

Universidad Nacional
“José Faustino Sánchez Carrión”

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA METALÚRGICA



TESIS:

**AISLAMIENTO Y APLICACIÓN DE LA BACTERIA
ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS EN LA BIOOXIDACIÓN DE
MINERALES AURIFEROS REFRACTARIOS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO METALÚRGICO

AUTOR:

JUAN JHONNY GIL ROBLES

ASESOR:

M(°). JUAN MANUEL IPANAQUE ROÑA
C.I.P. N.º 66303

.....
JUAN M. IPANAQUE ROÑA
Ingeniero Metalurgista
R. CIP: 66303

HUACHO – PERU
2020.

**“AISLAMIENTO Y APLICACIÓN DE LA BACTERIA
ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS EN LA
BIOOXIDACIÓN DE MINERALES AURIFEROS
REFRACTARIOS”.**



Dr. ALBERTO IRHAAM, SANCHEZ GUZMÁN
PRESIDENTE

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "A. Irhaam", written over a horizontal line.

Dr. EDWIN GUILLERMO, GÁLVEZ TORRES
SECRETARIO

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "E. Gálvez", written over a horizontal line.

M(o) RONALD FERNANDO, RODRIGUEZ ESPINOZA
VOCAL

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "R. Espinoza", written over a horizontal line.

M(o) JUAN MANUEL, IPANAQUE ROÑA
ASESOR

DEDICATORIA

A mis padres:

Por permitirme que pueda desempeñar una carrera profesional, y su apoyo constante en el transcurso de ese tiempo.

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme y guiarme por buen camino, para seguir adelante y no desmayar antes los problemas que se presentan, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

Al instituto de Investigación II GEO, por permitirme realizar mis prácticas Pre Profesionales, al director del Instituto por su apoyo constante, a los docentes de la UNJFSC por compartir sus conocimientos y compañeros de laboratorio quienes apoyaron con sus conocimientos.

Juan Gil

PENSAMIENTO

*“En el centro de tu Ser tienes la respuesta; sabes Quién
eres y sabes lo que quieres”*

Lao Tse.

INDICE GENERAL

Portada.....	i.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
PENSAMIENTO.....	v
INDICE GENERAL.....	vi
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE TABLAS	xi
GLOSARIO DE ABREVIATURA.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCION	xv
CAPITULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1 Descripción de la realidad problemática	1
1.2 Formulación del problema.....	2
1.2.1. Problema General.....	2
1.2.2. Problemas Específicos.....	2
1.3 Objetivo de la investigación.	2
1.3.1. Objetivo General	2
1.3.2. Objetivos Específicos	3
1.4 Justificación	3
1.5 Delimitación	3
1.5.1 Delimitación territorial.....	3
1.5.2 Delimitación tiempo y espacio.....	3
1.5.3 Delimitación de recursos.....	4
1.6 Viabilidad del estudio.....	4
CAPITULO II MARCO TEORICO	5
2.1 ANTECEDENTES	5
2.1.1 Investigaciones Nacionales.	5
2.1.2 Investigaciones Internacionales.....	7

2.1.3	Otras Investigaciones	8
2.2	MARCO TEORICO	10
2.2.1	Lixiviación de minerales refractarios	10
2.2.2	Minerales refractarios.....	11
2.2.3	Lixiviación bacteriana	12
2.2.4	Oxidación del Hierro.....	15
2.2.5	El azufre como fuente de energía.....	15
2.2.6	Parámetros que afectan la biolixiviación.	19
2.2.7	Tipo de Material	19
2.2.8	Inhibidores de la biooxidación	23
2.3	Definiciones Conceptuales	23
2.4	Formulación de la hipótesis	25
2.4.1	Hipótesis General	25
2.4.2	Hipótesis Específicas.....	25
2.5	Operacionalización de variables e indicadores.....	26
CAPITULO III METODOLOGIA		27
3.1	DISEÑO METODOLOGICO	27
3.2	Población y muestra.....	28
3.2.1	Población.....	28
3.2.2	Muestra.....	28
3.3	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	28
3.3.1	Técnicas a emplear	28
3.3.2	Instrumentos	29
3.4	Procedimiento y análisis de datos.....	29
CAPITULO IV RESULTADOS.....		30
4.1	Análisis de resultados	30
4.1.1	Recolección de Aguas acidas de mina	30
4.1.2	Aislamiento de Bacterias Acidithiobacillus Ferrooxidans	31
4.1.3	Aislamiento en Medio Líquido	34
4.1.4	Medio de Cultivo 9K Solido	35
4.1.5	Cinética Bacteriana	48

4.1.6	Adaptación de bacteria Acidithiobacillus Ferrooxidans a la pirita.....	51
4.1.7	Obtención de cepa adaptada.....	58
4.1.8	Obtención de Mineral Refractario.....	59
4.1.9	Análisis Mineralógico	59
4.1.10	Conminución	60
4.1.11	Análisis de Malla	60
4.1.12	Biooxidación del mineral refractario	61
4.1.13	Pruebas de Lixiviación	67
4.1.14	Lixiviación de Mineral sin Tratamiento	67
4.1.15	Lixiviación de Mineral Tratado con las Bacterias Acidithiobacillus Ferrooxidans.	69
CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		73
CAPITULO VI FUENTE DE INFORMACION		75
ANEXO.....		79

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Mecanismos directo e indirecto de biolixiviación	16
Figura N° 2: Las funciones microbianas en la biolixiviación de minerales de sulfuro.....	18
Figura N° 3: Inicio de crecimiento bacteriano	32
Figura N° 4: bacterias Acidithiobacillus ferrooxidans en microscopio aumento X1000	32
Figura N° 5: Procedimiento Aislamiento de Acidithiobacillus Ferrooxidans Muestra DAM.....	33
Figura N° 6: Siembra inicial de bacteria.....	35
Figura N° 7: Bacteria desarrollada.....	35
Figura N° 8: a y b, crecimiento de bacterias en medio sólido	36
Figura N° 9: Diseño Experimental.....	38
Figura N° 10: Cambios de potencial en los medios estudiados.....	40
Figura N° 11: Cambios de Ph en los diferentes medios de crecimiento.	41
Figura N° 12: Cámara Neubauer, secciones “R” son las usadas para el conteo Bacteriano.....	42
Figura N° 13: Conteo bacteriano en microscopio usando cámara de Neubauer.....	43
Figura N° 14: Crecimiento bacteriano en diferentes medios de cultivos.....	44
Figura N° 15: Formación de Precipitados en el crecimiento bacteriano.....	45
Figura N° 16: Producción de Hidroxi sulfatos de hierro en cada medio de crecimiento.....	46
Figura N° 17: Crecimiento bacteriano en su totalidad.....	48
Figura N° 18: Cámara de Neubauer usada para conteo bacteriano en el estudio	49
Figura N° 19: Cinética bacteriana realizada en el medio óptimo de crecimiento.	50
Figura N° 20: Viraje del medio en el crecimiento bacteriano.....	50
Figura N° 21: Resultados de análisis de malla después de la molienda	51
Figura N° 22: Cambios del potencial de oxidación en función de la cantidad de pirita.....	54
Figura N° 23: Cambios del potencial oxidación función cantidad de pirita a malla -400.	56
Figura N° 24: Cambios del potencial de oxidación en función de la cantidad de pirita.....	57
Figura N°25: Cambios del potencial oxidación en función cantidad de pirita malla del mineral.58	58
Figura N° 26: Resultado de la adaptación de mineral pirítico en 16 días.....	59
Figura N°27: Potencial oxidación de mineral refractario con Acidithiobacillus Ferrooxidans	63
Figura N° 28: Crecimiento Bacteriano oxidación mineral refractario Acidithiobacillus Ferrooxidans	63
Figura N° 29: Dilución de arsénico en la oxidación de mineral refractario con bacteria	64
Figura N° 30: Dilución de Fe en oxidación de mineral Refractario en bacteria Acidithiobacillus Ferrooxidans	65
Figura N° 31: Resultado de oxidación de mineral refractario con la bacteria Acidithiobacillus Ferrooxidans.	66
Figura N° 32: Recuperación de oro en mineral refractario sin tratamiento biológico.....	68
Figura N° 33: Variación de consumo de cianuro en lixiviación de mineral refractario sin tratamiento biológico	68
Figura N° 34: Momentos de la prueba de lixiviación de mineral refractario sin tratamiento biológico.	69

Figura N° 35: Recuperación de oro en lixiviación de mineral refractario oxidado con bacteria <i>Acidithiobacillus Ferrooxidans</i>	70
Figura N° 36: Variación de consumo de cianuro en la lixiviación de mineral refractario previamente oxidado con bacteria	70
Figura N° 37: Momentos de la prueba de lixiviación de mineral refractario al que previamente se le hizo un tratamiento biológico	71
Figura N° 38: Comparación de mineral refractario.....	71

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Producción total de Biolixiviación.....</i>	xvi
Tabla 2: Operación de Biolixiviación y Biooxidación en Perú.	xvi
Tabla 3 Factores y parámetros que afectan la biolixiviación y pilas y la recuperación del metal	19
Tabla 4 Operacionalización de las Variables	26
Tabla 5 Días de Aislamiento Bacteriano.....	35
Tabla 6: Crecimientos de microorganismos en medios de cultivos sólidos	37
Tabla 7: Condiciones del medio a evaluar.	38
Tabla 8: Control de potencial en diferentes medios.....	39
Tabla 9: Control de pH en diferentes medios	41
Tabla 10: Control de crecimiento bacteriano en los diferentes medios	43
Tabla 11: Comparación medios de crecimiento, antiguo y medio modificado.	47
Tabla 12: Crecimiento Bacteriano	49
Tabla 13: Adaptación la bacteria a medios piríticos, medio 9k disminuido progresivamente.	52
Tabla 14: Control de Potencia adaptación	53
Tabla 15: Control de potencia de segunda adaptación.....	54
Tabla 16: Cambios potencial de oxidación función cantidad de pirita y la malla del mineral	55
Tabla 17: Control de potencial de tercera adaptación.....	55
Tabla 18: Control de potencial de cuarta adaptación.....	57
Tabla 19: Control de potencial de quinta adaptación.....	58
Tabla 20: Análisis químico de la muestra refractaria	59
Tabla 21: Análisis de malla después de chancado el mineral	61
Tabla 22: Análisis de malla después de realizar la molienda	61
Tabla 23: Parámetros a utilizar en la oxidación bacteriana	62
Tabla 24: Control de potencial de biooxidación de mineral refractario.....	62
Tabla 25: Control de crecimiento bacteriano.....	63
Tabla 26: Control de dilución de arsénico en la oxidación de mineral refractario	65
Tabla 27: Control de dilución de hierro en la oxidación de mineral refractario	66
Tabla 28: Parámetros a considerar en la lixiviación con cianuro.....	67

GLOSARIO DE ABREVIATURA

%	:	Porcentaje
Ag	:	Plata
Atm	:	Atmosfera
KCl	:	Cloruro de potasio.
Cu	:	Cobre
CuSO ₄	:	Sulfato de cobre.
Fe	:	Hierro
FeSO ₄	:	Sulfato ferroso
gr	:	Gramos
H ₂ SO ₄	:	Ácido sulfúrico.
Kg/TM	:	Kilogramo por tonelada métrica
mg/l	:	Miligramo por litro
K ₂ HPO ₄	:	Fosfato di potásico
ml	:	Mililitros.
Mo	:	Molibdeno
Na ₂ S	:	Sulfuro de Sodio
NaCN	:	Cianuro de sodio.
NaHSO ₃	:	Bisulfito de sodio
OH ⁻	:	Alcohol
Onz	:	Onza
pH	:	peachimetro
TN	:	Tonelada
Zn	:	Zinc
ZnSO ₄	:	Sulfato de zinc.

RESUMEN

Actualmente el uso de bacterias se ha convertido en una alternativa viable para procesar diversos minerales. Este procedimiento es conocido también como biohidrometalurgia, que no es más que la oxidación del azufre, hierro ferroso y minerales sulfurados (Cu, Pb, Zn, Fe, Ni) por microorganismos de tipo acidófilas, en este estudio se usará como un pre-tratamiento oxidante de menas de oro refractarias, tornándola disponible para los procesos subsecuentes, como la lixiviación con cianuro; La oxidación mediante bacterias es una alternativa sostenible frente a la calcinación y oxidación por presión.

Los drenajes ácidos de mina (DAM) caracterizados por acidez extrema (pH 2.5 – 4.0) y altas concentraciones de metales pesados, contienen poblaciones nativas de bacterias oxidantes, responsables de la oxidación progresiva de los sulfuros. Estas bacterias con su oxidación nos ayudaran a mejorar el tema de contaminación ambiental y aumentar el tema de recuperación, factores muy importantes en lo que se refiere a las plantas metalúrgicas.

Palabras claves: Acidithiobacillus Ferrooxidans, Biooxidación, Lixiviación, pH, mv, Conteo bacteriano, Cianuro de sodio, Sulfato ferroso, Recuperación.

ABSTRACT

Currently the use of bacteria has become a viable alternative for transformed various minerals. This procedure is also known as biohydrometallurgy, which is nothing more than the oxidation of sulfur, ferrous iron and sulphide minerals (Cu, Pb, Zn, Fe, Ni) by acidophilic microorganisms, in this study it will be used as an oxidizing pretreatment of refractory gold ores, making it available for subsequent processes, such as cyanide leaching; Oxidation by bacteria is a sustainable alternative to calcination and pressure oxidation.

Acid mine drains (DAM) characterized by extreme acidity (pH 2.5 - 4.0) and high heavy metal antibodies, native populations of oxidizing bacteria, responsible for the progressive oxidation of sulphides. These bacteria with their oxidation help us to improve the issue of environmental pollution and increase the issue of recovery, very important factors when it comes to metallurgical plants.

Keywords: Acidithiobacillus Ferrooxidans, Biooxidation, Leaching, ph, mv, Bacterial count, Sodium cyanide, Ferrous sulfate, Recovery.

INTRODUCCION

En la industria minera es frecuente la búsqueda de métodos menos contaminantes en la extracción de metales, los métodos convencionales generan alto costo económico y ambiental, estos procesos metalúrgicos producen alto índice de contaminación.

Una alternativa biológica a este problema es la utilización de microorganismos biolixiviadores, los cuales se encuentran presentes en ambientes ricos en metales, podemos tomar el caso de un agua ácido proveniente de la misma mina o planta concentradora, convirtiéndose en una buena opción para su lixiviación. Este tipo de investigación ya se estuvo realizando en varios países, tanto en la aplicación en el oro como el cobre, (investigando más el tema del cobre, Brierley, 1978).

El proceso de biolixiviación o biooxidación es un evento natural que se ha aprovechado por décadas para la recuperación de metales (Brierley, 1982), en oro (Livesey- Goldblatt et al, 1983). Los procesos de lixivaciones biológicas han sido evaluados sobre diferentes tipos de minerales de diversas zonas geográficas. Literalmente, se afirma no existe dos tipos de minerales exactamente iguales; por tal motivo, cada depósito de mineral deberá ser evaluado previamente a la lixiviación ya que todos los minerales poseen diferencias cualitativas y cuantitativas en su composición mineralógica.

Desde 1980, diferentes estudios de biooxidación a escala de laboratorio y planta piloto se han realizado en reactores de tanque agitado y columnas Air Lyft, siendo los reactores continuos de tanque agitado los más implementados en las operaciones industriales a gran escala para el tratamiento de menas refractarias. Durante los años 2001 - 2003, este proceso biotecnológico fue aplicado para la recuperación de oro en varias plantas a nivel comercial, encontrándose establecidas en Australia, Sudáfrica, Ghana y Brasil (Das and Sen, 2001, González et al., 2003). Los resultados obtenidos demuestran que el proceso de biooxidación es una alternativa técnica, económica y ambientalmente viable, comparada con las técnicas convencionales de oxidación a presión, tostación y oxidación química.

La Biooxidación en el pre-tratamiento de concentrados de oro, antes de la extracción con cianuro convencional. Sin embargo, la aplicación moderna de biominería la década 1960 con la construcción y el riego de los vertederos para la recuperación de cobre en la mina Kennecott Bingham Canyon Copper, Utah, USA (Brierley 2001). La década 1980, hubo gran expansión en las operaciones de lixiviación en recuperación de cobre en minerales de baja ley, con muchas operaciones iniciaron en Chile. (Chandra, Sekhar, & Gahan, 2012).

Tabla 1:

Producción total de Biolixiviación

Operación	Producción (TM/año2008)	Operador	Grado Cobre	Duración del Proceso
Quebrada Blanca	82	Teck	.3	1994-Presente
Codelco-Chuquicamata	85	CODELCO	.3	1994-Presente
Andacollo22.500	22.5	Teck	.58	1996-Presente
Dos Amigos	10	Cemin	.5	1996-Presente
Los Bronces	46.4	Anglo American	.45	2006-Presente
Minera Escondida	182	BHP Billiton	.3 - 0.7	2006-Presente
Minera Spence	128	BHP Billiton	.12	2007-Presente
Total, Producción por Biolixiviación	555.9			
% Biolixiviación / Producción Total	10,4			

Fuente: Brierley, 2010.

Tabla 2:

Operación de Biolixiviación y Biooxidación en Perú.

Planta Industrial y localización	Capacidad de Concentración	Años de Operación	Operación y Tecnología
Tamboraque - san Mateo,	60 (TM/Día)	1998-2003	Gold field's BIOX®
Cerro Verde	54200 TM de Cátodos de Cobre /Año	1997-Presente	Biolixiviación

Fuente. Brierley, 2010.

La biotecnología aplicada a la minería, actualmente no está muy difundida en el Perú, por los pocos proyectos implementados. En la actualidad desarrollos en la implementación de pruebas de biolixiviación son el proyecto Yanacocha verde, proyecto la granja esperando incrementen la producción anual de cobre por biolixiviación.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática.

En la actualidad existen plantas mineras, que presentan muchos problemas en la recuperación del oro a partir del mineral aurífero refractario, la ocurrencia de oro con un alto contenido de este metal en pirita, está altamente diseminada. Generalmente el oro se encuentra encapsulado dentro de los granos de pirita. Presentando pérdidas del metal precioso en el relave y bajas recuperaciones en los procesos tanto flotación como lixiviación, afectando de esta manera a la producción de la empresa.

Este problema es presentado en su mayoría en los yacimientos meso termales, así como en el batolito de Pataz, presentando minerales como son la pirita, la arsenopirita, entre otras. Ante esta situación se han tomado medidas drásticas en cuanto al proceso de lixiviación, tal como es un aumento en la concentración del cianuro para poder tratar de aumentar la recuperación del metal, pero no soluciona el problema, por el contrario, esta medida afecta significativamente al medio ambiente.

Los relaves de dicho proceso concentran gran cantidad de este tipo de mineral, como es la pirita, llegando a un alto contenido de oro por tonelada, pero que no se puede recuperar, manteniéndolo de alguna manera como una reserva para su futura recuperación.

Se han presentado opciones de pre tratamientos para la oxidación de este tipo de mineral, como son la tostación y la oxidación a presión, pero estos tratamientos no tuvieron mucho éxito, presentando un mayor costo de operación, lo cual no se tomaron en cuenta.

Ante esta situación se propone la aplicación de un pre tratamiento a la lixiviación de este tipo de mineral, es la biooxidación, esto es a través de la bacteria acidithiobacillus ferrooxidans procedente de drenaje ácidos de mina, la cual tienen la propiedad de oxidar al mineral refractario usando como fuente energética el **Fe**. Esta propuesta es de gran interés ya que nos permitirá aumentar la recuperación del metal precioso, y porque no decir que podemos prolongar el tiempo de vida de la mina.

1.2 Formulación del problema

1.2.1. Problema General.

¿En qué medida afectará el aislamiento y aplicación de la bacteria *acidithiobacillus ferrooxidans* en la biooxidación como pre-tratamiento en comparación del método de lixiviación convencional en la recuperación de oro en un mineral aurífero refractario?

1.2.2. Problemas Específicos.

- ¿En qué medida afectará el aislamiento de bacteria *acidithiobacillus ferrooxidans* en la biooxidación como pre-tratamiento en comparación del método de lixiviación convencional sobre la recuperación de oro a partir de un mineral aurífero refractario?
- ¿En qué medida afectará la aplicación de bacteria *acidithiobacillus ferrooxidans* en la biooxidación como pre-tratamiento en comparación del método de lixiviación convencional sobre la recuperación de oro a partir de un mineral aurífero refractario?

