidación de hierro por el consorcio CL.



La biooxidación del Fe²⁺ a Fe³⁺ como del azufre a sulfato se evidenció en el incremento a través del tiempo por la acción oxidativa del cultivo microbiano constituido por dos cultivos puros *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (CL₁) (Tabla 10), obteniéndose dos picos de concentraciones elevadas como valores máximos 5,96 y 6,02 g/L de Fe³⁺ registrado a las 48 y 96 horas respectivamente (Figura 13). El incremento de sulfatos más alto se evidenció en 1668,89 ppm a las 96 horas (Figura 15). La biomasa logró incrementarse a 3,86 x 10⁹ cel/ml a las 48 horas del experimento (Figura 16).

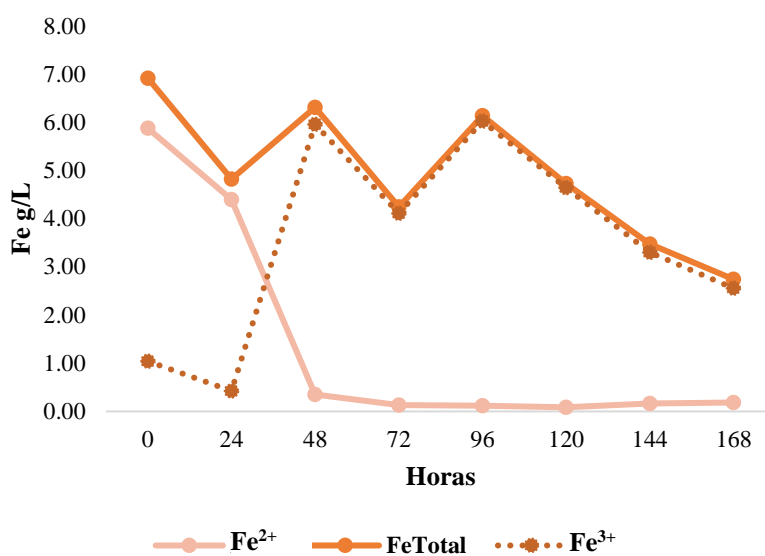
Tabla 10

Concentración promedio de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe total, SO_4^{2-} y biomasa en el consorcio constituido por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (CL_1), registrado en la biooxidación durante 168 horas.

| TIEMPO (HORAS) | CL ₁ | | | | |
|-------------------|------------------|----------|------------------|--|---------------------|
| | Hierro (g/L) | | | SO ₄ ²⁻ (ppm) | BIOMASA (cel/ml) |
| | Fe ²⁺ | Fe Total | Fe ³⁺ | | |
| 0 | 5,88 | 6,92 | 1,04 | 578,55 | 1,82E+08 |
| 24 | 4,40 | 4,82 | 0,43 | 1522,03 | 2,09E+09 |
| 48 | 0,35 | 6,31 | 5,96 | 1637,74 | 3,86E+09 |
| 72 | 0,13 | 4,24 | 4,11 | 1638,63 | 2,31E+09 |
| 96 | 0,12 | 6,14 | 6,02 | 1668,89 | 2,31E+09 |
| 120 | 0,09 | 4,73 | 4,64 | 1259,46 | 2,32E+09 |
| 144 | 0,17 | 3,47 | 3,30 | 1522,03 | 2,31E+09 |
| 168 | 0,19 | 2,74 | 2,56 | 1448,15 | 2,28E+09 |

Figura 13

Evolución de la biooxidación de hierro por el consorcio CL₁.



La biooxidación del Fe²⁺ a Fe³⁺ como del azufre a sulfato se evidenció en el incremento a través del tiempo por la acción oxidativa del cultivo microbiano constituido por dos cultivos puros *Leptospirillum sp. M3E-2020* y *Acidithiobacillus ferrooxidans DSM 14882 (CL₂)* (Tabla 11), obteniéndose el valor más alto de 5,74 g/L de concentración de Fe³⁺ a las 48 y 96 horas (Figura 14); siendo el incremento de sulfatos en su valor más alto 1490,88 ppm a las 96 horas (Figura 15) y el de la biomasa de 3,60 x 10⁹ cel/ml a las 48 horas (Figura 16).

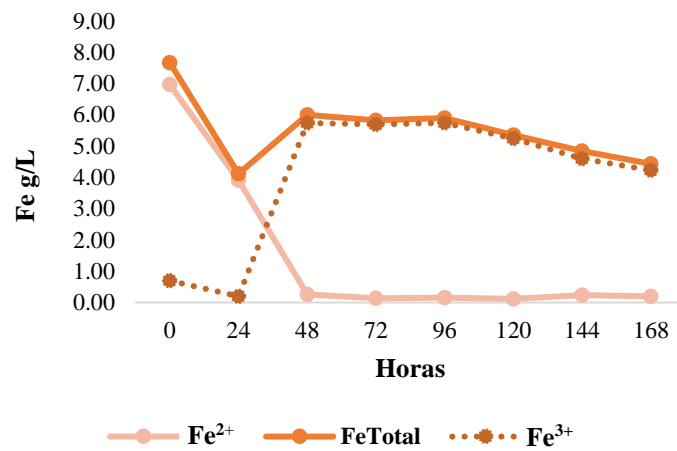
Tabla 11

Concentración promedio de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe total, SO_4^{2-} y biomasa en el consorcio constituido por *Leptospirillum* sp. M3E-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (CL_2), registrado en la biooxidación durante 168 horas.

| TIEMPO (HORAS) | CL_2 | | | | |
|-------------------|--------------|----------|-----------|----------------------|---------------------|
| | Hierro (g/L) | | | SO_4^{2-} (ppm) | BIOMASA (cel/ml) |
| | Fe^{2+} | Fe Total | Fe^{3+} | | |
| 0 | 6,97 | 7,67 | 0,70 | 440,59 | 1,75E+08 |
| 24 | 3,91 | 4,12 | 0,20 | 1508,68 | 1,96E+09 |
| 48 | 0,26 | 5,99 | 5,74 | 1050,29 | 3,60E+09 |
| 72 | 0,14 | 5,83 | 5,69 | 1437,47 | 2,36E+09 |
| 96 | 0,16 | 5,89 | 5,74 | 1490,88 | 2,30E+09 |
| 120 | 0,12 | 5,36 | 5,24 | 1223,85 | 2,14E+09 |
| 144 | 0,24 | 4,84 | 4,60 | 1486,43 | 2,18E+09 |
| 168 | 0,20 | 4,43 | 4,23 | 1361,82 | 2,22E+09 |

Figura 14

Evolución de la biooxidación de hierro por el consorcio CL₂.

**Figura 15**

Evolución de la biooxidación de azufre por consorcios constituidos por dos cultivos microbianos.

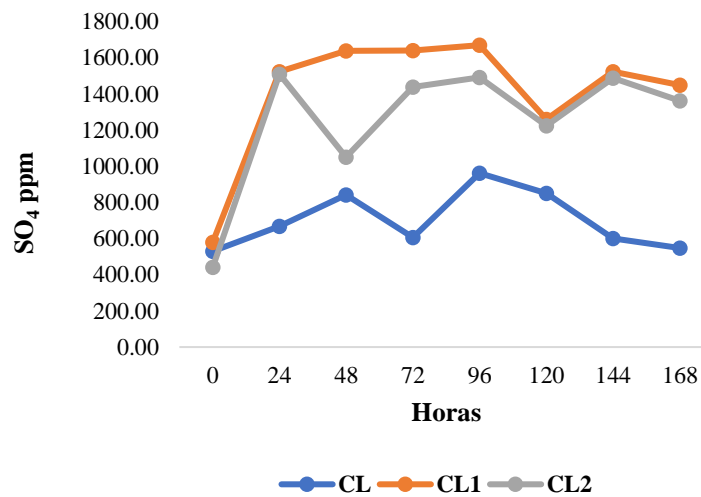
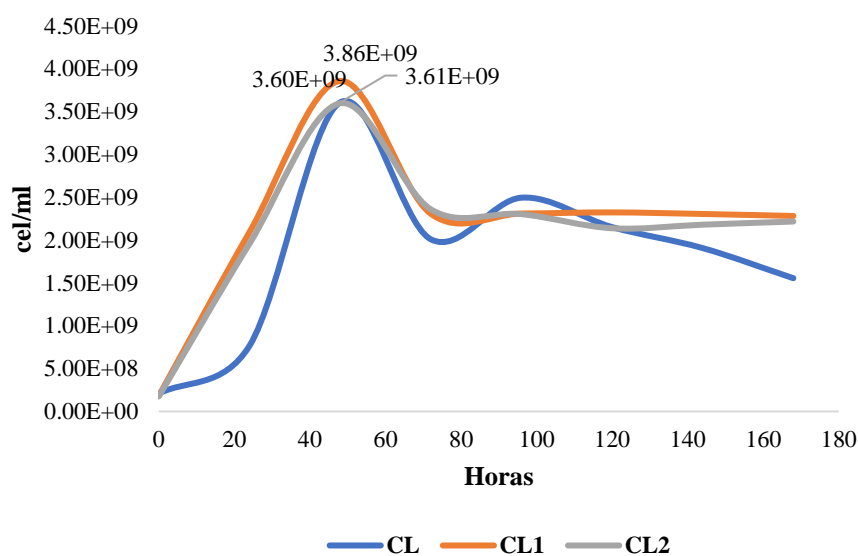


Figura 16

Evolución de la biomasa de los consorcios constituidos por dos cultivos microbianos.



3.3. Capacidad biooxidativa del consorcio constituido por tres cultivos microbianos.

La biooxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} como del azufre a sulfato se evidenció en el incremento a través del tiempo por la acción oxidativa del cultivo microbiano constituido por tres cultivos puros *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020, *Leptospirillum sp.* M3E-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (consorcio) (Tabla 12), obteniéndose el valor más alto de 7,66 g/L de Fe^{3+} a las 48 horas, de sulfatos de 1646,64 ppm a las 168 horas (Figura 17), y de biomasa de $4,83 \times 10^9$ cel/ml a las 48 horas (Figura 18).

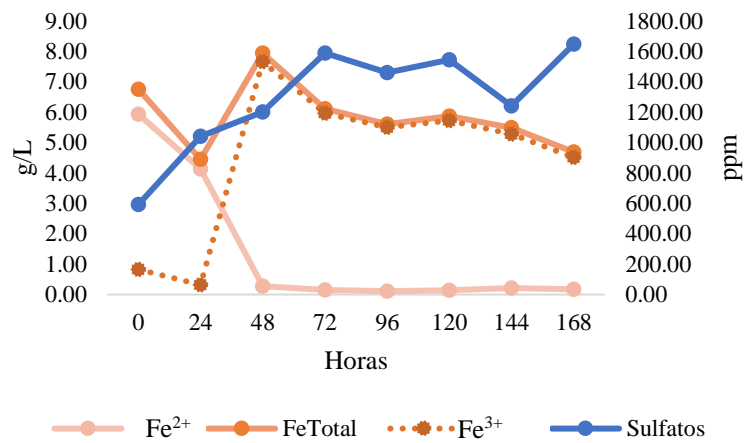
Tabla 12

Concentración promedio de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe total, SO_4^{2-} y biomasa en el consorcio constituido por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020, *Leptospirillum* sp. M3E-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (consorcio), registrado en el proceso de biooxidación durante 168 horas.

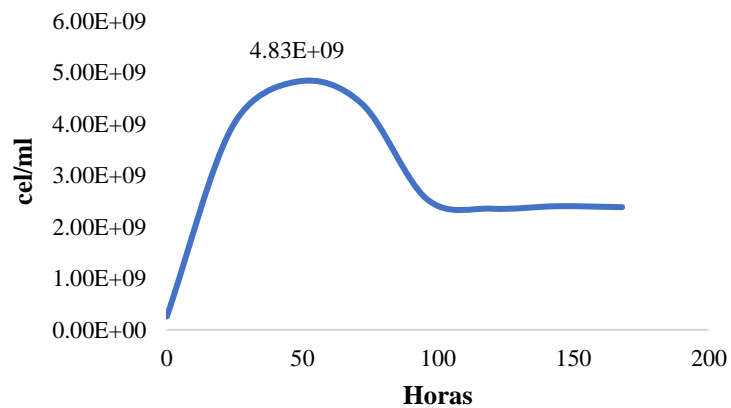
| TIEMPO (HORAS) | Consorcio | | | | |
|-------------------|--------------|----------|-----------|----------------------|---------------------|
| | Hierro (g/L) | | | SO_4^{2-} (ppm) | BIOMASA (cel/ml) |
| | Fe^{2+} | Fe Total | Fe^{3+} | | |
| 0 | 5,93 | 6,75 | 0,83 | 591,90 | 2,62E+08 |
| 24 | 4,13 | 4,45 | 0,32 | 1041,39 | 3,94E+09 |
| 48 | 0,28 | 7,94 | 7,66 | 1201,60 | 4,83E+09 |
| 72 | 0,15 | 6,11 | 5,96 | 1588,79 | 4,40E+09 |
| 96 | 0,11 | 5,61 | 5,49 | 1459,72 | 2,54E+09 |
| 120 | 0,14 | 5,86 | 5,72 | 1544,28 | 2,36E+09 |
| 144 | 0,21 | 5,49 | 5,28 | 1241,66 | 2,41E+09 |
| 168 | 0,17 | 4,69 | 4,51 | 1646,64 | 2,39E+09 |

Figura 17

Evolución de la biooxidación de hierro y azufre por el consorcio.

**Figura 18**

Evolución de la biomasa del consorcio en el experimento de biooxidación de hierro y azufre.



3.4. Capacidad biolixivante de los cultivos microbianos sobre la calcopirita.

La biolixiviación de la calcopirita en cultivo líquido se demostró con su incremento desde el inicio de los experimentos de una pendiente positiva hasta el final del proceso (Tabla 13), manteniendo una relación directa en sus inicios con la biooxidación del hierro y la formación de biomasa, y posterior a sus inicios con la biooxidación del azufre con tendencia en aumento; siendo el consorcio constituido por ***Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020**, ***Leptospirillum* sp. M3E-2020** y ***Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882**, el que tuvo más alta biooxidación de hierro férrico 6,8 g/L a las 648 horas (Figura 19), de sulfato de 3 392 ppm a las 72 horas (Figura 20) y de biomasa de $4,53 \times 10^9$ cel/ml a las 144 horas (Figura 21). Además, el cultivo que logró la mayor concentración de cobre recuperado 0,853 mg/L de cobre en suspensión a las 648 horas (Figura 22).

Se evidenció también que en el experimento control se recuperó 0,64 mg/L de cobre en suspensión, ya que a las 288 horas tuvo la reactivación de la biomasa propia del mineral con $1,0 \times 10^7$ cel/ml.

