

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

**Facultad de Ciencias**

Escuela Académico Profesional de Biología - Microbiología

“Biooxidación de arsenopirita por un cultivo  
microbiano puro y mixto”

TESIS

Presentada por:

Bach. Ely Judith Tirado Rebaza

Para optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO MICROBIÓLOGO**

TACNA - PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA  
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N° 256

TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

El Secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias, certifica que con Resolución de Facultad N° 8218 – 2015 – FACI – UNJBG, ha designado como jurados para la sustentación de la Tesis: “**Biooxidación de arsenopirita por un cultivo microbiano puro y mixto**”; el mismo que está conformado por:

**PRESIDENTE:** Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras

**SECRETARIO:** Mgr. Roberto Castellanos Cabrera


**VOCAL:** Msc. Ángela Choque Miranda

Para examinar y calificar el trabajo de tesis sustentado en acto público el día 25 de Agosto del 2015 a las 9:00 am. Presentado por la **Bachiller Ely Judith Tirado Rebaza**, de la Escuela Académico Profesional de Biología – Microbiología.

El jurado calificador, en forma secreta e individual se pronunció sobre el calificativo del trabajo expuesto y procedió a emitir el siguiente resultado:

APROBADO por UNANIMIDAD con el calificativo de Dieciséis (16), votos a favor y promedio de BUENO.


Para ratificar lo detallado firman.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras

Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Mgr. Roberto Castellanos Cabrera

Secretario

  
\_\_\_\_\_  
Msc. Ángela Choque Miranda

Vocal

## DEDICATORIA

A Dios, por permanecer siempre a mi lado. A mi familia, en especial a mi mamita, que gracias a sus consejos y apoyo hacen que mis días sean de inmensa felicidad.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su confianza y ánimo a lo largo de toda mi carrera profesional y durante el transcurso de la presente investigación.

A mis profesores y amigos Mgr. Albert Saavedra, Mgr. Daladier Castillo, Mgr. Roberto Castellanos, Dr. Mario Esparza e Ing. Raul Soto, por sus consejos, asesoramiento y experiencia que me fueron de mucha ayuda para la realización de la presente tesis.

A los ingenieros Julian Nieto, Alfredo Quispe y Felipe Maquera por brindarme sus áreas de trabajo para concluir con el presente trabajo de investigación.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	2
1.1 Justificación del problema	2
1.2 Importancia de la investigación	5
1.3 Hipótesis	5
1.4 Determinación de variables	6
1.4.1 Tipos de variables	6
1.4.2 Operacionalización de variables e indicadores	7
1.5 Objetivos	8
Objetivo general	8
Objetivos específicos	8
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b>	9
2.1. Antecedentes	9
2.2. Bases Teóricas	13

2.2.1. Biominería	13
2.2.2. Biooxidación	15
➤ CAMINO DE LAS REACCIONES	24
Mecanismo vía tiosulfato	25
Mecanismo vía polisulfuro	27
➤ VENTAJAS DE LA BIOOXIDACIÓN DE SULFUROS	30
2.2.3. Mineral Arsenopirita	31
2.2.4. Microorganismos Lixiviantes Mesófilos	35
• <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	39
• <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	40
<b>CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	41
3.1. Lugar de experimentación	41
3.2. Material en estudio	42
3.3. Métodos	43
3.4. Tratamientos de la Experimentación	44
3.5. Metodología	45
3.5.1. Evaluación de la estructura de la arsenopirita	45

3.5.2. Reactivación de los cultivos microbianos puros (Pavez, 2011)	45
3.5.3. Masificación de los cultivos microbianos (Diana M, <i>et al.</i> , 2005)	47
3.5.4. Adaptación de los cultivos microbianos	47
3.5.5. Biooxidación de la arsenopirita por un cultivo microbiano puro ( <i>A. ferrooxidans</i> )	48
3.5.6. Biooxidación de la arsenopirita por un cultivo microbiano mixto ( <i>A. ferrooxidans</i> + <i>A. thiooxidans</i> )	48
3.5.7. Evaluación del proceso biooxidativo de la arsenopirita	49
Determinación de la curva de calibración (Cabaña, 2005)	50
Determinación de fierro total	52
Determinación de fierro III	52
Determinación de fierro II	53
3.5.8. Determinación de la capacidad biooxidativa de los cultivos microbianos sobre la arsenopirita	53
3.6. Análisis estadístico	53

<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b>	54
<b>DISCUSIÓN</b>	74
<b>CONCLUSIONES</b>	79
<b>RECOMENDACIONES</b>	80
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	81
<b>ANEXOS</b>	96

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Operacionalización de variables y sus indicadores	7
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de microorganismos usados en la biolixiviación de metales	38
<b>Tabla 3.</b> Análisis químico de la arsenopirita aurífera (concentrado)	42
<b>Tabla 4.</b> Análisis mineralógico de la arsenopirita aurífera	42
<b>Tabla 5.</b> Tratamientos de experimentación	44
<b>Tabla 6.</b> Medio de cultivo 9K-Fe para reactivar a <i>A. ferrooxidans</i>	46
<b>Tabla 7.</b> Medio de cultivo 9K-S para reactivar <i>A. thiooxidans</i>	46
<b>Tabla 8.</b> Medio de cultivo para la biooxidación	49
<b>Tabla 9.</b> Concentración de células (células/mL) determinados para los cultivos microbianos puros y mixtos, en el proceso de biooxidación sobre la arsenopirita que duró 288 horas	58
<b>Tabla 10.</b> Valores de pH determinados para los cultivos microbianos puros y mixtos en el proceso de biooxidación sobre la arsenopirita hasta las 288 horas	60

<b>Tabla 11.</b>	Valores de Fe total, II y III (mg/L) en solución, de terminados en el proceso de biooxidación de 288 horas en el cultivo microbiano puro sobre la arsenopirita 8 %	62
<b>Tabla 12.</b>	Valores de Fe total, II y III (mg/L) en solución, determinados en el proceso de biooxidación de 288 horas en el cultivo microbiano puro sobre la arsenopirita 12 %	64
<b>Tabla 13.</b>	Valores de Fe total, II y III (mg/L) determinados en el proceso de biooxidación de 288 horas del cultivo microbiano mixto sobre la arsenopirita 8 %	66
<b>Tabla 14.</b>	Valores de Fe total, II y III (mg/L) determinados en el proceso de biooxidación de 288 horas del cultivo microbiano mixto sobre la arsenopirita 12 %	68
<b>Tabla 15.</b>	Biooxidación de Fe III obtenido a las 288 horas en los cultivo puro y mixto a las concentraciones de 8 y 12 % de arsenopirita con sus respectivas repeticiones	70
<b>Tabla 16.</b>	Análisis de varianza para la determinación del mayor grado de biooxidación	71
<b>Tabla 17.</b>	Prueba de comparaciones múltiples utilizando el Método de Duncan	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Mecanismos de oxidación bacteriana propuestos por Silverman (1967)	16
<b>Figura 2.</b> Mecanismo indirecto en la biooxidación de sulfuros (mecanismo de tiosulfato)	26
<b>Figura 3.</b> Mecanismo indirecto en la biooxidación de sulfuros (mecanismo de polisulfuro)	29
<b>Figura 4.</b> Cultivo microbiano puro ( <i>A. ferrooxidans</i> ) sobre FeAsS 8%	54
<b>Figura 5.</b> Cultivo microbiano puro ( <i>A. ferrooxidans</i> ) sobre FeAsS 12%	55
<b>Figura 6.</b> Cultivo microbiano mixto ( <i>A. ferrooxidans</i> + <i>A. thiooxidans</i> ) sobre FeAsS 8 %	56
<b>Figura 7.</b> Cultivo microbiano mixto ( <i>A. ferrooxidans</i> + <i>A. thiooxidans</i> ) sobre FeAsS 12 %	57
<b>Figura 8.</b> Curva de crecimiento poblacional del cultivo microbiano puro y mixto en medio líquido con arsenopirita al 8 y 12 %	59

<b>Figura 9.</b> Curva de pH del cultivo microbiano puro en medio líquido con Arsenopirita	61
<b>Figura 10.</b> Curva de fierro total, fierro II y fierro III en el proceso de biooxidación del cultivo microbiano puro sobre la arsenopirita 8 %	63
<b>Figura 11.</b> Curva de fierro total, fierro II y fierro III en el proceso de biooxidación del cultivo microbiano puro sobre la arsenopirita 12 %	65
<b>Figura 12.</b> Curva de fierro total, fierro II y fierro III en el proceso de biooxidación del cultivo microbiano mixto sobre la arsenopirita 8 %	67
<b>Figura 13.</b> Curva de fierro total, fierro II y fierro III en el proceso de biooxidación del cultivo microbiano mixto sobre la arsenopirita 12 %	69
<b>Figura 14.</b> Representación en barras de la concentración en solución de fierro (III) en mg/L, por los cultivos microbianos puro y mixto, durante las 288 horas	73

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por finalidad evaluar el grado de biooxidación de concentrado de arsenopirita por un cultivo microbiano puro (*A. ferrooxidans* DSMZ 1477) y un cultivo microbiano mixto (50 % de *A. ferrooxidans* DSMZ 1477 y 50 % de *A. thiooxidans* DSMZ 1478). Los cultivos, luego de su reactivación, fueron adaptadas al mineral (FeAsS) en medio OK con 1 % de arsenopirita.

Las concentraciones de 8 y 12 % de arsenopirita, pasante malla Tyler < 200, se colocaron en reactores, los cuales presentaron un volumen de trabajo de 700 mL. En ellos se agregó medio OK junto a sus respectivas concentraciones de mineral y se autoclavó, para posteriormente agregar el 10 % de inóculo microbiano adaptado. Durante las 288 horas que duró el proceso de biooxidación; se evaluó el crecimiento microbiano, pH, fierro total, fierro II y fierro III en solución; y al final de la biooxidación, se observó la superficie de la arsenopirita, para ello se utilizó la ayuda de un microscopio electrónico de barrido (SEM). Se concluyó que el cultivo microbiano mixto con arsenopirita al

8 % fue el que obtuvo mayor grado de biooxidación, logrando una concentración de fierro III en solución de 6465,1 mg/L.

Palabras claves: *Biooxidación*, *arsenopirita*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*.

## Abstract

This research was aimed at evaluating the degree of biooxidation of arsenopyrite concentrate for pure microbial culture (*A. ferrooxidans* DSMZ 1477) and a mixed microbial culture (50% of *A. ferrooxidans* DSMZ 1477 and 50% of *A. thiooxidans* DSMZ 1478). Crops, after his recovery, were adapted to mineral (FeAsS) amid 0K with 1% arsenopyrite.

The concentrations of 8 and 12% arsenopyrite, through Tyler mesh <200, they were placed in reactors, which had a working volume of 700 mL. They 0K medium was added along with their respective concentrations of mineral and autoclaved, to subsequently add 10% of microbial inoculum adapted. During 288 hours of the bio-oxidation process; microbial growth, pH, total iron, iron II and iron III solution was evaluated; and the end of biooxidation, the arsenopyrite surface, on the assistance of a scanning electron microscope (SEM) was used was observed.

It was concluded that the mixed microbial culture with arsenopyrite 8% was the highest degree of biooxidation obtained, achieving a concentration of iron in solution III 6465,1 mg / L.

**Key Works:** *Bio-oxidation, arsenopyrite, Acidithiobacillus ferrooxidans, Acidithiobacillus thiooxidans*

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, uno de los principales problemas en la minería viene siendo la dificultad de la extracción de oro en minerales refractarios que contienen arsénico, como es el caso de la arsenopirita. Debido a estas características que presentan ciertos minerales, no permiten durante su tratamiento la mayor recuperación de elementos económicamente importantes como es el oro, plata, etc. La presente tesis tiene por objetivo determinar el grado de biooxidación de la arsenopirita a diversas concentraciones por un cultivo microbiano puro (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) y mixto (*Acidithiobacillus ferrooxidans* + *Acidithiobacillus thiooxidans*).

Se conoce que las bacterias como *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* utilizan como fuente de energía compuestos inorgánicos, oxidando fierro y azufre elemental aunque en el caso de *A. thiooxidans* solo oxida azufre elemental.

La oxidación de los iones provoca que haya una disolución del mineral, de tal manera que el oro que se encuentra asociado a la matriz del mineral es

expuesto, de tal manera que durante el proceso de cianuración habrá mayor recuperación de oro.

La investigación se presenta en cuatro capítulos, basados en la normatividad que rige en la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. El Capítulo I denominado *El Planteamiento del Problema*, considera la justificación, importancia e hipótesis de la investigación; asimismo se dan a conocer la determinación de variables y los objetivos de investigación.

La revisión de la literatura, que sustenta teóricamente nuestro estudio se encuentra en el Capítulo II, denominado *Marco Teórico*, en el cual se expone y analiza las teorías, las conceptualizaciones, las perspectivas teóricas, las investigaciones y los antecedentes en general, que se consideren válidos para el correcto encuadre del estudio.

En el Capítulo III se diseña la Metodología de la Investigación, aquí se dan a conocer los materiales y métodos empleados en la presente investigación, también se describen los tratamientos de investigación y finalmente se presenta el respectivo análisis estadístico.

Es de importancia vital en toda investigación presentar los resultados y discusión de los mismos, por ello en el Capítulo IV, denominado *Resultados*, se describe los resultados encontrados en el presente estudio, los cuales, en la discusión respectiva, se los presentan relacionándolos con otros trabajos de investigación afines con nuestro tema de estudio cuyos resultados afianzan nuestra investigación. Finalmente se dan a conocer las conclusiones a las que arribó nuestra investigación así como las sugerencias las cuales esperamos se consideren por las entidades o personas referidas en el presente estudio.

## **CAPITULO I**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

#### **1.1 Justificación del Problema**

El problema de la refractariedad en menas de sulfuros para la extracción de metales preciosos es bien conocido y documentado a nivel mundial. En el caso de concentrados de arsenopirita aurífera el oro está directamente asociado a los sulfuros, puede ser por oclusión o bien por asociación. Las especies más comunes son la pirita y la arsenopirita, encontrándose en menor cantidad sulfuros como la esfalerita y la galena, además de sulfosales de cobre y antimonio.

Una alternativa biotecnológica para solucionar el problema de la refractariedad es el empleo de una variada cantidad de microorganismos quimiolitotrofos acidófilos, los cuales lixivian y oxidan los minerales que contienen sulfuros metálicos. Dicha tecnología ha venido ganando un gran apogeo en las últimas décadas, debido al mejoramiento en la cinética y la

eficiencia de los mecanismos implicados en los procesos de metalurgia extractiva.

La biooxidación es una tecnología relativamente nueva, capaz de aumentar la recuperación de metales económicamente importantes, como es el caso del oro. Debido a su disposición, encapsulada dentro de la arsenopirita, el proceso de cianuración, no permite una buena recuperación de oro, provocando un gasto excesivo de cianuro y pérdidas de metales valiosos.

El pretratamiento de biooxidación utilizando microorganismos quimiolitotróficos, capaces de oxidar hierro y azufre presentes en minerales refractarios, permite liberar parcialmente el oro encapsulado para que una vez expuesto, este sea tratado con menores cantidades de cianuro. Debido a ello, se considera una buena alternativa frente a los procesos de oxidación por presión, oxidación química y pirolixiviación (tostación) de donde se desprende en forma de gas el arsénico, antimonio y azufre.

Debido a que la arsenopirita presenta concentraciones elevadas de arsénico en su composición puede provocar la disminución en la actividad bacteriana y algunas veces hasta puede resultar nocivo.

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar el pre-tratamiento de biooxidación al mineral de arsenopirita, donado por la Empresa Minera Sudoeste S.A. Oruro – Bolivia, de tal manera que permita destruir la matriz del sulfuro que contiene encapsulado al oro, utilizando cepas microbianas *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* de la Colección Alemana de Microorganismos (DSMZ), donados por el laboratorio de Ingeniería Bioquímica de la Universidad de Valparaíso-Chile.

Es por ello que se plantea el siguiente problema de investigación ¿Cuál será el grado de biooxidación de un cultivo microbiano puro y mixto a diferentes concentraciones de arsenopirita?

## **1.2 Importancia de la Investigación**

Las investigaciones realizadas sobre la biooxidación tienen gran importancia, ya que es una tecnología ampliamente versátil, pues ofrece múltiples posibilidades, en cuanto a su economía y complejidad, para solucionar problemas en el campo de la recuperación de metales a diferentes escalas (Das y Sen, 2001; Karamanev *et al.*, 2001).

Estudios obtenidos demuestran que el proceso de oxidación biológica es una alternativa técnica, económicamente y ambientalmente viable, comparadas con oxidación a presión, tostación y oxidación química (D'Hugues *et al.*, 1997; Das y Sen, 2001, González *et al.*, 2003).

## **1.3 Hipótesis**

Los cultivos microbianos puro y mixto presentan diferentes capacidades biooxidativas sobre las concentraciones de arsenopirita al 8 y 12 %.

## 1.4 Determinación de variables

### 1.4.1 Tipos de variables

#### - Variable Independiente

- Arsenopirita al 8 % y 12%
- Cultivo microbiano puro (*A. ferrooxidans*) y Cultivo microbiano mixto (*A. ferrooxidans* + *A. thiooxidans*)

#### - Variable Dependiente

- Biooxidación de la arsenopirita

Indicador de la variable dependiente: Producción de Fierro III.

## 1.4.2 Operacionalización de variables e indicadores

**Tabla 1.** Operacionalización de variables y sus indicadores

<b>VARIABLE</b>		
<b>INDEPENDIENTE</b>	<b>DIMENSIONES</b>	<b>INDICADORES</b>
<b>Cultivos microbianos</b>	Células/mL	Crecimiento microbiano
<b>Concentración de Arsenopirita</b>	g/L	Corrosión del mineral
<b>VARIABLE</b>		
<b>DEPENDIENTE</b>	<b>DIMENSIONES</b>	<b>INDICADORES</b>
<b>Biooxidación de arsenopirita</b>	mg/L	Producción de Fierro III.

**Fuente:** Elaboración propia

## **1.5 Objetivos**

### **Objetivo General**

- Determinar el grado de biooxidación de la arsenopirita a diversas concentraciones por cultivos microbianos puro y mixto.

### **Objetivos Específicos**

- Evaluar la capacidad de biooxidación del cultivo puro y el cultivo mixto a concentraciones de arsenopirita de 8 y 12 %.
- Establecer el mayor grado de biooxidación del cultivo microbiano a concentraciones de arsenopirita de 8 y 12 %.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes

El tema de la biooxidación es un problema que se viene estudiando en diversas partes del mundo.