1.3 Objetivo de la investigación.

1.3.1. Objetivo General

Proponer el aislamiento y aplicación de la bacteria *acidithiobacillus ferrooxidans* en la biooxidación como pre-tratamiento en comparación del método de lixiviación convencional en la recuperación de oro en un mineral aurífero refractario.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Evaluar en qué medida afectará el aislamiento de bacteria acidithiobacillus ferrooxidans en la biooxidación como pre-tratamiento en comparación del método de lixiviación convencional sobre la recuperación de oro a partir de un mineral aurífero refractario.
- Evaluar en qué medida afectará la aplicación de bacteria acidithiobacillus ferrooxidans en la biooxidación como pre-tratamiento en comparación del método de lixiviación convencional sobre la recuperación de oro a partir de un mineral aurífero refractario.

1.4 Justificación

Esta investigación se justifica que la aplicación de este pre-tratamiento es de gran relevancia, ya que ante la necesidad de extraer el metal precioso de un mineral refractario (principalmente pirita y arsenopirita en los relaves de lixiviación) nos ayudara a facilitar la obtención del mismo. Aplicando este pre tratamiento el porcentaje de recuperación podría aumentar y más aún se puede prolongar el tiempo de vida de la mina de la cual se extrae dicho mineral.

1.5 Delimitación

15.1 Delimitación territorial

- Departamento: Lima
- Provincia: Lima metropolitana
- Distrito: Lima

15.2 Delimitación tiempo y espacio

La investigación se realizó y se basa en el instituto de investigación II GEO, tomo como referencia el año 2018.

1.5.3 Delimitación de recursos

La disponibilidad de los recursos económicos, son escasa para llevar a cabo la investigación de manera adecuada y detallada, recurriéndose a terceros para acceder a mayor tecnología o escala de pilotaje.

1.6 Viabilidad del estudio

La investigación es viable, porque se tiene los conocimientos, los medios técnicos del laboratorio del instituto GEO, la metodología estandarizada, permitiendo hacer lecturas confiables, y los recursos económicos.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 ANTECEDENTES

A continuación, citamos algunos trabajos de investigación que se relacionan con el tema del problema planteado, investigaciones realizadas anteriormente y que guardan alguna vinculación con las variables de estudio. Las documentaciones, existentes a nivel nacional e internacional, se constatan con algunas tesis y artículos científicos, que detallamos a continuación:

2.1.1 Investigaciones Nacionales.

Panduro T. y Peña Q. (2015), en su Tesis sobre “*Aislamiento de cepas de acidithiobacillus ferrooxidans para la recuperación de metales de minerales sulfurados*”, para optar el Título de Ingeniero Químico de la Universidad Nacional del Centro del Perú, llego a la conclusión que, se puede aislar de la muestra de agua acida la bacteria de acidithiobacillus ferrooxidans, cuya característica típica es de la forma de un bacilo y el color rojo (Tinción Gram) bajo diferentes niveles de concentración de sulfato ferroso y temperatura. De la misma manera se comprobó que, el efecto de la temperatura a nivel laboratorio (33 – 37 °C) en el aislamiento de cepas de acidithiobacillus ferrooxidans como se puede observar en el Grafico No 6, fue determinante en la actividad bacteriana, en este intervalo sucedió la fase de crecimiento exponencial, también se observó que arriba de 40 °C aparece la fase estacionaria, o sea no hay aumento de las cepas (canibalismo), esto debido a que la reacción de oxidación se inhibe, se terminó los nutrientes o cambió el *pH*, y finalmente se concluyó que las pruebas para el aislamiento y adaptación de las cepas a nivel laboratorio se realizaron en frascos agitados, se empleó el medio de cultivo 9K liquido modificado (M9K), con una cantidad de sulfato ferroso (33,4 g/L) como nutriente, además se encontró que el empleo de un *pH* de 1.7 – 2.0 mejoro el desempeño de los microorganismos (Panduro T. & Peña Q., 2015).

Álvarez C. (2017), en su Tesis sobre “*Evaluación de la biooxidación de concentrado arsenopiritico aurífero por pretratamiento con bacterias quimiolitotrofas acidófilas que*

mejoren la recuperación del oro por cianuración en la empresa minera Eminsol S.A. Bolivia”, desarrollo la misma para optar el Título de Ingeniero Metalurgista de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann Tacna, comprobando que, los ensayos de biooxidación de las bacterias *A. ferrooxidans* y el consorcio, aplicado a concentrados de arsenopirita aurífera variando el porcentaje de sólidos de 8 y 12 %, favorece el 8 % donde se logra una mayor biooxidación y crecimiento bacteriano, este se debe a que los microorganismos presentan menor estrés de las bacterias al 12 %, sabiendo que la cianuración directa sin tratamiento de la arsenopirita aurífera presenta una máxima recuperación del 51,57 % a las 72 horas del proceso, debido a que un porcentaje de oro, aún se encuentra encapsulado dentro de la matriz de la arsenopirita. Al realizar el pre tratamiento de biooxidación se logra beneficiar la recuperación del oro. Concluyendo que el tratamiento actual de cianuración directa aplicado actualmente en la Empresa Minera “Emilsol S. A. La Paz – Bolivia”, que no supera el 50% de recuperación de oro. Además, este proceso de biooxidación se adecua a las exigencias medio ambientales que rigen en todo el mundo (Alvarez C., 2017).

Dennis R. (2016), en su tesis sobre *“Biolixiviación de cobre por bacterias ferrooxidantes a partir de calcopirita en un sistema de columnas de lixiviación por gravedad”*, para optar el Título Profesional de Biólogo de la Universidad Nacional de San Agustín - Arequipa, llega a las siguientes conclusiones, se logró el aislamiento de bacterias ferrooxidantes a partir del drenaje de la pila de lixiviación (PAD) las que fueron aisladas en medio selectivo 9K con sulfato ferroso (FeSO_4), a 25°C y 1.8 pH, condiciones a las cuales solo se presentó el crecimiento de bacterias ferrooxidantes que utilizaron el hierro presente en la solución, como principal fuente de energía. También se concluyó que, las bacterias ferrooxidantes alcanzaron una población de 334000 bacterias/mL en 30 días de evaluación a $\text{pH}= 1.5$ y Temperatura de 20°C y en el sistema de columnas por gravedad para los tres diámetros de calcopirita, se presentó un mayor crecimiento de bacterias ferrooxidantes, en el tamaño 9.5mm de calcopirita con 3390000 bacteria/mL a los 20 día de evaluación (Dennis R., 2016).

2.1.2 Investigaciones Internacionales

Juárez A. (2004), en su Tesis sobre “*Biolixiviación de minerales sulfuro-ferroso en jales: aislamiento caracterización de cultivos puros mixtos de microorganismos involucrados*”, para optar el Título para obtener el grado de Doctor en Ciencias: Área biotecnología en la Universidad de COLIMA, se concluye que, al conocer esta arte de su naturaleza biológica, se puede asumir que, cuando proliferan estos microorganismos, se favorecen reacciones oxidativas en presencia de reducidas especies de azufre y hierro, lo cual provoca la conversión de los ambientes ácidos. Esta situación puede ayudar a que se liberen metales en la solución o bien quedarse sobre la superficie del mineral, lo que puede provocar situaciones con potencia de impacto como contaminante ambiental. Este proceso químico-biológico que se propicia en el sistema no es favorable para la mayoría de las comunidades biológicas, incluyendo el hombre. También concluye que la pirita presente en los jales, sirvió como fuente de energía al liberar electrones durante la oxidación del Fe (II) al estado de Fe (III), para el crecimiento de los cultivos microbianos nativos. Lo que demostró, que, aunque de manera lenta según las condiciones de azufre y hierro, el incremento a la acidez como el descenso del pH siguen su curso, por otra parte, cuando se adiciono sulfato ferroso y extracto de levadura como fuente de energía, se aceleró significativamente la actividad oxidativa. Concluyendo que al oxidar los compuestos de hierro en el ambiente y si existe la presencia de compuestos orgánicos y son empleados para su desarrollo, el ambiente resultaría más ácidos y por lo tanto con mayor riesgo de toxicidad. (Juárez A., 2004).

Meruane N. (2002), en su tesis sobre “*Oxidación bacteriana de sulfato ferrosos con acidithiobacillus ferrooxidans*”, para optar el Título al Grado de Doctor en Ciencias de la Ingeniería, mención Química en la Universidad de Chile, llegando a la conclusión que las mediciones de velocidad de oxidación bacteriana de ion ferroso con el “*Acidithiobacillus ferrooxidans*” en el rango de pH 1,3 – 2,5 indican que al aumentar la concentración de ácido en el sistema se produce una importante disminución de la actividad oxidativa. El análisis de los datos muestra que la oxidación es descrita en forma adecuada por una expresión del tipo Monod donde el parámetro K_S depende de la concentración de ácido en solución y el parámetro M_V es constante. La constante de afinidad disminuye linealmente con el aumento de acidez, es decir, la disminución en las velocidades de oxidación puede ser explicada por un mecanismo de inhibición competitiva por protones. Se

realizaron mediciones de velocidad de oxidación de iones ferrosos con *Acidithiobacillus ferrooxidans* en un rango de pH 2,5 – 7,0. Los resultados desprende de la metodología permiten estimar en forma adecuada la actividad oxidativa de la bacteria en el rango de pH: 2,5 - 5,0 que no es posible lograr con otras metodologías convencionales. (Meruane N., 2002).

Orrantia B. (1997), en su Tesis “*Aislamiento y caracterización de cepa de thiobacillus ferrooxidans con alta resistencia a arsénico y su utilización en la recuperación de oro a partir de concentrados de pirita y arsenopirita*”, para optar el Título Grado Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología - Universidad Autónoma de Nuevo León, México, se comprobó se puede aislar un total de 29 cepas de *thiobacillus ferrooxidans* a partir de aminas con alto contenido de pirita arsenopirita, las cepas nativas y resistentes al arsénico, mostraron niveles similares de resistencia natural a los metales pesados (Cu, Ag, Mo y Cd), con excepción del mercurio. Obteniéndose una cepa con alta resistencia al arsénico (1800 ppm). Presentando resistencia a Hg (15 ppm) y la recuperación de oro, por cianuración, se incrementa substancialmente con la biolixiviación comparando con minerales sin tratamiento. (Orrantia B., 1997).

2.13 Otras Investigaciones

Norman W. & Corale L. (1978), en su investigación científica “*Bacterial Leaching*”, señala una alternativa biológica de lixiviación, utilización de microorganismos biolixiviadores, manipulación genética de quimiolitotróficos. Sugirió la bacteria como un medio para aumentar la productividad en la lixiviación. La resistencia del metal a algunos organismos es una característica plasmídica, el mecanismo de resistencia generalmente implica una transformación de metal. Este campo de estudio es particularmente lucrativo para el desarrollo de cepas bacterianas, podría usar específicamente en lixiviación rápida operaciones en la disolución de metales a partir de concentrados minerales y lixiviación de minerales particularmente recalcitrantes u minerales que contienen sustancias tóxicas raras. La optimización de lixiviación bacteriana se ha correlacionado con los estudios en hidrometalurgia y geoquímica, llevando a significativos avances en la lixiviación y construcción de vertederos para aumentar aireación y aireación artificial con presión de aire; ambos tienen extracción de cobre mejorada. El tipo de investigación se estuvo realizando en varios países, tanto en la aplicación en el oro como el cobre. (Norman W. & Corale L., 1978).

Iglesias N., *et al.* (1998), "*La biolixiviación como pretratamiento de menas auríferas refractarias en matriz de sulfuros*", señalan en su investigación que la eficacia de la biolixiviación en el pretratamiento de un conjunto de minerales auríferos en los que la refractariedad viene provocada por la presencia de sulfuros metálicos. Se estudian tres tipos de matrices: pirita, arsenopirita y sulfuros de cobre. Se concluye que la biolixiviación es un pretratamiento eficaz para estos tipos de menas refractarias de oro. En el caso de menas en matriz de pirita es necesario el contacto directo entre el sulfuro y los microorganismos. En el caso de menas en matriz de sulfuros de cobre y/o de sulfuros de arsénico, la biolixiviación puede realizarse por un mecanismo de contacto indirecto con separación de efectos, lo que permite alcanzar una cinética mucho más rápida que la de los procesos convencionales de biolixiviación. Esta mejora cinética reduce los tiempos de operación con el consecuente abaratamiento de instalaciones y coste de operación. Este hecho, en un futuro, puede significar la ampliación de las reservas tratables de menas de oro mediante la incorporación de minerales que actualmente no tienen la consideración de tales por no existir procesos tecnológicos con viabilidad económica para su tratamiento. (Iglesias, Carranza, & I., 1998).

González R., *et al.*, (2003), señalan en su investigación "*Optimización of the solids suspension conditions in a continuous stirred tank reactor for the biooxidation of refractory gold concentrates*", señala que la biooxidación de concentrados de oro refractarios se ha convertido en la tecnología elegida para el pretratamiento de este tipo de minerales. La biooxidación a gran escala de los concentrados de oro es generalmente realizada en reactores de tanque agitado continuo (CSTR). Lograr lodos homogéneos es una tarea difícil, ya que los sólidos tienden a estratificarse en el tanque. El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones óptimas de agitación en un CSTR para obtener la mejor suspensión de sólidos. Se considera que los resultados obtenidos en este trabajo pueden extrapolarse a un sistema inoculado con microorganismos oxidantes ya que su biomasa será insignificante en comparación con la del mineral suspendido, por lo que no cambiará las propiedades hidrodinámicas de la suspensión. (González, Gentina, & Acevedo, 2003).

Gordillo E., *et al.*, "*Estudio de microorganismos nativos en procesos de biooxidación de minerales auríferos refractarios*", señalan que la adaptación individual y conjunta de las bacterias y los hongos dependen de sistemas adecuados de agitación y aireación, en los cuales se ha colocado concentraciones distintas de muestras auríferas refractarias que provienen de los procesos de recuperación de oro por métodos tradicionales, a fin de comprobar su

efectividad como pretratamiento en los procesos de cianuración. En condiciones controladas las cepas bacterianas recolectadas se adaptan exitosamente a los medios de cultivo *in vitro* y a los ensayos con pulpa mineral, mostrando los resultados estadísticos que el crecimiento bacteriano es directamente proporcional a la concentración de pulpa especialmente entre el 47% al 51% en condiciones controladas de granulometría, pH, temperatura y agitación. (Gordillo E., Sanmartín G., & Carrión M., 2017)

2.2 MARCO TEORICO

2.2.1 Lixiviación de minerales refractarios

González R., *et al.*, (2003), señalan que la lixiviación con cianuro es el método más empleado desde hace más de cien años para la extracción de oro. Este proceso se realiza en tanques, columnas o pilas, usando soluciones diluidas de NaCN (menores de 0.3 %) en ambiente básico. (González, Gentina, & Acevedo, 2003)

La reacción global del proceso es:



En un sistema de este tipo, el oro se disuelve con gran efectividad. Los únicos requerimientos son que el oro esté libre y limpio, que la solución no contenga impurezas que puedan inhibir la reacción, y que haya un adecuado suministro de oxígeno en la solución durante todo el período que dure la reacción. La cianuración puede llevarse a cabo en un proceso estático (en pilas percoladas o inundadas) o a través de un proceso dinámico (en tanques agitados). El proceso de cianuración presenta dificultades en la extracción de oro de ciertos tipos de minerales conocidos como refractarios, donde su recuperación resulta muchas veces menor del 30 %. La refractariedad en estos minerales y sus concentrados se debe principalmente a la naturaleza compleja de la forma en que se aloja el metal en el mineral, el efecto de los minerales acompañantes sobre las reacciones que ocurren en la lixiviación con cianuro y las características de la ganga. (González, Gentina, & Acevedo, 2003)

2.2.2 Minerales refractarios

El oro se encuentra en la naturaleza como oro nativo, aleado, en compuestos y en solución sólida principalmente en sulfuros (frecuentemente denominado como oro invisible).

Para Domic Mihovilovic (2001), la refractariedad de los minerales auríferos puede ser distinguida por su naturaleza física y/o química. La refractariedad química se debe a tres condiciones:

- Teluros de oro insolubles.
- Presencia de minerales que puedan descomponerse y reaccionar con el NaCN (cianicidas).
- Presencia de minerales que consuman oxígeno. La refractariedad de los minerales auroargentíferos es principalmente de naturaleza física.

Estos minerales refractarios se clasifican en:

- Minerales que contengan oro fino encapsulado o unido a materia carbonosa, pirita, arsenopirita y sílice.
- Minerales que contengan oro con: Sb, Pb, Ag, Pd, As, etc.
- Minerales que contengan oro recubierto con partículas finas de óxidos de hierro, cloruro de plata, compuestos de antimonio, manganeso o plomo.
- Minerales que presenten especies que estén en proceso de transformación, tales como, los sulfuros que se descomponen y forman cianicidas, tiosulfatos, arsenitos e iones ferrosos; que son consumidores de oxígeno.

Es por eso que cada depósito puede presentar un tipo especial de refractariedad, que depende de los minerales asociados, sus texturas y tamaño, tamaño de los granos de oro, etc. Por esta razón, es importante realizar una buena caracterización mineralógica para definir los posibles problemas a ser enfrentados.

Los minerales refractarios que contienen pirita y arsenopirita, requieren de un pretratamiento previo a la recuperación del metal. Los pretratamientos más comunes son el tostado, oxidación por presión y biolixiviación. Los dos primeros involucran altos costos de operación e infraestructura especializada, además de consumo de combustibles provenientes del petróleo (Domic M., 2001).

2.23 Lixiviación bacteriana

1. Biooxidación

Iglesias N., *et al.* (1998), refieren que la biooxidación es un método utilizado en el pretratamiento oxidante de menas refractarias, algunas veces como una alternativa a los procesos de calcinación y oxidación por presión o en la viabilización para la explotación de menas de bajo tenor. La capacidad de las bacterias para oxidar sulfuros metálicos está dada por su condición quimiolitótrofa, es decir, la obtención de su fuente de energía de compuestos inorgánicos, por lo tanto, ellas crecen a expensas de la liberación u obtención de electrones a partir de la oxidación de minerales, proceso que se aprovecha en la minería aurífera para la oxidación de especies minerales, permitiendo así la liberación del oro, ocluido o en forma de solución sólida, en la estructura de algunos minerales. Tornándolo disponible para los procesos subsecuentes, como la lixiviación con cianuro (Iglesias, Carranza, & I., 1998).

La biolixiviación puede participar en los siguientes tipos de lixiviación:

- a) Lixiviación “in situ
- b) Lixiviación en escombreras
- c) Lixiviación en montones
- d) Lixiviación dinámica

Perspectivas futuras

La biolixiviación de sulfuros minerales tiene grandes ventajas desde un punto de vista económico y medio ambiental. No obstante, a pesar de esto, la

aplicación de estas técnicas no ha progresado a nivel industrial, desde hace años, excepto en la recuperación de cobre y uranio por lixiviación en montones. Las razones hay que buscarlas en el inestable mercado de los metales, con precios muy bajos y al interés de las compañías mineras en rentabilizar rápidamente las inversiones.

2. *Acidithiobacillus Ferrooxidans*

Dentro de los microorganismos más importantes en los procesos biohidrometalúrgicos esta *Acidithiobacillus ferrooxidans*, bacteria gram-negativa, que presenta forma de bacilo, con diámetro entre 0,4 – 0,8 μm y longitud entre 0,9 – 2,0 μ (Ospina, Mejía, Osorno, Márquez, & Morales, 2012). Hay reportes donde se sugiere que la exposición de este tipo de microorganismos ambientes ricos en sulfuro metálicos puede resultar en la disminución o inhibición de la actividad metabólica de éstos. Las razones para dichas aseveraciones han sido diversas; entre las principales se encuentran la reducción de la cantidad de oxígeno disuelto, daño a la pared celular como resultado de la fricción entre las partículas minerales y los microorganismos, y al efecto nocivo de los iones metálicos como el As^{3+} , As^{5+} y Fe^{3+} . Sin embargo, *A. ferrooxidans* puede ser adaptado para incrementar su tolerancia a estos ambientes y disminuir los efectos inhibitorios; mejorando notablemente los procesos de beneficio mineral (Donati & Sand, 2007).