Tabla 13

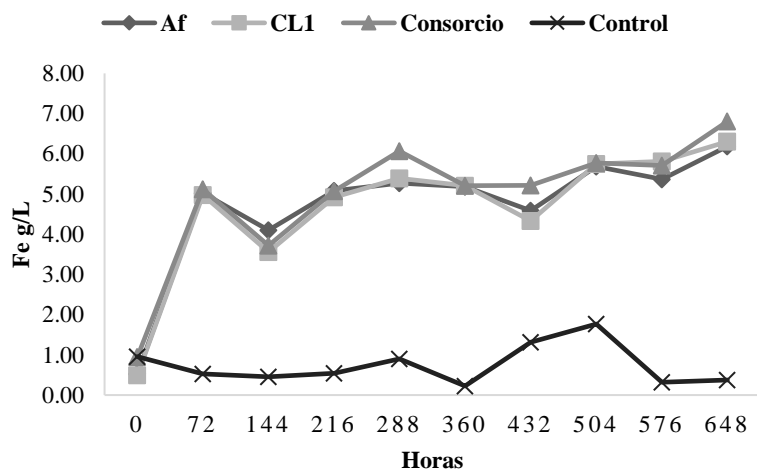
Concentración promedio de Fe^{3+} , SO_4^{2-} , *Cu diluido 1:100 y biomasa en: el cultivo microbiano *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (Af), el consorcio constituido por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (CL_1), el consorcio constituido por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020, *Leptospirillum* sp. M3E-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (Consortio) y un cultivo control; registrado en el proceso de biolixiviación sobre la calcopirita durante 648 horas.

| TIEMPO (HORAS) | Af | | | | CL_1 | | | | Consortio | | | | Control | | | |
|-------------------|--------------------|--------------------|---------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------|---------------------|
| | Fe^{3+} (g/L) | SO_4^{2-} ppm | *Cu (mg/L) | BIOMASA (cel/ml) | Fe^{3+} (g/L) | SO_4^{2-} ppm | *Cu (mg/L) | BIOMASA (cel/ml) | Fe^{3+} (g/L) | SO_4^{2-} ppm | *Cu (mg/L) | BIOMASA (cel/ml) | Fe^{3+} (g/L) | SO_4^{2-} ppm | *Cu (mg/L) | BIOMASA (cel/ml) |
| 0 | 0,53 | 5162 | 0,000 | 1,92E+08 | 0,49 | 3774 | 0,000 | 2,68E+08 | 0,95 | 2888 | 0,000 | 3,42E+08 | 0,96 | 5901 | 0,00 | 0,00E+00 |
| 72 | 5,03 | 1918 | 0,330 | 1,71E+09 | 4,97 | 2452 | 0,327 | 2,04E+09 | 5,12 | 3992 | 0,333 | 2,32E+09 | 0,53 | 2790 | - | 0,00E+00 |
| 144 | 4,10 | 1211 | 0,417 | 4,30E+09 | 3,56 | 1032 | 0,423 | 4,38E+09 | 3,72 | 1064 | 0,437 | 4,53E+09 | 0,45 | 1442 | - | 0,00E+00 |
| 216 | 5,08 | 1264 | 0,467 | 2,51E+09 | 4,92 | 1384 | 0,477 | 2,91E+09 | 5,08 | 1059 | 0,487 | 3,11E+09 | 0,55 | 494 | - | 0,00E+00 |
| 288 | 5,27 | 1749 | 0,523 | 2,63E+09 | 5,39 | 1215 | 0,543 | 2,95E+09 | 6,07 | 1179 | 0,543 | 3,05E+09 | 0,90 | 374 | - | 1,00E+07 |
| 360 | 5,18 | 1602 | 0,583 | 2,55E+09 | 5,21 | 2020 | 0,597 | 2,80E+09 | 5,21 | 1883 | 0,607 | 3,04E+09 | 0,23 | 1308 | - | 8,50E+07 |
| 432 | 4,59 | 3160 | 0,643 | 2,42E+09 | 4,33 | 3320 | 0,650 | 2,49E+09 | 5,21 | 3378 | 0,670 | 2,84E+09 | 1,32 | 2724 | - | 2,50E+08 |
| 504 | 5,68 | 2724 | 0,697 | 2,26E+09 | 5,75 | 2617 | 0,697 | 2,41E+09 | 5,77 | 2888 | 0,720 | 2,65E+09 | 1,77 | 1909 | - | 4,95E+08 |
| 576 | 5,36 | 2483 | 0,750 | 2,25E+09 | 5,81 | 2528 | 0,773 | 2,45E+09 | 5,71 | 1923 | 0,780 | 2,69E+09 | 0,32 | 1642 | - | 7,35E+08 |
| 648 | 6,18 | 2190 | 0,803 | 2,12E+09 | 6,30 | 2319 | 0,830 | 2,33E+09 | 6,80 | 3289 | 0,853 | 2,46E+09 | 0,38 | 2377 | 0,64 | 9,75E+08 |

Nota: *muestra tomada de los tratamientos, diluida a 1:100 y evaluada en un equipo de absorción atómica para medir la concentración de cobre en suspensión de cada experimento.

Figura 19

Evolución de la concentración de Fe^{3+} en la biolixiviación de la calcopirita.

**Figura 20**

Evolución de la concentración de SO_4^{2-} ppm en suspensión evaluado durante el experimento de biolixiviación de la calcopirita.

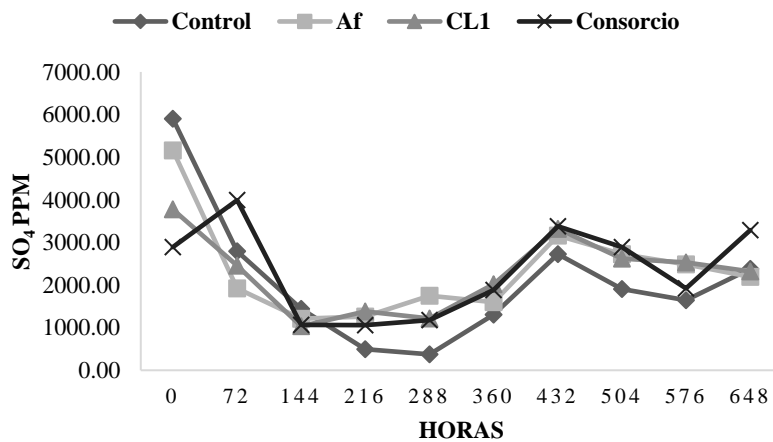
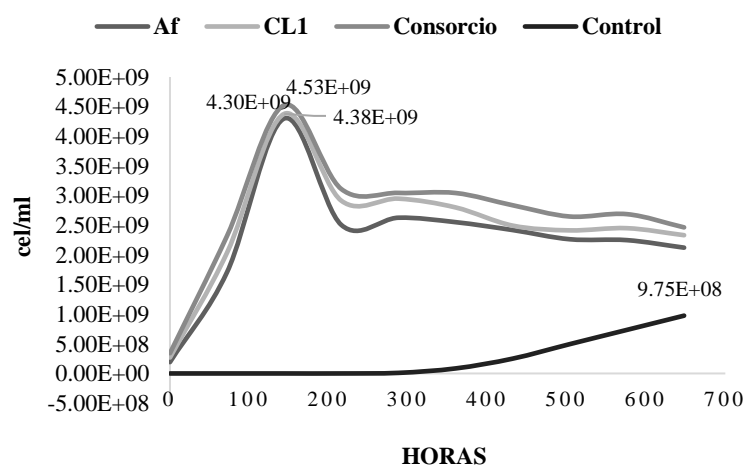
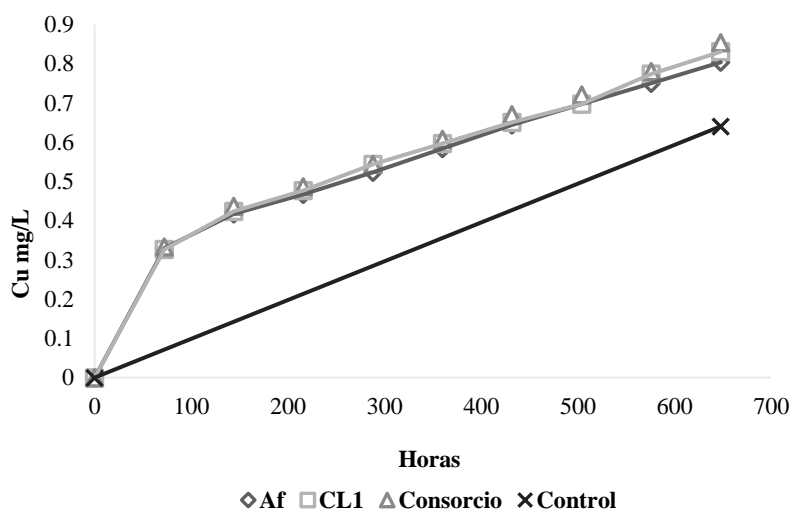


Figura 21

Evolución de la biomasa de los cultivos microbianos en el proceso de biolixiviación sobre la calcopirita.

**Figura 22**

Evolución de la concentración de cobre de las muestras diluidas 1:100 en función de los cultivos microbianos registrado en el proceso de biolixiviación sobre la calcopirita durante 648 horas.



Cada experimento contó con 20 gramos de calcopirita que estuvo compuesto por 0,23 % de cobre, por lo tanto, cada cultivo microbiano en experimentación tuvo para biolixiviar 46 mg de cobre. Los resultados obtenidos en la lectura por absorción atómica nos indicaron la concentración de cobre en suspensión recuperado por cada cultivo microbiano y por diferencia provino el cobre de la calcopirita sólida (Tabla 14). El consorcio microbiano constituido por ***Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020, *Leptospirillum* sp. M3E-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882** fue el que biolixivió mayor cantidad de calcopirita dando como resultado 17,07 mg de cobre en suspensión y quedando 28,93 mg como parte de la calcopirita no lixiviada (Figura 23).

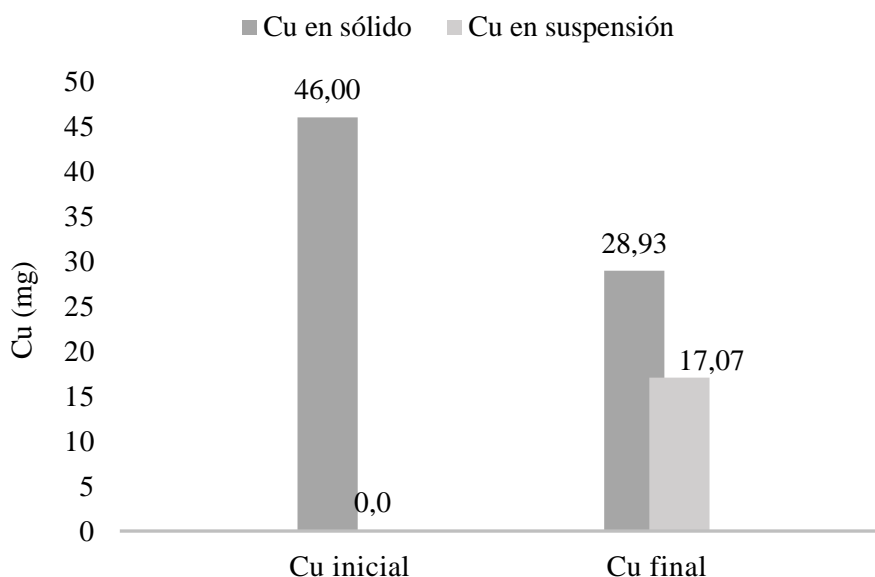
Tabla 14

Concentración promedio del cobre biolixiviado en suspensión y en mineral sólido en los experimentos de biolixiviación.

| TIEMPO (DÍAS) | Cu en suspensión (mg) en 200 ml de medio lixiviado por tratamiento | | | | Cu en sólido (mg) en 20 g de calcopirita por tratamiento | | | |
|--------------------------|---|-----------------------|------------------|----------------|---|-----------------------|------------------|----------------|
| | Af | CL₁ | Consortio | Control | Af | CL₁ | Consortio | Control |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 46,00 | 46,00 | 46,00 | 46,00 |
| 72 | 6,60 | 6,53 | 6,67 | - | 39,40 | 39,47 | 39,33 | - |
| 144 | 8,33 | 8,47 | 8,73 | - | 37,67 | 37,53 | 37,27 | - |
| 216 | 9,33 | 9,53 | 9,73 | - | 36,67 | 36,47 | 36,27 | - |
| 288 | 10,47 | 10,87 | 10,87 | - | 35,53 | 35,13 | 35,13 | - |
| 360 | 11,67 | 11,93 | 12,13 | - | 34,33 | 34,07 | 33,87 | - |
| 432 | 12,87 | 13,00 | 13,40 | - | 33,13 | 33,00 | 32,60 | - |
| 504 | 13,93 | 13,93 | 14,40 | - | 32,07 | 32,07 | 31,60 | - |
| 576 | 15,00 | 15,47 | 15,60 | - | 31,00 | 30,53 | 30,40 | - |
| 648 | 16,07 | 16,60 | 17,07 | 12,80 | 29,93 | 29,40 | 28,93 | 33,20 |

Figura 23

Concentración de cobre (mg) inicial y final en la biolixiviación de la calcopirita por el consorcio constituido por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020, *Leptospirillum* sp. M3E-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 durante 648 horas.



El mayor porcentaje en masa del cobre recuperado fue del 37.09 % del consorcio formado por cultivos microbianos *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020, *Leptospirillum* sp. M3E-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 a las 648 horas. Los cultivos microbianos Af y CL₁ tuvieron porcentajes cercanos de Cu recuperado de 34.93 % y 36.09 % respectivamente; el experimento control también tuvo un porcentaje de Cu recuperado del 27.83% (Figura 24).

El consorcio fue quien presentó la mejor productividad de recuperación de cobre en la biolixiviación de la calcopirita de baja ley, con una tendencia creciente de recuperación de cobre con el valor promedio de 0,0216 mg/hora (Figura 25).

Figura 24

Porcentaje de cobre recuperado, en función de los cultivos microbianos, registrado en el proceso de biolixiviación sobre la calcopirita durante 648 horas.

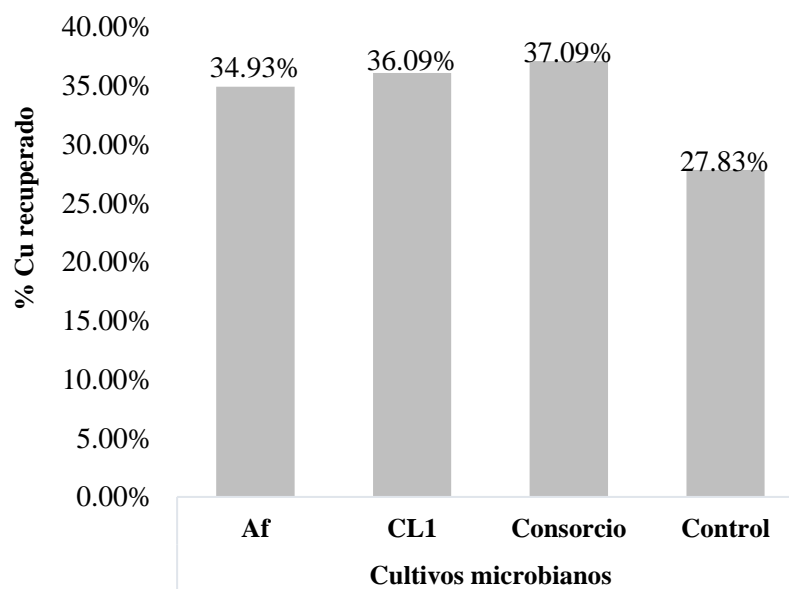
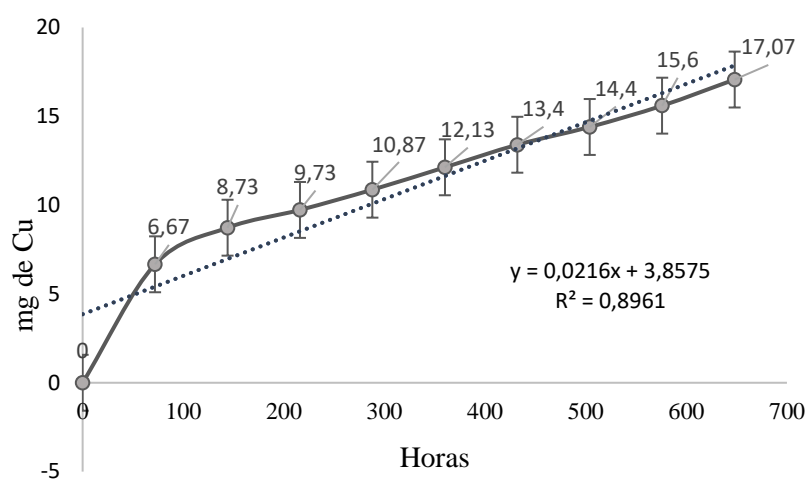


Figura 25

Producción de cobre en suspensión lixiviado por el consorcio constituido por *L. ferriphilum* M1D-2020, *Leptospirillum* sp. M3E-2020 y *A. ferrooxidans* DSM 14882 en la biolixiviación durante 648 horas.

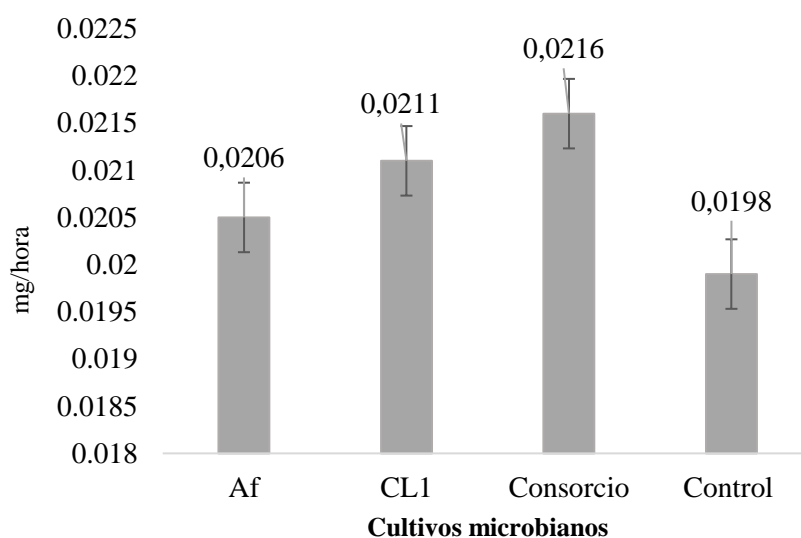
**Tabla 15**

Productividad de la biolixiviación del cobre (mg/hora).

| Productividad de la biolixiviación del cobre (mg/hora) | | | | |
|--|-------------------------|---------------------------------------|--|---------|
| Repetición | Cultivo microbiano puro | Consortio de dos cultivos microbianos | Consortio de tres cultivos microbianos | Control |
| R1 | 0,0208 | 0,0208 | 0,0215 | 0,0198 |
| R2 | 0,0206 | 0,0212 | 0,0222 | - |
| R3 | 0,0205 | 0,0212 | 0,0211 | - |
| \bar{X} | 0,0206 | 0,0211 | 0,0216 | 0,0198 |

Figura 26

Medias de la productividad de cobre (mg/hora) al 95 % de confianza de la mínima diferencia significativa (LSD).