En la Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín se han venido desarrollando diversas investigaciones en el campo de la biotecnología y de las transformaciones mineralógicas mediadas por la acción de microorganismos. Entre ellos tenemos: *“Biooxidación de sulfuros complejos mediada por bacterias como pretratamiento, para el mejoramiento de la extracción de valiosos vía lixiviación con cianuro de sodio, mina El Zancudo, Titiribí, Antioquia”* Colciencias – U.Nal (2002-2004). *Biooxidación de sulfuros mediante cepas nativas de acidófilos compatibles con Acidithiobacillus ferrooxidans y thiooxidans, mina de oro El Zancudo, (Titiribí, Colombia)* (Diana, M et al., 2005), concluye

que hubo una actividad de oxidación eficiente, con niveles elevados de fierro.

El artículo de investigación, “*Evaluación de oxidación bacteriana de sulfuros con Acidithiobacillus ferrooxidans mediante pruebas de FTIR y difracción de rayos X*”, (Muñoz, A. et al, 2003) concluye que la cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* tuvo un efecto catalizador sobre la disolución del mineral, independientemente del tamaño de partícula y de la concentración de pulpa que se emplearon en este estudio.

Según Jornadas SAM 200-IV Coloquio latinoamericano de fractura y fatiga, agosto de 2000, “*Pretratamiento de un mineral refractario de oro mediante células de Thiobacilli*” (Chiacchiarinia, P., et. al, 2000), muestra que los cultivos microbianos mixtos logran mayor extracción de metales asociados probablemente a sulfuros del mineral (pirita y arsenopirita).

La investigación titulada “*Mineralogía del proceso de oxidación bacteriana de arsenopirita (FeAsS) y pirita (FeS<sub>2</sub>)*” (Ospina, J. 2010), concluye que los resultados obtenidos para la mezcla *A. ferrooxidans*

más *A. thiooxidans*, mostraron una eficiencia, igual o menor, en la oxidación comparada con *A. ferrooxidans*.

Las investigaciones realizadas por Arroyave, D. *et al.*, (2009), titulada “*Evaluación y caracterización mineralógica del proceso de biooxidación en un reactor continuo de tanque agitado*”, demuestra que durante el proceso de oxidación bacteriana se encontró la formación de silicatos, jarosita y frushita, lo que permite tener un mejor conocimiento del comportamiento del sistema, además demuestra que gracias al pretratamiento de biooxidación se puede tener mayores recuperaciones de oro.

El artículo de investigación “*Biooxidación de concentrados de arsenopirita por Acidithiobacillus ferrooxidans en erlenmeyer agitados* de Ospina, J.*et al.*, (2012), concluye que los tamaños de partícula juegan un papel importante en la cinética bacteriana, a menor tamaño de sustrato mayor dificultad se le presenta al microorganismo para oxidar.

La investigación “Efecto del tiempo de residencia sobre la biooxidación de un mineral aurífero refractario” por Jaramillo, K. *et al.*, (2014), evalúa el efecto del tiempo durante el proceso de biooxidación. Resultados mostraron que la mejor solubilización del mineral se consiguió en un tiempo de residencia de 6 días.

Las investigaciones en el Perú con respecto a la lixiviación y biooxidación están aún en desarrollo. El proyecto más resaltante realizado durante los últimos años en el Perú fue el de Tamboraque, 1998, donde utilizó bacterias (cultivo mixto) aisladas de drenajes ácidos de la mina Coricancha, para el tratamiento de 60 toneladas de concentrado de arsenopirita, donde se obtuvo la recuperación de oro de 90%.

En Tacna se realizó la tesis: “*Solubilización del zinc a partir del mineral esfalerita del Yacimiento minero — María Grimanesa por lixiviación microbiana con cepas nativas*”. (Albert Saavedra, 2009), donde se obtuvo un mayor grado de solubilización de zinc en el proceso de biolixiviación en columnas de lecho fijo de percolación con

*Acidithiobacillus ferrooxidans* MV-UNJBG 1 que con *Paecilomyces* MV-UNJBG 2.

## **2.2 Bases Teóricas**

### **2.2.1 Biominería**

En la actualidad es conocida la participación significativa de múltiples microorganismos en los procesos de extracción de metales de interés económico a partir de yacimientos o concentrados minerales de bajo tenor, así como sus potenciales aplicaciones (Lundgren, 1980; Bosecker, 1997) y posibles características ambientales benignas, (Modak, 1999), no obstante, es hasta cerca de 50 años que se conoce que son bacterias y mohos los grandes responsables del enriquecimiento de metales en agua de yacimientos y minas Bosecker, (1997). Tales características y ventajas están implicadas en una nueva era de la Minería conocida como “Biominería” Moffa, (1994), que contempla la aplicación de distintas tecnologías y procesos hidrometalúrgicos a través del uso de microorganismos para la extracción o disolución de metales de interés económico a partir

de minerales o sólidos, con la finalidad de recuperar los elementos deseados Brierley, (1978). El creciente interés en dichas tecnologías se basa fundamentalmente en la escasa contaminación de agua y tierras producto de la aplicación tentativa de las mismas, lo que le da el carácter de “Tecnología Limpia”, junto a sus comparativamente bajos, requerimientos de costo y energía Krebs, (1997).

### **2.2.2 Biooxidación**

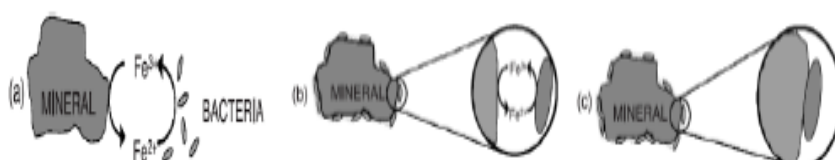
El término biooxidación es usado cuando el elemento a recuperar no puede ser solubilizado por los microorganismos pero su presencia beneficia la recuperación del mismo, a través de la degradación de la matriz mineral en la que está ocluido el elemento de interés Donati, (2006). Llamada también oxidación bacteriana, es un proceso en el cual ciertos microorganismos oxidan los sulfuros a través de mecanismos de acción directa e indirecta. Estos microorganismos utilizan como fuente primaria de energía las especies reducidas de hierro, azufre, y el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono para su síntesis celular Rodríguez *et al.*,

(2001), y generan durante el proceso grandes cantidades de ácido y arsénico.

Como uno de los desarrollos más notables en el estudio de los procesos de disolución de minerales, durante los últimos años, se encuentra los fundamentos bioquímicos de las reacciones de lixiviación, a continuación se explican los mecanismos químicos detrás del comportamiento del azufre en estos procesos Schippers y Sand (1999).

La comunidad científica internacional, en general, tiene el consenso que microorganismos como *Acidithiobacillus ferrooxidans* no son capaces de oxidar directamente un mineral a través de la adherencia a la superficie de éste Sand *et al.*, (1995); Jonson *et al.*,(2007), pero el acuerdo también es general referente a que estos microorganismos son capaces de transformar los iones Fe(II) a Fe(III) y lo hace como mecanismo indirecto de oxidación bajo dos submecanismos: de contacto indirecto y de no contacto, Rawlings, (2001); Sand *et al.*, (2001);

Rawlings, (2002); Foucher *et al.*, (2003); Vardanyan y Akopyan, (2003); Mignone y Donati, (2004); Rawlings, (2005).



**Figura 1.** Mecanismos de oxidación bacteriana propuestos por Silverman (1967). a) Mecanismo indirecto. b) Mecanismo de contacto indirecto. c) Mecanismo de contacto directo.

**Fuente:** Crundwell, (2003).

En el mecanismo indirecto, o de no contacto, la función de las bacterias presentes en la solución es la de oxidar los iones  $Fe$  (II) a  $Fe$  (III), este ión resultante entra en contacto con la superficie del mineral donde es reducido a expensas de la salida de un nuevo ión  $Fe$  (II) y regenerar el ciclo de una forma exponencial Sand *et al.*, (1995).

En el mecanismo de contacto indirecto la mayoría de los microorganismos están adheridos a la superficie del mineral, lo que implica que los procesos bioquímicos de transferencia electrónica, responsables de la disolución del mineral, tomen

lugar en la interface entre el mineral y la pared celular de la bacteria, en ambos mecanismos, contacto indirecto y directo, la contribución de la bacteria a la disolución del mineral es la regeneración del agente oxidante, el ión Fe (III) y la subsecuente oxidación de los compuestos resultantes de la disolución Rohwerder y Sand, (2003).

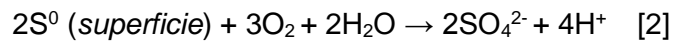
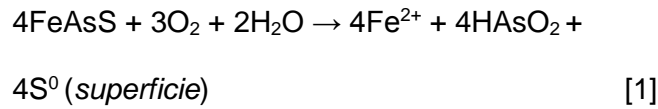
Varios autores han observado que la disolución de algunos minerales puede ser controlada por la estructura cristalográfica del mineral y esta determina la adherencia de los microorganismos a la superficie de la arsenopirita. Por ejemplo, Sampson *et al.*, (2000) observó que las células de *A. ferrooxidans* se adhieren a la superficie de arsenopiritas y loellingitas a lo largo de defectos cristalinos. Edwards y *col.*, (2000) investigó que la adherencia de *Acidithiobacillus caldus* en agregados masivos de arsenopirita y encontraron que la disolución ocurría en forma preferencial. Ellos sugirieron que esto podría deberse a que las células se adhieren a lo largo de *pits* y defectos en la estructura del material o en zonas ricas en

azufre. Estos resultados están de acuerdo con McGuire *et al.*, (2001b) quienes sugirieron que la adherencia celular debería ser controlada por las zonas de acumulación de azufre sobre la superficie del mineral. Edwards *y col.*, (2001) observó *pits* de disolución del tamaño de células bacterianas sobre la superficie oxidada de la arsenopirita en la presencia de *Ferroplasma acidarmanus* a 37 °C. El tamaño de los *pits* fue asociado con el incremento en la velocidad de disolución del mineral. Harneit *et al.*, (2005) observaron la ubicación preferencial de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre una superficie mineral con defectos visibles y atribuyeron éste comportamiento a una mayor viabilidad de azufre y de Fe (II). Células individuales fueron difíciles de detectar después de 120 horas de experimentación debido a la formación de *biofilm*sobre la superficie.

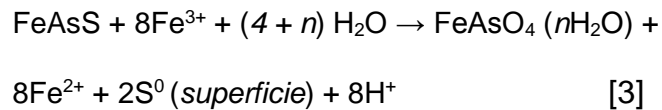
Se han realizado algunas investigaciones sobre la influencia de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas en la adherencia de *A. ferrooxidans* sobre la superficie de la arsenopirita. Cruz *et al.*, (2005) observó que la adherencia de los

microorganismos no ocurre inmediatamente, esto se puede deber a un proceso de disolución ácida que modifica la estructura superficial del mineral y promueve la lixiviación preferencial del Fe(II), una fuente energética más viable que la arsenopirita misma.

Sampson y Blake (1999) investigaron la adherencia de *A. ferrooxidans* a concentrados de arsenopirita y loellingitas. Encontraron que la adherencia de las células se debía, probablemente, a una unión proteica. Fernández y col., (1995) sugirió un mecanismo de tres pasos para la biooxidación de la arsenopirita por *A. ferrooxidans*. Ellos propusieron que el mecanismo de oxidación es iniciado por el crecimiento de las bacterias sobre la superficie del mineral, lo que genera *pits* de corrosión y disolución preferencial de Fe (II), As (III), S (IV) y S (0), según las siguientes ecuaciones:



Las altas concentraciones de Fe (II) en la solución aumenta la velocidad de crecimiento de los microorganismos. Luego la generación de Fe (III), promovida por bacterias, producido en la superficie del mineral. Este proceso produce arsenatos férricos de baja cristalinidad, ecuación [3]:



Fernández *et al.*, (1995) concluyeron que, a pesar de la evidencia de la biooxidación directa, un mecanismo de oxidación indirecta ocurre durante la disolución del mineral.

Sampson *et al.*, (2000) argumenta que pese a la evidencia de la adherencia de los microorganismos a la superficie de la

arsenopirita, el mecanismo de disolución del mineral es una mezcla de mecanismos indirectos y directos, y sugieren que el mecanismo de oxidación directa está presente en las etapas iniciales de la oxidación del mineral hasta el punto donde la concentración de Fe (II) es lo suficientemente alta. Lo que está de acuerdo con Corkhill *et al.*, (2008) quienes sugieren que la oxidación directa es poco probable. Carlson *et al.*, (1992) observaron la formación de jarositas ( $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ ) y escoroditas ( $\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) después de un proceso de biooxidación de arsenopirita con *A. ferrooxidans*.

Fernández *et al.*, (1995) reportaron la presencia de arsenatos férricos y azufre elemental sobre la superficie de la arsenopirita biooxidada por *A. ferrooxidans*. Tuovinen *et al.*, (1994) observó que la disolución de la arsenopirita producía jarositas, azufre elemental y arsenatos férricos cuando el mineral reaccionaba con *Acidithiobacillus caldusa* 45 °C. Ellos sugirieron que la cantidad de precipitados formados es controlada por la cantidad de superficie oxidada del mineral, el pH y la composición iónica

de la solución lixivante. McGuire *et al.*, (2001b) también observaron azufre elemental como producto de la oxidación del mineral. Sugirieron que, aunque se forma una película delgada sobre la superficie del mineral, la lixiviación del mineral por *A. caldus* no fue inhibida.

Varios estudios de la toxicidad del arsénico sobre bacterias y arqueas se han desarrollado Stolz *et al.*, (2006). Los iones arsenitos ( $\text{AsO}_3^{3-}$ ) inhibe compuestos importantes, deshidrogenasas tales como pirubica y  $\alpha$ -cetoglutarato, en procesos bioquímicos y los iones arsenatos inhiben la formación de ATP por quimiosmosis Stolz *et al.*, (2006). Sin embargo, también hay estudios que demuestran que cierto tipo de microorganismos son capaces de tolerar grandes cantidades de arsénico a través de un mecanismo de eliminación de este. Collinet y Morin (1990) observaron que la concentración de As (III) tiene un fuerte efecto sobre el crecimiento de *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* en concentrados de pirita y arsenopirita. La disminución en la velocidad de crecimiento ocurre a

concentración de As (III) de 10 gL<sup>-1</sup> y estas bacterias fueron capaces de crecer hasta concentraciones de As (V) de 40 gL<sup>-1</sup>.

Edwards *et al.*, (2000) trabajando con *A. caldus* sobre concentrados de arsenopirita observó que las curvas de crecimiento eran erráticas y atribuyeron esto a la toxicidad del As (III) y As (V). Hallberg *et al.*, (1996) también observaron que el As (III) reduce la viabilidad de *A. caldus*. Ellos observaron partículas de azufre extracelular indicando que la habilidad de *A. caldus* fue inhibida ante la presencia de los iones de arsénico. Estudios posteriores por Dopson *et al.*, (2001) y Groot *et al.*, (2003) identificaron un gen de resistencia al arsénico en *A. caldus*. Esto permite un mecanismo de eliminación de arsénico que se produce cuando la arsenato–reductasa (*arsC*) reduce el arsénico en el interior de la célula y una bomba específica de salida de arsénico (*arsB*) saca este ion, fuera de la célula, a través de la membrana citoplasmática. Un mecanismo similar fue identificado para *A. ferrooxidans* Butcher *et al.*, (2000), para *L. ferriphilum* Tuffin *et al.*, (2006) y para *L. ferrooxidans* Corkhill *et*

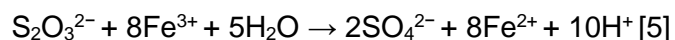
*al.*, (2008) quienes observaron, también, que *L. ferrooxidans* es capaz de soportar una concentración mucho mayor de arsénico en comparación con los demás microorganismos.

### ➤ CAMINO DE LAS REACCIONES

Las reacciones de disolución de los sulfuros son determinadas por la reactividad de los minerales con los protones Sand y Gehrke, (2006). Por ejemplo, el ácido no soluble de minerales como pirita ( $\text{FeS}_2$ ), molibdenita ( $\text{MoS}_2$ ) y tungestenita ( $\text{WS}_2$ ), disulfuros son degradados por un mecanismo diferente que el de ácidos solubles provenientes de minerales como la esfalerita ( $\text{ZnS}$ ), galena ( $\text{PbS}$ ), calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) y arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ), monosulfuros Suzuki, (2001); Rodríguez *et al.*, (2003); Sand y Gehrke, (2006). En estos dos grupos se pueden definir dos mecanismos diferentes para la oxidación bacteriana de sulfuros, “mecanismo vía tiosulfatos” y “mecanismo vía polisulfuro”, descritos a continuación:

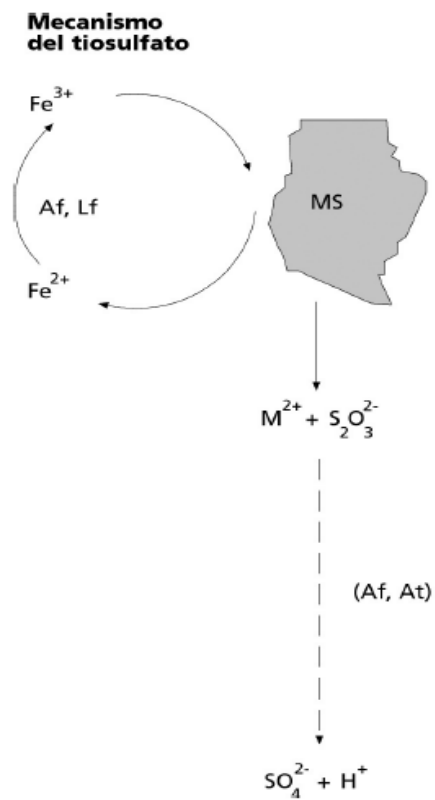
### **Mecanismo vía tiosulfato**

Según, Sand *et al.*, (1995, 1999), el mecanismo indirecto vía tiosulfato, que describe el mecanismo de degradación de ácidos no solubles de disulfuros como la pirita, la molibdenita y la tungestenita Suzuki, (2001); Rodríguez *et al.*, (2003); Sand y Gehrke, (2006). En este mecanismo el ión férrico hexahidratado comienza el ataque indirecto a los sulfuros. La pirita es disuelta vía la extracción de electrones por los iones hidratados de hierro (III) de acuerdo a las siguientes reacciones Suzuki, (2001).



En estas reacciones, el tiosulfato se supone es formado a partir del di-sulfuro contenido en el cristal de la pirita ( $\text{Fe-S-S} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{S-SO}_3^{2-}$ ). En este mecanismo los sulfuros no generan azufre como principal producto en la oxidación sino tiosulfato,

que es el primer intermediario liberado por el sulfuro luego de la oxidación Suzuki, (2001).