3. Microorganismos Presentes en el proceso de Biooxidación.

El *Acidithiobacillus Ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* son considerados los microorganismos más importantes en la disolución bacteriana de sulfuros metálicos (biooxidación). Estas dos especies de *Acidithiobacillus* son gram-negativa, aerobia y organismos quimioautotróficas. Se desarrollan a temperatura ambiente (bacterias mesófilas) y son comunes en ambientes ácidos contaminados. Ambas bacterias son capaces de crecer utilizando la energía obtenida a partir de compuestos reducidos de azufre. *A. ferrooxidans* también es capaz de oxidar el hierro (II) utilizando oxígeno como último aceptor de electrones. (Donati & Sand, 2007)

El *A. thiooxidans* comparte características morfológicas con *A. ferrooxidans*. Este autótrofo obligado deriva energía de la oxidación de tal y compuestos de azufre solubles, pero no puede oxidar el hierro ferroso y minerales de sulfuro refractarios, tales como pirita y calcopirita (Rawlings D. E., 1997). Sin embargo, en cultivos mixtos con *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* generalmente aumenta la oxidación de minerales de sulfuro. Los cultivos mixtos que comprenden *A. thiooxidans* y *A. ferrooxidans* presentan oxidación muy eficiente no sólo de la pirita, sino también de calcopirita y otros minerales de sulfuro. El papel de la *A. thiooxidans* en estos procesos es eliminar las películas de pasivación de azufre que se forman en superficies de las partículas de mineral durante la lixiviación. *A. thiooxidans* pueden crecer a valores de pH más bajos (por debajo de pH 0,5) que cualquier otra especie de microbios conocidos (Groudev, 1990).

En general, los tipos de microorganismos que se encuentran en los procesos de lixiviación en pila son similares a los encontrados en los procesos de tanque agitado, sin embargo, las proporciones de los microbios pueden variar dependiendo del mineral y las condiciones en las que se desarrollan los montones o tanques. En los procesos que operan desde la temperatura ambiente a aproximadamente 40 ° C, los microorganismos más importantes son consideradas como un consorcio de bacterias Gram-negativas. Estos son oxidantes de hierro y del azufre *Acidithiobacillus ferrooxidans* (previamente *Thiobacillus ferrooxidans*), los *thiooxidans*, oxidantes del azufre *Acidithiobacillus* (anteriormente *Thiobacillus thiooxidans*) y *Acidithiobacillus caldus* (anteriormente *Thiobacillus caldus*), y el leptospirilli hierro oxidante, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Leptospirillum ferriphilum* (Coram & Rawlings, 2001).

4. Fuentes de Energía.

La solubilización de minerales, es considerada como un proceso químico, que resulta de la acción de hierro férrico y/o ácido, típicamente ácido sulfúrico. Por lo tanto, independientemente de las temperaturas a las que crecen, los microorganismos que desempeñan el papel principal en la lixiviación de metales a partir de minerales son o bien organismos oxidantes de hierro y azufre. El hierro y el azufre, sirven como donantes de electrones durante la respiración (Rawlings D., 2005).

2.2.4 Oxidación del Hierro.

El hierro ferroso se oxida fácilmente a hierro férrico y de esta manera puede servir como un donador de electrones. El par redox de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ tiene un potencial de electrodo estándar muy positivo (770 mV a pH 2). Como resultado, solo el oxígeno es capaz de actuar como un aceptor de electrones natural y en presencia de protones siendo el producto de la reacción el agua ($\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O}$ 820 mV a pH 7). El uso de hierro como un donador de electrones por lo tanto ocurrir sólo durante la respiración aeróbica. (Rawlings D., 2005)

Sin embargo, bajo condiciones aeróbicas, el hierro ferroso se oxida espontáneamente a hierro férrico a menos que el pH es bajo. Por lo tanto, las bacterias acidófilas extremadamente son capaces de utilizar el hierro ferroso como un donador de electrones de una manera que no es posible para las bacterias que crecen a pH neutro. Debido a que la diferencia en el potencial redox entre el $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ y pares redox $\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O}$ es pequeño y porque sólo un mol de electrones es liberado por mol de hierro oxidado, grandes cantidades de hierro ferroso necesitan ser oxidado para producir relativamente poca masa celular. Estas grandes cantidades de hierro no son transportadas a través de la membrana celular, pero permanecen fuera de la célula y cada átomo de hierro ferroso simplemente entrega su electrón a un soporte situado en la envoltura celular. (Rawlings D., 2005)

2.2.5 El azufre como fuente de energía.

El ácido es responsable del pH bajo ambiente donde se encuentran los acidófilos extremos es más menudo el ácido sulfúrico. Este ácido sulfúrico es producido por la oxidación de RISCs (reducción de compuestos de azufre inorgánicos). Para que se produzca la oxidación biológica, los RISCs sirven como un donador de electrones con el oxígeno que actúa como el aceptor de electrones energéticamente favorable. La cantidad potencial de energía que se puede hacer disponible cuando un átomo de azufre a partir de un mineral de sulfuro se oxida a sulfato es mucho mayor que cuando el hierro es oxidado. Naturalmente los RISCs están presentes allí donde los minerales contienen sulfuros y están expuestos a la superficie. Una variedad de RISCs se liberan como resultado de la reacción química de minerales de sulfuro con agua, el hierro férrico y el oxígeno. (Schippers, Rohwerder, & Sand, 1999)

1. Mecanismo de Biolixiviación

Schippers, et al. (1999), afirma que, “Existen mecanismos que tratan de explicar el Proceso químico - Biológico de la biolixiviación, se tiene el mecanismo directo e indirecto o ambos simultáneamente” (*Schippers, Rohwerder, & Sand, 1999*),

2. Mecanismo Directo

Según *Schippers, et al.* (1999), el primero de los posibles mecanismos, la bacteria ataca al sulfuro metálico de forma directa, mediante su adherencia a la superficie mineral y la posterior oxidación enzimática de éste por transporte de electrones desde la parte reducida del mineral, generalmente un sulfuro, al oxígeno disuelto. La Reacción general sería:

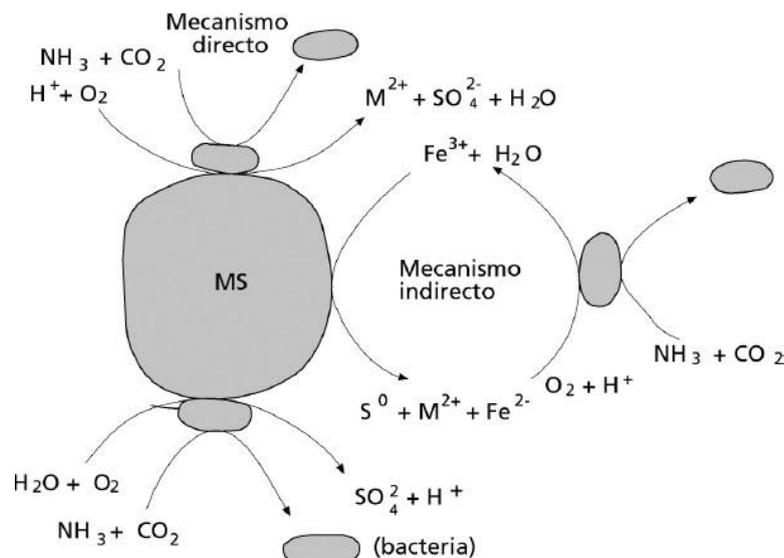


Figura N° 1 Mecanismos directo e indirecto de biolixiviación

Fuente: (Rawlings D., 2005)

La adherencia de bacterias al mineral es, un requisito del mecanismo directo y la principal evidencia presentada en defensa del mismo. Esta teoría ha sido apoyada por distintos estudios experimentales que confirman la adhesión de las bacterias biolixivantes a la superficie de los minerales (*Acevedo & Gentina, 2005*)

“La adsorción de células a las partículas minerales suspendidas se lleva a cabo en cuestión de minutos a horas. Este se ha demostrado utilizando radiactivamente células marcadas de *Thiobacillus Ferrooxidans* en crecimiento NaHCO_3 o la capacidad oxidativa de bacterias adheridas a la superficie del mineral. Las células se adhieren selectivamente a las superficies minerales que ocupan preferentemente irregularidades de la estructura de la superficie. Adicionalmente, un comportamiento químico táctico de cobre, hierro, iones de níquel se ha demostrado para *Leptospirillum ferrooxidans*. También diversos estudios han detectado genes implicados en la quimiotaxis en *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*.” (Ramírez O., 2015)

3. Mecanismo Indirecto

En contraste con el mecanismo directo, el indirecto considerabásicamente la acción de los iones férricos sobre el mineral sulfurado disolviéndolo. A través de esta reacción química de lixiviación, se producen iones ferrosos y azufre elemental. Finalmente, estas especies químicas son oxidadas biológicamente a hierro férrico e ion sulfato, respectivamente. Este mecanismo, en principio, no necesita de la adherencia de las células al sulfuro mineral. (Gadd & Geoffrey, 2001). Las ecuaciones que toman parte son las siguientes:



Paralelamente, la acción bacteriana cataliza la oxidación del ion ferroso y de azufre elemental según las dos reacciones siguientes:



La hipótesis de partida del modelo es que los iones férricos y/o los protones son los únicos agentes –químicos– que disuelven al sulfuro. El mecanismo es, por tanto, en sentido estricto, de naturaleza indirecta. Las bacterias tienen las funciones de: 1) regenerar los iones férricos y/o los protones; y 2) concentrarlos en la interface mineral/agua o mineral/célula bacteriana para favorecer y aumentar la degradación del mineral. Consideran entonces que hay un factor determinante: la

formación de una capa muy fina de exopolímeros, la glicocálix, con un espesor del orden de nanómetros, que rodea a las células. En esta capa, se postula que tienen lugar los procesos químicos que llevan a la degradación del sulfuro. La catálisis del proceso en presencia de bacterias, en comparación con el proceso químico convencional, se explica por la alta concentración de agentes de lixiviación que se llega a alcanzar en la interface citada. Además, el modelo no contempla la aparición de enzimas u otras sustancias biológicas que hasta la fecha no han sido detectadas. (Gadd & Geoffrey, 2001)

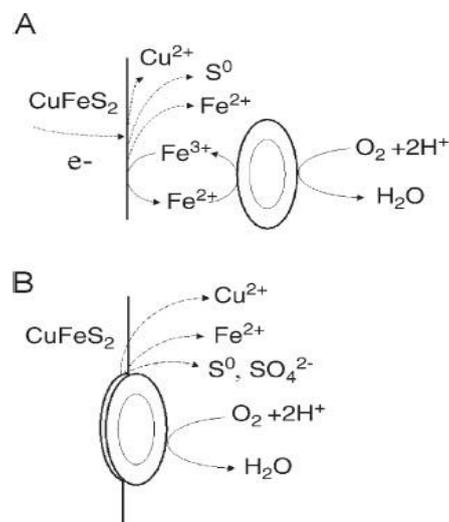


Figura N° 2: Las funciones microbianas en la biolixiviación de minerales de sulfuro. Fuente. (Abhilash & Pandey, 2015)

Mecanismo indirecto (A): las bacterias oxidan el hierro soluble (II) a hierro (III) y azufre a sulfato. Los iones férricos oxidan los minerales de sulfuro en un medio ácido. Mecanismo indirecto de contacto (B): La fijación bacteriana es importante fisiológicamente, pero los iones férricos oxidan los minerales de sulfuro.

Basándose en las sustancias intermedias ya detectadas dentro del mecanismo Indirecto, diferencian dos mecanismos indirectos: uno vía tiosulfato y otra vía polisulfuro, los cuales se describirán a continuación. Sin embargo, antes, se dará alguna información básica sobre la estructura electrónica de los sulfuros para entender mejor las hipótesis de partida. (Torma A., 1977)

22.6 Parámetros que afectan la biolixiviación.

Factores que influyen en la biolixiviación de pilas o lixiviación bacteriana, como cualquier otro proceso que implica la presencia de seres vivos, está influenciada por factores ambientales, biológicos y físico-químicos, que afectan el rendimiento de la extracción de metales. (Torma A., 1977)

Óptimas condiciones de humedad, pH, temperatura, fuentes de energía y nutrientes tienen que existir junto con la ausencia de inhibidores posibles para el crecimiento de microorganismos implicados en el proceso.

Tabla 3

Factores y parámetros que afectan la biolixiviación en pilas y la recuperación del metal

Factor	Parámetros que afectan la Biolixiviación
Físicos y químicos	Temperatura, pH, potencial redox, CO ₂ y O ₂ Contenido, la disponibilidad de nutrientes, la disponibilidad de oxígeno, transferencia de masa homogénea, la concentración Fe (III), la presencia de inhibidores, etc.
Biológicos	La diversidad microbiana, la densidad de población, las actividades microbianas, la tolerancia metal, distribución espacial de los microorganismos, la adaptación de microorganismos, y la concentración de inóculo.
Otros	Composición del mineral, el consumo de ácido, Granulometría del mineral, área de superficie, porosidad, interacciones hidrófobas galvánicas, y formación de minerales secundarios.

Fuente: (Brandl, 2001)

22.7 Tipo de Material

Muñoz, J. et al. (1995) "La eficacia de proceso de biolixiviación depende en gran medida de la naturaleza del material mineral en el que existe el metal." ... Cuando el medio es alcalino, es probable que se formen precipitados que dificultará la percolación natural de solución lixiviación a través de las pilas. Porosidad del material permite que la solución penetre más en el cuerpo de mineral. Otro aspecto importante del material/mineral es proporcionar una cantidad suficiente de nutrientes para los microorganismos de crecimiento. Minerales de cuarzo y granito muestran la susceptibilidad variable para la lixiviación microbiana. (Muñoz, González, Blazquez, & Ballester, 1995)

1. Aireación

Pal S., Pradhan D., et al. (2009), refieren que la mayoría de las bacterias que se usan en la oxidación de minerales son aeróbicos y quimiolitotrófica en la naturaleza, la aireación es importante en el proceso, ya que se encarga del suministro tanto del O₂ como del CO₂ al sistema de oxidación. El suministro suficiente de dióxido de carbono sirve como fuente de carbono que es necesaria para la generación de la biomasa. Al momento del proceso, si no ocurre una aireación adecuada, es propenso a que se dé una condición anaeróbica. La aireación de los medios puede acelerar las reacciones de la biooxidación y en el tratamiento del cobre, reduce el tiempo de ciclo de lixiviación, por esto es muy importante suministrar oxígeno al proceso para la viabilidad y la buena actividad lixivante de los microorganismos. (Pal, Pradhan, Das, Sukla, & Chaudhury, 2009)

2. Irrigación

Pal S., Pradhan D., et al. (2009), señala al respecto al tipo de riego, sea continuo o discontinuo, se presenta diferentes tendencias, aunque hay una hipótesis de que la irrigación discontinua favorece a la dilución del metal. En ese caso, la solución de ataque se esparce intermitentemente sobre la superficie del mineral acumulado, esto permite que se filtre antes de aplicar una nueva solución, de esta manera se establece un efecto capilar inverso, que permite la lixiviación de mineral sulfurado más grueso. (Pal, Pradhan, Das, Sukla, & Chaudhury, 2009)

3. Potencial redox (Eh)

Para *Acevedo F., Gentina, J. (2005)*, el potencial redox que se da en la solución, nos indica que existe un metabolismo energético (actividad bacteriana) en el proceso de la biooxidación, debido a que esta actividad genera una tendencia de la solución ya sea a ser oxidada o a ser reducida. Durante la fase de crecimiento exponencial, el potencial redox del *A. ferrooxidans* tiene la característica de estar entre 320 – 580 mV (Rossi, 1990). Por lo general, cuando el potencial redox de la solución supera los 400 – 450 mV, la oxidación bacterial alcanza sus mayores velocidades. (Acevedo & Gentina, 2005)

En la oxidación de la calcopirita, el efecto del potencial redox se ha investigado extensivamente. La velocidad de disolución al tratar la calcopirita es mayor en los potenciales redox de las soluciones de lixiviación por debajo de un valor crítico

Desde entonces, se buscó un método práctico para controlar el potencial redox al realizar la lixiviación de mineral con contenido de cobre de bajo grado. (Rawlings D., 2005)

4. pH

Es importante mantener el ajuste del valor del medio (pH) correcto para que ocurra un buen crecimiento de las bacterias con las que se hará la lixiviación y en el caso del cobre puede solubilizar este metal. (Brandl, 2001)

Los microorganismos que participan en la oxidación bacteriana de los minerales sulfurados son acidófilos, esto quiere decir que son activos a un pH por debajo de 3.0, se considera un pH óptimo de crecimiento para el *Acidithiobacillus ferrooxidans*” en el intervalo de 1.5 a 2.5. (Brandl, 2001)

“Un medio muy ácido cercanos a pH 1.0 también es perjudicial para el crecimiento bacteriano, ya que se daría una fuerte inhibición del crecimiento del *A. ferrooxidans*, caso contrario sucede con el *A. thiooxidans*, que en sus cultivos presentan caídas en su medio de crecimiento, llegando su pH hasta menos de 1.0, esto es ocasionado por la producción de ácido sulfúrico y a su capacidad de tolerar mayor acidez. (Gadd & Geoffrey, 2001)

5. Temperatura

Los microorganismos también se clasifican en cuanto a la temperatura del medio en el que crecen. Las temperaturas óptimas de crecimiento para estas bacterias que son mesófilas son de 30 a 40°C, se considera una temperatura de 50°C para las bacterias termófilas moderadas, y por encima de 65 °C para las bacterias que son termófilos extremos. Si se cultiva las bacterias por debajo de la temperatura óptima indicada, los microorganismos se vuelven inactivas, y si se cultiva a temperaturas por encima del óptimo establecido, las bacterias se destruyen rápidamente. La Biooxidación de minerales sulfurados, es un proceso que libera calor (llamado exotérmico), esto hace que se produzca un calentamiento significativo tanto en los reactores de tanque agitado como en montones. El control de la temperatura cuando se trabaja en montones es bastante difícil. La altura de la pila es un factor muy importante, ya que influye en el aumento de la temperatura, se considera que aumenta la temperatura con el cuadrado de la altura de la pila o montón.” (Donati & Sand, 2007)

“Cuando se trata de operaciones industriales, la temperatura dentro del montón puede llegar hasta los 500C, esto hace que las reacciones de oxidaciones a través de las bacterias y químicas no puedan ser reguladas, y la principal consecuencia de tener una temperatura demasiado alta en el proceso, es la inhibición de la actividad de las bacterias mesófilas. Los montones tienden a aumentar la temperatura debido al crecimiento de las bacterias mesófilas y a la oxidación de los sulfuros.” (Groudev, 1990)

6. Porcentaje de solidos

La biooxidación de minerales sulfurados con porcentajes de solidos mayores de 20%, estudiados en reactores de tanque agitado, no han arrojado buenos resultados. Este problema es ocasionado básicamente a que al aumentar la cantidad de sólidos en el medio aumenta la fricción entre las partículas del mineral en suspensión y la bacteria, lo que causa el daño celular al microorganismo (Groudev, 1990). Otro problema que ocasiona un alto porcentaje de solidos es que limitan las velocidades de transferencia del oxígeno, ante esto es necesario suministrar altas cantidades de oxígeno para poder oxidar a los minerales sulfurados. Una forma de mejorar la aireación es aumentando la velocidad de agitación, pero este aumento de velocidad genera una mayor fricción de las bacterias con las partículas de mineral en suspensión (Abhilash & Pandey, 2015).