Por el análisis de varianza, puesto que el valor-P 0,0007 de la razón-F 17,96 es menor que 0,05, con un nivel de confianza del 95 %, existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la productividad de biolixiviación de cobre entre los tratamientos (Tabla 15). Las medias de los cultivos microbianos obtenidas fueron los siguientes valores: media de Af = 0,0206 mg/hora, media de CL₁ = 0,0211 mg/hora, media del consorcio = 0,0216 mg/hora y media del cultivo control = 0,0198 mg/hora, lo cual indica que no existe similitud de medias entre los cultivos microbianos (Figura 26).

IV. DISCUSIÓN

La biolixiviación es el proceso convencional de lixiviación, catalizado biológicamente, pero aplicado a los minerales sulfurados, ante la necesidad de aumentar la cinética de su disolución para la obtención de un metal de valor presente en el mineral (Lagos y Guzmán, 2009); su aplicación para la recuperación de metales a partir de minerales de baja ley como la calcopirita es un proceso valioso para reciclar los desechos mineros y así la desintoxicación de sitios contaminados (Mishra y Rhee, 2010).

Las cepas utilizadas en los experimentos fueron corroborados en sus características microscópicas y fisiológicas de mesófilas, acidófilas y de oxidación del hierro y el azufre, por lo cual son las más utilizadas en la biominería (Tirado, 2015).

La biooxidación del hierro por acción microbiana produjo un incremento progresivo de la concentración del hierro férrico; siendo el cultivo microbiano puro constituido por *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882, quién logró oxidar y desabastecer la fuente de hierro ferroso del medio de forma más rápida y no generando niveles muy altos de hierro férrico. Situación similar se observó en el consorcio microbiano formado por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (CL₁) con la característica que el incremento del hierro férrico se obtuvo en un tiempo más corto. Esto permite comprobar la utilidad del hierro ferroso como fuente primaria de energía, siendo el elemento que se consume más rápido y decrece durante el desarrollo de los experimentos; en el caso

de que fuesen encontradas concentraciones elevadas de este mineral nos indicaría que algo inhibe la acción oxidadora de las bacterias (Alvarez, 2017).

Según (Misari, 2016), la biooxidación del azufre no es realizada por *Leptospirillum ferriphilum*, ya que carece de capacidad sulfooxidante, no obstante, si se da con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, debido a que posee capacidad oxidadora de azufre, lo cual se evidencia en los experimentos previos a la biolixiviación, en donde *A. ferrooxidans* tuvo incrementos de sulfatos y los cultivos microbianos nativos no. La formación de sulfatos es sucesiva a la biooxidación del hierro, ya que después de esta, se generan metales insolubles sulfurados que son liberados al medio; estos sulfuros por acción bacteriana se disuelven y en presencia del ion férrico se produce los tiosulfatos. Algo similar encontró (Pacheco, 2013), al determinar que la acidez del medio de cultivo y la presencia de intermediarios producidos por la oxidación parcial del azufre elemental y de sulfatos y ácido sulfúrico ocasionan valores lineales durante el proceso de biooxidación del azufre y no exponenciales, lo cual corresponde debido al comportamiento de las bacterias sulfooxidantes.

El medio de cultivo líquido empleado, medio 9k modificado (Silverman y Lundgren, 1959), suplementado con sulfato de hierro y azufre elemental como fuentes de energía, es el indicado para las pruebas de biolixiviación con bacterias acidófilas sulfooxidantes; no obstante, al añadirse el azufre como elemento de suplementación para la prueba de biooxidación, este muy probablemente provoque la formación de otros precipitados, lo cual interfiere con la actividad bacteriana lixivante debido a que cubre la superficie de la calcopirita (Misari, 2016).

Los factores que intervienen en la biolixiviación como temperatura, pH, agitación, aireación, tamaño de partículas del substrato mineral, entre otros, son determinantes para obtener mejores resultados en la recuperación del mineral a lixiviar; mientras las partículas del mineral fueron más pequeñas, la biomasa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* se incrementó, por lo que se deduce mayor adherencia de biomasa al mineral, lo que promueve mayor biolixiviación (Huarachi-Olivera y col., 2017). El tamaño de las partículas del mineral trabajado fueron no mayores a 0,149 mm de diámetro.

Las especies nativas del género *Leptospirillum* y la adquirida *Acidithiobacillus ferrooxidans* muestran en la biomasa un mismo patrón de crecimiento exponencial dentro de la lixiviación del mineral calcopirita, con una etapa de disminución después de la fase logarítmica, la cual puede deberse a que el medio de cultivo que les proporciona directamente el hierro ferroso como fuente primaria de energía, empezó a empobrecerse y con ello el incremento de la adherencia bacteriana a la superficie del mineral; por lo que cada vez existió un decrecimiento de biomasa en los conteos, situación que evidenciaría la lixiviación por el método de contacto bacteria-mineral, lo que conllevaría a la oxidación de sulfuros en la superficie mineral permitiendo la liberación del cobre de la calcopirita y su recuperación como solución de cobre (Bravo, 2010). Por lo general, la mayoría de los microorganismos biolixiviantes como las especies de los géneros *Leptospirillum* y *Acidithiobacillus* permanecen adheridos en la superficie del mineral, formando una biopelícula, que facilita la cesión de electrones para el desprendimiento de los elementos (García, 2007); por lo cual el verdadero valor poblacional del crecimiento microbiano dentro

del proceso de lixiviación de calcopirita es mucho mayor de lo que se genera para obtener la curva de crecimiento de biomasa.

El consorcio microbiano formado por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 y *Leptospirillum sp* M3E-2020 y el cultivo microbiano no nativo *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882, fue el que produjo la mayor concentración de cobre recuperado a través de la biolixiviación sobre la calcopirita con un porcentaje de 37,09 % del total de mineral presente en una muestra de 20 gramos de calcopirita en 648 horas. Los análisis estadísticos demostraron que existe diferencia significativa entre los tratamientos en la recuperación de cobre bajo las condiciones estudiadas; fue un hecho que los tratamientos conservan diferencias que favorecen la eficiencia de la capacidad biolixivante del consorcio con respecto a su productividad. El porcentaje de cobre recuperado por este consorcio microbiano fue mucho mayor comparado al de 17,29 % de cobre de una muestra de 10 gramos de calcopirita en condiciones de 21 °C, pH 2,0 y 120 rpm por acción biolixivante de otro consorcio microbiano en 28 días (De Los Santos y Sánchez, 2018). También, en la experimentación de biolixiviación de la calcopirita con *Acidithiobacillus ferrooxidans* en condiciones mesófilas, (Bravo, 2010) logró recuperar 7,3 % de cobre, este valor porcentual de recuperación de cobre también fue obtenido en otro trabajo (Sasaki y col., 2009).

El tratamiento control tuvo desarrollo biomasa microbiana, de biooxidación y por ende también presentó biolixiviación de cobre, lo que demuestra que el proceso de esterilización en autoclave mineral calcopirita fue insuficiente antes de aplicarse a los tratamientos, ya que no produjo la muerte de toda la flora microbiana del mineral considerando que, a las 288

horas hubo crecimiento microbiano, y que la biooxidación obtenida fue por acción de la flora microbiana que empezó a reactivarse; sin embargo, se tiene conocimiento que el mineral al exponerse a altas temperaturas, como el de la esterilización en autoclave, se oxida formando óxidos de cobre (Piceros, 2016). Esta situación perjudicaría la biooxidación y biolixiviación del cobre.

En la biolixiviación del cobre de la calcopirita a 30 °C, pH 2,0 y a 120 rpm durante 648 horas, el consorcio microbiano constituido por dos cultivos nativos y un cultivo adquirido, recuperó mayor concentración de cobre con una productividad promedio de 0,0216 mg/hora, esto nos demuestra que la capacidad biolixivante de los cultivos microbianos en consorcio es más eficiente al de un cultivo microbiano, debido a la interacción del conjunto mixto de bacterias que facilitarían la acidificación del medio y la biooxidación para una mayor disolución del mineral acelerando el mecanismo de biolixiviación (Tapia, 2016). El consorcio al actuar sobre el mineral de calcopirita de baja ley permitió la recuperación de 17,07 mg de cobre, lo que constituye una reducción del 0,09 % al porcentaje total compuesto del mineral. La composición de cobre del mineral de 0,23 % se pudo reducir a 0,14 % en 648 horas (27 días), lo cual se explica en función de la sinergia. A pesar de que los valores porcentuales de recuperación de cobre entre los tratamientos fueron cercanos; si existió diferencia significativa entre la productividad de las concentraciones de cobre recuperado por horas, lo que indicaría que el uso de consorcios constituidos por cultivos nativos en sinergia con cultivos microbianos de bacterias adquiridas de colecciones certificadas, generaría que la productividad en la biolixiviación de la calcopirita sea mejor no solo en condiciones de

laboratorio sino también a gran escala. El sinergismo propicia sincronía metabólica de los microorganismos oxidantes en el proceso de biolixiviación de la calcopirita lo que permite un mejor rendimiento de recuperación de cobre (Delgado y Castillo, 2015).

La poca diferencia entre los porcentajes de recuperación de cobre obtenidos en los tratamientos podría incrementarse aún más en medida que se extienda el periodo de experimentación hasta el punto donde la recuperación de cobre se concluya, considerando que todos los tratamientos tuvieron tendencia creciente hasta el fin de la experimentación.

V. CONCLUSIONES

En las condiciones trabajadas se concluye que:

1. Entre los cultivos microbianos, el cultivo microbiano adquirido *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 fue el más eficiente para la biooxidación de hierro y azufre.
2. Entre los cultivos de consorcios constituidos por dos cultivos microbianos, el consorcio constituido por el cultivo nativo *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 y el cultivo adquirido *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 fue el más eficiente para la biooxidación de hierro y azufre.
3. Entre los consorcios microbianos y cultivos microbianos el más eficiente en la lixiviación de cobre a partir de calcopirita fue el consorcio constituido por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020, *Leptospirillum* sp. M3E-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882, ya que lixivió mayor cantidad de cobre, recuperando 17,07 mg de Cu que representa el 37.09 % del total de una muestra de 46 mg de cobre contenido en 20 gramos de calcopirita con una productividad de cobre lixiviado de 0,0216 mg/hora.

VI. RECOMENDACIONES

Para futuros experimentos en biolixiviación de calcopirita se recomienda:

1. Realizar el enriquecimiento de los cultivos microbianos con incubación de 7 a 15 días para evitar que el metabolismo microbiano sea lento y no se afecte el tiempo de la biooxidación.
2. Realizar la evaluación de la biolixiviación durante un tiempo más prolongado para llegar a conocer el punto máximo de lixiviación.
3. Seguir la metodología de lectura por espectroscopia para la medición de hierro y sulfatos de forma ordenada, ya que una pequeña modificación alteraría enormemente el resultado.
4. Seguir la metodología establecida para la preparación del medio de cultivo líquido 9k suplementado con hierro y azufre elemental para mezclar los componentes; es necesario seguir el orden de estos y que la temperatura de la primera solución autoclavada sea menor a 45°C para que al momento de mezclarla con la solución de sulfato de hierro esterilizado por filtro al vacío se evite la precipitación de los sulfatos.

5. Realizar el conteo microbiano en la cámara Petroff-Hausser previa filtración y dilución de las muestras biolixiviadas, ya que un exceso de mineral no permitiría un adecuado conteo.

6. Realizar un estudio de la producción de biopelículas de exopolisacáridos (EPS) en este tipo de microorganismos en el proceso de biolixiviación de calcopirita debido a que en los conteos bacterianos se evidenció cúmulos de bacterias agrupadas en las fases de crecimiento exponencial.

7. Realizar un estudio de la capacidad biolixivante tomando en cuenta la formación de jarosita, covelina y otros precipitados, ya que son probables compuestos que se forman durante el proceso que causarían interferencia.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, F., Gentina, J. (2005). Fundamentos y Perspectivas de las Tecnologías Biomineras. *Archivos de Ingeniería Bioquímica*, 3–24. www.euv.cl
- Akcil, A., Ciftci, H. & Deveci, H. (2007). Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcopyrite concentrate. *Minerals Engineering*, 20(3), 310-318.
- Alpaca, M. (1998). Biolixiviación nueva: La opción metalúrgica. *Revista del instituto de investigación de la Facultad de Geología, Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas*. https://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/publicaciones/geologia/v01_n2/biolix.htm
- Alvarez, J. (2017). Evaluación de la biooxidación de concentrado arsenopirítico aurífero por pretratamiento con bacterias quimiolitotrofas acidófilas que mejoren la recuperación del oro por cianuración en la empresa minera Eminsol S.A. Bolivia – 2015. *Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann*. <http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/2487>
- Alvarez, I., Hernandez, L. (2011). *Determinación del contenido total de hierro presente en un mineral de hierro, por el método de volumetría de óxido-reducción*. Universidad Nacional Experimental Politécnica Antonio José de sucre.
- Bernardelli, C., Cazón, J. P., Urbietta, M. S., & Donati, E. R. (2017). Biominería: Los Microorganismos en la Extracción y Remediación de Metales. *Artículos técnicos*, 368, 47–56.

- Bravo, D. (2010). *Biolixiviación De Calcopirita Por Sulfobacillus Acidophilus*. Tesis de pregrado, Universidad de Chile.
- Cabaña, R. (2005). Determinación de sulfato ferroso por espectroscopia visible. *Mermoria. Encuentro de jóvenes investigadores*. España.
- Carmona, M. & Adaros, C. (2000). *Análisis secuencial de cobre aplicado al reconocimiento de especies mineralógicas y pruebas metalúrgicas*. Tesis de pregrado. Universidad de Tarapacá.
- Castillo, D., Castellanos, R., & Tirado, E. (2021). Acción biooxidativa de cultivos microbianos biolixiviantes sobre la arsenopirita. *Ciencia & Desarrollo*, 20(1), 57–69. <https://doi.org/10.33326/26176033.2021.1.1108>
- Castillo, D., & Eyzaguirre, P. (2019). Biolixiviación indicativa del sulfato de cobre por crecimiento microbiano ante el drenaje minero. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 21(1), 49–56. <https://doi.org/10.18271/ria.2019.444>
- Ccorahua, R.; Peceros, M. (2018). *Procedimiento para la visualización de muestras en MEB y XRD*.
- Codelco Educa. (2018). Biolixiviación: “Bacterias comepiedras”. *Codelco*. Chile, 1–9
- Colmer, A. R., & Hinkle, M. E. (1947). The role of microorganisms in acid mine drainage: A preliminary report. *Science*, 106(2751), 253–256. <https://doi.org/10.1126/science.106.2751.253>

Cortés, R. (2010). Revisión de experiencias en biolixiviación en Perú y Chile Dolores actuales de la industria minera mundial. *Biominería & Biotecnología S.A.C.* <https://docplayer.es/18458581-Revision-de-experiencias-en-biolixiviacion-en-peru-y-chile.html>

De Los Santos, I., & Sánchez, Y. (2018). *Efecto del pH en el proceso de biolixiviación de cobre a través de un consorcio bacteriano aislado a partir de drenajes ácido de la empresa minera Huinac S.A.C del departamento de Ancash en condiciones de laboratorio.* Tesis de pregrado, Universidad Nacional del Santa. <http://repositorio.uns.edu.pe/bitstream/handle/UNS/2557/23177.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Delgado, S. (2015). *Efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo microbiano biolixivante.* Tesis de pregrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Delgado, S., & Castillo, D. (2015). Efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo microbiano biolixiante. *Revista Ciencia & Desarrollo*, 20, 59–64.

Deloya, A. (2012). Tratamiento de desechos del cianuro por biorremediación. *Revista Tecnología en Marcha*, 25(2), 61–72. <https://doi.org/10.18845/tm.v25i2.317>

Eyzaguirre, P. (2016). *Influencia de la concentración de cobre en la biooxidación del fierro y en el crecimiento celular de un cultivo microbiano biolixivante de cobre.* Tesis de

pregrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Ferreira, R. (1972). *Leaching of chalcopyrite*. Tesis doctoral, University of London.

Galleguillos, P., Remonsellez, F., Galleguillos, F., Guiliani, N., Castillo, D. & Demergasso, C. (2008). Identification of differentially expressed genes in an industrial bioleaching heap processing low-grade copper sulphide ore elucidated by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Hydrometallurgy*. 94. 148–154

Gagliuffi, P., & Vera, M. (2018). *Caracterización petromineralógica de los yacimientos de Toquepala y Cuajones* (Patent Núm. N° 49). Boletín Serie B: Geología Económica.

García, J. (2007). Río Tinto y Leptospirillum. *repositorio de la UNAM*, 8, 1–141. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/1944/6300_garcia_moyano.pdf?sequence=1

Gautier, V. (2009). *Estudio de las interacciones microorganismo-mineral en la biolixiviación de la calcopirita con Sulfolobus metallicus*. Tesis de pregrado, Universidad de Chile. http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2007/celis_c/sources/celis_c.pdf

Genómica, V. H. (2013). Conteo celular y evaluación de viabilidad. En C. Commons (Ed.), *Standard operating procedures*.