**Figura 2:** Mecanismo indirecto en la biooxidación de sulfuros (mecanismo de tiosulfato)  
**Fuente:** Sand, (2001)

### **Mecanismo vía polisulfuro**

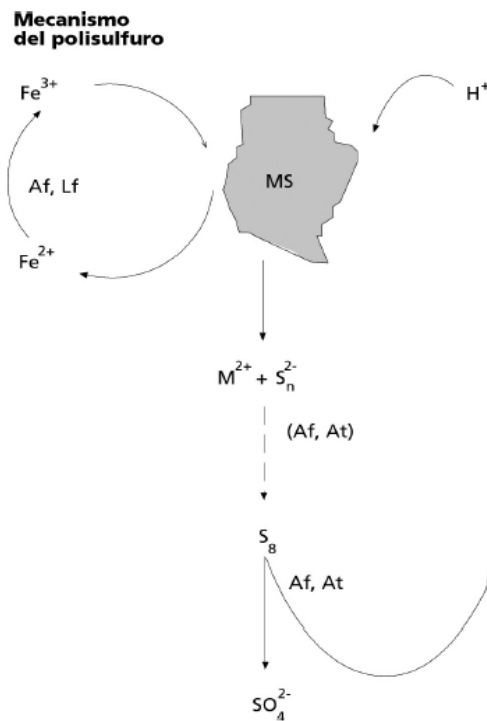
El mecanismo para la degradación de sulfuros con el intermediario principal polisulfuro es válido para ácidos solubles de monosulfuros como la esfalerita, galena, calcopirita y arsenopirita Suzuki, (2001); Sand y Gehrke, (2006). El ataque sobre el mineral es llevado a cabo por la acción combinada de protones y hierro (III). Los protones inducen la polarización del ión sulfuro superficial y la liberación del sulfuro es reforzada por la transferencia de electrones al ión férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) Sand y Gehrke, (2006).

Tributsch (1999) también reconoce que la oxidación del mineral por parte de la bacteria depende del tipo de sulfuro, debido a que estos presentan reacciones diferentes. Así, la esfalerita ( $\text{ZnS}$ ),  $\text{CdS}$ , galena ( $\text{PbS}$ ), covelina ( $\text{CuS}$ ), oropimente ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ), haverita ( $\text{MnS}_2$ ) son más fácilmente solubilizadas, mientras la molibdenita ( $\text{MoS}_2$ ), tungestenita ( $\text{WS}_2$ ), pirita ( $\text{FeS}_2$ ) no lo son. Lo anterior, puede ser explicado sobre la base de que los minerales con sulfuros con estado

de oxidación  $S^{-2}$ , como el ZnS, CuS, CdS, PbS,  $As_2S_3$ ,  $MnS_2$  tienen un nivel de mayor energía debido a un estado de mayor oxidación, donde la extracción de electrones de la banda de valencia por el ión férrico ( $Fe^{3+}$ ) y los protones ( $H^+$ ) provoca la disolución del sulfuro. Mientras que en minerales con sulfuros con estado de oxidación  $S^{-1}$ , como la  $FeS_2$ ,  $RuS_2$ ,  $MoS_2$ ,  $WS_2$ , la extracción de electrones provoca un aumento en el estado de oxidación del metal (aumento en el nivel de energía sin la dilución del sulfuro) Tributsch, (1999).

Por lo anterior, los mecanismos tiosulfato y polisulfuro actúan de acuerdo a la capacidad de los sulfuros a ser disueltos por ácidos, lo que está relacionado con las bandas de valencia de las que son extraídos los electrones durante el ataque. Los sulfuros que solo pueden ceder electrones desde las bandas de valencia del metal (sin afectar, en principio, el enlace azufre-metal) son denominados no solubles en ácido y en ellos actúa el mecanismo vía tiosulfato, mientras que los sulfuros que son solubles en ácido, y en el que procede el

mecanismo vía polisulfuro el ataque del hierro férrico o protones produce la transferencia de electrones desde el sulfuro provocando de esta forma la ruptura del enlace azufre-metal Tributsch, (1999); Suzuki, (2001) y Donatti, (2006).



**Figura 3.** Mecanismo indirecto en la biooxidación de sulfuros (mecanismo de polisulfuro)  
**Fuente:** Sand, (2001)

## ➤ VENTAJAS DE LA BIOOXIDACIÓN DE SULFUROS

La oxidación biológica de sulfuros metálicos se ha convertido en una alternativa importante y eficiente para el manejo de minerales auroargentíferos de carácter refractario, ya que cuenta con ventajas significativas sobre las otras tecnologías, de las cuales las más importantes son (Ortiz, (1992); Karamanevet *al.*, (2001); Márquez, (2002).

- La simplicidad y versatilidad del diseño y las operaciones, hacen esta tecnología apropiada para el uso en locaciones remotas. No se requiere de mano de obra muy calificada.
- La puesta en marcha es corta y los costos de capital y operación son bajos comparados con las técnicas de tostación y oxidación a presión.
- Es flexible y puede utilizarse para tratar una diversidad de sulfuros metálicos individuales o mezclas de minerales.

- La forma en que se puede aplicar varía desde un simple lecho fijo de percolación hasta sistemas de lixiviación en tanques de agitación.
- No requiere temperaturas ni presiones altas para su operación.
- Es autogeneradora de solventes en forma de solución de sulfato férrico, lo cual reduce las necesidades de este reactivo en el ataque de los minerales.
- Ausencia de polución por gases sulfurosos, ya que cualquier efluente líquido que produce está en una forma acuosa, que puede ser convenientemente neutralizada y no da lugar a la formación de subproductos gaseosos nocivos.

### 2.2.3 Mineral Arsenopirita

La arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ) es la fuente mineral de arsénico más común en la superficie terrestre. Se puede encontrar en una variedad de sistemas tales como depósitos magmáticos, hidrotermales y pórfidos, entre

otros. Es por esto que está comúnmente asociada a la aparición de oro, generando su amplia explotación y posterior descarga como desechos sólidos en los procesos mineros (Corkhill y Vaughan, 2009).

Es un mineral estable bajo condiciones reductoras, pero es oxidado durante condiciones de intemperismo, liberando durante este proceso  $H_2SO_4$ ,  $H_3AsO_3$  y  $H_3AsO_4$  (Nesbitt *et al.*, 1995).

Debido a su asociación con el oro. La forma en que este se encuentra asociado a la arsenopirita son diversas, las más comunes son, en fracturas que presenta el mineral, en vetas entre la arsenopirita y otro mineral, encapsulado en la matriz de  $FeAsS$  y formando una solución sólida con esta. Datos experimentales obtenidos por (Clark, 1996), mostraron que el oro se difunde fácilmente en la arsenopirita a temperatura de 600 – 700 °C.

Esta observación proporciona una posible explicación de los diferentes modos de asociación entre oro y arsenopirita. De acuerdo con esto el oro pudiera ser capturado en solución sólida a las altas temperaturas asociadas con la formación primaria de la arsenopirita. En el enfriamiento posterior de la masa de mineral, la presencia del oro distorsionaría la red cristalina de la arsenopirita aumentando así la energía libre de los cristales.

Posteriormente la migración del oro hacia las fracturas y límites de grano y la cristalización minimizarías la energía libre del sistema. Esto también parece explicar la presencia frecuente de oro “invisible” en arsenopirita relativamente no fracturada.

La recuperación de oro presente en este tipo de mineralización se dificulta por los métodos convencionales de extracción, ya que al estar atrapado en

la matriz de la arsenopirita, no podrá ser liberado por molienda fina, quedándose en los jales sulfurosos, considerándoles por esta razón minerales complejos o refractarios.

El procedimiento de estos minerales requiere de un pretratamiento para destruir la matriz sulfurosa y liberar al oro atrapado en ella. Este pre-tratamiento consiste en romper la estructura del cristal y liberar el oro el remover al azufre y la arsenopirita por medio de una oxidación.

Hasta hace pocos años, el método utilizado era la obtención de concentrado por flotación, para seguir con una oxidación por tostación y finalizar con un proceso de cianuración. En la actualidad se busca alternativas al proceso de tostación por los problemas de contaminación ambiental que lo acompañan, causando estos por la emisión de gases tóxicos de arsenopirita,  $As_2O_3$ , y dióxido de azufre,  $SO_2$ .

#### 2.2.4 Microorganismos Lixiviantes Mesófilos

En 1947, Colmer y Hinkle observaron que la oxidación de hierro asociada a la formación de drenajes ácidos de minería era un proceso que involucraba ciertos microorganismos, los cuales aumentaban la oxidación y solubilización de los sulfuros presentes en los drenajes ácidos de una mina de carbón en Estados Unidos. Grandes esfuerzos en la caracterización de la flora microbiana de estos efluentes dieron sus frutos cuando se logró aislar microorganismos como *Thiobacillus thiooxidans* (Colmer y Hinkle, 1947; Temple y Colmer, 1950) los cuales tienen la capacidad de aumentar la velocidad de oxidación de las inclusiones de pirita en el carbón, derivar la energía necesaria para la producción de ATP (adenosíntrifosfato) de la catálisis oxidativa de compuestos inorgánicos y fijar el carbono necesario para su metabolismo del CO<sub>2</sub> atmosférico. Estos microorganismos fueron considerados responsables de la oxidación del ion Fe<sup>+2</sup> hasta el ion Fe<sup>+3</sup>, por lo tanto el

grupo de Colmer, propuso el nombre de *Thiobacillus ferrooxidans* sp. (Colmer y Hinkle, 1947; Temple y Colmer, 1950).

En adelante, y debido al gran interés económico y a la relevancia en diversas áreas de la actividad humana, muchas investigaciones han sido enfocadas sobre el papel que tienen los microorganismos en la oxidación y lixiviación de sulfuros (Vanselow, 1976; Bruynesteyn, 1989; Rossi, 1990; Acevedo y Gentina, 1993; Ahonen y Tuovinen, 1993-1994; McIntosh *et al.*, 1997; Brierley, 2001; Rawlings, 2002; Rohwerder *et al.*, 2003; Olson *et al.*, 2003; DaSilva, 2004; Francisco, 2006; Ehrlich y Newman, 2008).

Los microorganismos acidófilos se clasifican de acuerdo al intervalo de temperatura óptima de crecimiento en mesófilos, moderadamente termófilos y termófilos extremos. Los microorganismos mesófilos crecen a una

temperatura alrededor de 30 y 40 °C. En este grupo el *Leptospirillum ferrooxidans* es capaz de crecer a una temperatura de 45 °C. Dentro de los microorganismos capaces de crecer a temperaturas mayores, se encuentran los *Sulfobacillus sp* que son moderadamente termófilos (40 – 60 °C). Los termófilos extremos son capaces de crecer a temperaturas superiores a los 70 °C. (Suzuki 2001; Donatti, 2006).

En la tabla 2 se presenta la clasificación de varios microorganismos usados en los procesos de lixiviación de sulfuros.

**Tabla 2.** Clasificación de microorganismos usados en la biolixiviación de metales.

GRUPO	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS
		FISIOLÓGICAS
<b>Mesófilos</b>	<i>Acithiobacillus</i>	Oxida el Fe <sup>+2</sup> y S <sup>0</sup>
	<i>ferrooxidans</i>	Oxida el S <sup>0</sup>
	<i>Acithiobacillus thiooxidans</i>	Oxida el Fe <sup>+2</sup>
	<i>Leptospirillum</i>	Oxida el Fe <sup>+2</sup>
	<i>ferrooxidans</i>	Oxida el Fe <sup>+2</sup>
	<i>Ferroplasmaacidarmanus</i>	
	<i>Ferroplasmaacidiphilum</i>	
<b>Termófilos moderados</b>	<i>Sulfolobussulfataricus</i>	Oxida el S <sup>0</sup>
	<i>Sulfobacillustermosulfidooxidans</i>	Oxida el Fe <sup>+2</sup> y S <sup>0</sup>
	<i>Sulfobacillusacidophilus</i>	Oxida el S <sup>0</sup>
	<i>Acithiobacilluscaldus</i>	
	<i>Sulfolobusacidocaldarius</i>	Oxida el S <sup>0</sup> y Fe <sup>+2</sup>
<b>Termófilos extremos</b>	<i>Acidianusbrierleyi</i>	Oxida el S <sup>0</sup> y Fe <sup>+2</sup>

**Fuente:**(Suzuki, 2001, Donatti, 2006)

Los microorganismos más empleados en el uso de lixiviación de sulfuros metálicos son los llamados *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* cuyas principales características son: crecer a temperaturas de 20 – 30°C (mesófilos), vivir en ambientes cuya acidez puede bajar hasta pH <1 y quimiolitautótrofos ya que tienen como fuente de energía componentes inorgánicos. (Bozdemir *et al.*, 1996, Rawling *et al.*, 1999, Daoud & Karamanev 2006).

- *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Antes conocida como *Thiobacillus ferrooxidans* (Temple y Colmer, 1951) y reclasificada como *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Kelly y Wood, 2000), es una bacteria aerobia, con forma de bastón, Gram negativa, no forma spora y tiene dimensiones de 0,5 µm de ancho y 1,0 a 2,0 µm de largo con extremos redondeados (Rossi, 1990). Es un microorganismo mesófilo, capaz de catalizar la oxidación de sulfuros metálicos por el mecanismo directo y el mecanismo

indirecto (Torma, 1977). Presenta un flagelo polar, encontrándose usualmente en aguas ácidas de mina de carbón y hierro.

- *Acidithiobacillus thiooxidans*

Antes conocida como *Thiobacillus thiooxidans* (Waksman y Joffe, 1922) y reclasificada como *Acidithiobacillus thiooxidans* (Kelly y Wood, 2000), es una bacteria extremadamente acidófila, pues presenta tolerancia a ambientes ácidos con un pH de 1 o inferior (Chen y Lin, 2004). Es muy conocido por su oxidación de azufre elemental pero no Fe II, se cree que es el responsable de la rápida disolución de los sulfuros metálicos. Por esta razón la acción de *A. thiooxidans* en sulfuros metálicos solo se ha estudiado parcialmente. Aunque las poblaciones compuestas por *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* en minerales de cobre mostraron altas recuperaciones de cobre durante la lixiviación (Khalid 1988; Falco *et al.*, 2003).

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar de experimentación**

- Laboratorio de Micología y Virología. Escuela de Biología y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna.
- Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna.
- Laboratorio de Biohidrometalurgia de la Escuela de Ingeniería Metalúrgica de la Facultad de Metalúrgica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna.

### 3.2 Material en estudio

Arsenopirita (FeAsS), donada por la Empresa Minera Sudoeste S.A.

Oruro – Bolivia con un tamaño de partícula pasante malla Tyler < 200.

**Tabla 3.** Análisis químico de la arsenopirita aurífera (concentrado)

Leyes %, Au y Ag en g/tn													
Au	Ag	As	Bi	Cd	Co	Fe	Ni	Pb	Sb	Zn	Cu	Al	SiO <sub>2</sub>
g/t	g/t	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
81,5	154	33,8	1,84	0,01	1,4	27,9	1,72	1,21	0,22	2,88	0,07	0,21	5,15

**Fuente:** Laboratorio SGS Bolivia S. A.

**Tabla 4.** Análisis mineralógico de la arsenopirita aurífera

CONCENTRADO	FORMULAS	%
Pirita	FeS <sub>2</sub>	7
Calcopirita	CuFeS <sub>2</sub>	0,2
Esfalerita	ZnS	4,3
Galena	PbS	1,6
Arsenopirita	FeAsS	73,5
Ganga	---	13,4

**Fuente:** Empresa EMISOL S. A. – Bolivia

Cultivos microbianos puros (*Acidithiobacillus ferrooxidans* DSMZ 1477 y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSMZ 1478), donados por el laboratorio de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Bioquímica de la Universidad de Valparaíso-Chile que a su vez fueron adquiridas de la Colección Alemana de Microorganismos (DSMZ).

### **3.3 Métodos**

Se aplicó el diseño de tratamientos factorial con dos niveles por factor según Ayala (1995).

Se trabajó con 4 tratamientos, cada tratamiento con dos repeticiones, cada repetición constituyó una unidad experimental la cual estuvo formado por un biorreactor, el que contenía un tipo de cultivo microbiano con una determinada concentración de arsenopirita (W/V).

### 3.4 Tratamientos de la experimentación

Se empleó cuatro tratamientos cada uno con dos repeticiones

Los tratamientos fueron:

**Tabla 5.** Tratamientos de experimentación

TRATAMIENTOS
T1 = Cultivo microbiano puro ( <i>A. ferrooxidans</i> ) + arsenopirita 8%
T2 = Cultivo microbiano puro ( <i>A. ferrooxidans</i> ) + arsenopirita 12%
T3 = Cultivo microbiano mixto ( <i>A. ferrooxidans</i> + <i>A. thiooxidans</i> ) + arsenopirita 8 %
T4 = Cultivo microbiano mixto ( <i>A. ferrooxidans</i> + <i>A. thiooxidans</i> ) + arsenopirita 12%

**Fuente:** Elaboración propia

La presente tesis es de tipo experimental ya que las variables independientes como concentración de arsenopirita e inóculo microbiano fueron variables manipuladas por el investigador, durante la realización de la presente tesis. Se utilizaron dos concentraciones de arsenopirita (8 y 12 %) y dos cultivos microbianos (cultivo microbiano puro y cultivo microbiano mixto).

### **3.5 Metodología**

#### **3.5.1 Evaluación de la estructura de la arsenopirita (Arroyave D. y col., 2009)**

La evaluación se realizó después de la biooxidación con los cultivos microbianos. Para ello se empleó un Microscopio electrónico de barrido (SEM) con el que se pudo observar la estructura en superficie de la arsenopirita la cual fue fotografiada para su descripción. Esta evaluación se hizo en el Laboratorio de Biohidrometalurgia de la Facultad de Metalurgia- UNJBG

#### **3.5.2 Reactivación de los cultivos microbianos puros (Pavez, 2011)**

Se extrajo 2 mL por separado de los cultivos *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*, que estuvieron en stock y en estado de conservación a 4 °C, para ser agregado a 25 mL de medio de cultivo en frascos biorreactores. A continuación se muestra la composición del medio de cultivo empleado para cada especie microbiana.

**Tabla 6.** Medio de cultivo 9K-Fe para reactivar a *A. ferrooxidans*

Medio 9K-Fe	
Componentes	g/L
$K_2HPO_4$	0,04
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,4
$(NH_4)SO_4$	0,1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	33,3
pH	1,5; ajustado con $H_2SO_4$

Fuente. (Kim y cols, 2002)

**Tabla 7.** Medio de cultivo 9K-S para reactivar *A. thiooxidans*

Medio 9K-S	
Componentes	g/L
$K_2HPO_4$	0,04
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,4
$NH_4SO_4$	0,1
Azufre	5,0
pH	1,5; ajustado con $H_2SO_4$

Fuente: (Kim y cols, 2002)

Se incubó los medios a 25 °C con aireación hasta que se obtuvo una concentración de  $10^8$  células/mL. Se hizo el recuento microbiano mediante la cámara de Neubauer y un microscopio de campo claro.