7. Sustrato de mineral

La composición mineralógica del mineral refractario a tratar es importante en la biooxidación. Un alto contenido de carbonato en el mineral o en la ganga aumenta el pH del medio líquido de la oxidación, y por ende genera la inhibición o supresión completa de la bacteria. Una posible solución para el óptimo crecimiento de las bacterias, es la adición externa de ácido, pero esta solución puede causar la formación y posterior precipitación de yeso, esta adición también afectará el costo del proceso. La Oxidación bacteriana también depende de la superficie del sustrato, al tener una disminución en el tamaño de partícula a tratar, significa que el área de la superficie de la partícula aumentaría, esto hace que el aumento de la recuperación del metal (cobre en caso de lixiviación ácida) sea obtenido sin ningún cambio en la masa en las partículas. Se considera un tamaño óptimo de la partícula de mineral de aproximadamente 42 μm . (Abhilash & Pandey, 2015)

2.2.8 Inhibidores de la biooxidación

Dependiendo de los tipos de metales que estén presentes en el mineral de estudio, en los procesos de molienda algunos iones se liberan, estos iones al estar a ciertas concentraciones son tóxicos para los microorganismos oxidantes, afectando así su crecimiento y actividad. Otro metal son las sales de potasio, estas sales generan una fuerte inhibición en las bacterias al oxidar los iones ferrosos. Otro factor es el cloruro, que es un conocido inhibidor del crecimiento bacterial y de la oxidación del ferroso, estando esto a concentraciones tan bajas como 10 mM en un estudio también se demostró que concentraciones de nitratos superiores a los 94 mM inhiben casi en su totalidad el crecimiento del A. Ferrooxidans (Mohee & Mudhoo, 2012). Otro factor es la presencia de sustratos con altas concentraciones, estas altas concentraciones pueden causar un efecto inhibitorio sobre las bacterias, esta inhibición es dada mediante el bloqueo momentáneo del complejo enzima-sustrato. (Luis, 2011)

2.3 Definiciones Conceptuales

- **Aguas acidas de mina:** se originan mediante la oxidación química y biológica de la pirita. Este fenómeno se produce cuando las rocas conteniendo dichos sulfuros entran en contacto con aire o agua.
- **Aislamiento de bacteria:** proceso biológico mediante el cual se separa una bacteria, en este caso la bacteria Acidithiobacillus Ferrooxidans, esto se realizará a través de medios de cultivo (medio líquido y solido).
- **Análisis mineralógico:** es una técnica de investigación geología de laboratorio dedicada a la obtención de datos mineralógicos necesarios para la evaluación y aprovechamiento de las materias primas minerales.
- **Biooxidación:** La biooxidación es un pre-tratamiento que se le hace a un mineral refractario de oro. El proceso BIOX es una de las tecnologías que se viene aplicando como un pre-tratamiento a este mineral, el cual requerirá de una combinación de bacterias mesófilas, que rompen la matriz de los sulfuros del mineral.
- **Cepa:** conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica.

- **Cianicidas:** Minerales metálicos (marcasita, pirrotina, minerales de cobre, arsenopirita) asociados a minerales fuentes de metales preciosos que pueden disolverse fácilmente en las soluciones de cianuro.
- **Cinética bacteriana:** Velocidad en que una bacteria aumenta su población.
- **Conminución de minerales:** conminución es un término general utilizado para indicar la reducción de tamaño de un material y que puede ser aplicado sin importar el mecanismo de fractura involucrado.
- **Flotación:** proceso metalúrgico que consiste en la separación del metal valioso de la ganga.
- **Lixiviación:** Extracción de la materia soluble de una mezcla mediante la acción de un disolvente líquido.
- **Ganga:** parte no valiosa de un mineral.
- **Molienda:** Proceso metalúrgico que consiste en la reducción del tamaño de las partículas provenientes desde el proceso de chancado, con la finalidad de producir un tamaño de partículas que permita la liberación de la especie de interés en partículas individuales, las cuales pueden ser recuperadas en el proceso posterior de lixiviación o flotación.
- **ORP:** conocida como redox es un parámetro que mide la capacidad que tiene una solución de absorber o expeler sales diluidas.
- **Refractariedad de minerales:** Propiedad de una mineral que dificulta la extracción del valor metálico mediante lixiviación convencional, puede ser por propiedades físicas o químicas (oro encapsulado, metales que reaccionan con el cianuro).
- **Teluros de oro insoluble:** presencia de teluros asociados con el oro que impide la lixiviación del mismo.
- **Trituración (Chancado):** La trituración es un proceso de reducción de materiales comprendido entre los tamaños de entrada de 1 metro a 1 centímetro (0,01m), diferenciándose en trituración primaria (de 1 m a 10 cm) y trituración secundaria (de 10 cm a 1 cm). Las fuerzas utilizadas en la reducción de tamaño son: la compresión, el cizallamiento, la percusión o impacto y la astricción o abrasión.
- **Solubilidad:** La solubilidad es una medida de la capacidad de una determinada sustancia para disolverse en otra.

2.4 Formulación de la hipótesis

2.4.1 Hipótesis General

La biooxidación como pre- tratamiento de un mineral aurífero refractario para su posterior lixiviación nos ayudará a mejorar la recuperación del oro en comparación del método de lixiviación convencional.

2.4.2 Hipótesis Específicas

- Afectará el aislamiento de bacteria acidithiobacillus ferrooxidans en la biooxidación como pre-tratamiento de un mineral aurífero refractario para su posterior lixiviación nos ayudará a mejorar la recuperación de oro en comparación del método de lixiviación convencional.
- Afectará la aplicación de bacteria acidithiobacillus ferrooxidans en la biooxidación como pre-tratamiento de un mineral aurífero refractario para su posterior lixiviación nos ayudará a mejorar la recuperación de oro a partir del método de lixiviación convencional.

2.5 Operacionalización de variables e indicadores

Tabla 4 Operacionalización de las Variables

Variables	Dimensión	Indicadores
Independientes		
Bacteria Acidithiobacillus Ferrooxidans	• Sustrato	• Composición mineralógica • Oxidación bacteriana
	• Inoculo de la Bacteria	• Concentraciones de inhibidores
	• Crecimiento bacteriano	• Porcentajes de solidos • Aireación • Temperatura
Dependientes		
Biooxidación de Minerales Auríferos Refractarios.	• Concentración del cianuro	• pH (optimo)
	• Grado de oxidación del mineral refractario	• Potencial redox (Eh)
	• % Recuperación	• Irrigación

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1 DISEÑO METODOLOGICO

La investigación se basa en la estrategia que se adaptara para responder al problema planteado, donde requiere la revisión de información técnica, de documentos, registros, historiales, condiciones de operaciones y funcionamiento de la empresa.

3.1.1 Tipo de investigación

El tipo de investigación es experimental porque se caracteriza porque en ella el investigador actúa conscientemente sobre el objeto de estudio, en tanto que los objetivos de estos estudios son precisamente conocer los efectos de los actos producidos por el propio investigador como mecanismo o técnica para probar sus hipótesis (Bernal, 2010)

De acuerdo a su naturaleza: Investigación experimental

De acuerdo al propósito: Investigación aplicada.

La investigación es netamente experimental, para la obtención de datos se realizarán pruebas en laboratorio.

3.1.2 Nivel de Investigación.

Es una investigación nivel predictiva o experimental por que se aplicara métodos y técnicas para mejorar y corregir la situación problemática, que da origen al estudio de investigación (Carrasco, 2005).

3.1.3 Diseño de la Investigación.

En el presente estudio se aplicará el diseño experimental, ya que se manipularán variables independientes, y constatarse los efectos de esta manipulación en las variables dependientes en el estudio. Con ello se pretende determinar la relación causal entre ambas variables mediante el control riguroso de otras variables no implicadas experimentalmente en el estudio (Pimienta, 2012, pág. 57)

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

La población es el mineral aurífero refractario (que contiene minerales de pirita) proveniente de yacimientos mesotermales.

3.2.2 Muestra

La muestra representativa será muestreada lo suficiente para realizar las pruebas a nivel laboratorio (500 gr aproximadamente.).

Tamaño de la muestra: para el presente estudio, se trabajará con 500 gr. Aproximadamente de mineral aurífero.

3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.3.1 Técnicas a emplear

Las técnicas que se emplearan para el experimento son las siguientes:

a. Observación sistemática Directa.

Se empleará esta técnica para observar el proceso de investigación en el momento que se está desarrollando

b. Observación Sistemática Indirecta.

Mediante esta técnica se podrá analizar y estudiar los diversos documentos que contiene información sobre el tema de investigación.

c. Observación experimental.

Con esta técnica es posible conocer la forma como se desarrollan las actividades para extraer datos con el fin de procesar posteriormente.

d. Otras Técnicas.

Técnica de cuestionario.

3.3.2 Instrumentos

- a. Ficha de observación.
- b. Lista de cotejo.
- c. Escalas libreta de notas.
- d. Filmadora, cámara fotográfica y grabadora.

3.4 Procedimiento y análisis de datos

El procedimiento de análisis de datos se llevará a cabo a través de tabulaciones de los datos que se obtengan, así como un diseño factorial para obtener la respuesta y una interpretación a través del grafico del mismo.

CAPITULO IV

RESULTADOS

El trabajo será realizado por el tesista, recibiendo apoyo técnico del Ing. Vladimir Arias Arce, docente de la Universidad Nacional Antúnez de Mayolo - Huaraz y Jefe de Planta de la U.M. Mesapata y asesorado por el M(o). Juan Manuel Ipanaque Roña, docente de la Facultad de Ingeniería Química y Metalúrgica.

4.1 Análisis de resultados

4.1.1 Recolección de Aguas acidas de mina

Los drenajes ácidos de mina, conocido también como DAM son caracterizados por tener una alta acidez (llegando a un pH de 2.5) y altas concentraciones de metales pesados, estas también contienen poblaciones nativas de bacterias oxidantes, responsables de la oxidación progresiva de los sulfuros. Entre estas se encuentra el género *Acidithiobacillus* comprende a bacterias acidófilas (Viven en medios muy ácidos), mesófilas (actúan a temperaturas entre 28 °C y 33 °C) y autotróficas (utilizan CO₂ como fuente de carbono), que obtienen energía de la oxidación de azufre, fierro y sulfuros, utilizando oxígeno como último aceptor electrónico, se tiene entre las más estudiadas al *Acidithiobacillus Thiooxidans*, *Acidithiobacillus Caldas*, *Acidithiobacillus Ferroxidans*.

Las muestras del DAM fueron tomadas de las inmediaciones de las unidades mineras de Julcani, Huancavelica, cuyas temperaturas fluctúan entre 9 a 12 °C y el pH entre 3.8 y 4.2. A una altura entre altitud entre 4200 y 4600 msnm. La muestra fue colectada en frascos estériles de plástico de 500ml y transportadas en un cooler preservando una temperatura de 4°C con el hielo seco en su interior.

La característica fundamental de los drenajes ácidos es la coloración amarillenta turbia por la oxidación del hierro ferroso a hierro férrico a partir de compuestos sulfurados con conteniendo de piritas entre otros.

4.12 Aislamiento de Bacterias *Acidithiobacillus Ferrooxidans*

Generalmente los microorganismos hallados en los drenajes ácidos son innumerables (Bacterias, hongos, algas, etc.), lo que se buscó fue separar las bacterias para el estudio de las demás, de esta manera obtener una cepa pura de la bacteria que utilizaremos en el estudio, en este caso la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*.

Existe una gran cantidad de pruebas que permiten establecer a que especies pertenece un microorganismo. Estas pruebas incluyen una determinación bioquímica para la identificación de microorganismos que se encuentran en los depósitos de minerales. La determinación de la fuente de energía, pH óptimo, temperatura, signos morfológicos, etc.; luego corroborado con las características de cultivos puros.

Los métodos para el seguimiento de la evolución de un cultivo microbiano pueden clasificarse en directos e indirectos. Los métodos directos se basan en la medida de la evolución del número de células vivas o de las características visuales. Los métodos indirectos se basan en la medida de algún parámetro del cultivo que nos permite deducir información sobre la evolución del número de microorganismos.



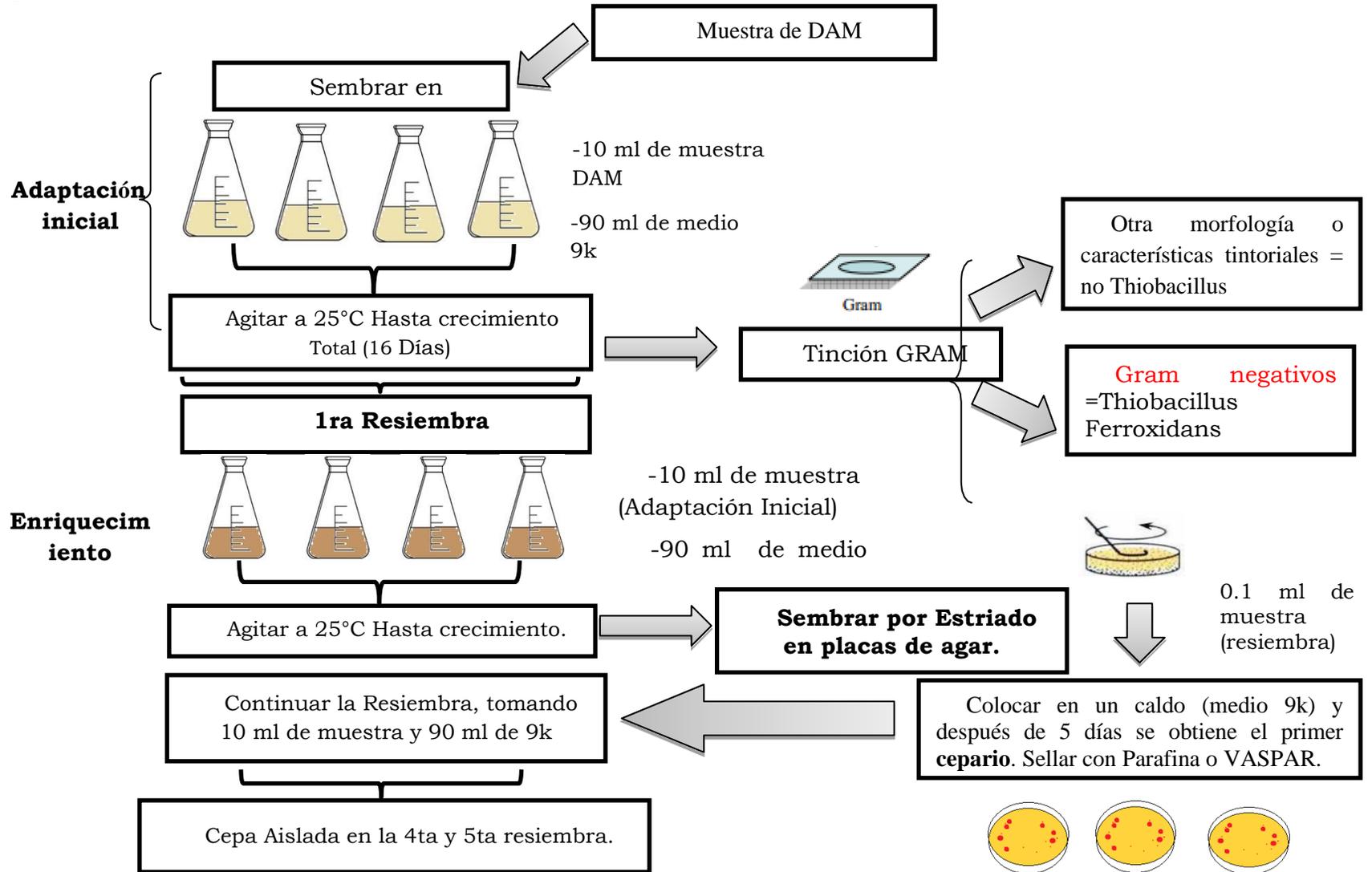
Figura N° 3: Inicio de crecimiento bacteriano
Fuente: El autor (2019)



Figura N° 4: bacterias Acidithiobacillus ferrooxidans en microscopio aumento X1000

En este caso para el aislamiento de la bacteria de estudio (*Acidithiobacillus Ferroxidans*) se utilizará medios de cultivo, tanto medio líquido y medio sólido, teniendo como fuente de energía de Fe, que es el principal alimento de este tipo de bacteria; esto con el objetivo de alimentar solo a esta bacteria, y así poder separarlo de las demás. Se usó Tinción Gram (anexo 1) para la identificación del tipo de bacteria.

Figura N° 5: Procedimiento de Aislamiento de *Acidithiobacillus Ferroxidans* en Muestra de DAM.



4.13 Aislamiento en Medio Líquido

El medio que se utilizó para el crecimiento inicial fue el medio 9kg. de Silverman y Lundgren por cuanto la literatura lo describe como el adecuado para el crecimiento de este tipo de bacterias. El pH final del medio fue de 1.5, ajustado con H_2SO_4 10 N y se esterilizó por auto clavado a 121 lb de presión por 15 minutos con el objetivo de eliminar toda contaminación.

Una alícuota de 10 ml provenientes del DAM fue transferida a un matraz de 150 ml conteniendo 90 ml de medio líquido 9k suplementado con $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, ajustando el pH= 1.50 con H_2SO_4 . Las muestras se incubaron a temperatura ambiente en agitación constante (125 rpm) en un agitador o rotator (Agitador Shaker). El tiempo que demoro en crecer las bacterias fue hasta que el medio vire de color (Rojo oscuro), en este caso fue de 16 días. Se procedió hacer siembras repetitivas para obtener un crecimiento rápido.

Medio 9k de Silverman y Lundgren

$(NH_4)_2 SO_4$	0.025 g/lit
K_2HPO_4	0.01g/lit
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	33.3 g/lit
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.025 g/lit

Luego del crecimiento en el medio de cultivo se realizó el método de Tinción Gram para observar presencia o ausencia de bacilos gram negativos, que es la característica principal de la bacteria *Acidithiobacillus Ferroxidans*.

En el Gram se pudo observar abundante presencia de bacilos Gram negativos, varios de ellos se encontraban en hileras, otros eran de tamaño más grande y otros muy finos.

El crecimiento de las bacterias fue cada vez más rápido conforme se aumentó el número de resiembras, tal como se observa en la tabla:

Tabla 5
Días de Aislamiento Bacteriano

N° de Siembras	Días de Crecimiento
Sembrado	16 días
1ra Resiembra	10 días
2da Resiembra	8 días
3ra Resiembra	6 días
4ta Resiembra	4 días
5ta Resiembra	4 días

Fuente. Autor



Figura N° 6: Siembra inicial de bacteria

Fuente. Autor.



Figura N° 7: Bacteria desarrollada

4.14 Medio de Cultivo 9K Solido

Con el fin de mejorar el aislamiento de la bacteria *Acidithiobacillus Ferroxidans*, se utilizaron dos tipos de medios sólidos, el agar 9K y el FeO; en el cual se llegó a sembrar por estriado de la primera resiembra.

a) Agar 9K

La solución A:

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 1.75 g/lt

K_2HPO_4	0.029 g/lt
KCl	0.058g/lt
$MgSO_4H_2O$	0.029 g/lt
$Ca(NO_3)_2$	0.0084 g/lt

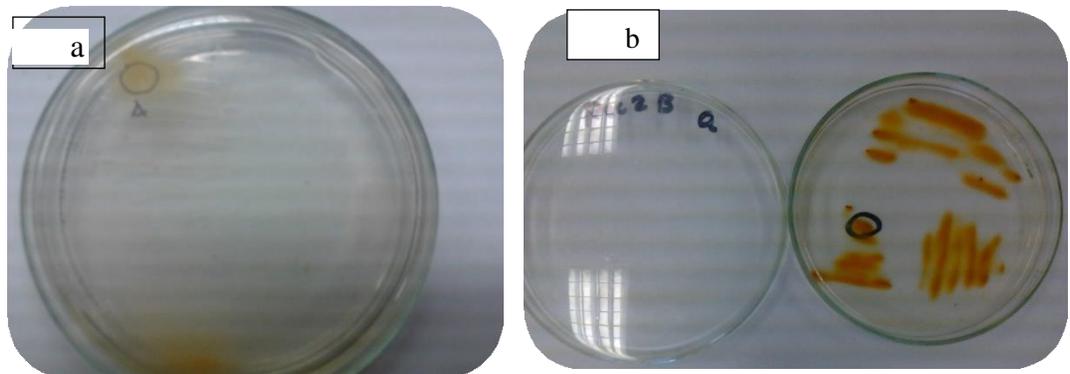
Estos reactivos fueron disueltos en 210 ml de agua destilada, fue ajustada a un pH 1.9 con H_2SO_4 10 N y posterior a ello se esterilizó por autoclavado a 121 libras de presión por 15 minutos.

b). La solución B:

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 37.3 g

En 290 ml de agua destilada a pH 1.9 con H_2SO_4 10 N, más 12 gr de agarosa. Esta solución no fue esterilizada para evitar precipitación de compuestos y la desnaturalización de la agarosa.

Una vez esterilizada la solución A, se filtró para separar de posibles impurezas, y se mezcló con la solución B y se llevó a ebullición. Después de la ebullición se vertió en placas Petri 15 ml de medio, se enfriaron y se refrigeraron.