Gómez, E. (2007). *Tipificación por métodos moleculares de microorganismos acidófilos presentes en los terreros de lixiviación de Mexicana de Cananea* [Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.]. <https://repositorio.ipicyt.edu.mx/bitstream/handle/11627/201/GomezRodriguez.pdf?sequence=1>

ence=1&isAllowed=y

Gonzales, A. (2010). Influencia de la acción química del oxígeno en la lixiviación química y biológica de calcopirita a 70°C. Universidad de Chile. En *Addiction*. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.1995.tb02822.x>

Ho-Lock, D. (2009). Aplicaciones en la biometalurgia. *Revista de Química*, 23(1–2), 25–30.

Huarachi-Olivera, R., Dueñas-Gonza, A., Yapó, U., Almanza, M., Manuel, D., Lazarte-Rivera, A., Mogrovejo-Medina, G., Taco-Cervantes, H., & Esparza, M. (2017). Biolixiviación de mineral cuarzo por *Acidithiobacillus ferrooxidans* en reactor de columna por gravedad. *Revista de Metalurgia*, 53(2), 470. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.096>

Kelly, D., Wood, A., & Stackebrandt, E. (2005). Genus *Thiobacillus* Beijerinck. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. En *Bergey's Manual Trust* (2a ed., Vol. 2, pp. 64–69). https://www.researchgate.net/publication/230682735_Genus_Thiobacillus_Bejerinck

Lagos, C., & Guzmán, X. (2009). Biolixiviación: Desarrollo actual y sus expectativas. En *COCHILCO* (p. 30). COCHILCO.

Ly, M. (2009). Perspectivas de la Biominería en el Perú. *1ª Conferencia Nacional de Biotecnología*, 101. <https://es.scribd.com/document/400033961/15-M-Ly-Biomineria-en-Peru>

Machaca, W., & Sotillo, C. (1975). *Potencial de Lixiviación bacteriana en el Perú*. Mimeo.

Marrero, J., Diaz, A., & Coto, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales

- pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 41(1), 67–70.
- Mikhlin, Y., Tomashevich, I., Asanov, A., Okotrub, V. & Vyalikh, D. (2004). Spectroscopic and electrochemical characterization of the surface layers of chalcopyrite reacted in acidic solutions. *Applied Surface Science*, 225. 395-409.
- Misari, F. (2016). Tecnología De La Lixiviación Bacteriana De Minerales (Patent Núm. 1ra edición). En *Elsevier Science* (1ra edición).
https://www.osinergmin.gob.pe/seccion/centro_documental/mineria/Documentos/Publicaciones/Biolixiviacion.pdf
- Mishra, D., & Rhee, Y. (2010). Current Research Trends of Microbiological Leaching for Metal Recovery from Industrial Wastes. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, January, 1289–1296. ht
- Ospina, G., García, J. & Martínez, P. (2010). Gravimetría y Volumetría. Fundamentación Experimental en Química Analítica. *Elizcom*, 150.
- Pacheco, R. (2013). Estudio de oxidación de azufre elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67°C. En *Occupational Medicine* (Vol. 53, Número 4).
- Piceros, E. (2016). *Caracterización espectral de reacciones a alta temperatura de intereses en la pirometalurgia del cobre.*
- Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M., González, F., & Muñoz, J. (2003). Study of bacterial attachment during the bioleaching of pyrite, chalcopyrite, and sphalerite. *Geomicrobiology*

Journal, 20(2), 131–141. <https://doi.org/10.1080/01490450303880>

Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M. L., González, F., & Muñoz, J. A. (2001). Mechanisms of metal sulfide bioleaching. *Revista de Metalurgia (Madrid)*, 37(6), 665–672. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.2001.v37.i6.534>

Saavedra, A. & Cortón, E. (2014). Biotecnología microbiana aplicada a la minería. *Química Viva*. 3. 25-26 <http://www.redalyc.org/pdf/863/86332856004.pdf>

Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P. G., & Schippers, A. (2001). Biochemistry of bacterial leaching - direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, 59(2–3), 159–175. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00180-8](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00180-8)

Sasaki, K., Nakamuta, Y., Hirajima, T., & Tuovinen, O. H. (2009). Raman characterization of secondary minerals formed during chalcopyrite leaching with *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 95(1–2), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.05.009>

Severiche, C., & González, H. (2012). Evaluación Analítica Para La Determinación De Sulfatos En Aguas Por Método Turbidimétrico Modificado Analytical Evaluation for the Determination of Sulfate in Water By Modified Turbidimetric Method. *Ing. USBMed*, 3(2), 2027–5846.

Silverman, M., & Lundgren, D. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus*. *Journal of bacteriology*, 78(3), 326–331. <https://doi.org/10.1128/JB.77.5.642-647.1959>

Skoog, D., West, D. & Holler. (2001). "Química Analítica". *Mc Graw Hill*. 432-437.

Sotillo, C. (1977). *Lixiviación bacteriana (Nueva tecnología de la hidrometalurgia)*.

Statista. (2021). *Los mayores productores de cobre del mundo | Statista*. Statista Research Department. <https://es.statista.com/estadisticas/635359/paises-lideres-en-la-produccion-de-cobre-a-nivel-mundial/#:~:text=Países líderes en la producción de cobre a nivel mundial 2020&text=La producción de cobre en,7 millones de toneladas%2C respectivamente>.

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

Tapia, S. (2016). *Biolixiviación de Cobre a partir de Calcopirita (CuFeS₂) utilizando un consorcio nativo aislado del mineral comparado con una cepa Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 23270*. Tesis de pregrado, Universidad Católica de Santa María.

Tirado, E. (2015). *Biooxidación de arsenopirita por un cultivo microbiano puro y mixto*. Tesis de pregrado, Tesis de pregrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Tributsch, H. (2001). Direct versus indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, 59(2-3), 177-185. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00181-X](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00181-X)

Zepeda, V. (2018). *Biolixiviación de minerales sulfurados de baja ley*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid. <https://eprints.ucm.es/49979/1/T40587.pdf>

Zhao, X., Wang, R., Lu, X., Lu, J., Li, C., & Li, J. (2013). Bioleaching of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering*, 53, 184–192.
<https://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.08.008>

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

Medio de cultivo líquido 9k modificado suplementado
con azufre (Silverman y Lundgren, 1959).

Medio Líquido 9k modificado suplementado con azufre (1L)

| | | |
|-------------------|---------------------------------------|--------|
| Solución A | FeSO ₄ x 7H ₂ O | 33.3 g |
| | H ₂ O _{dd} | 100 ml |

Se disuelve el mineral y se ajusta a pH 2.00 con H₂SO₄ 10N y se esterilizará con filtro al vacío.

| | | |
|-------------------|---|--------|
| Solución B | MgSO ₄ x 7H ₂ O | 0,4 g |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,1 g |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,04 g |
| | KCl | 0,1 g |
| | Ca(NO ₃) ₂ | 0,01 g |
| | H ₂ O _{dd} | 900 ml |

Se homogenizará y se ajusta a pH 2.00 con H₂SO₄ 10N y se realiza la esterilización a 121 °C durante 15 minutos en autoclave.

El azufre elemental se utiliza 10 g por litro.
Se debe esterilizar tres veces a 100 °C durante 30 minutos en autoclave.

En condiciones estériles se vierte la solución A hacia la solución B con una temperatura no mayor a 45° C y se homogeniza. Posteriormente se agrega el azufre.

ANEXO 2

Preparación del medio de cultivo y enriquecimiento de muestras

Esterilización de Sol. A



Preparación medio 9k



Preparación de materiales



Inoculación de muestras



Agitación 120 rpm e incubación 30°C



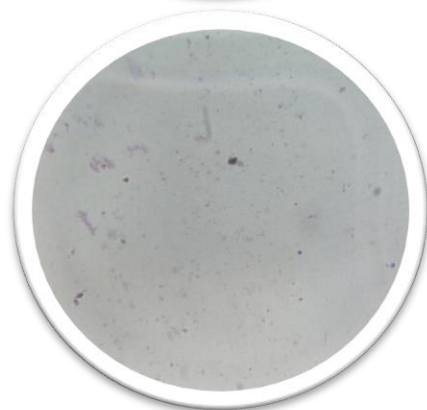
ANEXO 3

Caracterización de cultivos microbianos



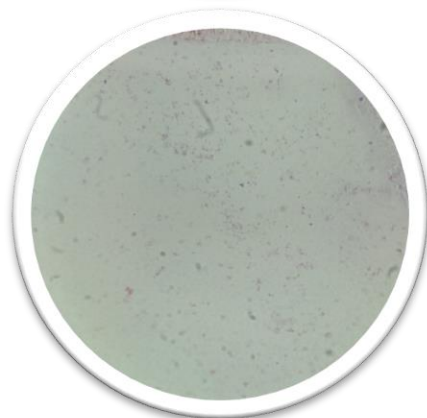
Acidithiobacillus ferrooxidans DSM 14882 (Af)

Aumento 1000x, bacterias Gram negativo, forma de bacilos de aproximadamente 0,5 μm de ancho por 0,9 – 2.0 μm de largo.



Leptospirillum ferriphilum M1D-2020 (L₁)

Aumento 1000x, bacterias Gram negativo, forma espiralada muy móvil de aproximadamente 0,3 - 0,5 μm de ancho por 0,9 – 3.0 μm de largo.



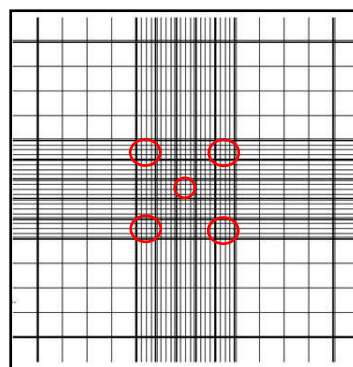
Leptospirillum sp. M1E-2020 (L₂)

Aumento 1000x, bacterias Gram negativo, forma espiralada muy móvil de aproximadamente 0,3 – 0,5 μm de ancho por 0,9 – 3.0 μm de largo.

ANEXO 4

Recuento en cámara de Petroff-Hausser

Esquema de conteo



Dilución de muestras

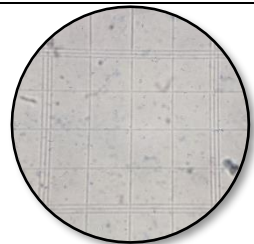
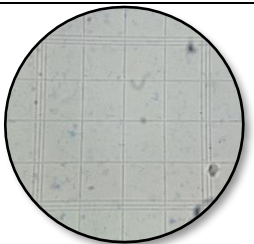
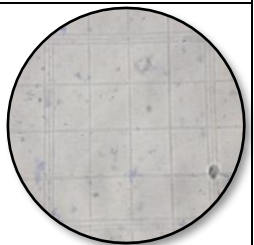
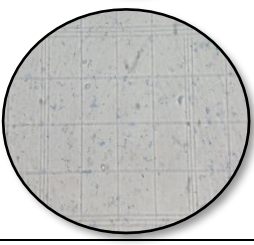
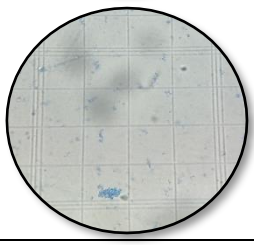
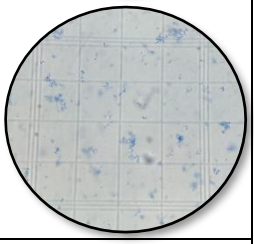
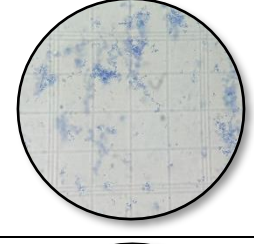
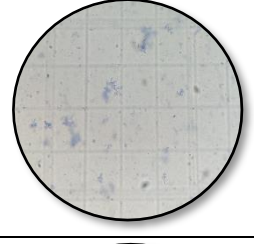
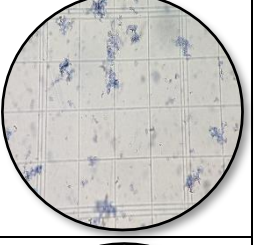
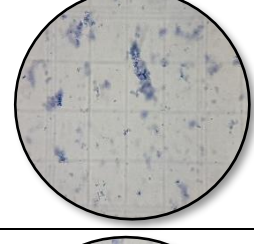
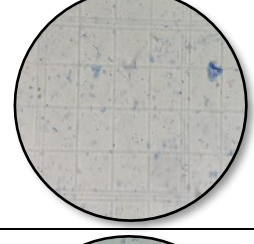
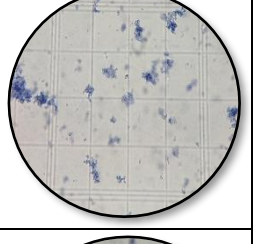
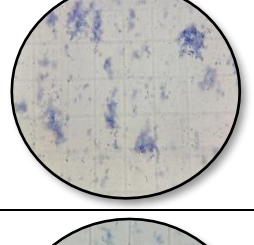
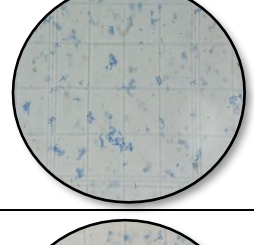
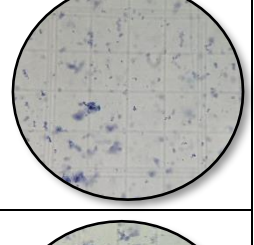
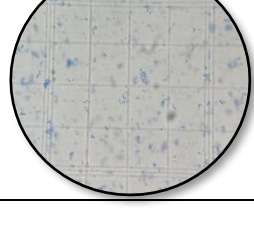
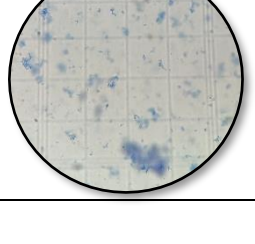
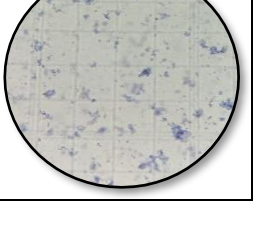


Conteo en microscopio electrónico



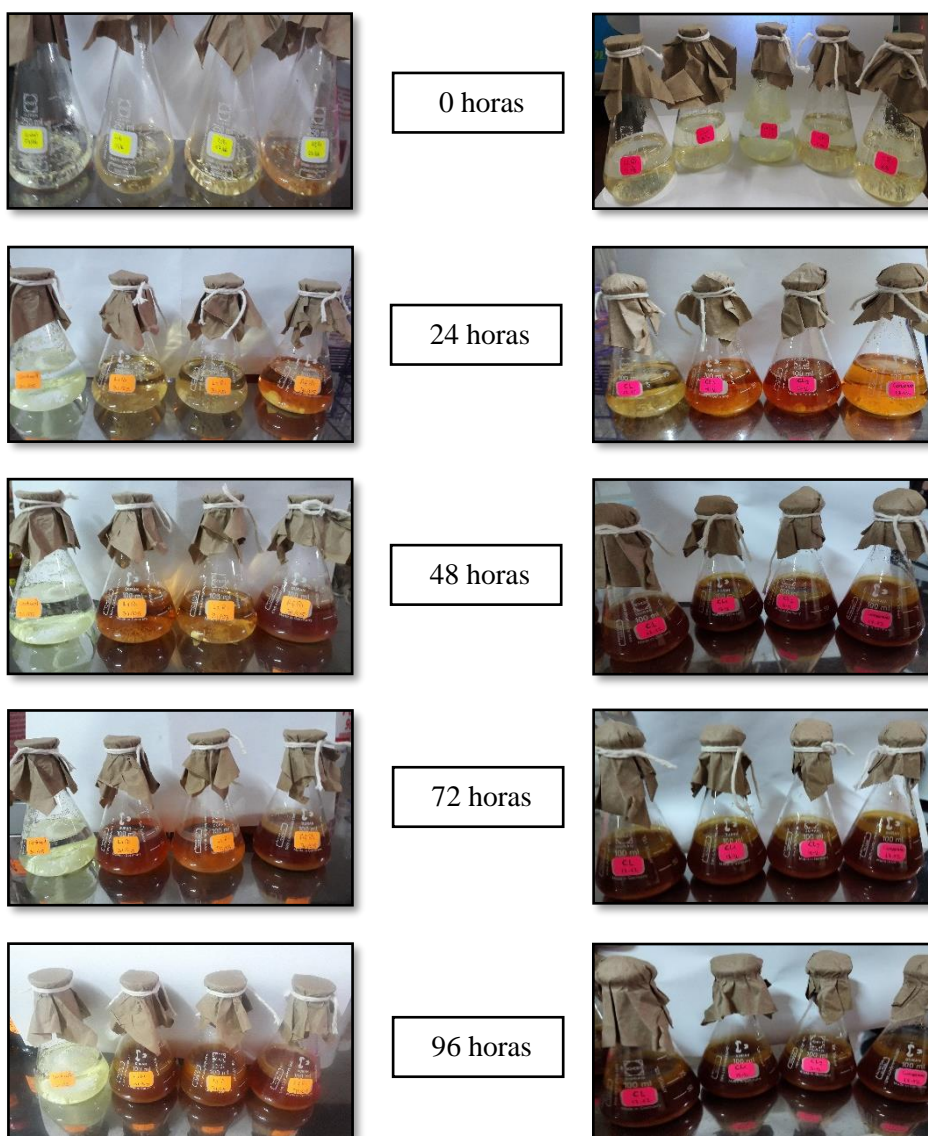
ANEXO 5

Evolución del crecimiento bacteriano

| | L ₁ | L ₂ | Af |
|-----------|---|---|--|
| 0 horas |  |  |  |
| 24 horas |  |  |  |
| 48 horas |  |  |  |
| 72 horas |  |  |  |
| 96 horas |  |  |  |
| 168 horas |  |  |  |