### **3.5.3 Masificación de los cultivos microbianos** (Diana M, *et al.* 2005)

Para cada cultivo microbiano por separado se inoculó 25 mL de cultivo microbiano reactivado (10 %) y 225 mL de medio de cultivo en un matraz. Se incubó el matraz a 25 °C con aireación hasta que alcanzó una concentración de  $10^8$  células/mL.

### **3.5.4 Adaptación de los cultivos microbianos**

Se agregó arsenopirita al 1 % (W/V) a 600mL del medio de cultivo OK contenido en un matraz, luego 10 % (V/V) de inóculo del microbio correspondiente y finalmente se incubó a 25 °C con aireación hasta que se alcanzó  $10^8$  células/mL.

### **3.5.5 Biooxidación de la arsenopirita por un cultivo microbiano puro (*A. ferrooxidans*)**

Se agregó a un biorreactor de 1000cm<sup>3</sup>, 630 mL de medio de cultivo OK (Tabla 8), previamente autoclavado y 70 mL de inóculo microbiano adaptado (*A. ferrooxidans*), finalmente 8 y 12 % (W/V) de arsenopirita de acuerdo al diseño experimental. Todo esto se hizo en su respectivo medio de cultivo. Cada biorreactor tuvo dos repeticiones. Todos fueron incubados a 25 °C con aireación hasta después de observarse incremento de biomasa microbiana, a través de los recuentos microbianos con cámara de Neubauer y un microscopio de campo claro.

### **3.5.6 Biooxidación de la arsenopirita por un cultivo microbiano mixto (*A. ferrooxidans* + *A. thiooxidans*)**

Se agregó 630 mL de medio de cultivo OK (Tabla 8), esterilizado a un biorreactor con capacidad de 1000 cm<sup>3</sup>, 35 mL de inóculo de cada uno de los dos cultivos microbianos puros de *Acidithiobacillus* adaptados y arsenopirita al 8 y 12 % (W/V) de acuerdo al diseño experimental. Cada biorreactor tuvo dos

repeticiones, se incubaron a 25 °C con aireación hasta que después se alcanzó el máximo crecimiento de biomasa.

**Tabla 8.** Medio de cultivo para la biooxidación

<b>MEDIO DE CULTIVO 0K</b>	
<b>Composición</b>	<b>[g/L]</b>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0,04
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0,4
<b>(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub></b>	0,1
<b>pH</b>	1,5; ajustado con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

**Fuente:** (Kim y col, 2002)

### 3.5.7 Evaluación del proceso biooxidativo de la arsenopirita

- Se tomó muestras de la fase dispersante de los biorreactores desde las 0 hasta las 288 horas, y se evaluó el crecimiento poblacional microbiano, el pH y la concentración de hierro total, hierro II y hierro III; de los cultivos microbianos puros (*A. ferrooxidans*) y mixto (*A. ferrooxidans* + *A. thiooxidans*) con arsenopirita al 8 y 12 %.

- El crecimiento poblacional se evaluó con la cámara de conteo de células Neubauer y un microscopio de campo claro.
- El pH se evaluó con un pHmetro digital marca HANNA Instruments.
- El hierro total y hierro III se evaluó utilizando un espectrofotómetro en el cual se determinó las absorbancias de las muestras que a su vez fueron llevadas a una curva de calibración para que en ella se determinara la concentración de hierro en función del valor de absorbancia.

### **Determinación de la curva de calibración**

La curva de calibración para la determinación de la concentración de fierro se obtuvo de la siguiente manera (Cabaña, 2005).

- Se preparó una solución madre de 100 ppm de  $\text{Fe}^{+3}$ . Se pesó 0,00244g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y se le colocó en una fiola de 50mL de capacidad que a su vez se enrazó a 50mL con agua destilada.
- Se obtuvo diluciones con agua destilada desde la solución madre de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm en tubos de ensayo.
- A continuación a 5 tubos de ensayo se le agregó 0,5 mL de cada dilución y a un sexto tubo 0,5 mL de agua destilada (blanco).
- A los 6 tubos se les añadió, 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3M, 1 – 2 gotas de  $\text{KMnO}_4$  0,1N y 3 mL de KSCN 2M. Finalmente todos fueron enrazados con agua destilada hasta 10 mL.
- Se hizo la lectura de absorbancias en el espectrofotómetro a 477 nm de longitud de onda.
- Las lecturas de absorbancias versus sus respectivas concentraciones se graficaron en Excel, para establecer la curva de calibración.

### **Determinación de hierro total**

La determinación de hierro total se hizo de la siguiente manera:

Se colocó en un tubo de ensayo 0,5 mL de muestra procedente del biorreactor; 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3M; 1 – 2 gotas de  $\text{KMnO}_4$  0,1N y 3 mL de  $\text{KSCN}$  2M.

- El tubo se enrazó a 10mL con agua destilada.
- Se hizo lectura de absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 477nm. Estas lecturas fueron llevadas a la curva de calibración para determinar la concentración de hierro total.

### **Determinación de hierro III**

La determinación de hierro III se hizo como se indica a continuación:

- En un tubo de ensayo se colocó 0,5mL de muestra procedente del biorreactor, 0,5mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3M y 3mL de  $\text{KSCN}$  2M.
- Se enrazó el tubo a 10mL con agua destilada.

- Se hizo lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 477nm.
- Se llevó la lectura a la curva de calibración para determinar la concentración de fierro III.

### **Determinación de fierro II**

Se hizo considerando la fórmula siguiente:

$$\text{Fe}^{+2} = \text{Fe}_{\text{total}} - \text{Fe}^{+3}$$

### **3.5.8 Determinación de la capacidad biooxidativa de los cultivos microbianos sobre la arsenopirita**

Fue determinada en función de la obtención de curvas con pendiente positiva para la relación concentración microbiana versus tiempo, para la relación concentración de fierro III versus tiempo; y con pendiente negativa para la relación pH versus tiempo

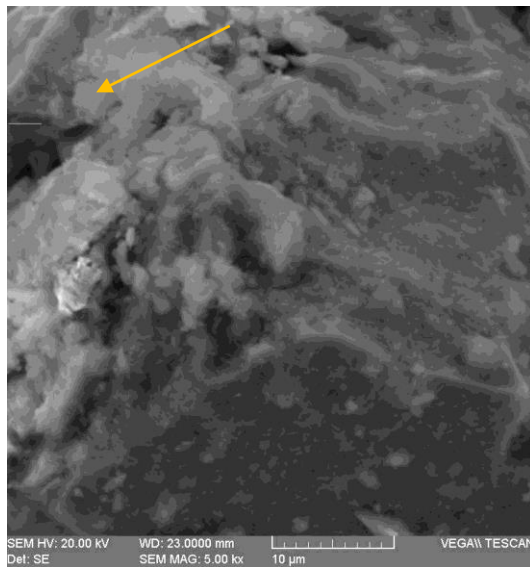
### **3.6 Análisis estadístico**

Los parámetros establecidos en el presente trabajo fueron evaluados por el Análisis de Varianza y Duncan para establecer el tratamiento con mayor grado de biooxidación.

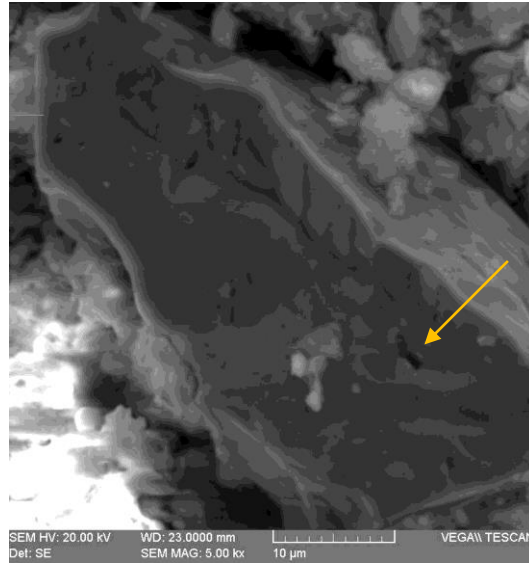
## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

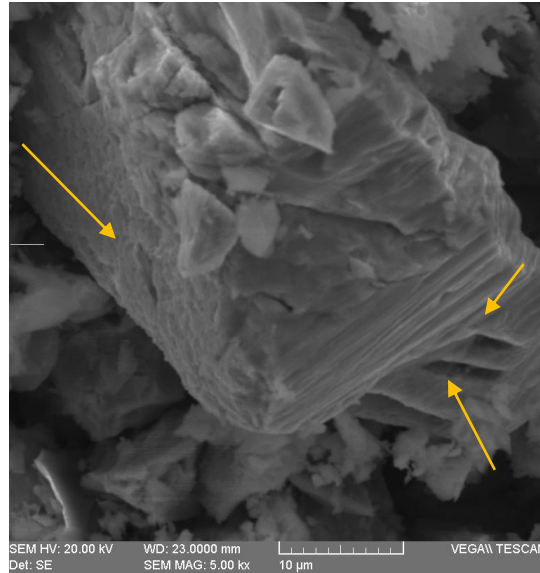
#### CAPACIDAD BIOOXIDATIVA DE LOS CULTIVOS MICROBIANOS SOBRE LA ARSENOPIRITA.



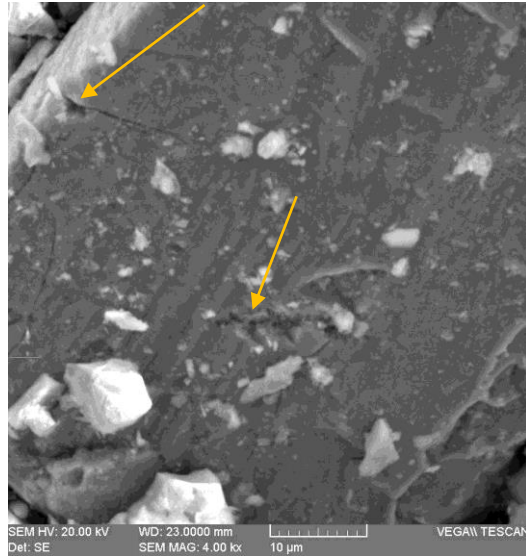
**Figura 4.** Cultivo microbiano puro (*A. ferrooxidans*) sobre FeAsS 8%



**Figura5.** Cultivo microbiano puro (*A. ferrooxidans*) sobre FeAsS 12%



**Figura 6.** Cultivo microbiano mixto (*A. ferrooxidans*+ *A. thiooxidans*) sobre FeAsS 8%



**Figura 7.** Cultivo microbiano mixto (*A. Ferrooxidans*+ *A. thiooxidans*) sobre FeAsS 12%

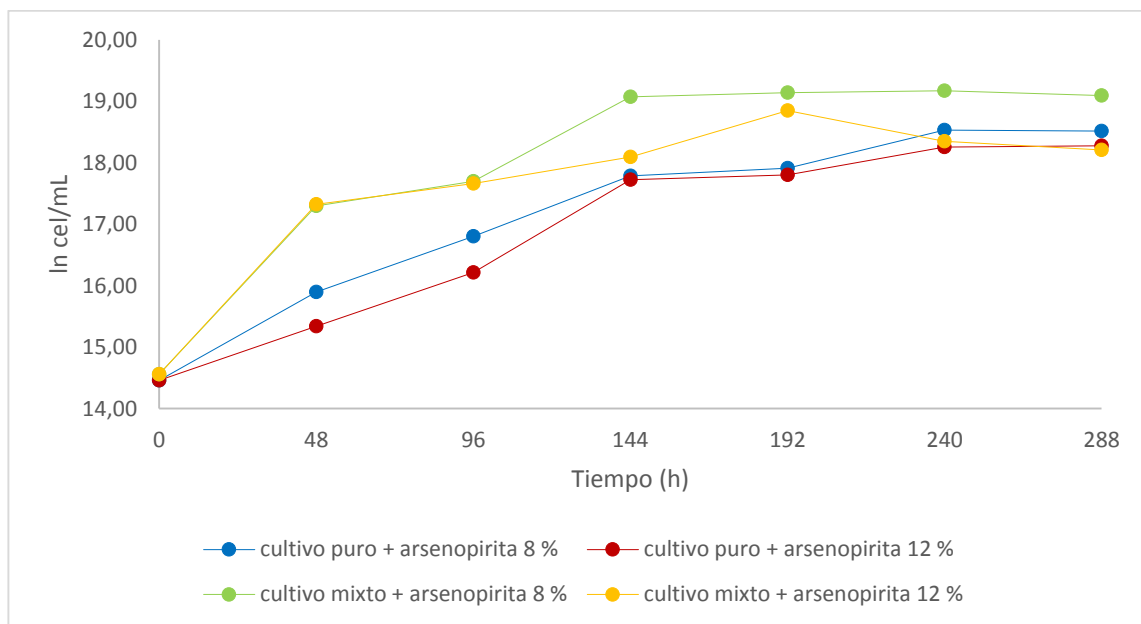
En las figuras 4, 5, 6, y 7, se muestra la superficie de la arsenopirita luego del tratamiento de biooxidación, en ellas se puede observar la presencia de hendiduras las que toman el nombre de golfos de corrosión, esto gracias a la acción bacteriana que oxida el ión ferroso a férrico. Se observan cristales en la superficie del mineral, propias del proceso de la oxidación bacteriana.

**Tabla 9.** Concentración de células (células/mL) determinados para los cultivos microbianos puros y mixtos, en el proceso de biooxidación sobre la arsenopirita

Tiempo (h)	CULTIVO MICROBIANO PURO ( <i>A. ferrooxidans</i> )		CULTIVO MICROBIANO MIXTO ( <i>A. ferrooxidans</i> + <i>A. thiooxidans</i> )	
	FeAsS 8% (células/mL)	FeAsS 12%(células/mL)	FeAsS 8%(células/mL)	FeAsS 12 % (células/mL)
	<b>0</b>	1,9x10 <sup>6</sup>	1,9x10 <sup>6</sup>	2,1x10 <sup>6</sup>
<b>48</b>	8x10 <sup>6</sup>	4,6x10 <sup>6</sup>	3,25x10 <sup>7</sup>	3,34x10 <sup>7</sup>
<b>96</b>	1,98x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>	4,87x10 <sup>7</sup>	4,69x10 <sup>7</sup>
<b>144</b>	5,3x10 <sup>7</sup>	5x10 <sup>7</sup>	1,92x10 <sup>8</sup>	7,23x10 <sup>7</sup>
<b>192</b>	6x10 <sup>7</sup>	5,4x10 <sup>7</sup>	2,06x10 <sup>8</sup>	1,54x10 <sup>8</sup>
<b>240</b>	1,12x10 <sup>8</sup>	8,5x10 <sup>7</sup>	2,12x10 <sup>8</sup>	9,3x10 <sup>7</sup>
<b>288</b>	1,1x10 <sup>8</sup>	8,65x10 <sup>7</sup>	1,96x10 <sup>8</sup>	8,11x10 <sup>7</sup>

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 9, se observa que el cultivo microbiano mixto con arsenopirita al 8 % alcanzó la mayor concentración celular que fue de 2,12x10<sup>8</sup> células/mL a las 240 horas, mientras que el cultivo microbiano mixto con 12 % de arsenopirita obtuvo un crecimiento de 1,54x10<sup>8</sup> células/mL, a las 192 horas. Con respecto al cultivo microbiano puro con arsenopirita al 8%, el mayor crecimiento celular fue 1,12x10<sup>8</sup> células/mL, a las 240 horas, mientras que el cultivo microbiano puro con arsenopirita al 12 % obtuvo la mayor concentración al final de proceso que fue de 8,65x10<sup>7</sup> células/mL.



**Figura 8.** Curva de crecimiento poblacional del cultivo microbiano puro y mixto en medio líquido con arsenopirita al 8 y 12 %  
**Fuente:** Elaboración propia

En la figura 8, se puede observar que el crecimiento microbiano mixto con arsenopirita al 8 % obtuvo la mayor concentración de células/mL a las 240 horas, mientras que el cultivo microbiano puro y mixto con arsenopirita al 12% obtuvieron las concentraciones microbianas más bajas al llegar a las 288 horas.

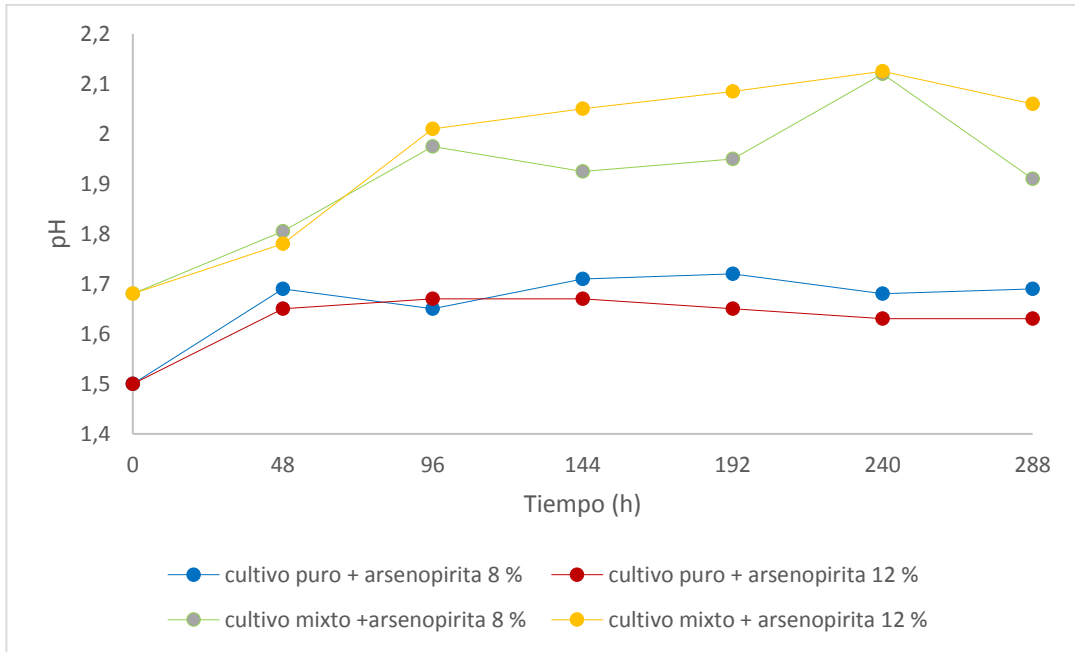
**Tabla 10.** Valores de pH determinados para los cultivos microbianos puros y mixtos en el proceso de biooxidación sobre la arsenopirita hasta las 288 horas

Tiempo (h)	CULTIVO MICROBIANO PURO ( <i>A. ferrooxidans</i> )		CULTIVO MICROBIANO MIXTO ( <i>A. ferrooxidans</i> + <i>A. thiooxidans</i> )	
	FeAsS 8 %	FeAsS 12 %	FeAsS 8 %	FeAsS 12 %
	<b>0</b>	1,50	1,50	1,68
<b>48</b>	1,69	1,65	1,81	1,78
<b>96</b>	1,65	1,67	1,98	2,01
<b>144</b>	1,71	1,67	1,93	2,05
<b>192</b>	1,72	1,65	1,95	2,09
<b>240</b>	1,68	1,63	2,12	2,13
<b>288</b>	1,69	1,63	1,91	2,06

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 10, se puede observar que los cultivos microbianos puros más arsenopirita al 8 y 12% inician con un pH de 1,5 y al transcurrir las 192 horas, el cultivo microbiano puro más arsenopirita al 8 % obtuvo el pH más alto que fue de 1,72, a las 192 horas, mientras que al 12% de arsenopirita el pH más alto fue de 1,67 a las 96 horas.