*Figura N° 8: a y b, crecimiento de bacterias en medio sólido
Fuente Propia*

Tabla 6:
Crecimientos de microorganismos en medios de cultivos sólidos

Tipo de Agar	Colonias Obtenidas
9K	Se obtuvieron colonias de hongos, con formas filamentosas y amarillentas con centros naranjas
FeO	Se observó una masa dispersa amarillenta. Las bacterias se encontraban en la región amarilla; Se hizo tinción Gram, y se observó la presencia de bacilos Gram Negativos.

Fuente. Jamanca G. y Salazar D.

En diferentes bibliografías la variedad de recetas en medios de crecimiento de la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*, variando principalmente el sustrato sulfato ferroso, se empezó a tomar parámetros para encontrar un medio ideal de crecimiento de la bacteria que se estudia, tomando como base el medio de cultivo Silverman y Lundgren (medio con el cual se realizó el aislamiento inicial). Se ha encontrado mejor respuesta de crecimiento bacterial, medios de cultivo 9K, modificado para tipos particulares de cepa de *Acidithiobacillus Ferrooxidans*, lo que está relacionado al lugar y condiciones ambientales de crecimiento bacterial.

Las condiciones a considerar son T° ambiente, agitación constante a 120 rpm y presión de 1 atm. Se varió el medio pH, que afecta las condiciones biológicas de las bacterias, este medio ácido afecta a los grupos ionizables que se encuentran presentes en las enzimas localizadas en el citoplasma y periplasma de la célula bacterial (Gómez & Cantero, 2005), También se varió el medio nutriente FeSO₄, que es el medio energético de cultivo (Acevedo & Gentina, 2005). Los rangos a considerar en el estudio están basados en estimaciones bibliográficas. Los controles que se realizaron fue velocidad de oxidación (Potencial Redox), en este tipo de medios es directamente proporcional al número de células bacterianas en crecimiento; el número de bacterias en crecimiento; el tiempo que demoró en crecer las bacterias (una forma empírica podemos decir que hay crecimiento bacteriano es el viraje de la solución a un color rojizo oscuro, característico de los iones Hierro +3).

Tabla 7:

Condiciones del medio a evaluar.

Condición	pH	FeSO ₄ g/lit	Inoculo (ml)
1	1.8	22.4	10
2	1.8	44.4	10
3	2	22.4	10
4	2	44.4	10
5	1.9	33.3	10
Blanco	1.9	33.3	0

Fuente. Jamanca G. y Salazar D.

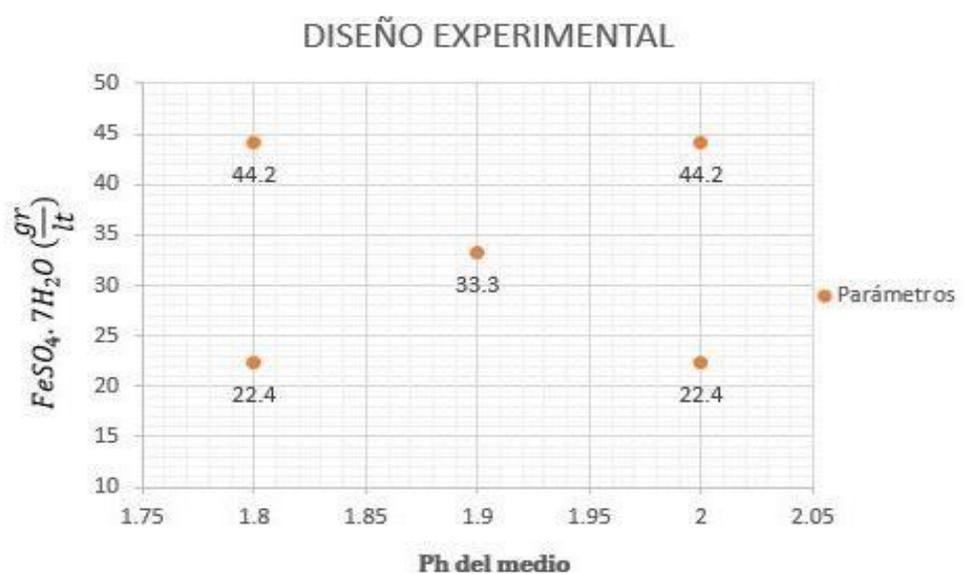


Figura N° 9: Diseño Experimental

Las Sales complementarias de nutrientes, no fueron modificadas

A los medios modificados de 9k estériles se inocularon con 10 ml de la Resiembra N° 5 de la cepa en estudio, que crecieron a las condiciones de 9k de Silverman y Lundgren (pH 1.5 y 33.3 g/lit FeSO₄). Para tener un mejor resultado, se realizó 3 réplicas en cada condición,

5 réplicas en el punto central y 3 réplicas de medios sin adición de bacteria, lo que se considera como muestra en “blanco”. Se tuvieron 20 muestras que fueron agitadas a 120 rpm en el agitador shaker, de esta manera se inicia el experimento para hallar el medio de cultivo ideal para la bacteria que se está estudiando, en este caso la bacteria *Acidithiobacillus Ferroxidans*. Se extraen muestras para la medición de Ph, Potencial Redox, y el conteo bacteriano, que son las variables a considerar para obtener el mejor medio de crecimiento.

a) Potencial Redox

La medición del Potencial Redox, conocido también como ORP (Oxidation reduction potencial) se realizó con un medidor portátil marca HANNA, con un electrodo para dicha medición. Los resultados fueron los siguientes:

*Tabla 8:
Control de potencial en diferentes medios*

CONDICIÓN	Cambios en el Potencial (mv)								
	0	2	3	4	5	6	7	8	9
Condición 1	371.1	612.43	615.9	621.57	617.57	618.87	620.82	613.43	612.07
Condición 2	372.6	597.7	609.93	603	610.77	607.17	620.27	613.93	610.17
Condición 3	366.5	452.63	606.47	615.93	617.13	610.43	619.57	620.33	618
Condición 4	369.1	455.2	594.4	609.13	609.33	610.43	614.67	615.27	618
Condición 5	371.8	438.66	604.85	614.62	615.4	614.81	614.14	618.23	617.11
Blanco	349.4	361.3	363.6	367	363	364	365	367	367

Fuente. Jamanca G. y Salazar D.

Al inicio del crecimiento, el potencial leído no tiene mayor variación, siendo un valor independiente a la cantidad de sulfato ferroso y pH del medio. El crecimiento a condiciones aeróbicas más la presencia de la bacteria, determina la variación del potencial oxidación y la acidez del medio. La muestra blanca hay una ligera variación en todo el periodo de estudio.

La diferencia entre las condiciones de cultivo estudio referente a la velocidad de oxidación es clara, al observar el gráfico, el crecimiento bacterial depende de las condiciones de los medios durante los 3 primeros días, y en el cuarto día alcanza un equilibrio en todas las condiciones, independientemente del medio inicial al cual fueron sembradas.

La oxidación en condiciones aeróbicas depende directamente del crecimiento de la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*; ni el pH, ni el potencial de oxidación de la muestra en “blanco” se incrementa significativamente a lo largo de la prueba en comparación a los demás medios de cultivo (teniendo una variación oscilatoria entre 1 a 4 mV), Se observa que no hay reacciones químicas significativas dentro del medio, ya que la variación de potencial depende exclusivamente del crecimiento de la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*

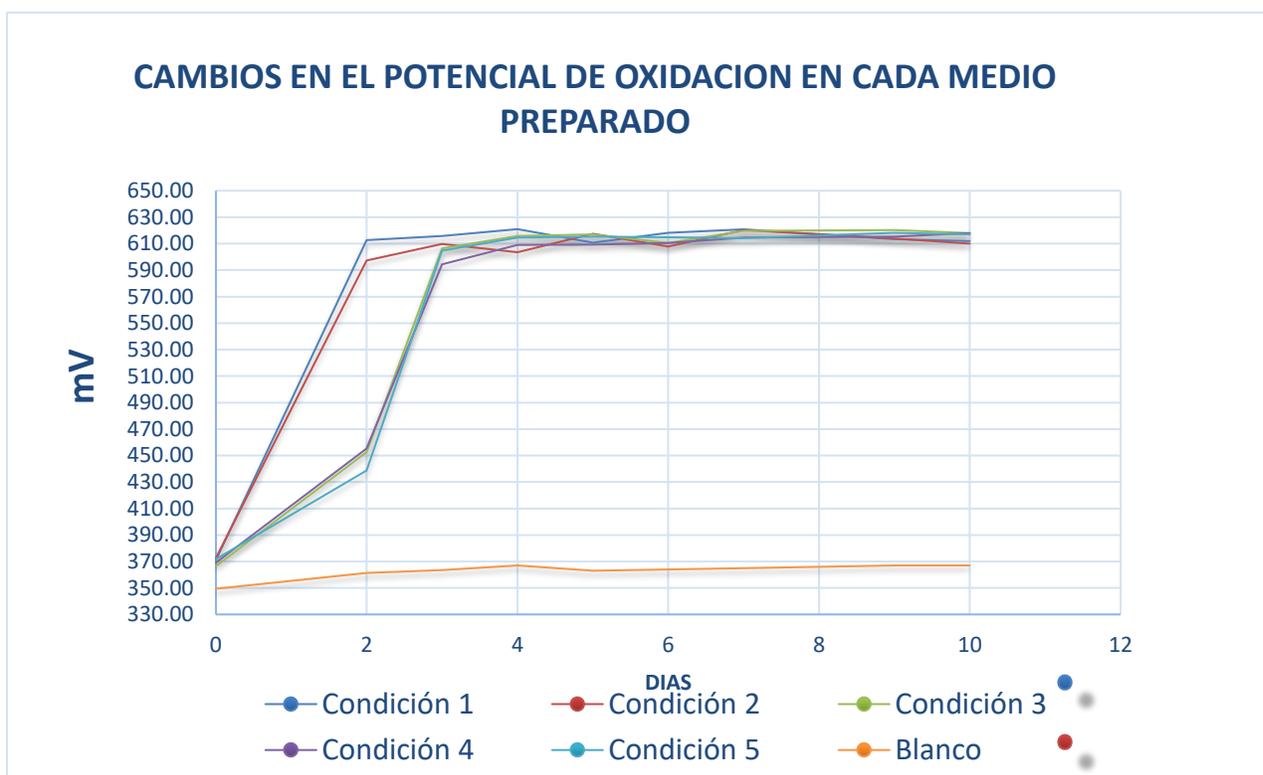


Figura N° 10: Cambios de potencial en los medios estudiados

b) pH

El control de pH se realiza a través de un peachimetro digital marca HANNA, este previamente es calibrado con ayuda de soluciones buffer, en este caso se usó buffer de ph 7 y ph 10. Los resultados de las lecturas del ph de las muestras son:

Tabla 9:
Control de pH en diferentes medios

CONDICIÓN	Cambios en el pH									
	0	2	3	4	5	6	7	9	10	
Condición 1	1.84	2.32	2.22	2.21	2.2	2.21	2.15	2.01	2.15	
Condición 2	2.07	2.41	2.26	2.22	2.18	2.18	2.14	2.01	2.15	

Condición 3	1.83	2.34	2.23	2.19	2.16	2.13	2.1	2	2.14
Condición 4	2.01	2.41	2.21	2.14	2.12	2.11	2.07	1.99	2.14
Condición 5	1.96	2.38	2.29	2.24	2.18	2.15	2.14	1.98	2.12
Condición 6	1.91	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.96	2.1

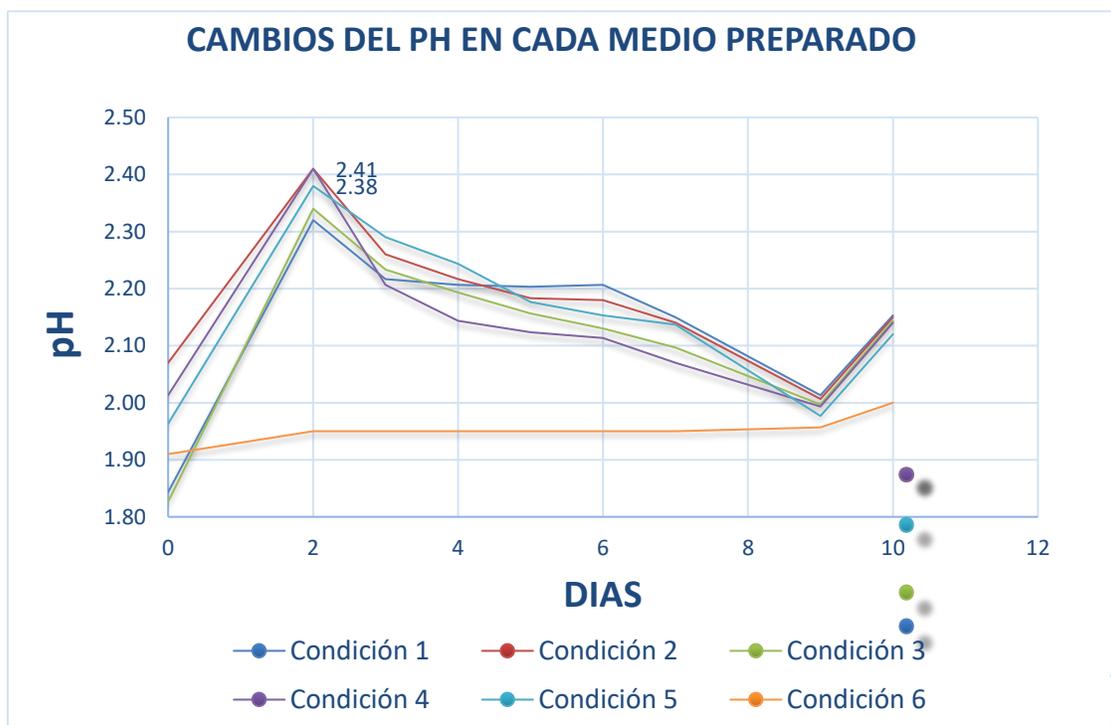


Figura N° 11: Cambios de Ph en los diferentes medios de crecimiento.

Todas las condiciones de estudio, los 2 primeros días, se genera un consumo de protones de hidrogeno, haciendo posible la reducción de acidez 2.3 a 2.4, siendo menor el efecto a bajas concentraciones de sustrato. La producción de ácido sulfúrico por el mecanismo de la oxidación dada por el *Acidithiobacillus Ferrooxidans* es apreciable del 3° día en adelante estabilizando el pH entre 1.9 a 2.0 siendo los más ácidos los que tienen mayor contenido de sustrato (44.4 g/l).

Se observaron en el estudio que la velocidad de basicidad o incremento del pH (básico) genera la producción de hidroxisulfatos básicos de hierro, son precipitados que se han formado durante el proceso de crecimiento bacteriano.

c) **Conteo Bacterial**

Se realizó un conteo de las bacterias *Acidithiobacillus Ferrooxidans* durante las diferentes etapas del estudio, esto para ver cómo se comporta el crecimiento de estas bacterias en los diferentes medios de cultivo. Se ha requerido de los siguientes materiales: Microscopio Trinocular, cámara de Neubauer, micropipeta, lámina de microscopio y aceite de inmersión.

Datos Básicos de la Cámara Neubauer

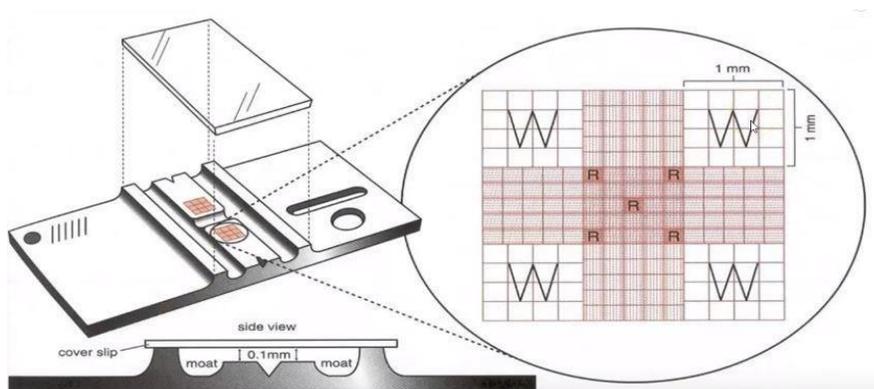


Figura N° 12: Cámara de Neubauer, las secciones "R" son las usadas para el conteo Bacteriano

Cuadro grande central (formado por 400 cuadros pequeños): 1mm x 1mm.

Cuadro mediano (formado por 4x4=16 cuadros pequeños): 0.2 mm x 0.2 mm

Cuadro pequeño: 0.05 mm x 0.05 mm

Líneas separadoras: 0.025 mm

Profundidad=0.1 mm

El recuento de las bacterias se ha realizado en 5 cuadrados medianos aleatorios (señalados como "R" en la figura anterior), posteriormente se calculó el promedio para obtener recuento representativo.

En la cámara Neubauer se ha agregado muestra extraída mediante la micropipeta, posteriormente se ha colocado la lámina de microscopio con cuidado, para las lecturas se han realizado en aumento 1000x se requiere agregar una gota de aceite de inmersión sobre la lámina de microscopio.

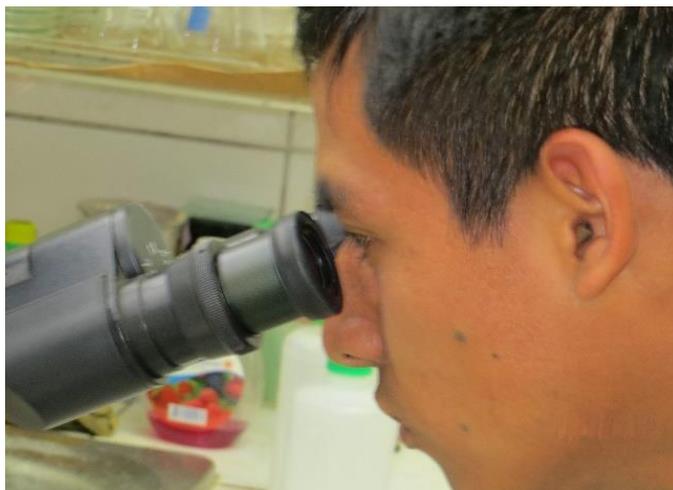


Figura N° 13: Conteo bacteriano en microscopio usando cámara de Neubauer.

Tabla 10:
Control de crecimiento bacteriano en los diferentes medios

CRECIMIENTO BACTERIANO					
DÍAS	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4	Condición 5
0	2.00E+05	2.00E+05	2.00E+05	2.00E+05	2.00E+05
1	4.00E+06	2.50E+06	2.40E+06	2.60E+06	2.95E+06
2	1.25E+07	4.00E+06	4.70E+06	6.00E+06	7.80E+06
3	1.60E+07	7.80E+06	7.10E+06	8.75E+06	8.70E+06
4	1.75E+07	1.16E+07	8.40E+06	1.32E+07	1.07E+07
5	1.95E+07	1.61E+07	1.23E+07	1.50E+07	1.29E+07
6	2.00E+07	1.90E+07	1.63E+07	1.78E+07	1.49E+07
7	2.05E+07	1.88E+07	1.79E+07	1.76E+07	1.62E+07
8	2.04E+07	1.85E+07	1.93E+07	1.93E+07	1.79E+07
9	2.04E+07	1.85E+07	1.87E+07	2.00E+07	1.93E+07
10	2.04E+07	1.83E+07	1.85E+07	2.06E+07	1.90E+07

Fuente. Autor.