ANEXO 6

Evolución de la biooxidación



ANEXO 7

Preparación del mineral calcopirita

Homogenización del mineral



Selección de partículas para moler



Molido

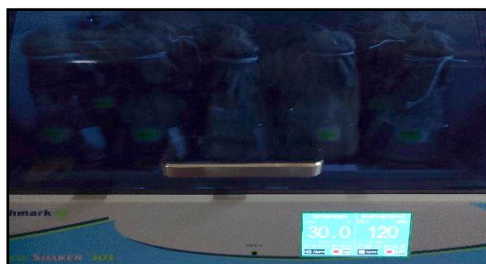
Tamizado malla 100



ANEXO 8

Biolixiviación de la Calcopirita

Incubación de los experimentos



Biolixiviación 0 horas



Biolixiviación 72 horas



Biolixiviación 216 horas



Biolixiviación 504 horas

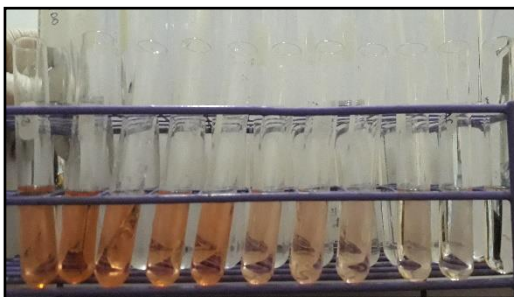


Biolixiviación 648 horas



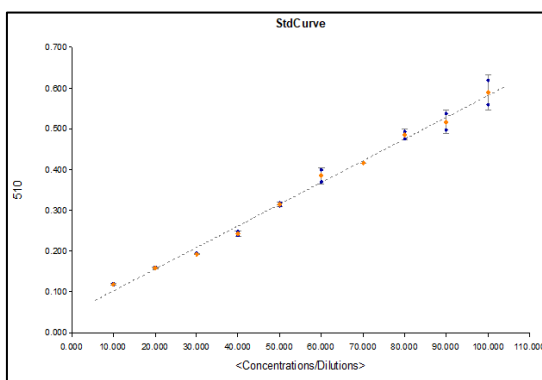
ANEXO 9

Curva de calibración del hierro



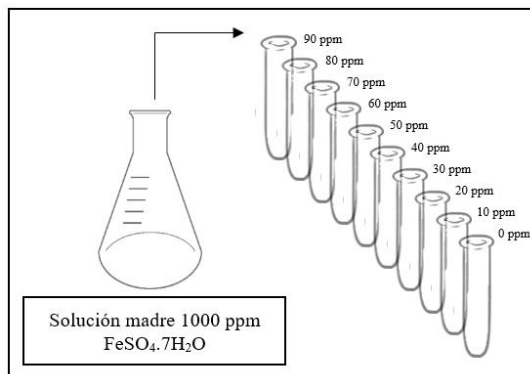
}

| Curva Calibración Fe | | | | |
|----------------------|---------|-----------|------------|------------|
| Dilución | Abs 510 | \bar{x} | mg/L | \bar{x} |
| 10 | 0.117 | 0.119 | 12.715 | 13.0915 |
| | 0.121 | | 13.468 | |
| 20 | 0.158 | 0.159 | 20.427 | 20.6155 |
| | 0.16 | | 20.804 | |
| 30 | 0.192 | 0.193 | 26.823 | 27.011 |
| | 0.194 | | 27.199 | |
| 40 | 0.238 | 0.2425 | 35.475 | 36.3215 |
| | 0.247 | | 37.168 | |
| 50 | 0.319 | 0.315 | 50.711 | 49.959 |
| | 0.311 | | 49.207 | |
| 60 | 0.37 | 0.3845 | 60.304 | 63.0315 |
| | 0.399 | | 65.759 | |
| 70 | 0.415 | 0.4155 | 68.769 | 68.863 |
| | 0.416 | | 68.957 | |
| 80 | 0.476 | 0.485 | 80.243 | 81.936 |
| | 0.494 | | 83.629 | |
| 90 | 0.496 | 0.5165 | 84.005 | 87.861 |
| | 0.537 | | 91.717 | |
| 100 | 0.558 | 0.588 | 95.667 | 100.810387 |
| | 0.618 | | 105.953774 | |



| Curve Name | Curve Formula | A | B | R2 |
|----------------|---------------|---------|--------|-------|
| Curva estándar | $Y=A*X+B$ | 0.00532 | 0.0494 | 0.994 |

ANEXO 10

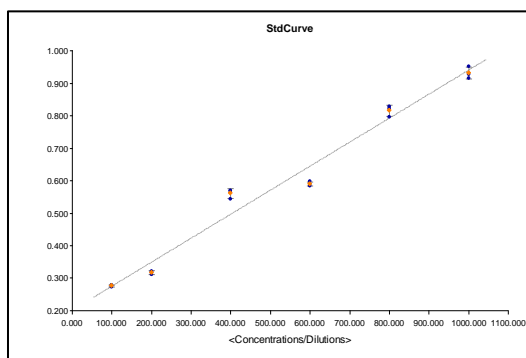
Determinación del Fe^{2+} y Fe_{TOTAL} 

ANEXO 11

Curva de calibración de sulfatos



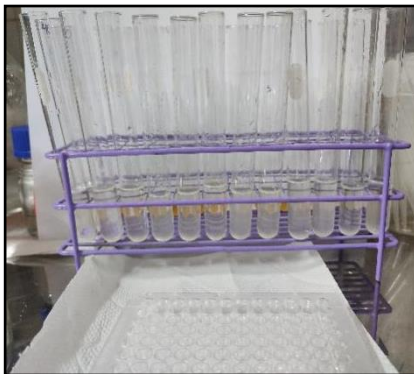
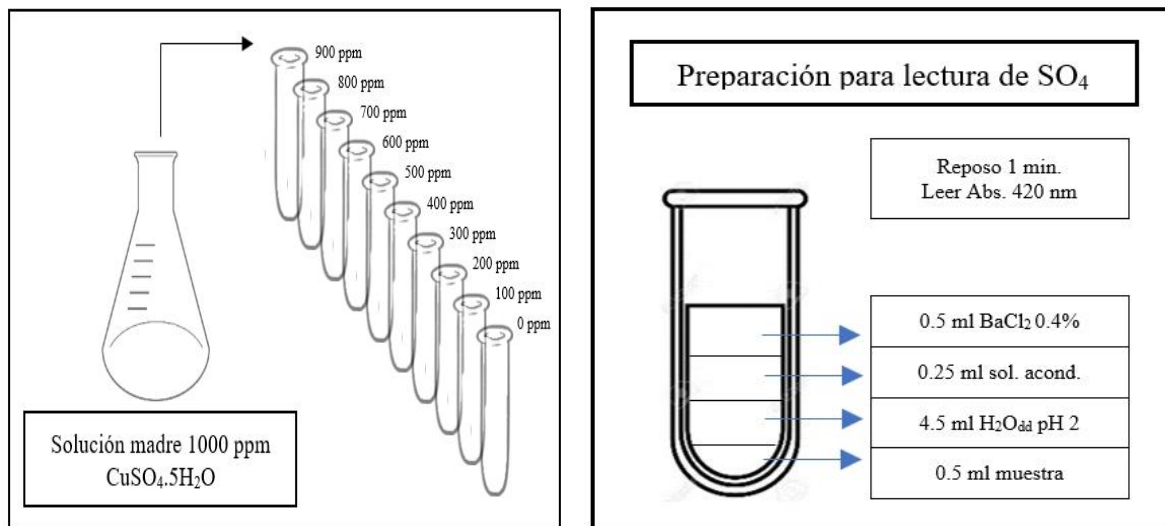
| Curva Calibración SO4 | | | | |
|-----------------------|---------|------------|------------|------------|
| Dilución | Abs 420 | \bar{x} | mg/L | \bar{x} |
| 100 | 0.273 | 0.276 | 96.1281709 | 100.133511 |
| | 0.276 | | 100.133511 | |
| | 0.279 | | 104.138852 | |
| 200 | 0.311 | 0.31766667 | 146.862483 | 155.76324 |
| | 0.32 | | 158.878505 | |
| | 0.322 | | 161.548732 | |
| 400 | 0.568 | 0.57066667 | 489.986649 | 493.546951 |
| | 0.57 | | 492.656876 | |
| | 0.574 | | 497.99733 | |
| 600 | 0.597 | 0.597 | 528.70494 | 528.70494 |
| | 0.59 | | 519.359146 | |
| | 0.604 | | 538.050734 | |
| 800 | 0.828 | 0.82533333 | 837.116155 | 833.555852 |
| | 0.823 | | 830.440587 | |
| | 0.825 | | 833.110814 | |
| 1000 | 0.928 | 0.93966667 | 970.627503 | 986.203827 |
| | 0.94 | | 986.648865 | |
| | 0.951 | | 1001.33511 | |



| Curve Name | Curve Formula | A | B | R2 |
|------------|---------------|----------|-------|-------|
| StdCurve | Y=A*X+B | 0.000749 | 0.201 | 0.973 |

ANEXO 12

Determinación de sulfatos



ANEXO 13

Valores obtenidos en el experimento de biooxidación por el cultivo microbiano constituido por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 (L₁)

| TIEMPO (HORAS) | REPETICIÓN | BIOOXIDACIÓN L1 | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------------|--------------------|------------|-------|------------|----------------------------|------------|--------|-------------|-------------|---------------------------|---------------|------------------|------------------------|
| | | ABSORBANCIA 510 nm | | | | CONCENTRACIÓN 1:100 (mg/L) | | | | SULFATOS | | | BIOMASA (cel/ml) | |
| | | Fe II | \bar{x} | Fe T | \bar{x} | Fe II | Fe T | Fe III | Abs. 420 nm | \bar{x} | CONCENTRACIÓN 1:10 (mg/L) | RECuento Ba's | \bar{x} | CONCENTRACIÓN (cel/ml) |
| 0 | 1 | 0.468 | | 0.403 | | | | 0.296 | | | | 4.6 | | |
| | 2 | 0.442 | 0.45033333 | 0.443 | 0.455 | 75.3634085 | 76.2406015 | 0.297 | 0.314 | 150.8678238 | 4 | 4.26666667 | 1.07E+08 | |
| | 3 | 0.441 | | 0.519 | | | | 0.349 | | | 4.2 | | | |
| 24 | 1 | 0.39 | | 0.456 | | | | 0.303 | | | 25.8 | | | |
| | 2 | 0.474 | 0.43666667 | 0.522 | 0.49866667 | 72.7944862 | 84.4486216 | 0.293 | 0.30033333 | 132.6212728 | 24.2 | 25.1333333 | 6.28E+08 | |
| | 3 | 0.446 | | 0.518 | | | | 0.305 | | | 25.4 | | | |
| 48 | 1 | 0.316 | | 0.484 | | | | 0.274 | | | 54.2 | | | |
| | 2 | 0.321 | 0.32666667 | 0.471 | 0.49533333 | 52.1177945 | 83.8220551 | 0.303 | 0.286 | 113.4846462 | 54 | 54.2 | 1.36E+09 | |
| | 3 | 0.343 | | 0.531 | | | | 0.281 | | | 54.4 | | | |
| 72 | 1 | 0.063 | | 0.439 | | | | 0.337 | | | 115.4 | | | |
| | 2 | 0.059 | 0.06366667 | 0.41 | 0.434 | 2.68170426 | 72.2932331 | 0.329 | 0.34233333 | 188.6960392 | 115.2 | 115.4 | 2.89E+09 | |
| | 3 | 0.069 | | 0.453 | | | | 0.361 | | | 115.6 | | | |
| 96 | 1 | 0.059 | | 0.398 | | | | 0.333 | | | 144.6 | | | |
| | 2 | 0.059 | 0.05933333 | 0.4 | 0.39566667 | 1.86716792 | 65.0877193 | 0.343 | 0.34333333 | 190.0311526 | 142.2 | 142.333333 | 3.56E+09 | |
| | 3 | 0.06 | | 0.389 | | | | 0.354 | | | 140.2 | | | |
| 120 | 1 | 0.06 | | 0.392 | | | | 0.393 | | | 135.6 | | | |
| | 2 | 0.058 | 0.059 | 0.378 | 0.38466667 | 1.80451128 | 63.0200501 | 0.396 | 0.338 | 182.9105474 | 138.6 | 136.133333 | 3.40E+09 | |
| | 3 | 0.059 | | 0.384 | | | | 0.225 | | | 134.2 | | | |
| 144 | 1 | 0.068 | | 0.382 | | | | 0.319 | | | 98.4 | | | |
| | 2 | 0.06 | 0.06233333 | 0.364 | 0.37566667 | 2.43107769 | 61.3283208 | 0.304 | 0.32966667 | 171.7846017 | 96.8 | 98 | 2.45E+09 | |
| | 3 | 0.059 | | 0.381 | | | | 0.366 | | | 98.8 | | | |
| 168 | 1 | 0.063 | | 0.349 | | | | 0.278 | | | 54.8 | | | |
| | 2 | 0.064 | 0.06366667 | 0.337 | 0.36733333 | 2.68170426 | 59.7619048 | 0.328 | 0.31133333 | 147.3075211 | 53.2 | 54.2 | 1.36E+09 | |
| | 3 | 0.064 | | 0.416 | | | | 0.328 | | | 54.6 | | | |

ANEXO 14

Valores obtenidos en el experimento de biooxidación por el cultivo microbiano constituido por *Leptospirillum* sp. M3E-2020. (L₂)

| TIEMPO (HORAS) | REPETICIÓN | BIOOXIDACIÓN L2 | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------------|--------------------|------------|-------|----------------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|---------------------------|---------------|------------|-----------------------|
| | | ABSORBANCIA 510 nm | | | CONCENTRACIÓN 1:100 (mg/L) | | | SULFATOS | | | BIOMASA (ce/ml) | | | |
| | | Fe II | \bar{x} | Fe T | \bar{x} | Fe II | Fe T | Fe III | Abs. 420 nm | \bar{x} | CONCENTRACIÓN 1:10 (mg/L) | RECuento Ba's | \bar{x} | CONCENTRACIÓN (ce/ml) |
| 0 | 1 | 0.413 | | 0.496 | | | | | 0.301 | | | 4.4 | | |
| | 2 | 0.478 | 0.45333333 | 0.492 | 0.50533333 | 75.9273183 | 85.7017544 | 9.77443609 | 0.329 | 0.33033333 | 172.6746773 | 3.8 | 3.93333333 | 9.83E+07 |
| | 3 | 0.469 | | 0.528 | | | | | 0.361 | | | 3.6 | | |
| 24 | 1 | 0.418 | | 0.478 | | | | | 0.318 | | | 21.6 | | |
| | 2 | 0.487 | 0.458 | 0.523 | 0.543 | 76.8045113 | 92.7819549 | 15.9774436 | 0.277 | 0.293 | 122.8304406 | 21.4 | 21 | 5.25E+08 |
| | 3 | 0.469 | | 0.628 | | | | | 0.284 | | | 20 | | |
| 48 | 1 | 0.425 | | 0.495 | | | | | 0.292 | | | 34.8 | | |
| | 2 | 0.447 | 0.44733333 | 0.538 | 0.504 | 74.7994987 | 85.4511278 | 10.6516291 | 0.3 | 0.34666667 | 194.4815309 | 33.8 | 34.2 | 8.55E+08 |
| | 3 | 0.47 | | 0.479 | | | | | 0.448 | | | 34 | | |
| 72 | 1 | 0.331 | | 0.515 | | | | | 0.276 | | | 72.6 | | |
| | 2 | 0.343 | 0.327 | 0.536 | 0.51333333 | 52.1804511 | 87.2055138 | 35.0250627 | 0.283 | 0.281 | 106.8090788 | 71.4 | 71.6666667 | 1.79E+09 |
| | 3 | 0.307 | | 0.489 | | | | | 0.284 | | | 71 | | |
| 96 | 1 | 0.069 | | 0.494 | | | | | 0.298 | | | 120.2 | | |
| | 2 | 0.071 | 0.06833333 | 0.499 | 0.486 | 3.55889724 | 82.0676692 | 78.5087719 | 0.288 | 0.299 | 130.8411215 | 120.4 | 120.6 | 3.02E+09 |
| | 3 | 0.065 | | 0.465 | | | | | 0.311 | | | 121.2 | | |
| 120 | 1 | 0.06 | | 0.481 | | | | | 0.35 | | | 115.2 | | |
| | 2 | 0.059 | 0.05933333 | 0.478 | 0.46966667 | 1.86716792 | 78.9974937 | 77.1303258 | 0.355 | 0.34333333 | 190.0311526 | 115.2 | 115.266667 | 2.88E+09 |
| | 3 | 0.059 | | 0.45 | | | | | 0.325 | | | 115.4 | | |
| 144 | 1 | 0.061 | | 0.447 | | | | | 0.271 | | | 84.6 | | |
| | 2 | 0.059 | 0.06 | 0.449 | 0.43533333 | 1.9924812 | 72.5438596 | 70.5513784 | 0.306 | 0.32366667 | 163.7739208 | 85.8 | 83.6 | 2.09E+09 |
| | 3 | 0.06 | | 0.41 | | | | | 0.394 | | | 80.4 | | |
| 168 | 1 | 0.066 | | 0.402 | | | | | 0.31 | | | 52.2 | | |
| | 2 | 0.063 | 0.064 | 0.402 | 0.39566667 | 2.7443609 | 65.0877193 | 62.3433584 | 0.279 | 0.29966667 | 131.7311972 | 52.4 | 51.8 | 1.30E+09 |
| | 3 | 0.063 | | 0.383 | | | | | 0.31 | | | 50.8 | | |