En el caso de los cultivos microbianos mixtos al 8 y 12% de arsenopirita, el pH inicial fue de 1,68, y al transcurrir las 240 horas se obtuvo los pH más altos que fueron de 2,12 y 2,13 respectivamente.



**Figura 9.** Curva de pH del cultivo microbiano puro en medio líquido con Arsenopirita.

**Fuente:** Elaboración propia

En la figura 9, se observa que el cultivo microbiano puro más arsenopirita al 12% es el que se mantuvo en el proceso de biooxidación con un mayor número de valores bajos de pH en relación a los otros cultivos, mientras que en el caso del cultivo microbiano mixto con arsenopirita al 12% los valores de pH fueron los más altos en relación a los otros cultivos microbianos.

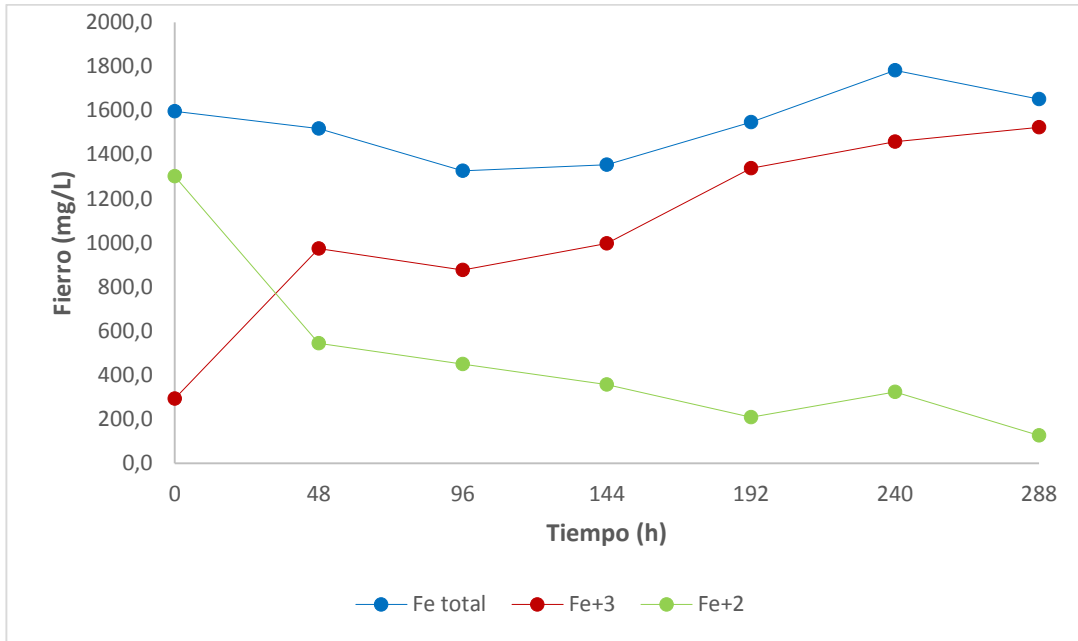
**Tabla 11.** Valores de Fe total, II y III (mg/L) en solución, determinados en el proceso de biooxidación de 288 horas en el cultivo microbiano puro sobre la arsenopirita 8 %

Tiempo (h)	CULTIVO MICROBIANO PURO CON ARSENOPIRITA 8%		
	Fe total (mg/L)	Fe II (mg/L)	Fe III (mg/L)
<b>0</b>	1595,6	1302,2	293,4
<b>48</b>	1517,8	544,0	973,8
<b>96</b>	1326,4	450,5	875,8
<b>144</b>	1353,8	357,1	996,7
<b>192</b>	1546,2	208,8	1337,4
<b>240</b>	1782,4	324,2	1458,2
<b>288</b>	1650,5	126,4	1524,2

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 11, se puede observar que al inicio de la biooxidación el hierro total en solución fue de 1595,6mg/L, mientras que el hierro II inició con una concentración de 1302,2mg/L y el hierro III contiene una concentración inicial de 293,4mg/L.

Hacia el final del proceso de biooxidación, trascurridas 288 horas, las concentraciones de hierro total en solución, finalizan con una concentración de 1650,5mg/L, el hierro II con 126,4 mg/L y el hierro III con una concentración de 1524,2mg/L.



**Figura 10.** Curva de fierro total, fierro II y fierro III en el proceso de biooxidación del cultivo microbiano puro sobre la arsenopirita 8%.

**Fuente:** Elaboración propia

En la figura 10, se aprecia el comportamiento de biooxidación del fierro total, fierro II y fierro III en solución, alcanzando valores de 1650,5; 126,4; 1524,2 mg/L respectivamente a las 288 horas de proceso.

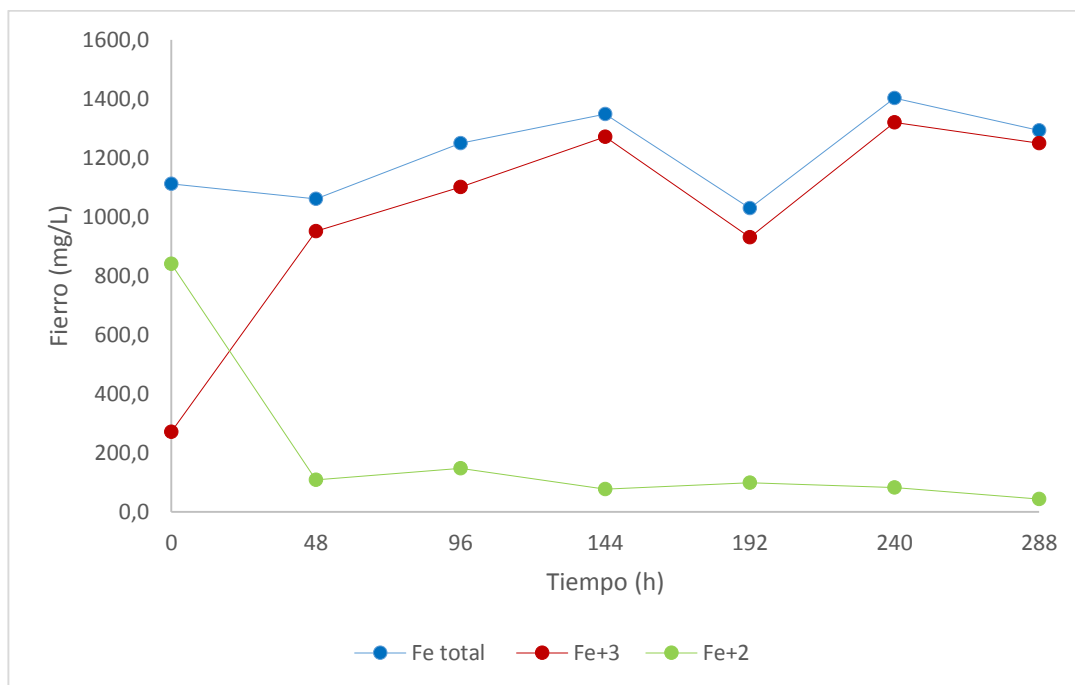
**Tabla 12.** Valores de Fe total, II y III (mg/L) en solución, determinados en el proceso de biooxidación de 288 horas en el cultivo microbiano puro sobre la arsenopirita 12%.

Tiempo (h)	CULTIVO MICROBIANO PURO CON ARSENOPIRITA 12%		
	Fe total (mg/L)	Fe II (mg/L)	Fe III (mg/L)
<b>0</b>	1112,1	840,7	271,4
<b>48</b>	1060,7	108,8	951,9
<b>96</b>	1249,5	148,4	1101,1
<b>144</b>	1348,4	76,9	1271,4
<b>192</b>	1029,7	98,9	930,8
<b>240</b>	1403,3	82,4	1320,9
<b>288</b>	1293,4	44,0	1249,5

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 12, se puede observar que al inicio de la biooxidación el hierro total en solución fue de 1112,1mg/L, mientras que el hierro II inició con una concentración de 840,7mg/L y el hierro III continuó una concentración inicial de 271,4mg/L.

Hacia el final del proceso de la biooxidación, trascurridas 288 horas, las concentraciones de hierro total fue de 1293,4mg/L, el hierro II con 44,0mg/L y el hierro III con una concentración de 1249,5mg/L.



**Figura 11.** Curva de fierro total, fierro II y fierro III en el proceso de biooxidación del cultivo microbiano puro sobre la arsenopirita 12%

**Fuente:** Elaboración propia

En la figura 11, se aprecia el comportamiento de biooxidación del fierro total, fierro II y fierro III en solución, alcanzando valores de 1293,4; 44,0 y 1249,5 mg/L respectivamente a las 288 horas de proceso.

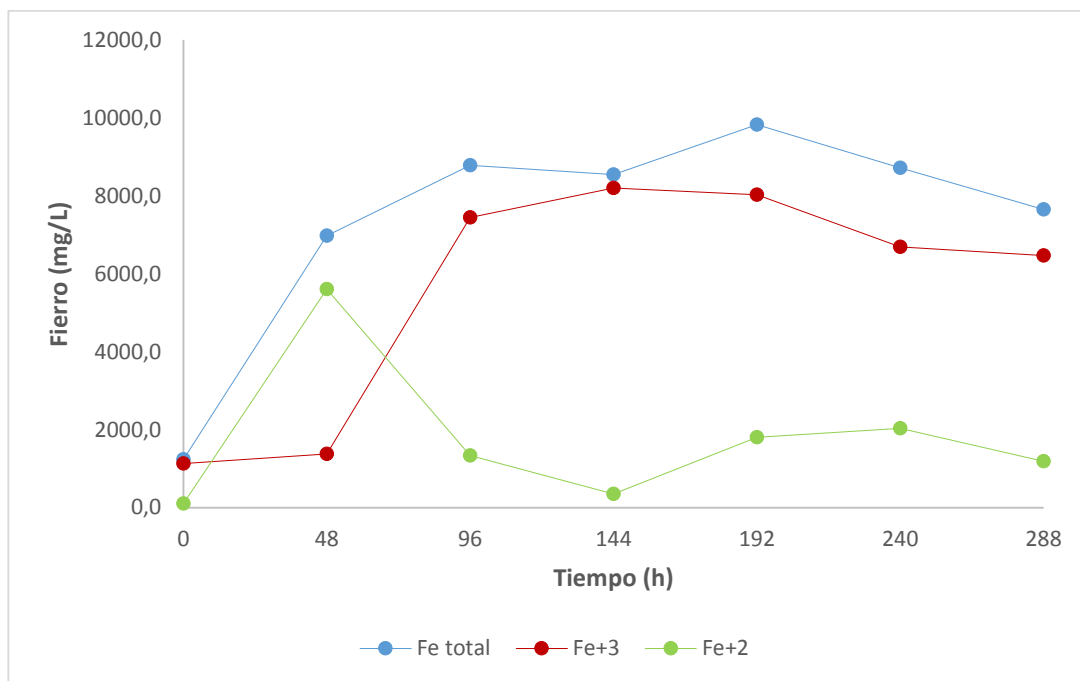
**Tabla 13.** Valores de Fe total, II y III (mg/L) determinados en el proceso de biooxidación de 288 horas del cultivo microbiano mixto sobre la arsenopirita 8 %.

<b>CULTIVO MICROBIANO MIXTO CON ARSENOPIRITA 8%</b>			
<b>Tiempo (h)</b>	<b>Fe total (mg/L)</b>	<b>Fe II (mg/L)</b>	<b>Fe III (mg/L)</b>
<b>0</b>	1238,4	104,7	1133,7
<b>48</b>	6976,7	5604,7	1372,1
<b>96</b>	8779,1	1337,2	7441,9
<b>144</b>	8546,5	348,8	8197,7
<b>192</b>	9825,6	1802,3	8023,3
<b>240</b>	8720,9	2034,9	6686,0
<b>288</b>	7651,2	1186,0	6465,1

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla13, se puede observar que al inicio de la biooxidación el hierro total en solución fue de 1238,4mg/L, mientras que el hierro II inició con una concentración de 104,7mg/L y el hierro III con una concentración inicial de 1133,7mg/L.

Hacia el final del proceso de la biooxidación, trascurridas 288 horas, las concentraciones de hierro total finalizaron con una concentración de 7651,2mg/L, el hierro II con 1186,0mg/L y el hierro III con una concentración de 6465,1mg/L.



**Figura 12.** Curva de fierro total, fierro II y fierro III en el proceso de biooxidación del cultivo microbiano mixto sobre la arsenopirita 8%

**Fuente:** Elaboración propia

En la figura 12, se aprecia el comportamiento de biooxidación del fierro total, fierro II y fierro III en solución, alcanzando valores de 7651,2; 1186,0 y 6465,1mg/L respectivamente a las 288 horas de proceso.

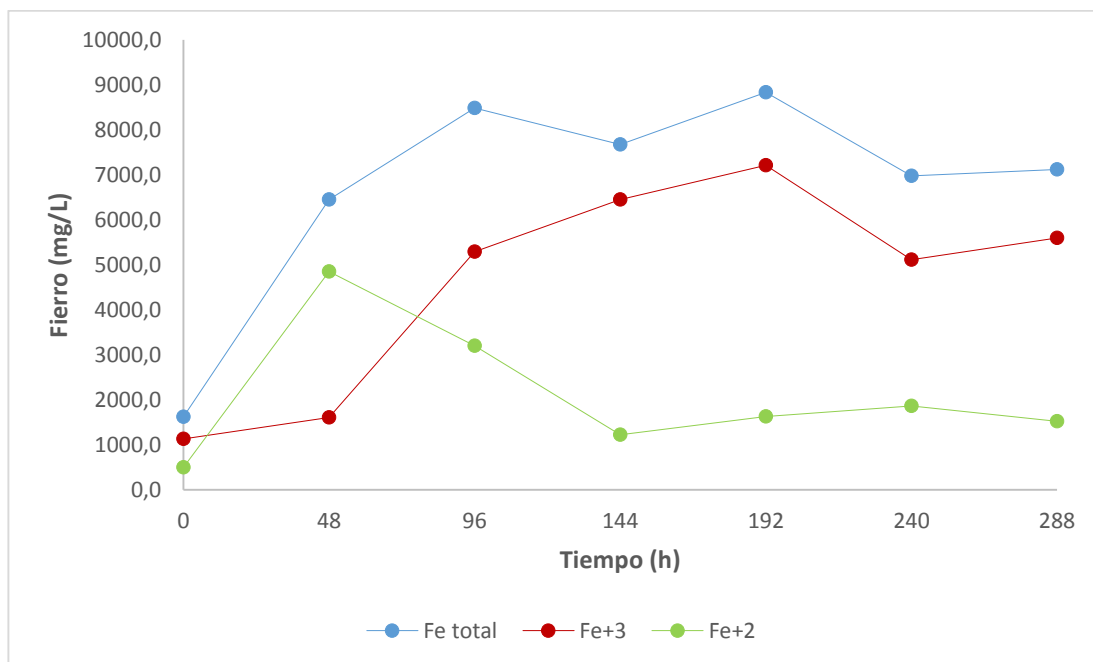
**Tabla 14.** Valores de Fe total, II y III (mg/L) determinados en el proceso de biooxidación de 288 horas del cultivo microbiano mixto sobre la arsenopirita 12 %

<b>CULTIVO MICROBIANO MIXTO CON ARSENOPIRITA 12%</b>			
<b>Tiempo (h)</b>	<b>Fe total (mg/L)</b>	<b>Fe II (mg/L)</b>	<b>Fe III (mg/L)</b>
<b>0</b>	1622,1	494,2	1127,9
<b>48</b>	6453,5	4848,8	1604,7
<b>96</b>	8488,4	3197,7	5290,7
<b>144</b>	7674,4	1220,9	6453,5
<b>192</b>	8837,2	1627,9	7209,3
<b>240</b>	6976,7	1860,5	5116,3
<b>288</b>	7122,1	1523,3	5598,8

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 14, se puede observar que al inicio de la biooxidación el fierro total en solución fue de 1622,1mg/L, mientras que el fierro II inicia con una concentración de 494,2mg/L y el fierro III con tiene una concentración inicial de 1127,9mg/L.

Hacia el final del proceso de la biooxidación, trascurridas 288 horas, las concentraciones de fierro total finalizaron con una concentración de 7122,1mg/L, el fierro II con 1523,3mg/L y el fierro III con una concentración de 5598,8mg/L.



**Figura 13.** Curva de fierro total, fierro II y fierro III en el proceso de biooxidación del cultivo microbiano mixto sobre la arsenopirita 12%.

**Fuente:** Elaboración propia

En la figura 13, se aprecia el comportamiento de biooxidación del fierro total, fierro II y fierro III en solución, los cuales alcanzaron valores de 7122,1; 1523,3 y 5598,8mg/L respectivamente a las 288 horas de proceso.

**Tabla 15.** Biooxidación de Fe III obtenido a las 288 horas en los cultivos puro y mixto a las concentraciones de 8 y 12 % de arsenopirita con sus respectivas repeticiones

CULTIVO	CONCENTRACIÓN DE ARSENOPIRITA (%)	REPETICIÓN I (mg/L)	REPETICIÓN II (mg/L)	PROMEDIO (mg/L)
CULTIVO PURO	8	1524,2	1524,2	1524,2
	12	1249,5	1249,5	1249,5
CULTIVO MIXTO	8	6407,0	6523,3	* 6465,1
	12	5430,2	5767,4	5598,8

\* Estadísticamente muy significativo.

**Fuente:** Elaboración propia

Según la tabla 15, se observa que el cultivo microbiano mixto con arsenopirita al 8% es superior numéricamente y estadísticamente por ANOVA y prueba de DUNCAN a los demás cultivos en biooxidación a Fe III teniendo un promedio de 6465,1 mg/L de fierro III en solución; siendo inferiores los cultivos microbianos puros con arsenopirita al 8 y 12%, cuyas concentraciones fueron 1524,2 y 1249,5 mg/L de Fe III respectivamente.