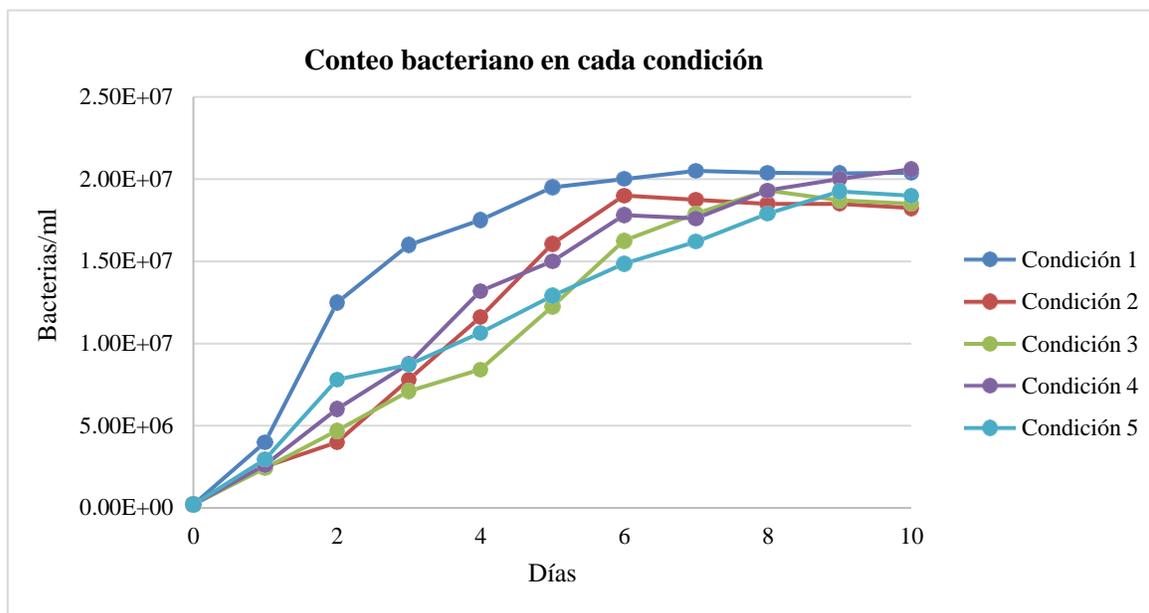


Figura N° 14: Crecimiento bacteriano en diferentes medios de cultivos

Fuente. Autor.

Para correlacionar experimentalmente los resultados se realizó el conteo de bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans* en la muestra y al día durante todo el estudio, observando así mayor diferenciación y velocidad de crecimiento en los medios. En los conteos realizados, el mayor crecimiento bacteriano se da a menor cantidad de sustrato y a pH de 1.8, coincidiendo con lo obtenido en los análisis del potencial redox.

Un estudio demostró el crecimiento bacteriano, puede ser medido indirectamente como menciona Iglesias (1997), esto es por la velocidad de oxidación del medio, la misma que se realizó en control anterior. Al observar ambos gráficos se puede ver similitud en la obtención de resultados. Un crecimiento bacteriano que se muestra en periodo exponencial, se muestra encima de los 450 mV.

Viendo el grafico, se observa un mejor crecimiento en la condición 1, en esta condición se puede ver que en el día 5 ya empieza a mantenerse constante el crecimiento bacteriano, esto indica que llegó a su máximo crecimiento y que a partir de ello el crecimiento bacteriano empezara a disminuir. Lo mismo sucede en las demás condiciones, llegan a un punto de constancia en el crecimiento, se mantendrá ese

crecimiento y posteriormente descenderá la población bacteriana. Esto debido a factores como son la falta de fuente de energía y la superpoblación de la misma.

d) Formación de precipitados

Al realizar la evaluación de los medios de cultivo, se pudo observar la formación de precipitados en las siembras (excepto la muestra en blanco), Los precipitados están formados por hidroxisulfatos básicos de hierro, una caracterización mediante difracción DRX, muestra jarosita y nitratos de hierro. Podemos decir que estos precipitados están formados por hidroxisulfatos básicos de hierro.

Cuando el pH del medio aumenta con tenencia a la basicidad, hace que se generen estos tipos de precipitados que son hidroxisulfatos básicos de hierro. Se puede ver en el estudio, que la producción de este precipitado depende positivamente tanto del pH como el Sulfato de Hierro presentes en el medio de cultivo, lo cual significa que siempre se va producir estos precipitados, esto está en función a la cantidad de sustrato adicionado, pero puede ser controlada manteniendo el pH.

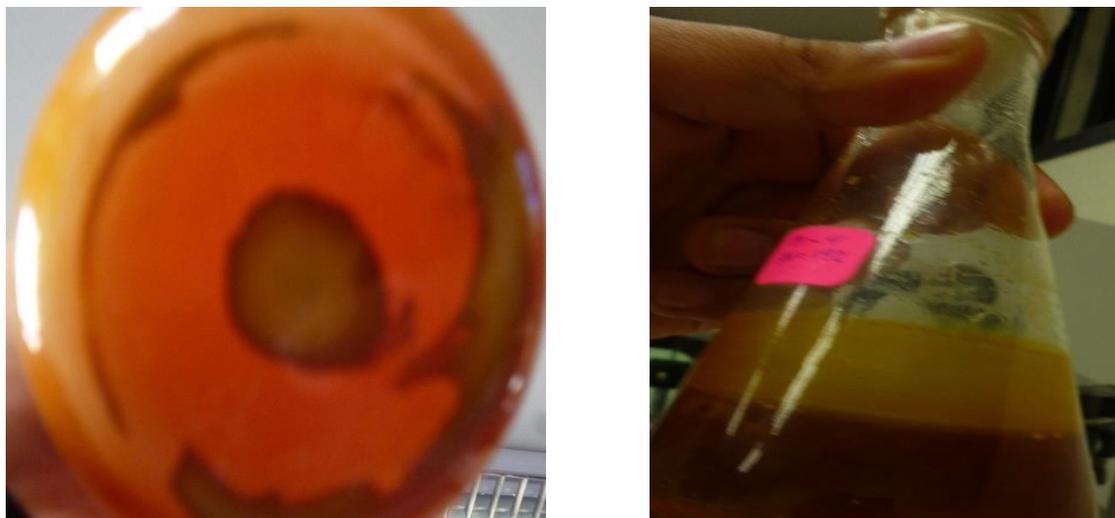


Figura N° 15: Formación de Precipitados en el crecimiento bacteriano

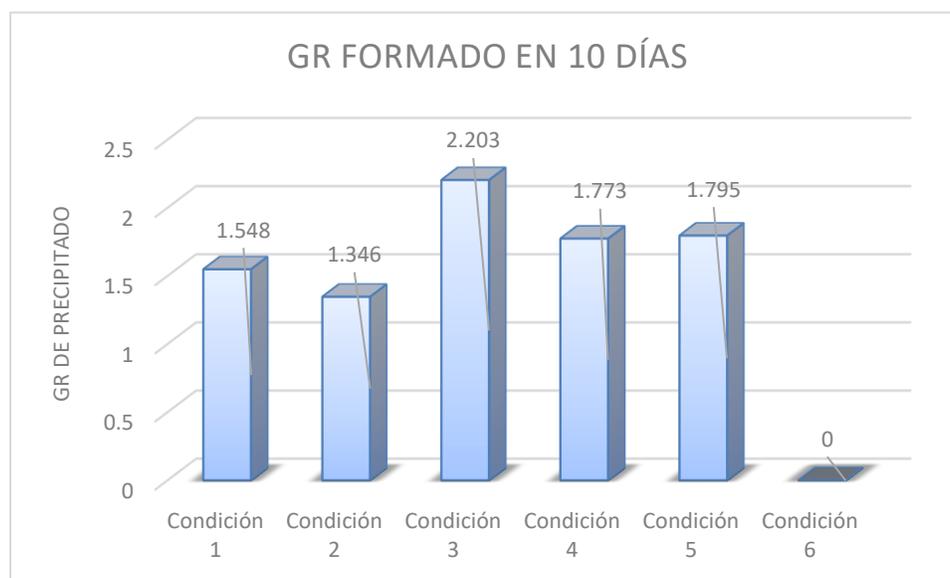


Figura N° 16: Producción de Hidroxi sulfatos de hierro en cada medio de crecimiento.

e) Interpretación

Al evaluar el comportamiento de las bacterias *Acidithiobacillus Ferroxidans* en los diferentes medios de crecimiento, se pudo observar en todas las muestras hay un decline en cuanto a la acides de la solución en las primeras 48 horas. La diferencia entre los medios de crecimiento en lo que concierne a velocidad inicial de oxidación es clara, el crecimiento bacteriano depende bastante de las condiciones del medio que crecen, esta diferencia se ve en los primeros 3 días, ya en el cuarto día alcanza un equilibrio uniforme en todos los medios, sin importar a cuál medio fueron sembrados las bacterias.

Una de las formas básicas de ver que se está dando un crecimiento bacteriano sin necesidad de realizar algún control como son el potencial redox y conteo bacteriano; es la coloración de la solución, en este caso se pudo observar que las soluciones que contienen 22.4 gr/ lt y un ph de 1.8, fue la primera que se tornó de un color rojizo oscuro, indicando que la oxidación del Fe se está dando en su totalidad. A partir del día 4 se pueden ver un potencial que se va manteniendo y el crecimiento bacteriano, indicando que el crecimiento bacteriano llegó a su máxima etapa, por lo que posterior a ello se comenzara la inhibición de la bacteria, esto debido a la falta de energía que era brindado por el sulfato de hierro. Ante la falta de energía la bacteria tiende a morir.

Como se indicó la oxidación inicial depende casi en su totalidad de la concentración de Sulfato de hierro en el medio y el pH (tiene un leve efecto positivo sobre la oxidación),

el crecimiento del *Acidithiobacillus Ferroxidans* es bien representado por estas 2 variables. Por lo que al finalizar el experimento se puede apreciar una clara ventaja en cuanto el crecimiento de bacterias en la solución que contiene 22.4 gr de sulfato ferroso y un pH de 1.8; por lo que podemos concluir que este medio es el adecuado para un crecimiento rápido de la bacteria *Acidithiobacillus Ferroxidans*.

Analizando los resultados un medio 9K óptimo, no debe tener exceso de sulfato ferroso, ya que inhibe el crecimiento, por lo que la bacteria tarda en crecer, el pH ideal esta alrededor de 1.8, si se trabaja a mayor pH produce precipitados insolubles.

Se hizo una comparación entre el medio óptimo para el crecimiento de la bacteria *Acidithiobacillus Ferroxidans* y el medio con el que se estuvo trabajando inicialmente. Se puede ver los siguientes resultados:

Tabla 11:

Comparación de medios de crecimiento, medio de crecimiento antiguo y medio modificado.

Condición	pH	FeSO ₄ g/lit	Inoculo (ml)	Cantidad de Mv 48 horas	Bacterias/ml 48 horas	Tiempo a color rojizo
Anterior	1.5	33.3	10	438.66	4.00E+06	4 días
Modificado	1.84	44.4	10	612.43	1.25E+07	2 días

Fuente. Autor.

En la tabla anterior, se puede apreciar la gran mejora que se tuvo en el crecimiento bacterial, en el nuevo medio, las bacterias tardan en crecer 48 horas, mientras que en el medio de crecimiento de Laured y Silverman, la bacteria tarda en crecer 4 días.

Esto demuestra que ya se tiene el medio óptimo de crecimiento de la bacteria *Acidithiobacillus Ferroxidans* que se está estudiando, obteniendo esto ya se puede avanzar con los siguientes trabajos.



Figura N° 17: Crecimiento bacteriano en su totalidad.
Fuente. Autor.

4.15 Cinética Bacteriana

Las células bacterianas previamente identificadas como *Acidithiobacillus Ferrooxidans*, se le hizo una evaluación al crecimiento de la bacteria en función al tiempo. Las muestras fueron sacadas en intervalos de 8 horas, para así evaluar como progresa el crecimiento de la bacteria. Esto fue evaluado con la ayuda de un microscopio trinocular a 1000X, y de la cámara de Neubauer.

El conteo se realizó en la parte central de la cámara, de 1 mm² tomando como referencia los 5 cuadrantes interiores del mismo de 0.04 mm² cada uno, se consideró los 4 cuadrantes de los extremos y el cuadrante central. Debido a la gran cantidad de bacterias se hizo una dilución a la muestra extraída para el conteo respectivo.

La cantidad de bacterias por ml se halla mediante la siguiente ecuación:

$$\# \text{ Bacterias/ml} = \frac{\text{Bacterias contadas} \times D \times 10 \times 25}{\text{N}^\circ \text{ cuadrantes contados}}$$

Donde:

D: Dilución, en este caso 200

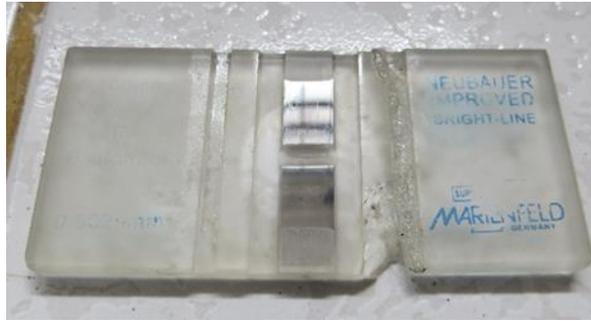


Figura N° 18: Cámara de Neubauer usada para conteo bacteriano en el estudio Fuente. Autor.

Se inició la siembra y se realizaron los siguientes resultados de crecimiento bacterial en función al tiempo:

Tabla 12:
Crecimiento Bacteriano

CINÉTICA BACTERIANA	
Horas	Bacterias/ml
0	2.04E+06
8	7.50E+06
16	1.27E+07
24	1.63E+07
32	2.41E+07
40	3.26E+07
48	4.20E+07
56	4.13E+07
64	4.17E+07
72	4.15E+07

Fuente. Autor.

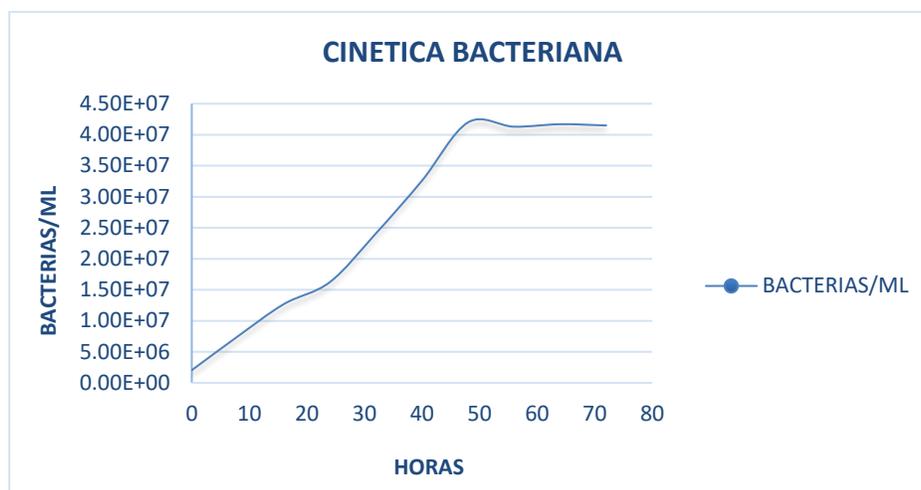


Figura N° 19: Cinética bacteriana realizada en el medio óptimo de crecimiento.
Fuente. Autor.

En el gráfico se puede apreciar como el crecimiento de las bacterias aumenta progresivamente en las primeras 48 horas, llegando tener el color rojizo oscuro, característica de que el Fe en la solución esta oxidado.

A llegar 48 horas el crecimiento bacteriano empieza a mantenerse, el indicativo no hay más crecimiento de población bacteriana, debido a la falta de su fuente de energía principal, Fe +2. Esto quiere decir que, en las próximas horas al no encontrar más fuente de energía, las bacterias comenzaran a morir, y la población bacteriana disminuirá, por lo que se tiene q hacer constantes resiembras para poder seguir manteniendo viva la bacteria.

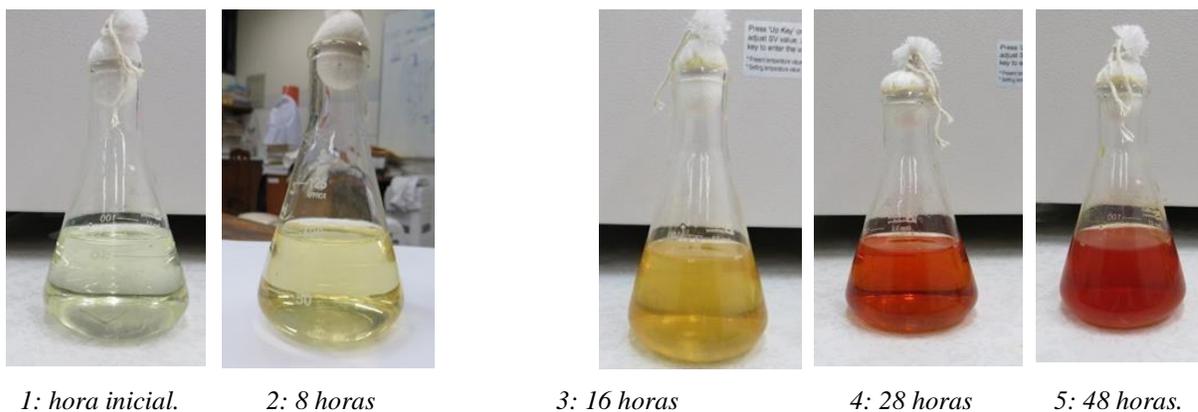


Figura N° 20: Viraje del medio en el crecimiento bacteriano
Fuente. Autor

4.16 Adaptación de bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans* a la pirita.

Obtener el medio ideal un rápido crecimiento de la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*, se inician las pruebas preliminares de adaptación. El objetivo de adaptación es familiarizar la bacteria a medios con contenido mineral, obtener una idea de cuanto es el porcentaje de sólidos para hacer el tratamiento al mineral refractario, y pasar a la lixiviación convencional, obtener una bacteria capaz de crecer en medios de pirita sin necesidad de sulfato de hierro, en otras palabras, se alimente propiamente del Hierro que contiene la pirita, posteriormente nos ayudara a realizar pruebas de oxidación a minerales refractarios que contenga pirita y arsenopirita.

Las pruebas anteriores, la cepa aislada en medio líquido fue sembrada a condiciones distintas 9K, consideramos presencia de pirita en los medios. Durante los experimentos de adaptación, medio 9k fue suplementado progresivamente con cantidades crecientes de concentrados de pirita y disminuyendo, progresivamente sulfato ferroso (FeSO_4). En siguiente procedimiento:

- Moler el mineral, con molino de bolas, tiempo 20 minutos, con un % de solidos de 60%.
- Flotar mineral con reactivo con colector Z-11 y espumante MICK.
- Pasar por mallas Tyler: +200; +325; -400
- Se coloca el % de sólidos de forma variable en cada matraz como se muestra en la tabla N° 4.9, manteniendo constante la concentración de sales para 90mL.
- Autoclavar los matraces (que contienen medio 9k, pirita y sales) a presión de 1 Mpa por espacio tiempo de 15min.
- Inocular 10ml de cultivo bacteriano.
- Monitorear potencial redox.



1: malla 200.

2: malla 325

3: malla 400

4: malla 400

Figura N° 21: Resultados de análisis de malla después de la molienda.

Fuente. Autor

*Tabla 13:
Adaptación la bacteria a medios piriticos, el medio 9k fue disminuido progresivamente.*

Etapa de Adaptación	% de FeSO ₄	%Sólidos	Malla
1era etapa	100%	1%	80% -400
		2%	
		3%	
		4%	
2da etapa	50%	5% de py	(-150+325)
			(-325+400)
			-400
3ra etapa	25%	7.5% de py	100 % -400
4ta etapa	12.50%	10% de py	80 % -400
5ta etapa	10%	10% de py	80 % -400

Fuente. Autor

El estudio inicia con una concentración inicial 22.4g/L de FeSO₄ La adaptación de la cepa *Acidithiobacillus Ferrooxidans* es muy variado, ciertamente el uso del medio de crecimiento 9k es ya uno establecido, pero las cantidades de proporción empleadas por cada sustancia a añadir son variadas, dependiendo en su mayoría del tipo de cepa con el cual se esté trabajando.

Para ello se modifica este medio 9k, con el objetivo de hallar un medio ideal en el cual la bacteria pueda crecer de manera rápida. Para que la bacteria pueda oxidar el mineral refractario al cual se empleara, lo primero es llevar a la bacteria a una previa adaptación a minerales piriticos, esto con el fin de no ocasionar una inhibición de la cepa *acidithiobacillus Ferrooxidans* al momento de ponerlo en contacto con el mineral en estudio. Es por eso que se trabajó en la adaptación, considerando ciertos parámetros.

Este proceso contiene ciertas complicaciones, por la presencia de metales inhibidores (como el arsénico) impiden el crecimiento rápido de la bacteria en este medio, por eso llamamos *ADAPTACION*, ya que con una serie de pruebas se logrará la adaptación de la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*, y así no tener problemas al tratar el mineral refractario.

En el caso de la resiembra como adaptación, se consideró una nueva siembra cuando la muestra sembrada llegue a un potencial por encima de los 600 Mv (indicándonos que hay un

crecimiento bacteriano), ya que en los estudios anteriores se observó que cuando llegue a este potencial, este se mantiene y posterior a ello comenzará a descender.