ANEXO 15

Valores obtenidos en el experimento de biooxidación por el cultivo microbiano constituido por *Acidithiobacillus ferrooxidans*

DSM 14882 (Af)

| TIEMPO (HORAS) | REPETICIÓN | BIOOXIDACIÓN Af | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------------|--------------------|------------|-------|----------------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|---------------------------|------------------|------------|------------------------|--|
| | | ABSORBANCIA 510 nm | | | CONCENTRACIÓN 1:100 (mg/L) | | | | SULFATOS | | | BIOMASA (cel/ml) | | | |
| | | Fe II | \bar{x} | Fe T | \bar{x} | Fe II | Fe T | Fe III | Abs. 420 nm | \bar{x} | CONCENTRACIÓN 1:10 (mg/L) | RECuento Ba's | \bar{x} | CONCENTRACIÓN (cel/ml) | |
| 0 | 1 | 0.341 | | 0.484 | | | | | 0.366 | | | | 6.4 | | |
| | 2 | 0.531 | 0.43633333 | 0.4 | 0.46533333 | 72.7318296 | 78.1829574 | 5.45112782 | 0.327 | 0.33833333 | 183.3555852 | 6.2 | 6.2 | 1.55E+08 | |
| | 3 | 0.437 | | 0.512 | | | | | 0.322 | | | 6 | | | |
| 24 | 1 | 0.311 | | 0.558 | | | | | 0.279 | | | 60.8 | | | |
| | 2 | 0.404 | 0.33233333 | 0.56 | 0.53533333 | 53.1829574 | 91.3408521 | 38.1578947 | 0.305 | 0.305 | 138.8518024 | 62 | 60.8 | 1.52E+09 | |
| | 3 | 0.282 | | 0.488 | | | | | 0.331 | | | 59.6 | | | |
| 48 | 1 | 0.059 | | 0.366 | | | | | 0.312 | | | 171.8 | | | |
| | 2 | 0.063 | 0.06133333 | 0.358 | 0.36433333 | 2.24310777 | 59.197995 | 56.9548872 | 0.368 | 0.338 | 182.9105474 | 170.4 | 171.266667 | 4.28E+09 | |
| | 3 | 0.062 | | 0.369 | | | | | 0.334 | | | 171.6 | | | |
| 72 | 1 | 0.056 | | 0.312 | | | | | 0.318 | | | 94.6 | | | |
| | 2 | 0.059 | 0.05866667 | 0.361 | 0.34933333 | 1.74185464 | 56.3784461 | 54.6365915 | 0.314 | 0.32833333 | 170.0044504 | 94.6 | 94.6666667 | 2.37E+09 | |
| | 3 | 0.061 | | 0.375 | | | | | 0.353 | | | 94.8 | | | |
| 96 | 1 | 0.06 | | 0.331 | | | | | 0.418 | | | 93.4 | | | |
| | 2 | 0.059 | 0.05933333 | 0.333 | 0.33433333 | 1.86716792 | 53.5588972 | 51.6917293 | 0.398 | 0.423 | 296.3951936 | 92.4 | 92.3333333 | 2.31E+09 | |
| | 3 | 0.059 | | 0.339 | | | | | 0.453 | | | 91.2 | | | |
| 120 | 1 | 0.057 | | 0.303 | | | | | 0.464 | | | 95.6 | | | |
| | 2 | 0.056 | 0.05633333 | 0.307 | 0.30333333 | 1.30325815 | 47.7318296 | 46.4285714 | 0.434 | 0.43766667 | 315.976858 | 94 | 94.6666667 | 2.37E+09 | |
| | 3 | 0.056 | | 0.3 | | | | | 0.415 | | | 94.4 | | | |
| 144 | 1 | 0.057 | | 0.251 | | | | | 0.358 | | | 92 | | | |
| | 2 | 0.057 | 0.05733333 | 0.212 | 0.221 | 1.49122807 | 32.2556391 | 30.764411 | 0.401 | 0.41366667 | 283.9341344 | 91.2 | 91.5333333 | 2.29E+09 | |
| | 3 | 0.058 | | 0.2 | | | | | 0.482 | | | 91.4 | | | |
| 168 | 1 | 0.058 | | 0.327 | | | | | 0.408 | | | 89.4 | | | |
| | 2 | 0.066 | 0.06233333 | 0.411 | 0.343 | 2.43107769 | 55.1879699 | 52.7568922 | 0.406 | 0.40966667 | 278.5936805 | 86.6 | 88.2 | 2.21E+09 | |
| | 3 | 0.063 | | 0.291 | | | | | 0.415 | | | 88.6 | | | |

ANEXO 16

Valores obtenidos en el experimento de biooxidación por el consorcio constituido por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 y *Leptospirillum* sp. M3E-2020 (CL)

| TIEMPO (HORAS) | REPETICIÓN | BIOOXIDACIÓN DE CL | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------------|--------------------|-----------|-------|----------------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|---------------------------|---------------|-----------|-----------------------|
| | | ABSORBANCIA 510 nm | | | CONCENTRACIÓN 1:100 (mg/L) | | | SULFATOS | | | BIOMASA (ce/ml) | | | |
| | | Fe II | \bar{x} | Fe T | \bar{x} | Fe II | Fe T | Fe III | Abs. 420 nm | \bar{x} | CONCENTRACIÓN 1:10 (mg/L) | RECuento Ba's | \bar{x} | CONCENTRACIÓN (ce/ml) |
| 0 | 1 | 0.442 | | 0.463 | | | | | 0.215 | | | 8.2 | | |
| | 2 | 0.369 | 0.4283333 | 0.377 | 0.445 | 71.2280702 | 74.3609023 | 3.13283208 | 0.217 | 0.24066667 | 52.95950156 | 7.8 | 8.3333333 | 2.08E+08 |
| | 3 | 0.474 | | 0.495 | | | | | 0.29 | | | 9 | | |
| 24 | 1 | 0.388 | | 0.392 | | | | | 0.288 | | | 31.2 | | |
| | 2 | 0.396 | 0.3776667 | 0.406 | 0.3846667 | 61.7042607 | 63.0200501 | 1.31578947 | 0.228 | 0.251 | 66.75567423 | 29 | 30.6 | 7.65E+08 |
| | 3 | 0.349 | | 0.356 | | | | | 0.237 | | | 31.6 | | |
| 48 | 1 | 0.261 | | 0.294 | | | | | 0.233 | | | 144.4 | | |
| | 2 | 0.265 | 0.2678 | 0.268 | 0.2783333 | 41.0526316 | 43.0325815 | 1.97994987 | 0.324 | 0.264 | 84.11214953 | 144 | 144.26667 | 3.61E+09 |
| | 3 | 0.2774 | | 0.273 | | | | | 0.235 | | | 144.4 | | |
| 72 | 1 | 0.107 | | 0.432 | | | | | 0.246 | | | 79.4 | | |
| | 2 | 0.098 | 0.103 | 0.377 | 0.403 | 10.075188 | 66.4661654 | 56.3909774 | 0.251 | 0.24633333 | 60.52514464 | 80 | 80.4 | 2.01E+09 |
| | 3 | 0.104 | | 0.4 | | | | | 0.242 | | | 81.8 | | |
| 96 | 1 | 0.058 | | 0.313 | | | | | 0.278 | | | 99.8 | | |
| | 2 | 0.059 | 0.0576667 | 0.345 | 0.3313333 | 1.55388471 | 52.9949875 | 51.4411028 | 0.259 | 0.273 | 96.12817089 | 99.6 | 99.8 | 2.50E+09 |
| | 3 | 0.056 | | 0.336 | | | | | 0.282 | | | 100 | | |
| 120 | 1 | 0.061 | | 0.293 | | | | | 0.264 | | | 85.6 | | |
| | 2 | 0.062 | 0.0623333 | 0.471 | 0.357 | 2.43107769 | 57.8195489 | 55.3884712 | 0.281 | 0.26466667 | 85.00222519 | 86.6 | 86.06667 | 2.15E+09 |
| | 3 | 0.064 | | 0.307 | | | | | 0.249 | | | 86 | | |
| 144 | 1 | 0.068 | | 0.299 | | | | | 0.248 | | | 76.8 | | |
| | 2 | 0.068 | 0.065 | 0.375 | 0.3476667 | 2.93233083 | 56.0651629 | 53.1328321 | 0.24 | 0.246 | 60.08010681 | 75.4 | 76.26667 | 1.91E+09 |
| | 3 | 0.059 | | 0.369 | | | | | 0.25 | | | 76.6 | | |
| 168 | 1 | 0.059 | | 0.295 | | | | | 0.25 | | | 62.2 | | |
| | 2 | 0.059 | 0.0596667 | 0.345 | 0.3273333 | 1.92982456 | 52.2431078 | 50.3132832 | 0.24 | 0.242 | 54.73965287 | 62.4 | 62.2 | 1.56E+09 |
| | 3 | 0.061 | | 0.342 | | | | | 0.236 | | | 62 | | |

ANEXO 17

Valores obtenidos en el experimento de biooxidación por el consorcio constituido por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (CL₁)

| TIEMPO (HORAS) | REPETICIÓN | BIOOXIDACIÓN DE CL ₁ | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------------|---------------------------------|-----------|-------|----------------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|---------------------------|---------------|-----------|-----------------------|
| | | ABSORBANCIA 510 nm | | | CONCENTRACIÓN 1:100 (mg/L) | | | SULFATOS | | | BIOMASA (ce/ml) | | | |
| | | Fe II | \bar{x} | Fe T | \bar{x} | Fe II | Fe T | Fe III | Abs. 420 nm | \bar{x} | CONCENTRACIÓN 1:10 (mg/L) | RECUESTO Ba's | \bar{x} | CONCENTRACIÓN (ce/ml) |
| 0 | 1 | 0.33 | | 0.397 | | | | | 0.284 | | | 7.2 | | |
| | 2 | 0.394 | 0.362 | 0.434 | 0.4173333 | 58.7593985 | 69.160401 | 10.4010025 | 0.236 | 0.24433333 | 57.85491767 | 7.4 | 7.2666667 | 1.82E+08 |
| | 3 | 0.362 | | 0.421 | | | | | 0.213 | | | 7.2 | | |
| 24 | 1 | 0.296 | | 0.315 | | | | | 0.319 | | | 84.8 | | |
| | 2 | 0.254 | 0.2833333 | 0.283 | 0.306 | 43.9724311 | 48.2330827 | 4.26065163 | 0.317 | 0.315 | 152.2029372 | 83.2 | 83.666667 | 2.09E+09 |
| | 3 | 0.3 | | 0.32 | | | | | 0.309 | | | 83 | | |
| 48 | 1 | 0.061 | | 0.383 | | | | | 0.335 | | | 153.6 | | |
| | 2 | 0.084 | 0.068 | 0.401 | 0.385 | 3.4962406 | 63.0827068 | 59.5864662 | 0.301 | 0.32366667 | 163.7739208 | 154.4 | 154.26667 | 3.86E+09 |
| | 3 | 0.059 | | 0.371 | | | | | 0.335 | | | 154.8 | | |
| 72 | 1 | 0.056 | | 0.262 | | | | | 0.323 | | | 94.4 | | |
| | 2 | 0.054 | 0.0563333 | 0.279 | 0.275 | 1.30325815 | 42.406015 | 41.1027569 | 0.3241 | 0.32373333 | 163.8629283 | 88.4 | 92.333333 | 2.31E+09 |
| | 3 | 0.059 | | 0.284 | | | | | 0.3241 | | | 94.2 | | |
| 96 | 1 | 0.053 | | 0.338 | | | | | 0.341 | | | 92.8 | | |
| | 2 | 0.06 | 0.0556667 | 0.392 | 0.376 | 1.17794486 | 61.3909774 | 60.2130326 | 0.354 | 0.326 | 166.8891856 | 91.8 | 92.4 | 2.31E+09 |
| | 3 | 0.054 | | 0.398 | | | | | 0.283 | | | 92.6 | | |
| 120 | 1 | 0.054 | | 0.225 | | | | | 0.273 | | | 95 | | |
| | 2 | 0.053 | 0.054 | 0.359 | 0.301 | 0.86466165 | 47.2932331 | 46.4285714 | 0.279 | 0.29533333 | 125.9457054 | 93.4 | 92.933333 | 2.32E+09 |
| | 3 | 0.055 | | 0.319 | | | | | 0.334 | | | 90.4 | | |
| 144 | 1 | 0.057 | | 0.214 | | | | | 0.363 | | | 93.8 | | |
| | 2 | 0.059 | 0.0583333 | 0.242 | 0.234 | 1.67919799 | 34.6992481 | 33.0200501 | 0.288 | 0.315 | 152.2029372 | 91 | 92.2 | 2.31E+09 |
| | 3 | 0.059 | | 0.246 | | | | | 0.294 | | | 91.8 | | |
| 168 | 1 | 0.058 | | 0.189 | | | | | 0.3364 | | | 92.6 | | |
| | 2 | 0.061 | 0.0593333 | 0.199 | 0.1953333 | 1.86716792 | 27.4310777 | 25.5639098 | 0.292 | 0.30946667 | 144.8153093 | 89.6 | 91.266667 | 2.28E+09 |
| | 3 | 0.059 | | 0.198 | | | | | 0.3 | | | 91.6 | | |

ANEXO 18

Valores obtenidos en el experimento de biooxidación por el consorcio constituido por *Leptospirillum* sp. M3E-2020 y

Acidithiobacillus ferrooxidans DSM 14882 (CL₂)

| TIEMPO (HORAS) | REPETICIÓN | BIOOXIDACIÓN DE CL ₂ | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------------|---------------------------------|-----------|-------|----------------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|---------------------------|---------------|-----------|------------------------|
| | | ABSORBANCIA 510 nm | | | CONCENTRACIÓN 1:100 (mg/L) | | | SULFATOS | | | BIOMASA (cel/ml) | | | |
| | | Fe II | \bar{x} | Fe T | \bar{x} | Fe II | Fe T | Fe III | Abs. 420 nm | \bar{x} | CONCENTRACIÓN 1:10 (mg/L) | RECuento Ba's | \bar{x} | CONCENTRACIÓN (cel/ml) |
| 0 | 1 | 0.396 | | 0.45 | | | | | 0.23 | | | 7 | | |
| | 2 | 0.45 | 0.42 | 0.458 | 0.4573333 | 69.6616541 | 76.679198 | 7.01754386 | 0.234 | 0.234 | 44.05874499 | 7.2 | 7 | 1.75E+08 |
| | 3 | 0.414 | | 0.464 | | | | | 0.238 | | | 6.8 | | |
| 24 | 1 | 0.221 | | 0.244 | | | | | 0.272 | | | 78.8 | | |
| | 2 | 0.278 | 0.2576667 | 0.286 | 0.2683333 | 39.1478697 | 41.1528822 | 2.00501253 | 0.34 | 0.314 | 150.8678238 | 77.4 | 78.266667 | 1.96E+09 |
| | 3 | 0.274 | | 0.275 | | | | | 0.33 | | | 78.6 | | |
| 48 | 1 | 0.06 | | 0.378 | | | | | 0.287 | | | 143.6 | | |
| | 2 | 0.063 | 0.063 | 0.364 | 0.3683333 | 2.55639098 | 59.9498747 | 57.3934837 | 0.276 | 0.27966667 | 105.0289275 | 143.8 | 143.86667 | 3.60E+09 |
| | 3 | 0.066 | | 0.363 | | | | | 0.276 | | | 144.2 | | |
| 72 | 1 | 0.053 | | 0.355 | | | | | 0.337 | | | 94.4 | | |
| | 2 | 0.058 | 0.0566667 | 0.346 | 0.3593333 | 1.36591479 | 58.2581454 | 56.8922306 | 0.245 | 0.30866667 | 143.7472185 | 94 | 94.4 | 2.36E+09 |
| | 3 | 0.059 | | 0.377 | | | | | 0.344 | | | 94.8 | | |
| 96 | 1 | 0.052 | | 0.382 | | | | | 0.251 | | | 92.6 | | |
| | 2 | 0.06 | 0.0576667 | 0.339 | 0.363 | 1.55388471 | 58.9473684 | 57.3934837 | 0.343 | 0.31266667 | 149.0876725 | 92 | 92.133333 | 2.30E+09 |
| | 3 | 0.061 | | 0.368 | | | | | 0.344 | | | 91.8 | | |
| 120 | 1 | 0.053 | | 0.311 | | | | | 0.315 | | | 86.4 | | |
| | 2 | 0.058 | 0.0556667 | 0.318 | 0.3343333 | 1.17794486 | 53.5588972 | 52.3809524 | 0.29 | 0.29266667 | 122.3854028 | 83.8 | 85.533333 | 2.14E+09 |
| | 3 | 0.056 | | 0.374 | | | | | 0.273 | | | 86.4 | | |
| 144 | 1 | 0.064 | | 0.299 | | | | | 0.368 | | | 89.2 | | |
| | 2 | 0.064 | 0.0623333 | 0.334 | 0.307 | 2.43107769 | 48.4210526 | 45.9899749 | 0.294 | 0.31233333 | 148.6426346 | 88 | 87.2 | 2.18E+09 |
| | 3 | 0.059 | | 0.288 | | | | | 0.275 | | | 84.4 | | |
| 168 | 1 | 0.06 | | 0.294 | | | | | 0.367 | | | 88.8 | | |
| | 2 | 0.06 | 0.06 | 0.321 | 0.285 | 1.9924812 | 44.2857143 | 42.2932331 | 0.274 | 0.303 | 136.1815754 | 88.4 | 88.666667 | 2.22E+09 |
| | 3 | 0.06 | | 0.24 | | | | | 0.268 | | | 88.8 | | |