**Tabla 16.** Análisis de varianza para la determinación del mayor grado de biooxidación

<b>ANOVA</b>						
<b>F de V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Fa</b>	
<b>Tipo cultivos (T)</b>	1	43154372,5	43154372,5	2713,481	7,70864742	21,19769
<b>Conc. de FeAsS (C)</b>	1	650997,551	650997,551	40,93374		
<b>T x C</b>	1	175024,861	175024,861	11,0053		
<b>Error experimental</b>	4	63614,765	15903,6913			
<b>TOTAL</b>	7	44044009,7				

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 16, de análisis de varianza, se puede observar que existe diferencia altamente significativa entre tipos de cultivo.

Existe diferencia altamente significativa entre las concentraciones del mineral (FeAsS).

Existe diferencia significativa entre la interacción de tipo de cultivo y concentraciones de mineral.

**Tabla 17.** Prueba de comparaciones múltiples utilizando el Método de Duncan

Comparaciones de promedios de tipos de cultivos			
O.M.	Tratamiento	Media	Significación
1o	a2b1	6465,15	a
2o	a2b2	5598,8	b
3o	a1b1	1524,2	c
4o	a1b2	1249,5	c

**Fuente:** Elaboración propia

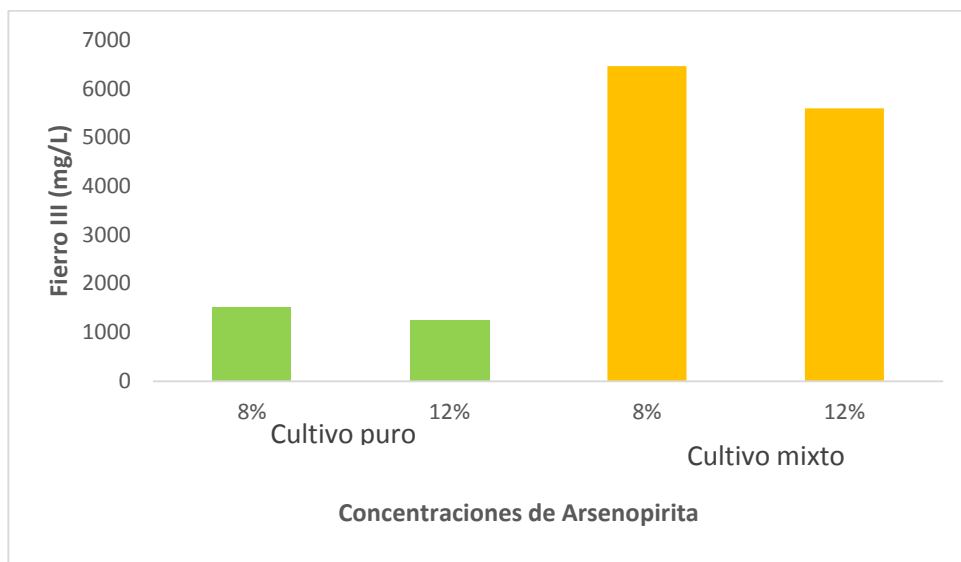
a2b1: Cultivo mixto con arsenopirita al 8 %

a2b2: Cultivo microbiano mixto con arsenopirita 12 %

a1b1: Cultivo microbiano puro con arsenopirita 8 %

a1b2: Cultivo microbiano puro con arsenopirita 12 %

En la tabla 17, se puede observar que el tratamiento del consorcio microbiano mixto con arsenopirita al 8% tiene el mayor grado de biooxidación (a), con respecto a los demás tratamientos. Letras iguales (c) no difieren estadísticamente.



**Figura14.** Representación en barras de la concentración en solución de hierro (III) en mg/L, por los cultivos microbianos puro y mixto, durante las 288 horas.

**Fuente:** Elaboración propia

En la figura 14, se puede observar que el mayor grado de biooxidación lo tiene el cultivo microbiano mixto con arsenopirita al 8%, obteniendo una concentración de hierro III de 6465,1 mg/L.

El cultivo microbiano mixto con arsenopirita al 12% obtuvo una concentración de hierro III de 5598,8 mg/L. El cultivo microbiano mixto con arsenopirita al 8% obtuvo una concentración de hierro III de 1524,2mg/L, mientras que el cultivo microbiano puro con 12 % de arsenopirita obtuvo una concentración de hierro III de 1249,5 mg/L.

## DISCUSIÓN

La arsenopirita es el mineral más común portador de sulfuro, y muy frecuente en la superficie terrestre, (Corkhill C.L., Vaughan D.J. 2009). Encapsula en su matriz elementos valiosos como oro, sea en la forma de pequeñas inclusiones (Márquez, 1999) o como oro invisible (Márquez *et al.* 2006), lo cual hace que la mayoría de las veces la cianuración de estos minerales requiera largos periodos de exposición, obteniéndose de este modo un material de mayor costo (Suzuki, 2001).

La biooxidación por microorganismos es una tecnología empleada por mineras refractarias. (Gilbert *et al.*, 1988; Daoud y Karamanev, 2006; Corkhill y Vaughan, 2009). Uno de los microorganismos más utilizados en la biominería es *Acidithiobacillus ferrooxidans*, acidófilo y mesófilo capaz de emplear como fuente de energía azufre y hierro, mientras que *Acidithiobacillus thiooxidans* es un microorganismo acidófilo capaz de emplear azufre como única fuente de energía. Se puede observar en el presente trabajo que el crecimiento microbiano puro y mixto durante la biooxidación tuvo una *fase lag* muy corta, esto probablemente gracias a la

preadaptación de ambas cepas (*A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*), al 1% de FeAsS.

Barrie J., (2006), dice que los procesos de disolución y adsorción de metales, se requieren de la contribución de especies bacterianas previamente adaptadas a los ambientes específicos, con la finalidad de lograr buenos resultados.

Según (Masoon y Rice, 2002; Deveciet *al.*, 2004; Shiet *al.*, 2005, Shiet *al.*, 2006; Astudillo y Acevedo, 2008) indican que los intervalos de FeAsS para la adaptación microbiana puede variar entre 1 hasta 5% W/V, y se puede comprobar al obtener un recuento microbiano de  $10^8$  células/ml, (Xia *et al.*, 2008b). El principal inconveniente de esta metodología es que no se sigue un protocolo determinado, siendo necesarios periodos de adaptación de hasta años en algunos casos. (Brahmaprakash y *col.*, 1988; Natarajan *et al.*, 1994; Das y *col.*, 1998).

También se puede observar que los cultivos microbianos puros obtienen su mayor crecimiento entre las 240 – 288 horas del proceso de biooxidación. A diferencia de los cultivos microbianos mixtos que obtuvieron su mayor crecimiento entre las 192 – 240 horas y comienzan a decrecer a las 288 horas, esto probablemente se deba al incremento de fierro y otros iones en

solución que provocan fricción a la pared celular disminuyendo o inhibiendo la actividad microbiana, como lo indica Gomez *et al.*, (1999); Akcil *et al.*, (2007); Mousavi *et al.*, (2007); Marhual y *col.*, (2008), quienes sostienen que la reducción de oxígeno disuelto, provoca la concentración de ciertos iones como  $As^{3+}$ ,  $As^{5+}$  y  $Fe^{3+}$ , ocasionando fricción a la pared celular, teniendo efectos nocivos para los microorganismos.

Otros de los parámetros evaluados fue el pH, los cuales iniciaron entre 1,5 - 1,68, según, Gómez y Cantero, (2005); Daoudy Karamanev, (2006) el pH menor a 1,8 es efectivo para limitar la extensión de la precipitación de Fe (III). Se puede observar que al finalizar la biooxidación, el pH se incrementa ligeramente en todos los tratamientos, para el caso de los cultivos microbianos puros con arsenopirita al 8 y 12 % el pH final fue de 1,69 y 1,63 respectivamente. Para el caso de los cultivos microbianos mixtos el pH final al 8 y 12 % de arsenopirita fue de 1,91 y 2,06 respectivamente, según Rossi, (1990) el incremento de pH se puede deber a la disolución de ciertos minerales no metálicos, acompañantes del mineral de arsenopirita.

Durante el proceso de biooxidación se puede observar que el hierro total en solución para los cultivos puros con arsenopirita al 8 y 12% fue entre

1595,6 - 1112,1mg/L respectivamente y al transcurrir los días este se siguió liberando alcanzando valores de 1650,5mg/L en el cultivo puro al 8% de arsenopirita y 1293,4mg/L en cultivo puro con 12% de arsenopirita; mientras que en los tratamientos de los cultivos mixtos con arsenopirita al 8 y 12% las concentraciones de fierro total en solución al inicio del proceso fueron 1238,4 y 1622,1 mg/L respectivamente, y al transcurrir los días se observó que hubo un mayor incremento que los cultivos puros alcanzando valores de 7651,2mg/L al 8% de arsenopirita y 7122,1mg/L al 12% de arsenopirita; esta reacción ocurre debido a la solubilización que va sufriendo el mineral, gracias al metabolismo fortalecido de la oxidación de azufre por *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*, de esta manera se va liberando a su vez el fierro que está conformando el mineral de arsenopirita.

En la evaluación de las concentraciones de fierro III en solución, se pudo observar que la mayor concentración lo obtuvo el tratamiento del cultivo mixto con arsenopirita al 8% logrando la mayor concentración que fue de **6465,1mg/L**. En el tratamiento del cultivo mixto con arsenopirita al 12% se observó una concentración de fierro III de **5598,8mg/L**, mientras que los reactores con concentraciones de arsenopirita al 8 y 12% cuya oxidación lo realizaron las cepas de *A. ferrooxidans* fue de **1524,2 y 1249,5 mg/L**

respectivamente. Por ello se llega a la conclusión que el cultivo microbiano mixto tuvo un mejor resultado de trabajo que solo usando las cepas puras de *A. ferrooxidans*. Según Tuovinen *et al.*, (1994); Clark y Norris, (1996); McGuire *y col.*, (2001), los consorcios de microorganismos han sido empleados para investigar la oxidación de la arsenopirita y han mostrado ser más eficientes comparados con cepas solas. P. Chiacchiarini *et al.*, (2000); sostienen que los cultivos mixtos muestran mayor actividad que los cultivos puros y una fuerte complementariedad.

Finalmente al observar el mineral con el microscopio electrónico una vez terminada la biooxidación, se visualizan pequeños agujeros llamados golfos de corrosión.

Según Arroyave *et al.*, (2009) los pequeños golfos de corrosión confirman la acción de los microorganismos acidófilos sobre el mineral. Pese a que la mayor biooxidación se obtuvo en los cultivos microbianos mixtos a ambas concentraciones de arsenopirita, también se observaron ligeros golfos de corrosión en la arsenopirita que fue biooxidada por las cepas puras. Paralelo a esto se puede visualizar que sobre la superficie del mineral se habían formado cristales, productos secundarios de la solubilización.

## CONCLUSIONES

PRIMERA: El cultivo microbiano mixto con arsenopirita al 8% estadísticamente es el mejor, luego en segundo lugar se encuentra el cultivo microbiano mixto con arsenopirita al 12% ambos estadísticamente diferentes. Mientras que los cultivos microbianos puros al 8 y 12% de arsenopirita se encontrarían en tercer lugar, ambas estadísticamente similares.

SEGUNDA: Los cultivos microbianos puro y mixto presentaron capacidad biooxidativa del hierro en concentraciones de arsenopirita de 8 y 12%.

TERCERA: El cultivo microbiano con mayor capacidad biooxidativa de hierro contenido en la arsenopirita fue el cultivo microbiano mixto sobre la concentración de arsenopirita al 8% con un valor de 6465,1mg/L.

## **RECOMENDACIONES**

PRIMERA: Realizar el proceso de biooxidación con concentraciones mayores de bacterias biooxidantes tanto en el consorcio bacteriano como en el cultivo puro.

SEGUNDA: Considerar otras variables en el proceso de biooxidación como, diferentes tamaños de partículas, agitación del biorreactor entre otras.

TERCERA: Trabajar con otros consorcios bacterianos que presenten actividad biooxidante sobre la arsenopirita.

## BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, F., Gentina, J. C., & Bustos, S. (1993). Bioleaching of minerals—a valid alternative for developing countries. *Journal of Biotechnology*, 31(1), 115-123.

Alfaro, C. (2002). Geoquímica del sistema geotérmico de Paipa. *Ingeominas-OIEA. Bogotá, Colombia*.

Andrade, C. M., Pereira Jr, N., & Antranikian, G. (1999). Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. *Revista de Microbiología*, 30(4), 287-298.

Arroyave, D., Márquez, M., Gallego, D., & Pacheco, G. (2011). Evaluación y caracterización mineralógica del proceso de biooxidación en un reactor continuo de tanque agitado. *Dyna*, 77(164), 18-29.

Atlas, R. M., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson educación. Madrid: Addison Wesley. 279-283

Ayala, J., & Pardo, R. (1995). Optimización por Diseños Experimentales con Aplicaciones en Ingeniería. *Lima: CONCYTEC*.

Bosecker, K. (1997). Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology reviews*, 20(3-4), 591-604.

Brahmaprakash, G. P., Devasia, P., Jagadish, K. S., Natarajan, K. A., & Rao, G. R. (1988). Development of *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859 strains tolerant to copper and zinc. *Bulletin of Materials Science*, 10(5), 461-465.

Brierley, J. A., & Brierley, C. L. (2001). Present and future commercial applications of biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*, 59(2), 233-239.

Brierley, C. L., & Le Roux, N. W. (1978). Bacterial leaching. *CRC critical reviews in microbiology*, 6(3), 207-262.

Bruynesteyn, A. (1989). Mineral Biotechnology-Minireview. *Journal of Biotechnology*. 11,1 – 10.

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

Chiacchiarini, P., de la Fuente, V., & Donati, E. (2000). Pre-tratamiento de un mineral refractario de oro mediante células de *Thiobacilli*.

Colmer, A. R., & Hinkle, M. E. (1947). The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. *Science*, 106(2751), 253-256.

Corkhill C.L. & Vaughan D.J. (2009). Arsenopyrite oxidation. *Applied Geochemistry*. doi:10.1016/j.apgeochem.2009.09.008.

Da Silva, G. (2004). Kinetics and mechanism of the bacterial and ferric sulphate oxidation of galena. *Hydrometallurgy*, 75(1), 99-110.

Daoud J., Karamanev D. (2006). Formation of jarosite during Fe<sup>2+</sup> oxidation by *A. ferrooxidans*. *Minerals Engineering*, 19(9), 960–967.

Das, T., & Sen, P. K. (2001). Bioreactor simulation and modeling for a gold bio leaching process. *Minerals engineering*, 14(3), 305-316.

Das, A., Modak, J. M., & Natarajan, K. A. (1997). Studies on multi-metal ion tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering*, 10(7), 743-749.

Deveci, H., Akcil, A., & Alp, I. (2004). Bioleaching of complex zinc sulphides using mesophilic and thermophilic bacteria: comparative importance of pH and iron. *Hydrometallurgy*, 73(3), 293-303.

d'Hugues, P., Cezac, P., Cabral, T., Battaglia, F., Truong-Meyer, X. M., & Morin, D. (1997). Bioleaching of a cobaltiferous pyrite: a continuous laboratory-scale study at high solids concentration. *Minerals Engineering*, 10(5), 507-527.

Donati, E. (2006). *Biominería: Una tecnología alternativa. Disponible en internet: <http://www.voces.antahualan.com.ar/edi11.htm>*

Ehrlich, H. L., & Newman, D. K. (Eds.). (2008). *Geomicrobiology*. CRC press.

Francisco Junior, W. E. (2006). *Estudo da oxidação de covelita (CuS) e molibdenita (MoS<sub>2</sub>) sintéticas por Acidithiobacillus ferrooxidans*. Tesis M.Sc. Universidade Estadual do Sao Paulo.

Gallego, A. N., Zapata, D. M., & Márquez, M. A. (2005). Mineralogía aplicada a la definición del tipo de refractariedad en la mina de oro El Zancudo, Titiribí, Antioquia. *Boletín de Geología*, 27(2), 87-97

Gilbert, S. R., Bounds, C. O., & Ice, R. R. (1988). Comparative economics of bacterial oxidation and roasting as a pre-treatment step for gold recovery from an auriferous pyrite concentrate. *Can. Min. Metall. Bull.*, 81(910), 89-94.

González, R., Gentina, J. C., & Acevedo, F. (2003). Optimisation of the solids suspension conditions in a continuous stirred tank reactor for the

biooxidation of refractory gold concentrates. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(3), 233-243.

Horikoshi, Kori. (2007). Foreword, xi-xiii. In Asm Press (ed.) *Physiology and biochemistry of extremophiles*. Washington, D. C.

Iglesias, N., Carranza, F., & Palencia, I. (1998). La biolixiviación como pretratamiento de menas auríferas refractarias en matriz de sulfuros. *Revista de metalurgia*, 34(1), 29-38.

Karamanev, D., Margaritis, A., & Chong, N. (2001). The application of ore immobilization to the bioleaching of refractory gold concentrate. *International journal of mineral processing*, 62(1), 231-241.

Kelly, D. P., & Wood, A. P. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2), 511-516.

Khalid, Z. M., & Malik, K. A. (1988). Leaching of chalcopyrite by *Thiobacillus thiooxidans* and oxidized copper ore by *Thiobacillus ferrooxidans* isolated from local environments. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology*, 4(4), 447-453.

Krebs, W., Brombacher, C., Bosshard, P. P., Bachofen, R., & Brandl, H. (1997). Microbial recovery of metals from solids. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3-4), 605-617.

Lundgren, D. G., & Silver, M. (1980). Ore leaching by bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 34(1), 263-283.

Márquez, M. (1999). *Mineralogia dos processos de oxidação sobre pressão bacteriana do minério de ouro da mina São Bento*. MG. Tese de doutorado. Universidad de Brasilia.

Márquez, M., Muñoz A. & Gaspar J.C. (2002). *Oxidación bacteriana de sulfuros para el aumento en la recuperación de oro en menas refractarias*.

*Memorias del Primer Simposio sobre Biofábricas. Biología y Aplicaciones de la Célula Cultivada.* Medellín, Universidad Nacional.

Márquez, M., Gaspar, J., Bessler, K. E., & Magela, G. (2006). Process mineralogy of bacterial oxidized gold ore in São Bento Mine (Brasil). *Hydrometallurgy*, 83(1), 114-123.

Mason, L. J., & Rice, N. M. (2002). The adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* for the treatment of nickel–iron sulphide concentrates. *Minerals Engineering*, 15(11), 795-808.

Modak, J. M, Vassan, S. S., & Natarajan, K. (1999). *Calcium removal from bauxite using Paenibacillus polymyxa.* *Minerals and Metallurgical Process*, 16(4), 6 – 12.