El nivel de acides del medio no varió, se consideró ph inicial 1.8 y tampoco los nutrientes variaron. Las variables que trabajaron son: la cantidad de pirita y el % de sulfato de hierro.

Los medios modificados 9K se le inocularon 10 ml con la cepa aislada (crecimiento 2 días). Cada condición fue experimentada a condiciones ambientales (Presión 1 atm y Temperatura 20 - 25°C). Las siembras al ser adaptadas son agitadas a 120 rpm en agitador orbital, se hace un control del potencial de cada muestra en intervalos de tiempo, teniendo datos para realizar gráficos respectivos. Se determina la evolución de fase adaptación al variar el potencial (Juan O. & col; 2012), una adecuada adaptación generará buenos resultados.

Variables operativas.

- pH: 1.8
- Agitación: 120 rpm.
- Temperatura y presión a condiciones naturales (1 atm y 20°C).

1. Primera Adaptación

Se consideró en 4 muestra la pirita: 1, 2 3, 4 gr respectivamente. La cantidad de sulfato de hierro fue de 22.4 gr/lt. Los demás nutrientes no fueron modificados.

Tabla 14:
Control de Potencia adaptación

Primera Resiembra con Pirita - (Horas)					
Muestra	0	12	24	36	48
1 gr	487.6	492.5	504.9	524	615.2
2 gr	463.5	470.5	473.6	509.8	600.2
3 gr	454.7	461.5	465.3	508.5	600.3
4 gr	432.7	439.6	444.1	506.1	605.2

Fuente. Autor

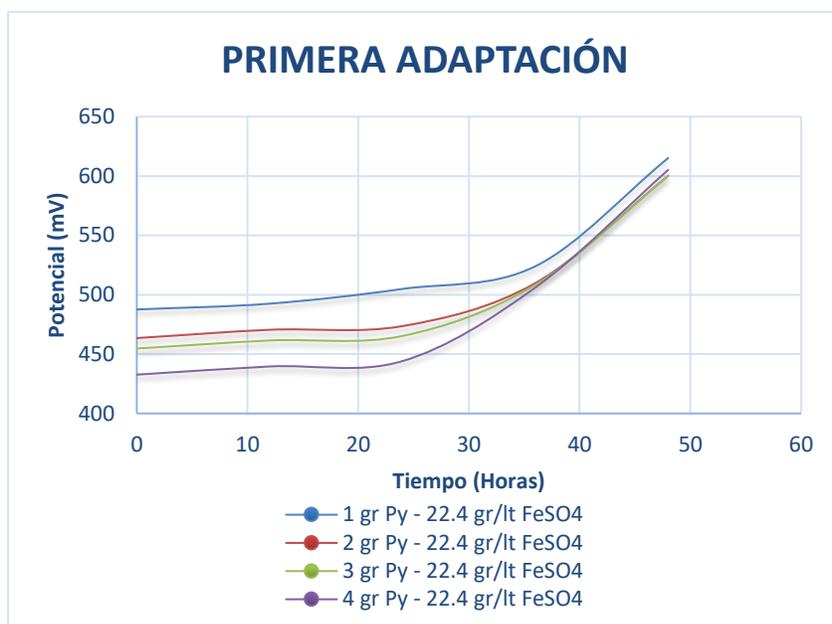


Figura N° 22: Cambios del potencial de oxidación en función de la cantidad de pirita.

Se observa del gráfico, considerable aumento del potencial en la muestra de 1 gramo de mineral pirítico, se debe que presenta menos daño a la bacteria a causa de la fricción que hay entre las partículas de mineral y la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*, podemos observar que, a mayor cantidad de mineral, hay mayor inhibición de la bacteria, por la fricción y por la cantidad de arsénico presente en el medio. El resultado en general de adaptación fue bueno, ya que en solo 48 horas llego al potencial deseado.

2. Segunda Adaptación

Para la segunda adaptación, se consideró la adaptación en mallas de la pirita. Aquí se utilizó 3 granulometrías diferentes: malla 325, 400 y -400 respectivamente. En este caso ya la cantidad de sulfato de hierro vario a 11.1 gr/ Lt y la cantidad de pirita fue de 5 gr. El inóculo fue agregado del resultado de la adaptación 1 (5 g. de pirita).

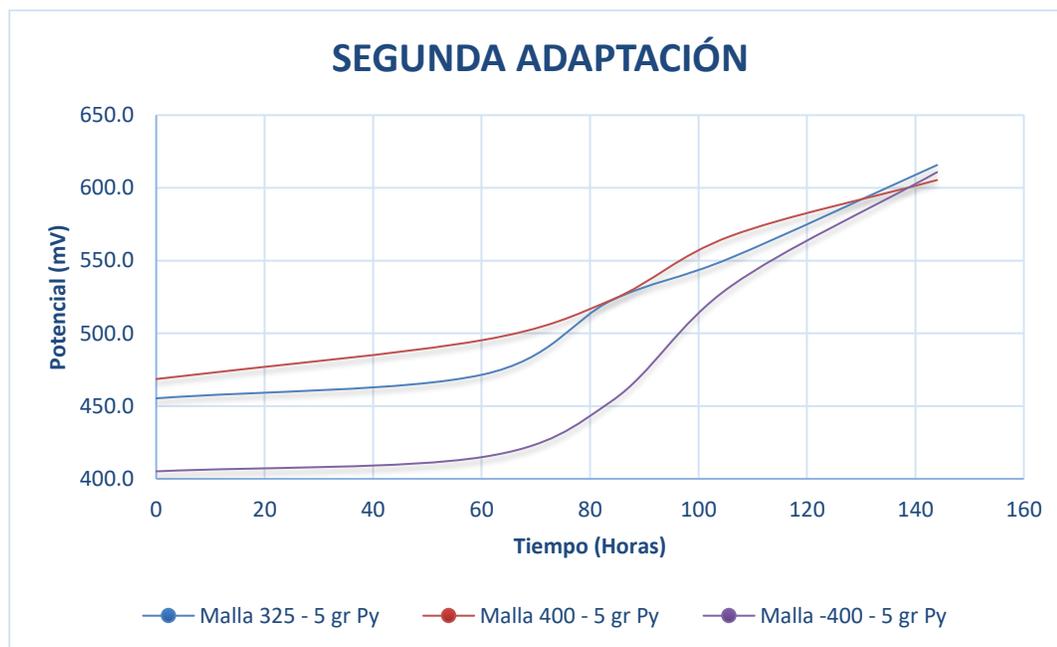
Tabla 15:
Control de potencia de segunda adaptación

Segunda Resiembra con Pirita - Horas					
Muestra	0	60	84	106	144
Malla 325 - 5 gr Py	455.4	471.5	522.7	552	615.7
Malla 400 - 5 gr Py	468.6	495.3	523.1	567	605.4
Malla -400 - 5 gr Py	405.2	414.9	453.5	532.5	610.8

Fuente. Autor

Tabla 16:

Cambios del potencial de oxidación en función de la cantidad de pirita y la malla del mineral



Del gráfico observamos, malla 400 en primeras horas hay mejor respuesta, en comparación a otras, es por la cantidad de pirita presente en cada malla, haciendo la bacteria no sea afectada por la fricción, consideramos la cantidad de arsénico presente en cada malla, influyendo en el crecimiento de la bacteria. El tiempo de adaptación, que demora a llegar al potencial requerido es 6 días, demorando más que la adaptación anterior; llegando al crecimiento de la bacteria en todas las mallas, avanzando con el estudio.

3. Tercera Adaptación

La etapa de adaptación, se trató de profundizar el tema y se optó por continuar la adaptación con la malla -400, esto debido a que en la mayoría de los minerales refractarios de interés por lo general tienen hasta un 80% malla -400. La cantidad de sulfato de hierro se bajó hasta un 5.55 gr/ lt y la cantidad de pirita que se agregó fue de 7.5 gr. El pH fue mantenido en 1.8 a 1.84. Se corrigió con ácido sulfúrico 10N.

Tabla 17:

Control de potencial de tercera adaptación

TERCERA ADAPTACIÓN												
Días	0	1	4	5	6	7	8	11	12	13	14	15
mV	387.6	411.7	464.3	444.4	465.1	462.3	484.5	479.8	489.7	523.4	527.1	535.3

Fuente. Autor

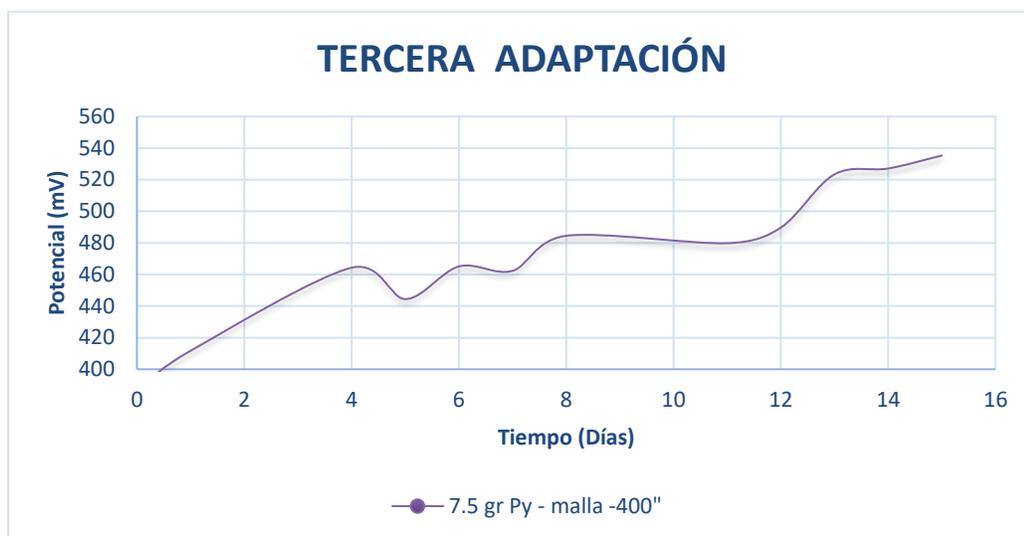


Figura N° 23: Cambios del potencial de oxidación en función de la cantidad de pirita a la malla -400.

La variación del potencial en todo el crecimiento, indica la dificultad que tuvo la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans* para adaptarse, puede ver momentos en los cuales la bacteria se inhibe, el tiempo de adaptación también es largo (el doble de adaptación anterior), se debe al aumentar la cantidad de mineral piritico, existe más fricción del mineral con la bacteria, aumentando la cantidad de arsénico, factores que provocan la dificultad de crecimiento de la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*. Se agito la bacteria 15 días, el potencial era favorable y por ello se continuó con los procesos de adaptación.

4. Cuarta Adaptación

En esta etapa de adaptación, se trató de aumentar el porcentaje de pirita presente en la solución y disminuir el porcentaje de sulfato ferroso, esto con el objetivo de hacer que la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans* tenga como única fuente de energía a la pirita. La cantidad de sulfato de hierro se bajó hasta un 2.8 gr/ lt y la cantidad de pirita que se agrego fue de 10 gr. El ph fue mantenido en 1.8 a 1.84. Se añadió 10 ml de inóculo que resultado de la tercera adaptación. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 18:
Control de potencial de cuarta adaptación

CUARTA ADAPTACIÓN												
Días	0	1	2	4	5	7	9	12	13	14	15	16
mV	374.2	421.6	432.6	444.4	417.3	435.2	451.8	462.5	489.7	529.5	575.6	601.2

Fuente. Autor

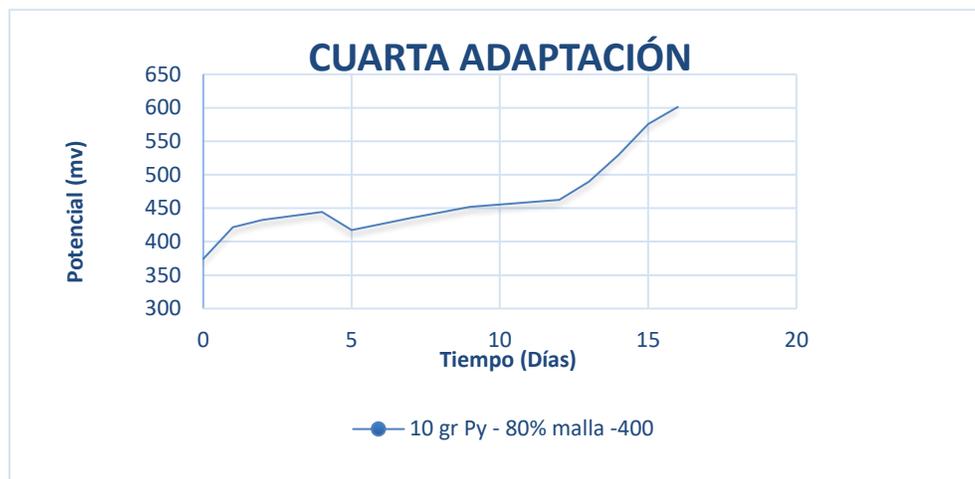


Figura N° 24: Cambios del potencial de oxidación en función de la cantidad de pirita

De gráfico se observar una variación significativa que la tercera adaptación, el día 4 el potencial tiende a bajar (existe una fuerte inhibición de la bacteria), pero a partir del día 5 la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans* vuelve a retomar su crecimiento; esta dificultad se presenta a la existencia de una mayor concentración de arsénico en el mineral que inhibe a las bacterias, observando que demora 12 días en comenzar a tener un aumento en el potencial, llegando así en el día 16 tomar un color rojizo la solución y teniendo un potencial de 601.2 mv, siguiendo así con el procedimiento de adaptación.

5. Quinta Adaptación

En esta quinta adaptación se buscó aumentar el porcentaje de sólidos, manteniendo el porcentaje de sulfato ferroso de la adaptación anterior, esto con el fin de no inhibir tanto la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*, y pueda desarrollarse con facilidad. Se debe recordar que, en la adaptación anterior, la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans* tuvo dificultades para poder crecer. Se obtuvo los siguientes resultados:

Tabla 19:
Control de potencial de quinta adaptación

QUINTA ADAPTACIÓN												
Días	0	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	19
mV	392.2	406.5	415.2	400.3	402.6	398.2	392.5	390.5	370.2	360.7	368.2	364.3

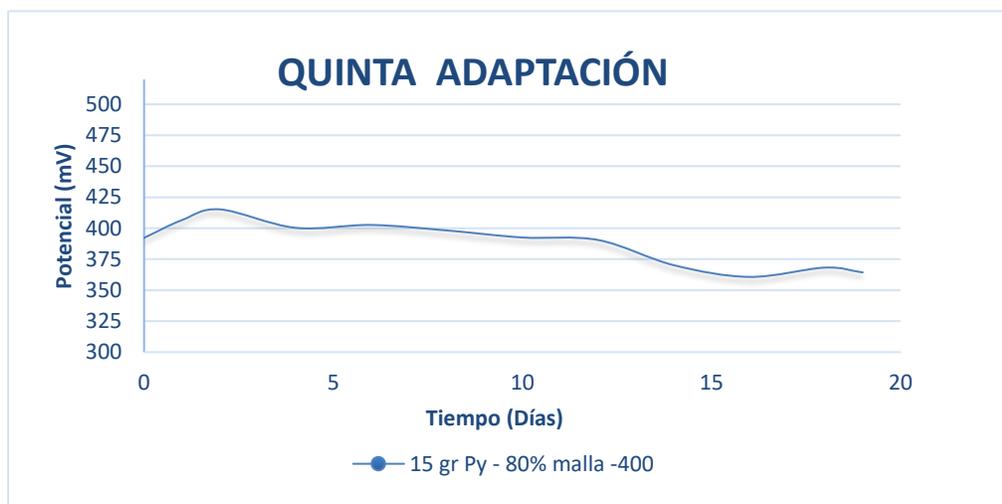


Figura N° 25: Cambios del potencial de oxidación en función de la cantidad de pirita y la malla del mineral.

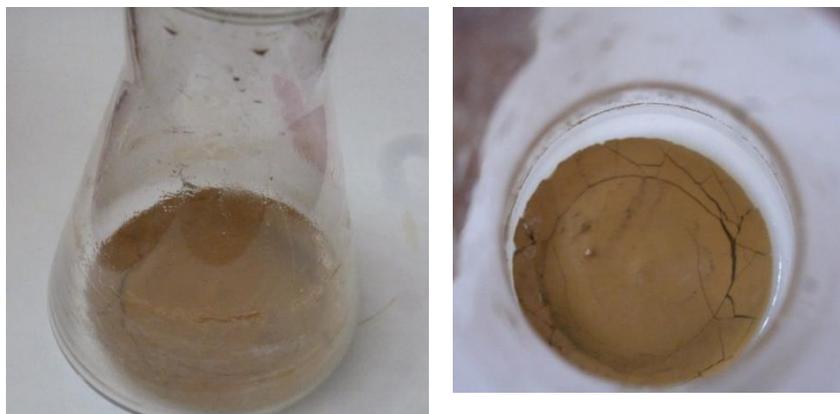
En el gráfico se puede apreciar que la bacteria no pudo crecer en el medio con el 15% de pirita, esto debido ha aumentado la cantidad de arsénico en la solución, metal inhibea la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*, y por ende llegó a morir.

Se observa la bacteria los primeros 6 días tiene un leve crecimiento en el potencial, pero como está expuesto a una mayor concentración de arsénico, en los próximos días la bacteria empieza a decaer en potencial, se mantuvo en agitación 19 días con la idea de que la bacteria en algún momento pueda crecer, pero no fue así, llegando es día 19 al 364.3 mV., el mismo día se llevó una muestra al microscopio a ver si hay bacterias vivas en la solución, pero no se pudo observar alguna, confirmando que la bacteria murió.

4.1.7 Obtención de cepa adaptada

Después de las diferentes adaptaciones por los cuales tuvo que pasar la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*, se logró obtener una bacteria capaz de crecer en medios con

contenido de 10% de pirita, logrando de esta manera lograr crecer teniendo como fuente de energía a la pirita, oxidando la pirita, que es el principal objetivo de este estudio.



1: Dia 1

2: Dia 16

Figura N° 26: Resultado de la adaptación de mineral pirítico en 16 días

Fuente. Autor

4.18 Obtención de Mineral Refractario

Para el estudio se utilizó un mineral proveniente de la mina Korimarca cuyo ensaye de cabeza indica, el oro es el principal constituyente económico del mineral con contenido de arsénico como ganga; siendo este un mineral refractario, encontrándose el oro encapsulado por la estructura de la pirita y por el alto contenido de arsénico en el mismo.

4.19 Análisis Mineralógico

El mineral de estudio tiene como principal compuesto la arsenopirita, cuya fórmula química es FeAsS . Siendo el arsénico uno de los principales problemas que presenta este mineral, por lo que en pruebas anteriores la recuperación del oro sólo llegó al 32%.

Un análisis químico realizado al mineral arrojó los siguientes resultados:

Tabla 20:

Análisis químico de la muestra refractaria

Análisis Químico			
Elementos	Au	Fe	As
Contenido	0.141 Onz/Tc	17.20%	5.56%

Fuente. Autor

4.1.10 Conminución

La reducción del mineral se realizó en 2 etapas, una etapa de chancado y otra de molienda.

1. Chancado

- El chancado se llevó a cabo con la ayuda de una chancadora de quijada y una chancadora cónica.
- En la etapa de chancado se llegó a una granulometría de 100% malla -10

2. Molienda

- En esta etapa de molienda, se usó un molino de bolas de laboratorio, la reducción que se logró con esta molienda fue de 80% malla -400, esto con el objetivo de ayudar a liberar las partes valiosa, en este caso el oro.
- El porcentaje de solidos que se empleó para la molienda fue de 66% y el tiempo de molienda fue de 20 minutos.