ANEXO 19

Valores obtenidos en el experimento de biooxidación por el por el consorcio constituido por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020, *Leptospirillum* sp. M3E-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (Consortio)

| TIEMPO (HORAS) | REPETICIÓN | BIOOXIDACIÓN DEL CONSORCIO | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------------|----------------------------|-----------|-------|-----------|----------------------------|------------|------------|-------------|------------|---------------------------|------------------|-----------|------------------------|
| | | ABSORBANCIA 510 nm | | | | CONCENTRACIÓN 1:100 (mg/L) | | | SULFATOS | | | BIOMASA (cel/ml) | | |
| | | Fe II | \bar{x} | Fe T | \bar{x} | Fe II | Fe T | Fe III | Abs. 420 nm | \bar{x} | CONCENTRACIÓN 1:10 (mg/L) | RECuento Ba's | \bar{x} | CONCENTRACIÓN (cel/ml) |
| 0 | 1 | 0.312 | | 0.301 | | | | | 0.188 | | | 10.6 | | |
| | 2 | 0.383 | 0.3646667 | 0.433 | 0.4086667 | 59.2606516 | 67.5313283 | 8.27067669 | 0.281 | 0.24533333 | 59.19003115 | 10.8 | 10.466667 | 2.62E+08 |
| | 3 | 0.399 | | 0.492 | | | | | 0.267 | | | 10 | | |
| 24 | 1 | 0.276 | | 0.307 | | | | | 0.274 | | | 157.4 | | |
| | 2 | 0.245 | 0.269 | 0.265 | 0.286 | 41.2781955 | 44.4736842 | 3.19548872 | 0.333 | 0.279 | 104.1388518 | 158 | 157.46667 | 3.94E+09 |
| | 3 | 0.286 | | 0.286 | | | | | 0.23 | | | 157 | | |
| 48 | 1 | 0.062 | | 0.464 | | | | | 0.285 | | | 196.2 | | |
| | 2 | 0.063 | 0.0643333 | 0.468 | 0.4716667 | 2.80701754 | 79.3734336 | 76.566416 | 0.325 | 0.291 | 120.1602136 | 188 | 193.06667 | 4.83E+09 |
| | 3 | 0.068 | | 0.483 | | | | | 0.263 | | | 195 | | |
| 72 | 1 | 0.054 | | 0.362 | | | | | 0.261 | | | 176 | | |
| | 2 | 0.055 | 0.0573333 | 0.378 | 0.3746667 | 1.49122807 | 61.1403509 | 59.6491228 | 0.348 | 0.32 | 158.8785047 | 175 | 175.8 | 4.40E+09 |
| | 3 | 0.063 | | 0.384 | | | | | 0.351 | | | 176.4 | | |
| 96 | 1 | 0.053 | | 0.328 | | | | | 0.352 | | | 101.4 | | |
| | 2 | 0.054 | 0.0553333 | 0.341 | 0.3476667 | 1.11528822 | 56.0651629 | 54.9498747 | 0.29 | 0.31033333 | 145.9724077 | 101.4 | 101.6 | 2.54E+09 |
| | 3 | 0.059 | | 0.374 | | | | | 0.289 | | | 102 | | |
| 120 | 1 | 0.058 | | 0.36 | | | | | 0.299 | | | 94.2 | | |
| | 2 | 0.054 | 0.057 | 0.346 | 0.3613333 | 1.42857143 | 58.6340852 | 57.2055138 | 0.359 | 0.31666667 | 154.4281264 | 94.4 | 94.266667 | 2.36E+09 |
| | 3 | 0.059 | | 0.378 | | | | | 0.292 | | | 94.2 | | |
| 144 | 1 | 0.059 | | 0.383 | | | | | 0.244 | | | 98.2 | | |
| | 2 | 0.063 | 0.0606667 | 0.296 | 0.3416667 | 2.11779449 | 54.9373434 | 52.8195489 | 0.288 | 0.294 | 124.1655541 | 93.6 | 96.2 | 2.41E+09 |
| | 3 | 0.06 | | 0.346 | | | | | 0.35 | | | 96.8 | | |
| 168 | 1 | 0.058 | | 0.305 | | | | | 0.286 | | | 95.8 | | |
| | 2 | 0.059 | 0.0586667 | 0.28 | 0.2986667 | 1.74185464 | 46.8546366 | 45.112782 | 0.3 | 0.32433333 | 164.6639964 | 95.8 | 95.466667 | 2.39E+09 |
| | 3 | 0.059 | | 0.311 | | | | | 0.387 | | | 94.8 | | |

ANEXO 20

Valores obtenidos en el experimento de biolixiviación por el cultivo microbiano constituido por *Acidithiobacillus ferrooxidans*

DSM 14882 (Af)

| TIEMPO (HORAS) | REPETICIÓN | BIOLIXIVIACIÓN DEL Af | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------------|-----------------------|------------|-------|------------|--------|----------------------------|-----------|------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|----------------------------|-----------|---------------|-----------------|-------------------------|--|
| | | ABSORBANCIA 510 nm | | | | | CONCENTRACIÓN 1:100 (mg/L) | | | | | SULFATOS | | | COBRE AAS | | BIOMASA (ce/ml) | | |
| | | Fe II | \bar{X} | Fe T | \bar{X} | Fe III | \bar{X} | Fe II | Fe T | Fe III | Abs .420 nm | \bar{X} | CONCENTRACIÓN 1:10 (mg/L) | CONCENTRACIÓN 1:100 (mg/L) | \bar{X} | RECUENTO Ba's | \bar{X} | CONCENTRACIÓN N (ce/ml) | |
| 0 | 1 | 0.412 | | 0.415 | | 0.003 | | | | | 0.516 | | | <0.10 | 7.6 | | | | |
| | 2 | 0.416 | 0.408 | 0.47 | 0.436 | 0.054 | 0.028 | 67.406015 | 72.6691729 | 5.263157895 | 0.589 | 0.587666667 | 516.2438807 | <0.10 | 8 | 7.66666667 | 1.92E+08 | | |
| | 3 | 0.396 | | 0.423 | | 0.027 | | | | 0.658 | | | <0.10 | 7.4 | | | | | |
| 72 | 1 | 0.089 | | 0.383 | | 0.294 | | | | 0.282 | | | 0.34 | 68.2 | | | | | |
| | 2 | 0.113 | 0.10666667 | 0.391 | 0.374 | 0.278 | 0.267333333 | 10.764411 | 61.0150376 | 50.25062657 | 0.319 | 0.344666667 | 191.811304 | 0.33 | 72 | 68.4 | 1.71E+09 | | |
| | 3 | 0.118 | | 0.348 | | 0.23 | | | | 0.433 | | | 0.32 | 65 | | | | | |
| 144 | 1 | 0.077 | | 0.286 | | 0.209 | | | | 0.293 | | | 0.42 | 172.8 | | | | | |
| | 2 | 0.083 | 0.08333333 | 0.32 | 0.30166667 | 0.237 | 0.218333333 | 6.3784461 | 47.4185464 | 41.04010025 | 0.298 | 0.291666667 | 121.0502893 | 0.41 | 172 | 172 | 4.30E+09 | | |
| | 3 | 0.09 | | 0.299 | | 0.209 | | | | 0.284 | | | 0.42 | 171.2 | | | | | |
| 216 | 1 | 0.074 | | 0.345 | | 0.271 | | | | 0.288 | | | 0.46 | 103.8 | | | | | |
| | 2 | 0.074 | 0.074 | 0.345 | 0.34433333 | 0.271 | 0.270333333 | 4.6240602 | 55.4385965 | 50.81453634 | 0.307 | 0.295666667 | 126.3907432 | 0.46 | 99 | 100.2 | 2.51E+09 | | |
| | 3 | 0.074 | | 0.343 | | 0.269 | | | | 0.292 | | | 0.48 | 97.8 | | | | | |
| 288 | 1 | 0.078 | | 0.374 | | 0.296 | | | | 0.404 | | | 0.53 | 101.4 | | | | | |
| | 2 | 0.072 | 0.081 | 0.291 | 0.36133333 | 0.219 | 0.280333333 | 5.9398496 | 58.6340852 | 52.69423559 | 0.299 | 0.332 | 174.8998665 | 0.51 | 112.4 | 105.066667 | 2.63E+09 | | |
| | 3 | 0.093 | | 0.419 | | 0.326 | | | | 0.293 | | | 0.53 | 101.4 | | | | | |
| 360 | 1 | 0.076 | | 0.305 | | 0.229 | | | | 0.315 | | | 0.59 | 100 | | | | | |
| | 2 | 0.08 | 0.077 | 0.35 | 0.35266667 | 0.27 | 0.275666667 | 5.1879699 | 57.0050125 | 51.81704261 | 0.334 | 0.321 | 160.2136182 | 0.58 | 105.8 | 102.066667 | 2.55E+09 | | |
| | 3 | 0.075 | | 0.403 | | 0.328 | | | | 0.314 | | | 0.58 | 100.4 | | | | | |
| 432 | 1 | 0.071 | | 0.264 | | 0.193 | | | | 0.46 | | | 0.65 | 100.2 | | | | | |
| | 2 | 0.07 | 0.07 | 0.333 | 0.314 | 0.263 | 0.244 | 3.8721805 | 49.7368421 | 45.86466165 | 0.439 | 0.437666667 | 315.976858 | 0.64 | 96 | 96.7333333 | 2.42E+09 | | |
| | 3 | 0.069 | | 0.345 | | 0.276 | | | | 0.414 | | | 0.64 | 94 | | | | | |
| 504 | 1 | 0.083 | | 0.388 | | 0.305 | | | | 0.354 | | | 0.72 | 91.2 | | | | | |
| | 2 | 0.085 | 0.08433333 | 0.392 | 0.38666667 | 0.307 | 0.302333333 | 6.566416 | 63.39599 | 56.82957393 | 0.37 | 0.405 | 272.3631509 | 0.7 | 87 | 90.5333333 | 2.26E+09 | | |
| | 3 | 0.085 | | 0.38 | | 0.295 | | | | 0.491 | | | 0.67 | 93.4 | | | | | |
| 576 | 1 | 0.078 | | 0.383 | | 0.305 | | | | 0.378 | | | 0.75 | 93 | | | | | |
| | 2 | 0.078 | 0.079 | 0.34 | 0.36433333 | 0.262 | 0.285333333 | 5.5639098 | 59.197995 | 53.63408521 | 0.396 | 0.387 | 248.3311081 | 0.75 | 87.4 | 89.9333333 | 2.25E+09 | | |
| | 3 | 0.081 | | 0.37 | | 0.289 | | | | 0.387 | | | 0.75 | 89.4 | | | | | |
| 648 | 1 | 0.092 | | 0.418 | | 0.326 | | | | 0.363 | | | 0.82 | 84.2 | | | | | |
| | 2 | 0.092 | 0.09133333 | 0.411 | 0.42033333 | 0.319 | 0.329 | 7.8822055 | 69.7243108 | 61.84210526 | 0.349 | 0.365 | 218.9586115 | 0.8 | 86 | 84.8666667 | 2.12E+09 | | |
| | 3 | 0.09 | | 0.432 | | 0.342 | | | | 0.383 | | | 0.79 | 84.4 | | | | | |

ANEXO 21

Valores obtenidos en el experimento de biolixiviación por el consorcio constituido por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (CL₁)

| TIEMPO (HORAS) | REPETICIÓN | BIOLIXIVIACIÓN DEL CLI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------------|------------------------|------------|-------|------------|--------|-------------|----------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|----------------------------|-------------|---------------|------------|-------------------------|-----------------|--|--|
| | | ABSORBANCIA 510 nm | | | | | | CONCENTRACIÓN 1:100 (mg/L) | | | | | | SULFATOS | | | COBRE AAS | | BIOMASA (ce/ml) | | |
| | | Fe II | \bar{X} | FeT | \bar{X} | Fe III | \bar{X} | Fe II | FeT | Fe III | Abs .420 nm | \bar{X} | CONCENTRACIÓN 1:10 (mg/L) | CONCENTRACIÓN 1:100 (mg/L) | \bar{X} | RECUENTO Ba's | \bar{X} | CONCENTRACIÓN N (ce/ml) | | | |
| 0 | 1 | 0.319 | | 0.347 | | 0.028 | | | | 0.552 | | | <0.10 | | 11.6 | | | | | | |
| | 2 | 0.34 | 0.32933333 | 0.336 | 0.35566667 | -0.004 | 0.026333333 | 52.619048 | 57.5689223 | 4.949874687 | 0.485 | 0.483666667 | 377.3920783 | <0.10 | 0 | 9.8 | 10.7333333 | 2.68E+08 | | | |
| | 3 | 0.329 | | 0.384 | | 0.055 | | | | 0.414 | | | <0.10 | | 10.8 | | | | | | |
| 72 | 1 | 0.081 | | 0.271 | | 0.19 | | | | 0.367 | | | 0.32 | | 82.8 | | | | | | |
| | 2 | 0.086 | 0.08833333 | 0.364 | 0.353 | 0.278 | 0.264666667 | 7.3182957 | 57.0676692 | 49.74937343 | 0.389 | 0.384666667 | 245.2158433 | 0.32 | 0.326666667 | 80.8 | 81.5333333 | 2.04E+09 | | | |
| | 3 | 0.098 | | 0.424 | | 0.326 | | | | 0.398 | | | 0.34 | | 81 | | | | | | |
| 144 | 1 | 0.075 | | 0.349 | | 0.274 | | | | 0.291 | | | 0.42 | | 172.6 | | | | | | |
| | 2 | 0.08 | 0.08166667 | 0.253 | 0.271 | 0.173 | 0.189333333 | 6.0651629 | 41.6541353 | 35.58897243 | 0.271 | 0.278333333 | 103.2487761 | 0.42 | 0.423333333 | 174.4 | 175.133333 | 4.38E+09 | | | |
| | 3 | 0.09 | | 0.211 | | 0.121 | | | | 0.273 | | | 0.43 | | 178.4 | | | | | | |
| 216 | 1 | 0.069 | | 0.328 | | 0.259 | | | | 0.31 | | | 0.46 | | 114 | | | | | | |
| | 2 | 0.073 | 0.07333333 | 0.288 | 0.335 | 0.215 | 0.261666667 | 4.4987469 | 53.6842105 | 49.18546366 | 0.291 | 0.304666667 | 138.4067646 | 0.49 | 0.476666667 | 117.6 | 116.533333 | 2.91E+09 | | | |
| | 3 | 0.078 | | 0.389 | | 0.311 | | | | 0.313 | | | 0.48 | | 118 | | | | | | |
| 288 | 1 | 0.065 | | 0.346 | | 0.281 | | | | 0.274 | | | 0.53 | | 119.8 | | | | | | |
| | 2 | 0.066 | 0.06866667 | 0.373 | 0.35533333 | 0.307 | 0.286666667 | 3.6215539 | 57.5062657 | 53.88471178 | 0.265 | 0.292 | 121.4953271 | 0.55 | 0.543333333 | 118.2 | 117.933333 | 2.95E+09 | | | |
| | 3 | 0.075 | | 0.347 | | 0.272 | | | | 0.337 | | | 0.55 | | 115.8 | | | | | | |
| 360 | 1 | 0.07 | | 0.299 | | 0.229 | | | | 0.383 | | | 0.58 | | 111.6 | | | | | | |
| | 2 | 0.077 | 0.076 | 0.354 | 0.353 | 0.277 | 0.277 | 5 | 57.0676692 | 52.06766917 | 0.336 | 0.352333333 | 202.047174 | 0.6 | 0.596666667 | 113.4 | 112 | 2.80E+09 | | | |
| | 3 | 0.081 | | 0.406 | | 0.325 | | | | 0.338 | | | 0.61 | | 111 | | | | | | |
| 432 | 1 | 0.065 | | 0.268 | | 0.203 | | | | 0.488 | | | 0.65 | | 108 | | | | | | |
| | 2 | 0.063 | 0.067 | 0.311 | 0.29733333 | 0.248 | 0.230333333 | 3.3082707 | 46.60401 | 43.29573935 | 0.436 | 0.449666667 | 331.9982198 | 0.65 | 0.65 | 93.8 | 99.7333333 | 2.49E+09 | | | |
| | 3 | 0.073 | | 0.313 | | 0.24 | | | | 0.425 | | | 0.65 | | 97.4 | | | | | | |
| 504 | 1 | 0.075 | | 0.361 | | 0.286 | | | | 0.45 | | | 0.68 | | 97 | | | | | | |
| | 2 | 0.069 | 0.07166667 | 0.383 | 0.37733333 | 0.314 | 0.305666667 | 4.1854637 | 61.641604 | 57.45614035 | 0.393 | 0.397 | 261.682243 | 0.7 | 0.696666667 | 96.2 | 96.5333333 | 2.41E+09 | | | |
| | 3 | 0.071 | | 0.388 | | 0.317 | | | | 0.348 | | | 0.71 | | 96.4 | | | | | | |
| 576 | 1 | 0.075 | | 0.388 | | 0.313 | | | | 0.397 | | | 0.76 | | 101.6 | | | | | | |
| | 2 | 0.069 | 0.07266667 | 0.38 | 0.382 | 0.311 | 0.309333333 | 4.3734336 | 62.518797 | 58.14536341 | 0.377 | 0.390333333 | 252.7814864 | 0.78 | 0.773333333 | 96.4 | 98 | 2.45E+09 | | | |
| | 3 | 0.074 | | 0.378 | | 0.304 | | | | 0.397 | | | 0.78 | | 96 | | | | | | |
| 648 | 1 | 0.082 | | 0.432 | | 0.35 | | | | 0.375 | | | 0.82 | | 93.2 | | | | | | |
| | 2 | 0.085 | 0.08566667 | 0.432 | 0.421 | 0.347 | 0.335333333 | 6.8170426 | 69.8496241 | 63.03258145 | 0.372 | 0.374666667 | 231.8647085 | 0.83 | 0.83 | 91.8 | 93.2666667 | 2.33E+09 | | | |
| | 3 | 0.09 | | 0.399 | | 0.309 | | | | 0.377 | | | 0.84 | | 94.8 | | | | | | |