Moffa, A. (1994). *Microbial Mining Boosts the Environment.* *Bottom Line. Science*, 264, 778 – 779.

Mousavi, S.M., Jafari, A., Yaghmaei, S., Vossoughi, M. & Roostaazad, R.(2006a). *Bioleaching of low-grade sphalerite using a column reactor*. Hydrometallurgy. Vol 82. p. 75–82.

Mousavi, S.M., Yaghmaei, S., Vossoughi, M., Jafari, A. &Roostaazad, R. (2006b). *Zinc extraction from Iranian low-grade complex zinc–lead ore by two native microorganisms: Acidithiobacillus ferrooxidans and Sulfobacillus*. International Journal of Mineral Processing. Vol 80. p. 238–243.

Muñoz, A., Márquez, M. A., Montoya, O. I., Ruiz, O., & Lemehsko, V. (2003). Evaluación de oxidación bacteriana de sulfuros con *Acidithiobacillus ferrooxidans* mediante pruebas de FTIR y difracción de rayos X. *Revista Colombiana de Biotecnología*, (1), 73-81.

Mustin, C.; Berthelin, J.; Marion, P. & Donato, P. (1992). *Corrosion and electrochemical oxidation of a pyrite by Thiobacillus ferrooxidans*. Applied Environmental Microbiology. 58 (4): 1175-1182.

Natarajan, K. A., Sudeesha, K., & Rao, G. R. (1994). Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(4), 303-306.

Olson, G. J., Brierley, J. A., & Brierley, C. L. (2003). Bioleaching review part B. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(3), 249-257.

Ortiz, F. (1992). Geología de los depósitos minerales metálicos. *Universidad Nacional de Medellín*.

Ospina, J. D., Restrepo, E. M., Bedoya, L. O., Márquez, M. A., & Morales, A. L. (2010). Biooxidación de concentrados de arsenopirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* en erlenmeyer agitados. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14 (1), 135-145.

Ospina Correa, J. D. (2010). Mineralogía del proceso de oxidación bacteriana de arsenopirita (FeAsS) y pirita (FeS<sub>2</sub>). Maestría thesis, Universidad Nacional de Colombia.

Pavez, B. (2011). *Cuantificación de la expresión del gen omp-40 y de los genes que conforman el operón gal, vinculado a cambios cinéticos de Acidithiobacillus ferrooxidans en respuesta adaptativa a mineral sulfurado de cobre*. Tesis para optar el título de Bioquímico.

Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M. L., González, F., & Muñoz, J. A. (2001). Mecanismo de biolixiviación de sulfuros metálicos. *Revista de metalurgia*, 37(6), 665-672.

Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M. L., González, F., & Muñoz, J. A. (2003). New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy*, 71(1), 37-46.

Rohwerder, T., & Sand, W. (2003). The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology*, 149(7), 1699-1710.

Rossi, G. (1990). *Biohydrometallurgy*. McGraw-hill.

Saavedra, A. (2009). Solubilización del zinc a partir del mineral esfalerita del yacimiento minero “María Grimanesa” por lixiviación microbiana con cepas nativas. Tesis para optar el titular profesional Biólogo – Microbiólogo. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. 162p

Sampson, M.I., Van der Merwe, J. W., Harvey, T. J. y Bath, M.D. (2005). Testing the ability of a low grade sphalerite concentrate to achieve autothermality during biooxidation heap leaching. *Minerals Engineering*. 18,427–437.

San, W., Gehrke, T., Jozsa, P. G. y Schippers, A. (2001). (Bio) chemistry of bacterial leaching – direct vs. indirect bioleaching. *Hidromerallurgy*. 59, 159 – 175.

Sand, W. and Gehrke, T. (2006). Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. *Resear. Microbiol.*, 157, 49–56.

Schippers, A., Jozsa, P., & Sand, W. (1996). Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), 3424-3431.

Shi, S. & Fang, Z.(2005). Bioleaching of marmatite flotation concentrate by adapted mixed mesoacidophilic cultures in an Air-lift reactor. *International Journal of Mineral Processing*. 76, 3–12.

Suzuki, I. & Werkman, C. (1958).Glutathione y sulfur oxidation by *Thiobacillusthiooxidans*.*Microbiology*.1, 239-244.

Suzuki, I. (2001). Microbial leaching of metals from sulfide minerals. *Biotechnology advances*, 19(2), 119-132.

Temple, K. L. & Colmer, A.R. (1951), The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*, *Journal of bacteriology*. USA. 605-611.

Third, K. A., Cord-Ruwisch, R., & Watling, H. R. (2000). The role of iron-oxidizing bacteria in stimulation or inhibition of chalcopyrite bioleaching. *Hydrometallurgy*, 57(3), 225-233.

Torma, A. (1977). The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in hydrometallurgical processes. In *Advances in Biochemical Engineering*, 6, 1-37. Springer Berlin Heidelberg.

Tuovinen, O. H., Niemelä, S. I., & Gyllenberg, H. G. (1971). Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. *Antonie van Leeuwenhoek*, 37(1), 489-496.

Vanselow, D. (1976). *Mechanisms of bacterial oxidation of the copper sulphide mineral, covellite* (Doctoral dissertation, University of New South Wales, School of Biological Technology).

Vorgias, C. E. & Antranikian, G. (2004). *Extremophiles: pH, temperature, and salinity*, 146-153p. In Asm Press (ed.), *Microbial diversity and bioprospecting*. Washington. D. C.

Zhen, S., Yan, Z., Zhang, Y., Wang, J., Campbell, M., & Qin, W. (2009). Column bioleaching of a low grade nickel-bearing sulfide ore containing high magnesium as olivine, chlorite and antigorite. *Hydrometallurgy*, 96(4), 337-341.

## ANEXOS

### ANEXO 1: Cuadro de recuento de células del cultivo puro

(*Acidithiobacillus ferrooxidans*) en medio 0K

Tiempo (h)	Cultivo microbiano puro 8 % FeAsS			Cultivo microbiano puro 12 % FeAsS		
	REPETICIÓN I (cél/mL)	REPETICIÓN II (cél/mL)	PROMEDIO (cél/mL)	REPETICIÓN I (cél/mL)	REPETICIÓN II (cél/mL)	PROMEDIO (cél/mL)
<b>0</b>	1,9x10 <sup>6</sup>	1,9x10 <sup>6</sup>	<b>1,9X10<sup>6</sup></b>	1,9x10 <sup>6</sup>	1,9x10 <sup>6</sup>	<b>1,9X10<sup>6</sup></b>
<b>48</b>	9,4x10 <sup>6</sup>	6,6x10 <sup>6</sup>	<b>8X10<sup>6</sup></b>	4,6x10 <sup>7</sup>	4,6x10 <sup>7</sup>	<b>4,6X10<sup>7</sup></b>
<b>96</b>	1,98x10 <sup>7</sup>	1,98x10 <sup>7</sup>	<b>1,98X10<sup>7</sup></b>	1,1x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>	<b>1,1X10<sup>7</sup></b>
<b>144</b>	5,2x10 <sup>7</sup>	5,4x10 <sup>7</sup>	<b>5,3X10<sup>7</sup></b>	4x10 <sup>7</sup>	6x10 <sup>7</sup>	<b>5X10<sup>7</sup></b>
<b>192</b>	6x10 <sup>7</sup>	6x10 <sup>7</sup>	<b>6X10<sup>7</sup></b>	4,8x10 <sup>7</sup>	6x10 <sup>7</sup>	<b>5,4X10<sup>7</sup></b>
<b>240</b>	7,6x10 <sup>7</sup>	1,48x10 <sup>8</sup>	<b>1,12x10<sup>8</sup></b>	9,4x10 <sup>7</sup>	7,6x10 <sup>7</sup>	<b>8,5X10<sup>7</sup></b>
<b>288</b>	1x10 <sup>8</sup>	1,2x10 <sup>8</sup>	<b>1,1X10<sup>8</sup></b>	8,7x10 <sup>7</sup>	8,6x10 <sup>7</sup>	<b>8,65X10<sup>7</sup></b>

**ANEXO 2: Cuadro de recuento de células del cultivo mixto**  
*(Acidithiobacillus ferrooxidans y Acidithiobacillus thiooxidans) en medio 0K*

Tiempo (h)	Cultivo microbiano mixto 8 % FeAsS			Cultivo microbiano mixto 12 % FeAsS		
	REPETICIÓN I (cél/mL)	REPETICIÓN II (cél/mL)	PROMEDIO (cél/mL)	REPETICIÓN I (cél/mL)	REPETICIÓN II (cél/mL)	PROMEDIO (cél/mL)
<b>0</b>	2,1x10 <sup>6</sup>	2,1x10 <sup>6</sup>	<b>2,1x10<sup>6</sup></b>	2,1x10 <sup>6</sup>	2,1x10 <sup>6</sup>	<b>2,1X10<sup>6</sup></b>
<b>48</b>	3,36x10 <sup>7</sup>	3,14x10 <sup>7</sup>	<b>3,25x10<sup>7</sup></b>	3,26x10 <sup>7</sup>	3,42x10 <sup>7</sup>	<b>3,34X10<sup>7</sup></b>
<b>96</b>	5,24x10 <sup>7</sup>	4,5x10 <sup>7</sup>	<b>4,87x10<sup>7</sup></b>	4,82x10 <sup>7</sup>	4,56x10 <sup>7</sup>	<b>4,69X10<sup>7</sup></b>
<b>144</b>	7,22x10 <sup>7</sup>	3,12x10 <sup>8</sup>	<b>1,92x10<sup>8</sup></b>	7,9x10 <sup>7</sup>	6,56x10 <sup>7</sup>	<b>7,23X10<sup>7</sup></b>
<b>192</b>	2,02x10 <sup>8</sup>	2,10x10 <sup>8</sup>	<b>2,06x10<sup>8</sup></b>	1,06x10 <sup>8</sup>	2,01x10 <sup>8</sup>	<b>1,54X10<sup>8</sup></b>
<b>240</b>	2,12x10 <sup>8</sup>	2,12x10 <sup>8</sup>	<b>2,12x10<sup>8</sup></b>	8,4x10 <sup>7</sup>	1,02x10 <sup>8</sup>	<b>9,3X10<sup>7</sup></b>
<b>288</b>	2x10 <sup>8</sup>	1,92x10 <sup>8</sup>	<b>1,96X10<sup>8</sup></b>	8,3x10 <sup>7</sup>	7,91x10 <sup>7</sup>	<b>8,11X10<sup>7</sup></b>

### ANEXO 3: pH del cultivo microbiano puro (*Acidithiobacillus ferrooxidans*)

Tiempo (h)	Cultivo microbiano puro 8 % FeAsS			Cultivo microbiano puro 12 % FeAsS		
	REPETICIÓN	REPETICIÓN	PROMEDIO	REPETICIÓN	REPETICIÓN	PROMEDIO
	I	II		I	II	
0	1,50	1,50	<b>1,50</b>	1,50	1,50	<b>1,50</b>
48	1,69	1,69	<b>1,69</b>	1,65	1,65	<b>1,65</b>
96	1,65	1,65	<b>1,65</b>	1,67	1,67	<b>1,67</b>
144	1,71	1,71	<b>1,71</b>	1,67	1,67	<b>1,67</b>
192	1,72	1,72	<b>1,72</b>	1,65	1,65	<b>1,65</b>
240	1,68	1,68	<b>1,68</b>	1,63	1,63	<b>1,63</b>
288	1,68	1,70	<b>1,70</b>	1,64	1,62	<b>1,63</b>

### ANEXO 4: pH del cultivo microbiano mixto (*Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*)

Tiempo (h)	Cultivo microbiano mixto 8 % FeAsS			Cultivo microbiano mixto 12 % FeAsS		
	REPETICIÓN	REPETICIÓN	PROMEDIO	REPETICIÓN	REPETICIÓN	PROMEDIO
	I	II		I	II	
0	1,68	1,68	<b>1,68</b>	1,68	1,68	<b>1,68</b>
48	1,88	1,73	<b>1,81</b>	1,66	1,9	<b>1,78</b>
96	1,93	2,02	<b>1,98</b>	2,01	2,01	<b>2,01</b>
144	1,89	1,96	<b>1,93</b>	2,11	1,99	<b>2,05</b>
192	1,94	1,96	<b>1,95</b>	2,17	2,00	<b>2,09</b>
240	2,10	2,14	<b>2,12</b>	2,15	2,10	<b>2,13</b>
288	1,86	1,96	<b>1,91</b>	2,06	2,06	<b>2,06</b>

**ANEXO 5:** pH del blanco al 8 y 12 % de arsenopirita

Tiempo (h)	Blanco al 8 % FeAsS			Blanco al 12 % FeAsS		
	REPETICIÓN I	REPETICIÓN II	PROMEDIO	REPETICIÓN I	REPETICIÓN II	PROMEDIO
0	1,55	1,5	1,53	1,55	1,55	1,55
48	1,54	1,54	1,54	1,57	1,59	1,58
96	1,52	1,52	1,52	1,56	1,58	1,57
144	1,51	1,58	1,55	1,57	1,59	1,58
192	1,55	1,55	1,55	1,63	1,61	1,62
240	1,61	1,56	1,59	1,63	1,63	1,63
288	1,6	1,6	1,60	1,59	1,64	1,62

**ANEXO 6:** Miligramos de fierro total del cultivo puro (*A. ferrooxidans*) al 8 % de arsenopirita

CULTIVO PURO ( <i>A. ferrooxidans</i> ) 8 % FeAsS FIERRO TOTAL			
Tiempo (h)	REPETICIÓN I (mg/L)	REPETICIÓN II (mg /L)	PROMEDIO (mg/L)
0	1469,23	1721,98	1595,60
48	1555,71	1479,89	1517,80
96	1326,37	1326,37	1326,37
144	1337,36	1370,33	1353,85
192	1546,15	1546,15	1546,15
240	1601,10	1963,74	1782,42
288	1623,08	1678,02	1650,55

**ANEXO 7:** Miligramos de fierro III del cultivo puro (*A. ferrooxidans*) al 8 % de arsenopirita

<b>CULTIVO PURO (<i>A. ferrooxidans</i>) 8 % FeAsS FIERRO III</b>			
<b>Tiempo (h)</b>	<b>REPETICIÓN I (mg/L)</b>	<b>REPETICIÓN II (mg /L)</b>	<b>PROMEDIO (mg/L)</b>
<b>0</b>	447,25	139,56	<b>293,41</b>
<b>48</b>	1174,40	773,30	<b>973,85</b>
<b>96</b>	853,85	897,80	<b>875,82</b>
<b>144</b>	996,70	996,70	<b>996,70</b>
<b>192</b>	1216,48	1458,24	<b>1337,36</b>
<b>240</b>	1392,31	1524,18	<b>1458,24</b>
<b>288</b>	1524,18	1524,18	<b>1524,18</b>

**ANEXO 8:** Miligramos de fierro total del cultivo puro (*A. ferrooxidans*) al 12 % de arsenopirita

<b>CULTIVO PURO (<i>A. ferrooxidans</i>) 12 % FeAsS FIERRO TOTAL</b>			
<b>Tiempo (h)</b>	<b>REPETICIÓN I (mg/L)</b>	<b>REPETICIÓN II (mg /L)</b>	<b>PROMEDIO (mg/L)</b>
<b>0</b>	1018,68	1205,49	<b>1112,09</b>
<b>48</b>	1061,21	1060,11	<b>1060,66</b>
<b>96</b>	1249,45	1249,45	<b>1249,45</b>
<b>144</b>	1524,18	1172,53	<b>1348,35</b>
<b>192</b>	1029,67	1029,67	<b>1029,67</b>
<b>240</b>	1370,33	1436,26	<b>1403,30</b>
<b>288</b>	1293,41	1293,41	<b>1293,41</b>

**ANEXO 9:** Miligramos de fierro III del cultivo puro (*A. ferrooxidans*) al 12 % de arsenopirita

<b>CULTIVO PURO (<i>A. ferrooxidans</i>) 12 % FIERRO III</b>			
<b>Tiempo (h)</b>	<b>REPETICIÓN I (mg/L)</b>	<b>REPETICIÓN II (mg /L)</b>	<b>PROMEDIO (mg/L)</b>
<b>0</b>	271,43	271,43	<b>271,43</b>
<b>48</b>	860,11	1043,63	<b>951,87</b>
<b>96</b>	1051,65	1150,55	<b>1101,10</b>
<b>144</b>	1293,41	1249,45	<b>1271,43</b>
<b>192</b>	930,77	930,77	<b>930,77</b>
<b>240</b>	1436,26	1205,49	<b>1320,88</b>
<b>288</b>	1249,45	1249,45	<b>1249,45</b>

**ANEXO 10:** Miligramos de fierro total del cultivo mixto (*A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*) al 8 % de arsenopirita

<b>CULTIVO MIXTO (<i>A. ferrooxidans</i> Y <i>A. thiooxidans</i>) 8 % FeAsS FIERRO TOTAL</b>			
<b>Tiempo (h)</b>	<b>REPETICIÓN I (mg/L)</b>	<b>REPETICIÓN II (mg /L)</b>	<b>PROMEDIO (mg/L)</b>
<b>0</b>	1255,87	1220,95	<b>1238,37</b>
<b>48</b>	8023,26	5930,23	<b>6976,74</b>
<b>96</b>	8604,65	8953,49	<b>8779,07</b>
<b>144</b>	8953,49	8139,53	<b>8546,51</b>
<b>192</b>	9883,72	9767,44	<b>9825,58</b>
<b>240</b>	7674,42	9767,44	<b>8720,93</b>
<b>288</b>	7697,67	7604,65	<b>7651,16</b>

**ANEXO 11:** Miligramos de fierro III del cultivo mixto (*A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*) al 8 % de arsenopirita

<b>CULTIVO MIXTO (<i>A. ferrooxidans</i> Y <i>A. thiooxidans</i>) 8 % FeAsS FIERRO III</b>			
<b>Tiempo (h)</b>	<b>REPETICIÓN I (mg/L)</b>	<b>REPETICIÓN II (mg /L)</b>	<b>PROMEDIO (mg/L)</b>
<b>0</b>	1081,40	1186,05	<b>1133,72</b>
<b>48</b>	1348,84	1395,35	<b>1372,09</b>
<b>96</b>	7558,14	7325,58	<b>7441,86</b>
<b>144</b>	5930,23	5930,23	<b>5930,23</b>
<b>192</b>	9651,16	6395,35	<b>8023,26</b>
<b>240</b>	6627,91	6744,19	<b>6686,05</b>
<b>288</b>	6406,98	6523,26	<b>6465,12</b>

**ANEXO 12:** Miligramos de fierro total del cultivo mixto (*A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*) al 12 % de arsenopirita

<b>CULTIVO MIXTO (<i>A. ferrooxidans</i> Y <i>A. thiooxidans</i>) 12 % FeAsS FIERRO TOTAL</b>			
<b>Tiempo (h)</b>	<b>REPETICIÓN I (mg/L)</b>	<b>REPETICIÓN II (mg /L)</b>	<b>PROMEDIO (mg/L)</b>
<b>0</b>	1616,28	1627,91	<b>1622,09</b>
<b>48</b>	5465,12	7441,86	<b>6453,49</b>
<b>96</b>	8139,53	8837,21	<b>8488,37</b>
<b>144</b>	8255,81	7093,02	<b>7674,42</b>
<b>192</b>	9418,60	8255,81	<b>8837,21</b>
<b>240</b>	6976,74	6976,74	<b>6976,74</b>
<b>288</b>	7081,40	7162,79	<b>7122,09</b>

**ANEXO 13:** Miligramos de fierro III del cultivo mixto (*A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*) al 12 % de arsenopirita

<b>CULTIVO MIXTO (<i>A. ferrooxidans</i> Y <i>A. thiooxidans</i>) 12 % FeAsS FIERRO III</b>			
<b>Tiempo (h)</b>	<b>REPETICIÓN I (mg/L)</b>	<b>REPETICIÓN II (mg /L)</b>	<b>PROMEDIO (mg/L)</b>
<b>0</b>	1162,79	1093,02	<b>1127,91</b>
<b>48</b>	1604,65	1604,65	<b>1604,65</b>
<b>96</b>	5348,84	5232,56	<b>5290,70</b>
<b>144</b>	6627,91	6279,07	<b>6453,49</b>
<b>192</b>	8255,81	6162,79	<b>7209,30</b>
<b>240</b>	5000,00	5232,56	<b>5116,28</b>
<b>288</b>	5430,23	5767,44	<b>5598,84</b>

**ANEXO 14:** Miligramos de fierro total del blanco al 8 % de arsenopirita

<b>Blanco 8 % FeAsS FIERRO III</b>			
<b>Tiempo (h)</b>	<b>REPETICIÓN I (mg/L)</b>	<b>REPETICIÓN II (mg /L)</b>	<b>PROMEDIO (mg/L)</b>
<b>0</b>	54,7	55,8	55,2
<b>48</b>	64,0	61,6	62,8
<b>96</b>	54,7	57,0	55,8
<b>144</b>	60,5	59,3	59,9
<b>192</b>	67,4	65,1	66,3
<b>240</b>	64,0	58,1	61,0
<b>288</b>	62,8	65,1	64,0

**ANEXO 15:** Miligramos de hierro III del blanco al 8 % de arsenopirita

<b>Blanco 8 % FeAsS FIERRO TOTAL</b>			
<b>Tiempo (h)</b>	<b>REPETICIÓN I (mg/L)</b>	<b>REPETICIÓN II (mg /L)</b>	<b>PROMEDIO (mg/L)</b>
0	558,1	569,8	564,0
48	674,4	651,2	662,8
96	686,0	674,4	680,2
144	709,3	674,4	691,9
192	720,9	720,9	720,9
240	674,4	662,8	668,6
288	639,5	674,4	657,0

**ANEXO 16:** Miligramos de hierro total del blanco al 12 % de arsenopirita

<b>Blanco 12 % FeAsS FIERRO III</b>			
<b>Tiempo (h)</b>	<b>REPETICIÓN I (mg/L)</b>	<b>REPETICIÓN II (mg /L)</b>	<b>PROMEDIO (mg/L)</b>
0	57,0	55,8	56,4
48	60,5	61,6	61,0
96	59,3	59,3	59,3
144	58,1	55,8	57,0
192	64,0	61,6	62,8
240	61,6	59,3	60,5
288	53,5	50,0	51,7

**ANEXO 17:** Miligramos de fierro III del blanco al 12 % de arsenopirita

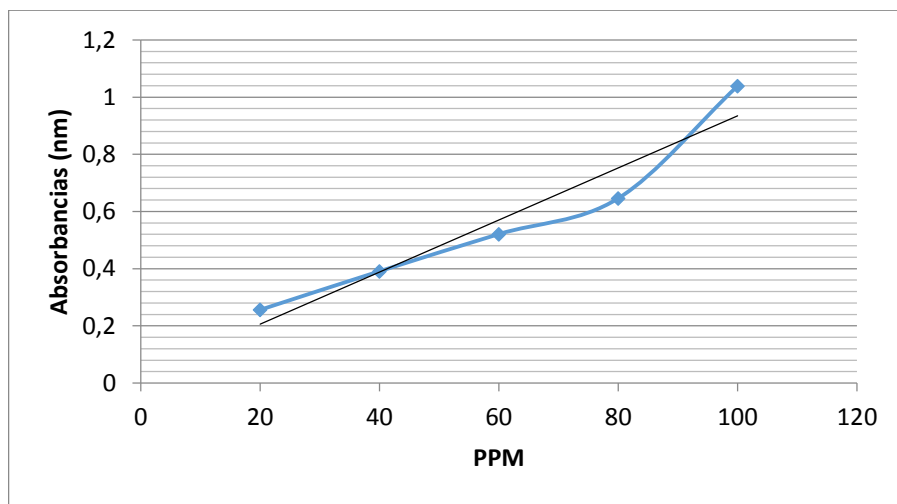
<b>Blanco 12 % FeAsS FIERRO TOTAL</b>			
<b>Tiempo (h)</b>	<b>REPETICIÓN I (mg/L)</b>	<b>REPETICIÓN II (mg /L)</b>	<b>PROMEDIO (mg/L)</b>
<b>0</b>	604,7	581,4	593,0
<b>48</b>	639,5	674,4	657,0
<b>96</b>	697,7	686,0	691,9
<b>144</b>	720,9	627,9	674,4
<b>192</b>	674,4	755,8	715,1
<b>240</b>	558,1	755,8	657,0
<b>288</b>	569,8	581,4	575,6

**ANEXO 18:** Datos para la curva patrón de calibración de Fe total y Fe III del cultivo microbiano puro a 477 nm

<b>PPM</b>	<b>Densidad óptica a 477 nm</b>
20	0,256
40	0,391
60	0,521
80	0,646
100	1,039

Regresión lineal de la curva patrón de calibración de Fe total y Fe III a 477nm

$$Y=0,0091X+0,0243; R^2 = 0,9243$$

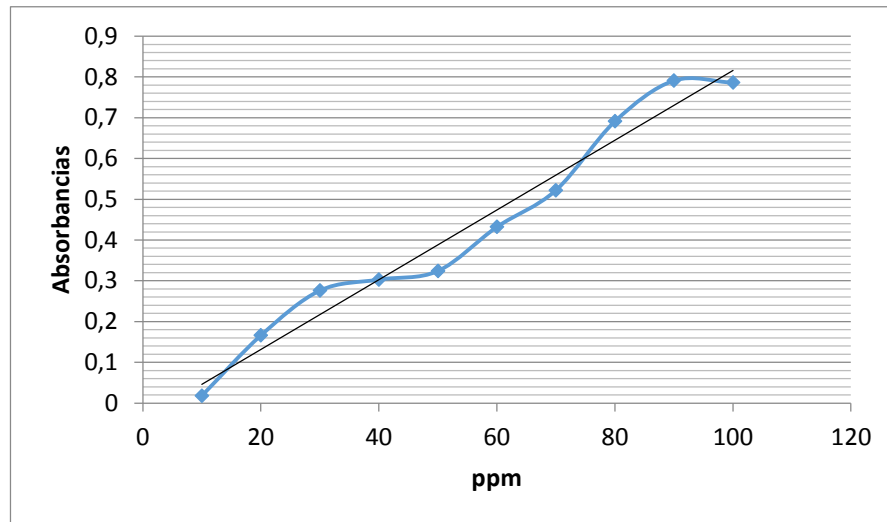


**ANEXO 19:** Datos para curva patrón de calibración de Fe total y Fe III del cultivo microbiano mixto 477nm

PPM	Densidad óptica a 477 nm
10	0,018
20	0,166
30	0,276
40	0,303
50	0,324
60	0,432
70	0,522
80	0,691
90	0,791
100	0,786

Regresión lineal de la curva patrón de calibración de Fe total y Fe III a 477nm.

$$Y=0,0086X-0,04; R^2= 0,9689$$



**ANEXO 20:** Absorbancias de fierro total del cultivo microbiano puro con arsenopirita al 8 %

ABSORBANCIAS DEL CULTIVO PURO ( <i>A. ferrooxidans</i> )			
8 % FeAsS FIERRO TOTAL			
TIEMPO (h)	REPETICIÓN I	REPETICIÓN II	PROMEDIO
0	0,158	0,181	0,170
48	1,440	1,371	1,406
96	0,145	0,145	0,145
144	0,146	0,149	0,148
192	0,165	0,165	0,165
240	0,170	0,203	0,187
288	0,172	0,177	0,175

**ANEXO 21:** Absorbancias de fierro III del cultivo microbiano puro con arsenopirita al 8 %

<b>ABSORBANCIAS DEL CULTIVO PURO (<i>A. ferrooxidans</i>)</b>			
<b>8 % FeAsS FIERRO III</b>			
<b>TIEMPO (h)</b>	<b>REPETICIÓN I</b>	<b>REPETICIÓN II</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>0</b>	0,065	0,037	<b>0,051</b>
<b>48</b>	1,093	0,728	<b>0,911</b>
<b>96</b>	0,102	0,106	<b>0,104</b>
<b>144</b>	0,115	0,115	<b>0,115</b>
<b>192</b>	0,135	0,157	<b>0,146</b>
<b>240</b>	0,151	0,152	<b>0,152</b>
<b>288</b>	0,163	0,163	<b>0,163</b>

**ANEXO 22:** Absorbancias de fierro total del cultivo microbiano puro con arsenopirita al 12 %

<b>ABSORBANCIAS DEL CULTIVO PURO (<i>A. ferrooxidans</i>)</b>			
<b>12 % FeAsS FIERRO TOTAL</b>			
<b>TIEMPO (h)</b>	<b>REPETICIÓN I</b>	<b>REPETICIÓN II</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>0</b>	0,117	0,134	<b>0,126</b>
<b>48</b>	0,990	0,989	<b>0,990</b>
<b>96</b>	0,138	0,138	<b>0,138</b>
<b>144</b>	0,163	0,131	<b>0,147</b>
<b>192</b>	0,118	0,118	<b>0,118</b>
<b>240</b>	0,149	0,155	<b>0,152</b>
<b>288</b>	0,142	0,142	<b>0,142</b>

**ANEXO 23.** Absorbancias de fierro III del cultivo microbiano puro con arsenopirita al 12 %

<b>ABSORBANCIAS DEL CULTIVO PURO (<i>A. ferrooxidans</i>)</b>			
<b>12 % de FeAsS FIERRO III</b>			
<b>TIEMPO (h)</b>	<b>REPETICIÓN I</b>	<b>REPETICIÓN II</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>0</b>	0,049	0,049	<b>0,049</b>
<b>48</b>	0,807	0,974	<b>0,891</b>
<b>96</b>	0,120	0,129	<b>0,125</b>
<b>144</b>	0,142	0,138	<b>0,140</b>
<b>192</b>	0,109	0,109	<b>0,109</b>
<b>240</b>	0,155	0,134	<b>0,145</b>
<b>288</b>	0,138	0,138	<b>0,138</b>

**ANEXO 24:** Absorbancias de fierro total del cultivo microbiano mixto con arsenopirita al 8 %

<b>ABSORBANCIAS DEL CULTIVO MIXTO (<i>A. ferrooxidans</i> Y <i>A. thiooxidans</i>)</b>			
<b>8 % FeAsS FIERRO TOTAL</b>			
<b>TIEMPO (h)</b>	<b>REPETICIÓN I</b>	<b>REPETICIÓN II</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>0</b>	0,068	0,065	<b>0,067</b>
<b>48</b>	0,029	0,011	<b>0,020</b>
<b>96</b>	0,034	0,037	<b>0,036</b>
<b>144</b>	0,037	0,030	<b>0,034</b>
<b>192</b>	0,045	0,044	<b>0,045</b>
<b>240</b>	0,026	0,044	<b>0,035</b>
<b>288</b>	0,622	0,614	<b>0,618</b>

**ANEXO 25.** Absorbancias de fierro III del cultivo microbiano mixto con arsenopirita al 8 %

<b>ABSORBANCIAS DEL CULTIVO MIXTO (<i>A. ferrooxidans</i> Y <i>A. thiooxidans</i>)</b>			
<b>8 % FeAsS FIERRO III</b>			
<b>TIEMPO (h)</b>	<b>REPETICIÓN I</b>	<b>REPETICIÓN II</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>0</b>	0,053	0,062	<b>0,058</b>
<b>48</b>	0,076	0,080	<b>0,078</b>
<b>96</b>	0,025	0,023	<b>0,024</b>
<b>144</b>	0,011	0,011	<b>0,011</b>
<b>192</b>	0,043	0,015	<b>0,029</b>
<b>240</b>	0,017	0,018	<b>0,018</b>
<b>288</b>	0,511	0,521	<b>0,516</b>

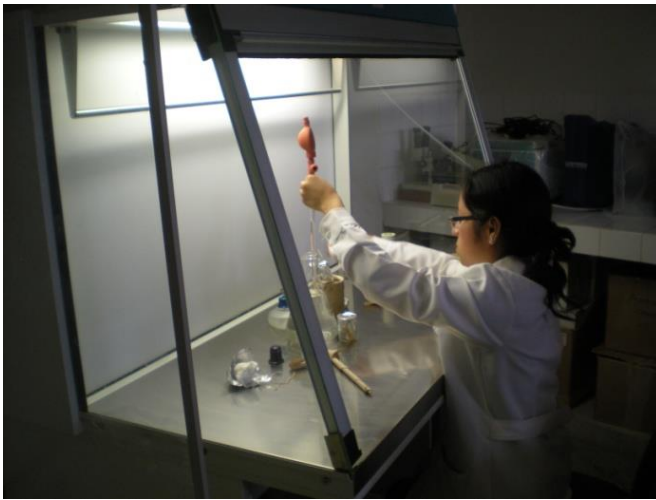
**ANEXO 26:** Absorbancias de fierro total del cultivo microbiano mixto con arsenopirita al 12 %

<b>ABSORBANCIAS DEL CULTIVO MIXTO (<i>A. ferrooxidans</i> Y <i>A. thiooxidans</i>)</b>			
<b>12 % FeAsS FIERRO TOTAL</b>			
<b>TIEMPO (h)</b>	<b>REPETICIÓN I</b>	<b>REPETICIÓN II</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>0</b>	0,099	0,100	<b>0,100</b>
<b>48</b>	0,007	0,024	<b>0,016</b>
<b>96</b>	0,030	0,036	<b>0,033</b>
<b>144</b>	0,031	0,021	<b>0,026</b>
<b>192</b>	0,041	0,031	<b>0,036</b>
<b>240</b>	0,020	0,020	<b>0,020</b>
<b>288</b>	0,569	0,576	<b>0,573</b>

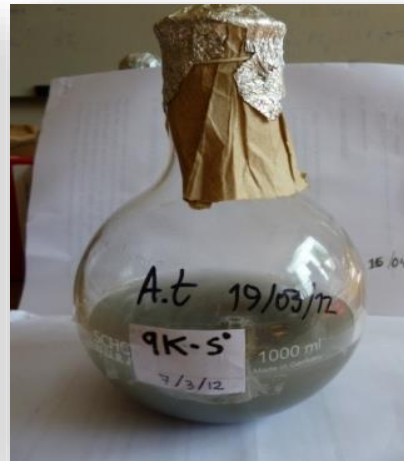
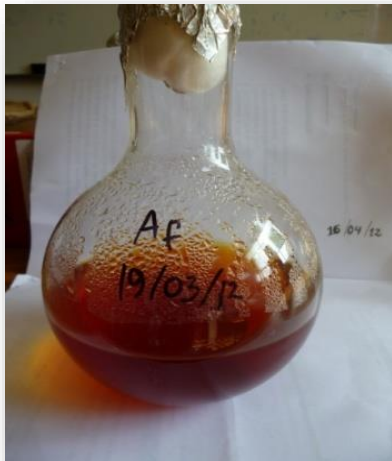
**ANEXO 27:** Absorbancias de fierro III del cultivo microbiano mixto con arsenopirita al 12 %

<b>ABSORBANCIAS DEL CULTIVO MIXTO (<i>A. ferrooxidans</i> Y <i>A. thiooxidans</i>)</b>			
<b>12 % FeAsS FIERRO III</b>			
<b>TIEMPO (h)</b>	<b>REPETICIÓN I</b>	<b>REPETICIÓN II</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>0</b>	0,060	0,054	<b>0,057</b>
<b>48</b>	0,098	0,098	<b>0,098</b>
<b>96</b>	0,006	0,005	<b>0,006</b>
<b>144</b>	0,017	0,014	<b>0,016</b>
<b>192</b>	0,031	0,013	<b>0,022</b>
<b>240</b>	0,003	0,005	<b>0,004</b>
<b>288</b>	0,427	0,456	<b>0,442</b>

**ANEXO 28:** Reactivación de las cepas (*A. ferrooxidans* DSMZ 1477 y *A. thiooxidans* DSMZ 1478) donadas por la Facultad de Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.



**ANEXO 29:** Masificación de los inóculos microbianos



**ANEXO 30.** Reactores al inicio del proceso con inóculo microbiano puro (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) y sus respectivas concentraciones de arsenopirita



**ANEXO 31:** Reactores al final del proceso con inóculo microbiano puro (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) y sus respectivas concentraciones de arsenopirita



**ANEXO 32:** Reactores al inicio del proceso con inóculo microbiano mixto (*A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*) y sus respectivas concentraciones de arsenopirita



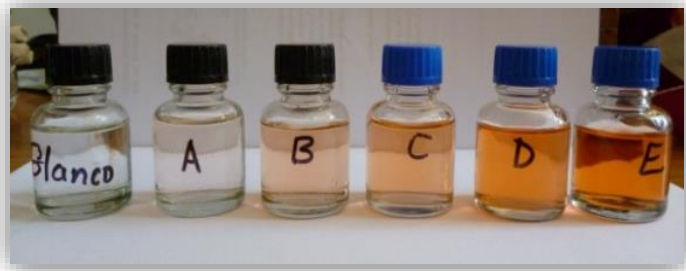
**ANEXO 33:** Reactores al final del proceso con inóculo microbiano mixto (*A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*) y sus respectivas concentraciones de arsenopirita



**ANEXO 34: Microscopio electrónico de la UNJBG**



**ANEXO 35: Patrones de hierro**





---

FIRMA DEL TESISISTA

Bach. Ely Judith Tirado Rebaza



---

FIRMA DEL ASESOR

Mgr. Daladier Miguel Castillo Cotrina