ANEXO 22

Valores obtenidos en el experimento de biolixiviación por el consorcio constituido por *Leptospirillum ferriphilum* M1D-2020, *Leptospirillum* sp. M1E-2020 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 14882 (Consortio)

| TIEMPO (HORAS) | REPETICIÓN | BIOLIXIVIACIÓN DEL CONSORCIO | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------------|------------------------------|------------|-------|------------|----------------------------|------------|-----------|------------|-------------|-------------|------------|---------------------------|----------------------------|------------|---------------|------------|--------------------------|--|
| | | ABSORBANCIA 510 nm | | | | CONCENTRACIÓN 1:100 (mg/L) | | | | | | SULFATOS | | | | COBRE AAS | | BIOMASA (cel/ml) | |
| | | Fe II | \bar{x} | Fe T | \bar{x} | Fe III | \bar{x} | Fe II | Fe T | Fe III | Abs .420 nm | \bar{x} | CONCENTRACIÓN 1:10 (mg/L) | CONCENTRACIÓN 1:100 (mg/L) | \bar{x} | RECUENTO Ba's | \bar{x} | CONCENTRACIÓN N (cel/ml) | |
| 0 | 1 | 0.414 | | 0.443 | | 0.029 | | | | | 0.349 | | | <0.10 | | 14.6 | | | |
| | 2 | 0.469 | 0.427 | 0.528 | 0.47733333 | 0.059 | 0.05033333 | 70.977444 | 80.4385965 | 9.461152882 | 0.494 | 0.41733333 | 288.8295505 | <0.10 | 0 | 12.6 | 13.6666667 | 3.42E+08 | |
| | 3 | 0.398 | | 0.461 | | 0.063 | | | | | 0.409 | | | <0.10 | | 13.8 | | | |
| 72 | 1 | 0.114 | | 0.384 | | 0.27 | | | | | 0.452 | | | 0.32 | | 90.2 | | | |
| | 2 | 0.1 | 0.10833333 | 0.398 | 0.38066667 | 0.298 | 0.27233333 | 11.077694 | 62.2681704 | 51.19047619 | 0.465 | 0.5 | 399.1989319 | 0.35 | 0.33333333 | 94.6 | 92.8666667 | 2.32E+09 | |
| | 3 | 0.111 | | 0.36 | | 0.249 | | | | | 0.583 | | | 0.33 | | 93.8 | | | |
| 144 | 1 | 0.095 | | 0.289 | | 0.194 | | | | | 0.284 | | | 0.42 | | 179.4 | | | |
| | 2 | 0.105 | 0.09766667 | 0.284 | 0.29533333 | 0.179 | 0.19766667 | 9.0726817 | 46.2280702 | 37.15538847 | 0.288 | 0.28066667 | 106.3640409 | 0.46 | 0.43666667 | 175 | 181 | 4.53E+09 | |
| | 3 | 0.093 | | 0.313 | | 0.22 | | | | | 0.27 | | | 0.43 | | 188.6 | | | |
| 216 | 1 | 0.075 | | 0.356 | | 0.281 | | | | | 0.263 | | | 0.48 | | 128.4 | | | |
| | 2 | 0.072 | 0.07366667 | 0.386 | 0.34366667 | 0.314 | 0.27 | 4.5614035 | 55.3132832 | 50.7518797 | 0.296 | 0.28033333 | 105.9190031 | 0.5 | 0.48666667 | 121.6 | 124.4 | 3.11E+09 | |
| | 3 | 0.074 | | 0.289 | | 0.215 | | | | | 0.282 | | | 0.48 | | 123.2 | | | |
| 288 | 1 | 0.071 | | 0.347 | | 0.276 | | | | | 0.289 | | | 0.54 | | 121 | | | |
| | 2 | 0.07 | 0.07166667 | 0.499 | 0.39433333 | 0.429 | 0.32266667 | 4.1854637 | 64.8370927 | 60.65162907 | 0.276 | 0.28933333 | 117.9350245 | 0.56 | 0.54333333 | 122.6 | 121.8 | 3.05E+09 | |
| | 3 | 0.074 | | 0.337 | | 0.263 | | | | | 0.303 | | | 0.53 | | 121.8 | | | |
| 360 | 1 | 0.089 | | 0.343 | | 0.254 | | | | | 0.346 | | | 0.6 | | 123 | | | |
| | 2 | 0.089 | 0.08866667 | 0.397 | 0.36566667 | 0.308 | 0.277 | 7.3809524 | 59.4486216 | 52.06766917 | 0.343 | 0.342 | 188.2510013 | 0.62 | 0.60666667 | 122.8 | 121.733333 | 3.04E+09 | |
| | 3 | 0.088 | | 0.357 | | 0.269 | | | | | 0.337 | | | 0.6 | | 119.4 | | | |
| 432 | 1 | 0.069 | | 0.347 | | 0.278 | | | | | 0.426 | | | 0.66 | | 115.6 | | | |
| | 2 | 0.071 | 0.07033333 | 0.385 | 0.34766667 | 0.314 | 0.27733333 | 3.9348371 | 56.0651629 | 52.13032581 | 0.482 | 0.454 | 337.7837116 | 0.69 | 0.67 | 109.2 | 113.466667 | 2.84E+09 | |
| | 3 | 0.071 | | 0.311 | | 0.24 | | | | | 0.454 | | | 0.66 | | 115.6 | | | |
| 504 | 1 | 0.075 | | 0.387 | | 0.312 | | | | | 0.406 | | | 0.69 | | 106.2 | | | |
| | 2 | 0.079 | 0.079 | 0.385 | 0.386 | 0.306 | 0.307 | 5.5639098 | 63.2706767 | 57.70676692 | 0.414 | 0.41733333 | 288.8295505 | 0.76 | 0.72 | 105.8 | 105.866667 | 2.65E+09 | |
| | 3 | 0.083 | | 0.386 | | 0.303 | | | | | 0.432 | | | 0.71 | | 105.6 | | | |
| 576 | 1 | 0.074 | | 0.371 | | 0.297 | | | | | 0.338 | | | 0.77 | | 110.2 | | | |
| | 2 | 0.075 | 0.07533333 | 0.373 | 0.379 | 0.298 | 0.30366667 | 4.8746867 | 61.9548872 | 57.0802005 | 0.336 | 0.345 | 192.2563418 | 0.8 | 0.78 | 108.4 | 107.466667 | 2.69E+09 | |
| | 3 | 0.077 | | 0.393 | | 0.316 | | | | | 0.361 | | | 0.77 | | 103.8 | | | |
| 648 | 1 | 0.086 | | 0.454 | | 0.368 | | | | | 0.441 | | | 0.85 | | 99.8 | | | |
| | 2 | 0.087 | 0.08666667 | 0.443 | 0.44866667 | 0.356 | 0.362 | 7.0050125 | 75.0501253 | 68.04511278 | 0.454 | 0.44733333 | 328.8829551 | 0.88 | 0.85333333 | 97.6 | 98.533333 | 2.46E+09 | |
| | 3 | 0.087 | | 0.449 | | 0.362 | | | | | 0.447 | | | 0.83 | | 98.2 | | | |

ANEXO 23

Valores obtenidos en el experimento de biolixiviación por el experimento control

| TIEMPO (HORAS) | BIOLIXIVIACIÓN DEL CONTROL | | | | | | | | | | |
|----------------|----------------------------|-------|--------|---------------------|------------|----------|----------|---------------------------|----------------------------|------------------|------------------------|
| | ABSORBANCIA 500 nm | | | CONCENTRACIÓN 1:100 | | | SO4 | | COBRE | BIOMASA (cel/ml) | |
| | Fe II | FeT | Fe III | Fe II | FeT | Fe III | Abs. 420 | CONCENTRACIÓN 1:10 (mg/L) | CONCENTRACIÓN 1:100 (mg/L) | RECuento Ba's | CONCENTRACIÓN (cel/ml) |
| 0 | 0.445 | 0.496 | 0.051 | 74.3609 | 83.9473684 | 9.586466 | 0.643 | 590.1201602 | <0.10 | 0 | 0.00E+00 |
| 72 | 0.397 | 0.425 | 0.028 | 65.33835 | 70.6015038 | 5.263158 | 0.41 | 279.0387183 | - | 0 | 0.00E+00 |
| 144 | 0.424 | 0.448 | 0.024 | 70.41353 | 74.924812 | 4.511278 | 0.309 | 144.1922563 | - | 0 | 0.00E+00 |
| 216 | 0.381 | 0.41 | 0.029 | 62.33083 | 67.7819549 | 5.451128 | 0.238 | 49.39919893 | - | 0 | 0.00E+00 |
| 288 | 0.416 | 0.464 | 0.048 | 68.90977 | 77.9323308 | 9.022556 | 0.229 | 37.38317757 | - | 0.4 | 1.00E+07 |
| 360 | 0.5 | 0.512 | 0.012 | 84.69925 | 86.9548872 | 2.255639 | 0.299 | 130.8411215 | - | 3.4 | 8.50E+07 |
| 432 | 0.362 | 0.432 | 0.07 | 58.7594 | 71.9172932 | 13.15789 | 0.405 | 272.3631509 | - | 10 | 2.50E+08 |
| 504 | 0.395 | 0.489 | 0.094 | 64.96241 | 82.6315789 | 17.66917 | 0.344 | 190.9212283 | - | 19.8 | 4.95E+08 |
| 576 | 0.373 | 0.39 | 0.017 | 60.82707 | 64.0225564 | 3.195489 | 0.324 | 164.2189586 | - | 29.4 | 7.35E+08 |
| 648 | 0.496 | 0.516 | 0.02 | 83.94737 | 87.7067669 | 3.759398 | 0.379 | 237.6502003 | 0.64 | 39 | 9.75E+08 |

ANEXO 24

Preparación de muestras para lectura de cobre por absorción atómica

Obtención de muestra



Filtración de muestra



Dilución de muestra



Muestra diluida 1:100

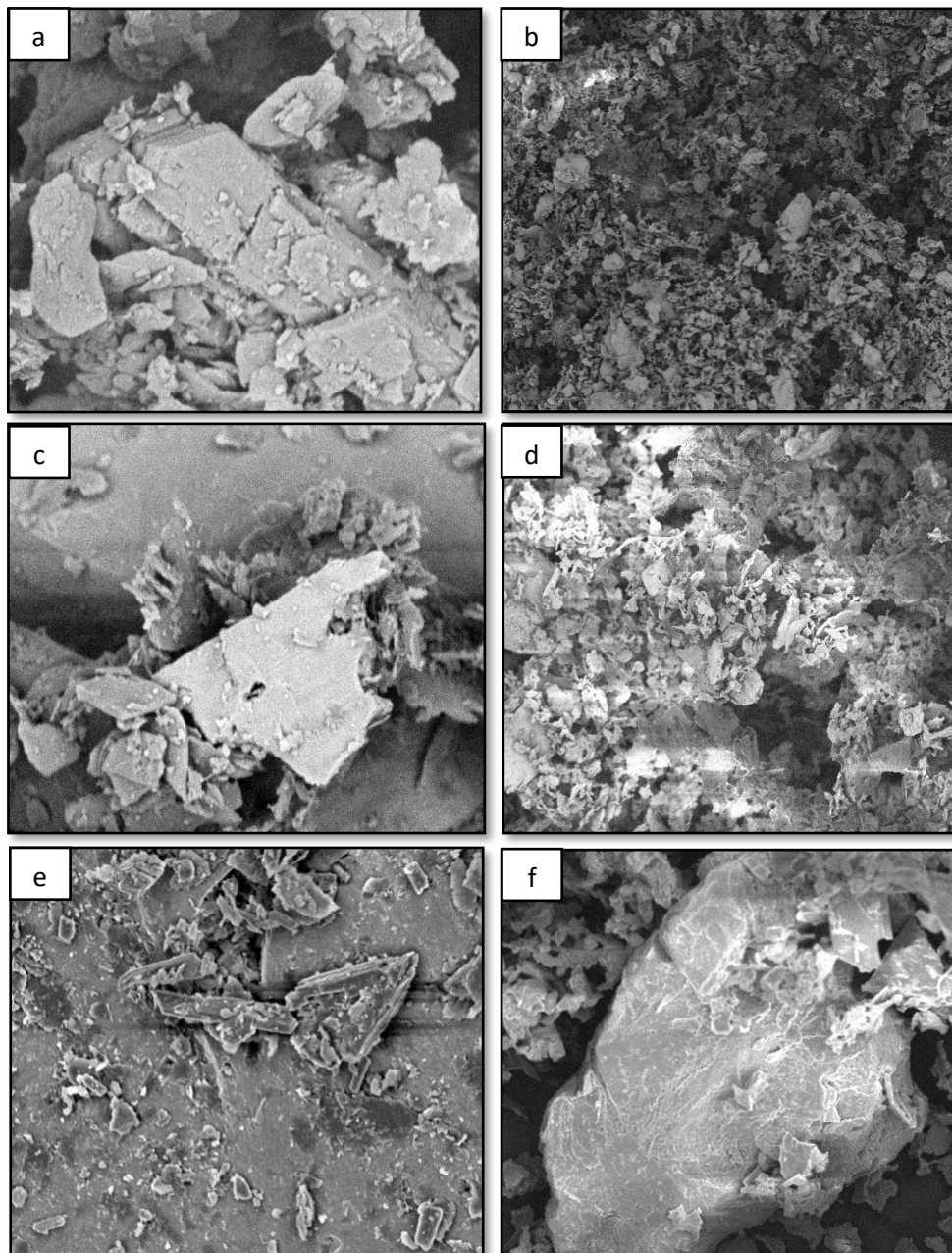


Codificación y reserva

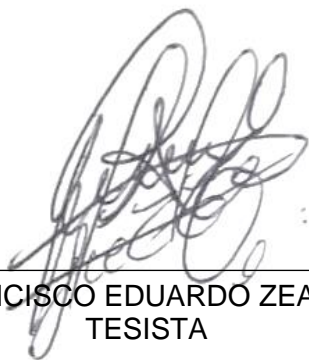


ANEXO 25

Mineral biolixiviado en microscopio electrónico de barrido (MEB)



Figuras (a y c) partículas de calcopirita con evidencia de adherencia microbiana vista a 10 μm . Figura (e) partículas de calcopirita con evidencia de adherencia microbiana vista a 20 μm . Figuras (b y d) mineralización de calcopirita a sulfatos vista a 200 μm y 100 μm respectivamente. Figura (f) degradación del mineral producto de la biolixiviación vista a 10 μm .



Bach. FRANCISCO EDUARDO ZEA GAMBOA
TESISTA



Dr. DALADIER MIGUEL CASTILLO COTRINA
ASESOR