4.1.11 Análisis de Malla

Se realizó el análisis granulométrico en húmedo. Se usó las siguientes mallas:

- Para análisis de chancado: Malla 10, 40, 80, 100, 200, 325 y 400
- Para análisis de molienda: Malla 200, 325 y 400

El análisis de malla se hizo en húmedo, para esto se sacó una muestra y se pasó con agua ligeramente a presión, ya que, al pasar malla con el rotap, siempre quedan partículas pequeñas (polución) impregnadas en las partículas grandes, pasando malla con el agua se obtiene mejores resultados. Los resultados del análisis de malla en ambas etapas es el siguiente:

Tabla 21:
Análisis de malla después de chancado el mineral

ANÁLISIS DE MALLA DE CHANCADO			
Nº Malla	Peso	% Malla	% Acum.
Malla 10	0	0.00%	0.00%
Malla 40	9.1	3.60%	3.60%
Malla 80	8.3	3.30%	6.90%
Malla 100	8.3	3.30%	10.20%
Malla 200	50.8	20.20%	30.40%
Malla 325	35	13.90%	44.30%
Malla 400	27.9	11.10%	55.40%
Malla -400	112.2	44.60%	100.00%
TOTAL	251.6	100.00%	

Fuente. Autor

Tabla 22:
Análisis de malla después de realizar la molienda

ANÁLISIS DE MALLA DE MOLIENDA			
MALLA	Peso (gr)	% Malla	% Acum.
Malla 200	6.42	3.21%	3.21%
Malla 325	22.38	11.19%	14.40%
Malla 400	12.2	6.10%	20.50%
Malla -400	159	79.50%	100.00%
SUMA	200	100.00%	

Fuente. Autor

4.1.12 Biooxidación del mineral refractario

Teniendo la cepa *Acidithiobacillus Ferrooxidans* ya adaptada a medios con contenidos arsenopiriticos, se procede con la oxidación del mineral en estudio con la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*. Para ello se consideró un 10% de mineral con respecto a la solución, como se hizo la adaptación número 4, no se consideró un 15% de solidos debido a que en el proceso de adaptación la bacteria no sobrevivió a ese medio. Se considera los siguientes parámetros:

*Tabla 23:
Parámetros a utilizar en la oxidación bacteriana.*

PARÁMETROS	
FeSO ₄	12.50%
% Mineral	10%
pH	1.8
Rpm	120
Tiempo	16 DÍAS

Fuente. Autor

El ph se reguló con ácido sulfúrico a una concentración de 10 N, Las sales basales se consideraron el mismo de las adaptaciones anteriores. En esta parte del estudio se consideró la dilución de Arsénico, dilución de Fe, potencial Redox y conteo bacteriano como controles del proceso.

a. Potencial Redox

Se midió el potencial redox, con ayuda de un potenciómetro portátil marca HANNA, los resultados obtenidos son los siguientes:

*Tabla 24:
Control de potencial de biooxidación de mineral refractario*

BIOOXIDACIÓN																	
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
mV	406.5	423.9	422.6	447.2	456.3	460.2	482.6	514.6	512.3	529.5	551.3	601.2	611.2	618.9	624.3	625.7	625.6

Fuente. Autor

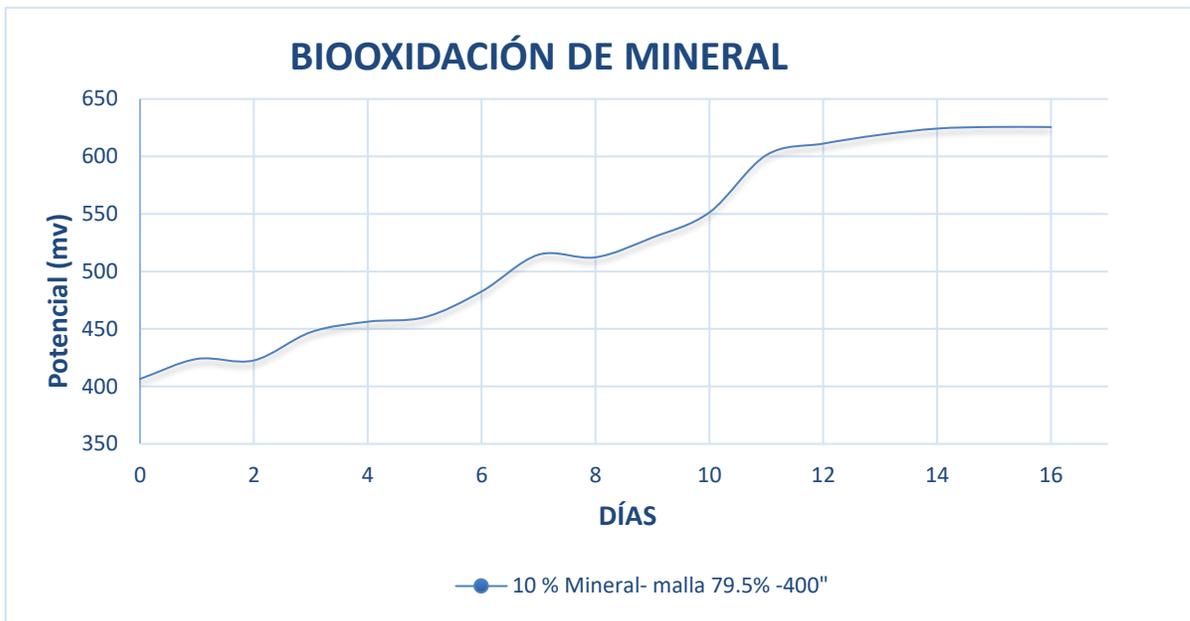


Figura N° 27: Cambios del potencial en la oxidación de mineral refractario con *Acidithiobacillus Ferrooxidans*

b. Conteo bacteriano

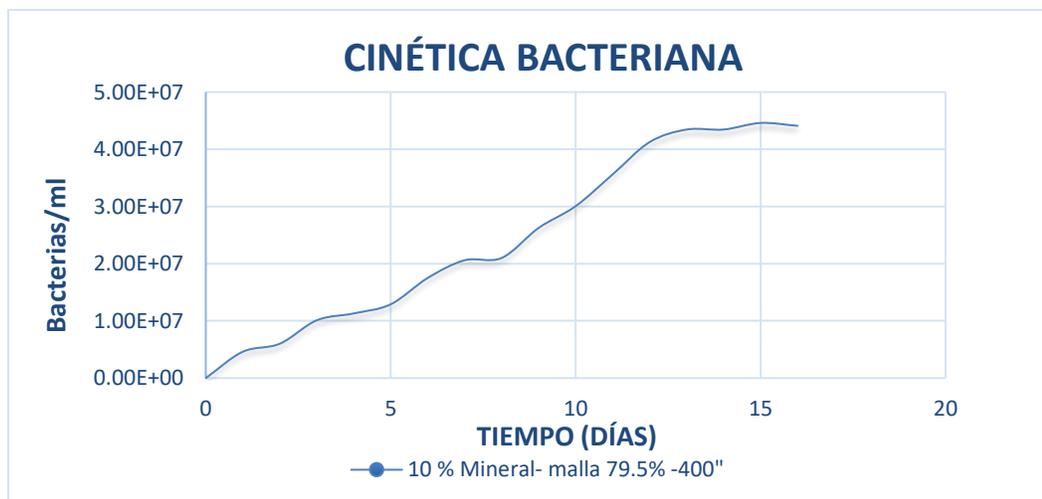


Figura N° 28: Crecimiento Bacteriano en la oxidación de mineral refractario con *Acidithiobacillus Ferrooxidans*.

Tabla 25:
Control de crecimiento bacteriano

CINÉTICA BACTERIANA	
Días	Bacterias/ml
0	0.00E+00
1	4.60E+06
2	6.00E+06
3	1.01E+07
4	1.13E+07
5	1.29E+07
6	1.75E+07
7	2.06E+07
8	2.10E+07
9	2.63E+07
10	3.01E+07
11	3.56E+07
12	4.13E+07
13	4.35E+07
14	4.35E+07
15	4.46E+07
16	4.41E+07

Fuente. Autor

c. Dilución de Arsénico.

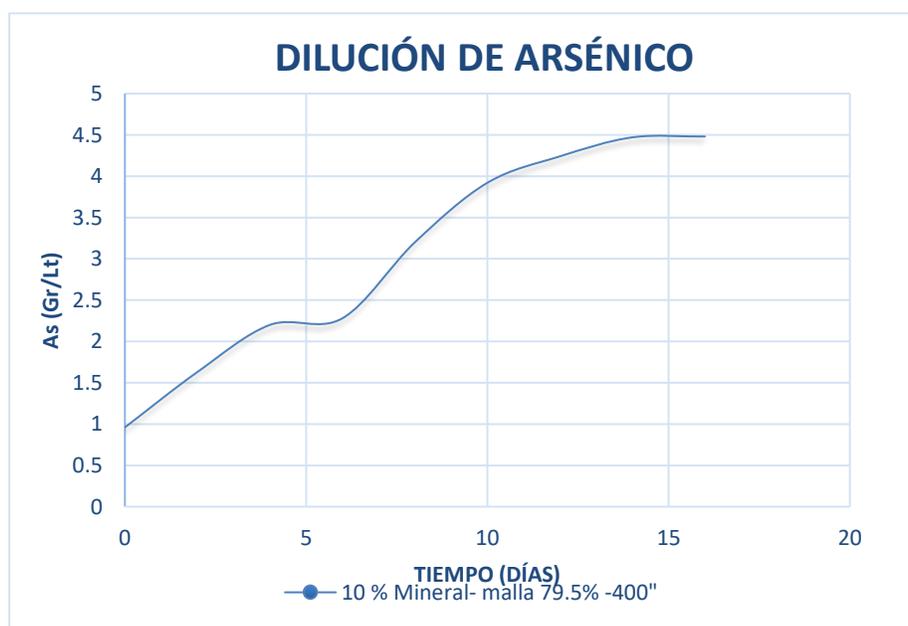


Figura N° 29: Dilución de arsénico en la oxidación de mineral refractario con bacteria

Tabla 26:
Control de dilución de arsénico en la oxidación de mineral refractario

DILUCIÓN DE ARSÉNICO	
Días	As (gr/lit)
0	0.96
2	1.63
4	2.2
6	2.28
8	3.2
10	3.92
12	4.24
14	4.47
16	4.48

Fuente. Autor

c. Dilución de Fe

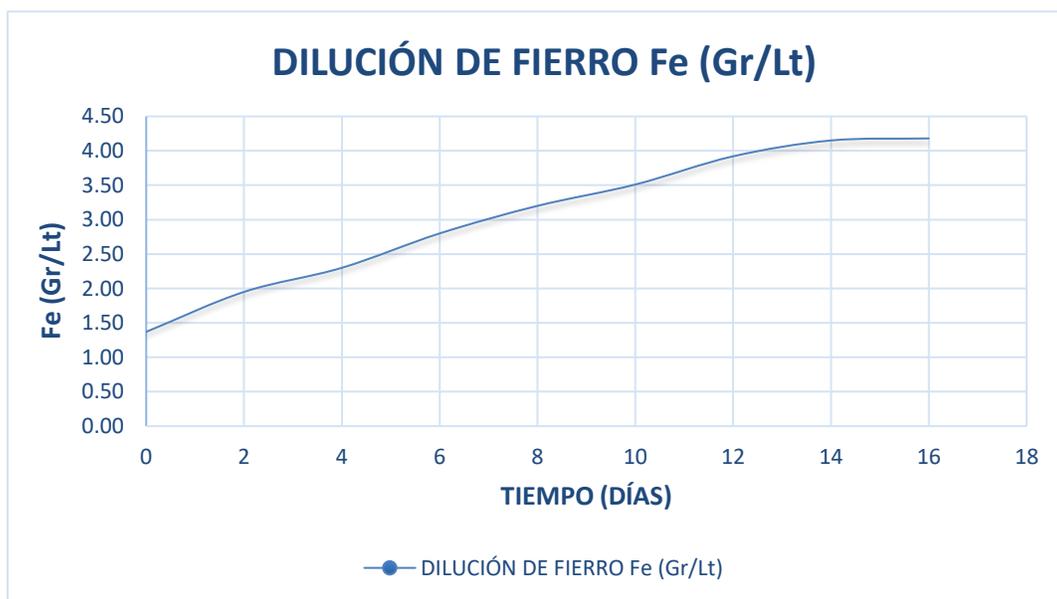


Figura N° 30: Dilución de Fe en la oxidación de mineral Refractario con la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*

Tabla 27:
Control de dilución de hierro en la oxidación de mineral refractario

DILUCIÓN DE FIERRO	
Días	Fe (gr/lt)
0	1.37
2	1.95
4	2.3
6	2.8
8	3.2
10	3.51
12	3.92
14	4.15
16	4.18

Fuente. Autor

Bacteria cumple la función de oxidar a los compuestos de arsenopirita, disolviendo el arsénico y oxidando el Fe+2 en Fe+3, de esta manera la pirita rompe su estructura, y ahora es más fácil de tratar con el cianuro. Se aprecia un cambio de coloración del mineral, lo que demuestra que la bacteria si ha cumplido su objetivo.



1



2

Figura N° 31: Resultado de oxidación de mineral refractario con la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*. Fuente. Autor

4.1.13 Pruebas de Lixiviación

Cumplido la etapa de oxidación mediante la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*. Se hacen las pruebas de lixiviación para corroborar la efectividad del pre-tratamiento dado al mineral, se hacen 2 pruebas de lixiviación, una con el mineral normal (sin tratamiento) y otra con el mineral al cual previamente se hizo la oxidación con la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*. Se considera los parámetros de lixiviación. La variable que se tiene, es el mineral a lixiviar.

*Tabla 28:
Parámetros a considerar en la lixiviación con cianuro*

PARÁMETROS	
% So:	20.00%
NaCN:	2000 ppm
Vel. Agitación	400 RPM
pH:	10.8

Fuente. Autor

4.1.14 Lixiviación de Mineral sin Tratamiento

Se hizo la prueba de lixiviación en un agitador de laboratorio, con un vaso de 1000 ml de capacidad, en un tiempo de 48 horas. Para ello se sacó una muestra de 120 gramos del mineral ya antes molido a 79.5% malla -400. Se hizo pruebas de evaporación para compensación, también se compenso el volumen de muestra extraída para la titulación. La titulación del cianuro se hizo con nitrato de plata (4.33 gr/Lt), teniendo como indicador yoduro de potasio (KI) al 5%. El ph se mantuvo a 10.8 con cal.

Se obtuvieron los siguientes resultados.

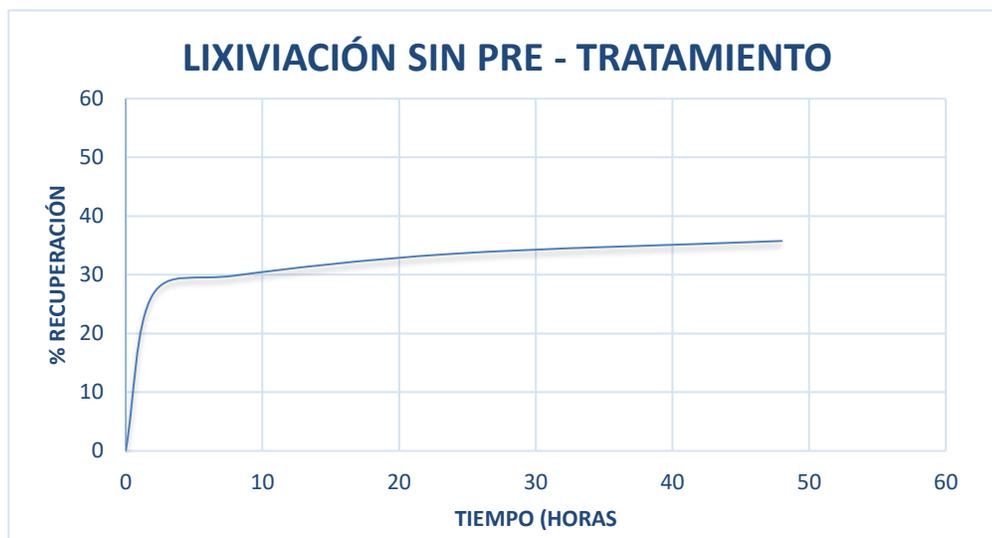


Figura N° 32: Recuperación de oro en mineral refractario sin tratamiento biológico
Fuente. Propia



Figura N° 33: Variación de consumo de cianuro en lixiviación de mineral refractario sin tratamiento biológico
Fuente. Propia

Se tiene un alto consumo de cianuro de sodio, algo que también desfavorece al querer tratar este mineral, esto debido a la existencia de metales que reaccionan con el cianuro (cianicidas), consumiendo el cianuro.



Figura N° 34: Momentos de la prueba de lixiviación de mineral refractario sin tratamiento biológico

Fuente. Propia

4.1.15 Lixiviación de Mineral Tratado con las Bacterias Acidithiobacillus Ferrooxidans.

La prueba de lixiviación se hizo en un agitador de laboratorio, con un vaso de 1000 ml de capacidad, en un tiempo de 48 horas. Para ello se consideró 120 gr de mineral al cual se le ha hecho una previa oxidación con la bacteria Acidithiobacillus Ferrooxidans. Se hizo pruebas de evaporación para compensación, también se compenso el volumen de muestra extraída para la titulación. La titulación del cianuro se hizo con nitrato de plata (4.33 gr/Lt), teniendo como indicador yoduro de potasio (KI) al 5%. El ph se mantuvo a 10.8 con cal.

Se obtuvieron los siguientes resultados:



Figura N° 35: Recuperación de oro en lixiviación de mineral refractario oxidado con bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*
Fuente. Propia

Se obtiene una recuperación de 77.44 %, con lo que se demuestra que la oxidación bacteriana cumplió su función, y el mineral refractario va en camino de ser rentable, aplicando este pre-tratamiento.



Figura N° 36: Variación de consumo de cianuro en la lixiviación de mineral refractario previamente oxidado con bacteria
Fuente. Propia

El consumo de cianuro de sodio disminuye en este proceso, debido a que la bacteria oxidó al mineral refractario y este ya no presenta los compuestos cianicidas que consumían el cianuro de sodio, y a la vez, al descomponer la pirita, este libera al oro y lo hace fácilmente lixiviable; esto favorece al proceso de lixiviación de un mineral aurífero que presenta contenido de arsenopirita en su mineralogía.



Figura N° 37: Momentos de la prueba de lixiviación de mineral refractario al que previamente se le hizo un tratamiento biológico
Fuente. Propia



1. Mineral refractario sin tratamiento 2: Mineral refractario al que se le realizo oxidación con la bacteria

Figura 38.

En la figura anterior, claramente se puede ver la variación de color que sufrió el mineral refractario al ser sometido a la oxidación con la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans*. Se ve como si el mineral fuere un mineral oxidado, esto demuestra que la bacteria *Acidithiobacillus Ferrooxidans* cumplió su función oxidativa; dando características ideales de un mineral oxidado para ser tratado con la lixiviación convencional.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1.1 CONCLUSIONES

- Los medios de crecimiento para la bacteria *Acidithiobacillus Ferroxidans* son muy variados, sabiendo que los sustratos varían, pero se tiene en claro que la fuente de energía principal es el Fe, considerando como sustrato el sulfato ferroso, pero este a su vez este sustrato también se presenta en diversas proporciones; el estudio realizado demostró que la velocidad de oxidación inicial depende casi en su totalidad de la concentración de sulfato de hierro. Es por ello que la cantidad de sulfato ferroso añadido en el medio de crecimiento influye en el desarrollo de la bacteria.
- El medio óptimo para lograr un crecimiento bacteriano se logra a las siguientes condiciones: 22.2 gr/lit y un pH de 1.8, obteniéndose así el medio 9k modificado.
- El desarrollo a condiciones aeróbicas más la presencia de la bacteria determina la variación del potencial de oxidación y la acidez del medio, generado estos por la reacción, ya sea directa o indirectamente.
- El crecimiento bacteriano, conocido como cinética bacteriana, llega a su máxima población en alrededor de 620 mv, manteniendo ese potencial por unos días, para luego comenzar a decaer, esto debido a que ya no se genera más oxidación por la inhibición de la bacteria, esto causado por falta de sustratos y por la saturación, por lo que podemos decir que la bacteria comienza a morir.
- La adaptación de la bacteria a medios con contenido mineral, se logró hasta un 10% en peso de mineral. Esto debido a que las bacterias al estar expuestas a altas concentraciones de arsénico y por la misma fricción que tiene con las partículas de mineral, se inhiben. Es por ello la importancia de que la adaptación de la bacteria *Acidithiobacillus Ferroxidans* se progresiva.
- Se pudo lograr la oxidación del mineral refractario a través de la bacteria *Acidithiobacillus Ferroxidans*, considerando el 10% de peso de mineral, teniendo en cuenta que la temperatura del medio fue entre 20 °C a 23 °C (temperatura ambiente); la oxidación tuvo un tiempo de 16 días, tiempo en el cual estuvo en agitación constante.

- En la lixiviación aplicada a las dos muestras (1 muestra sin oxidación y la otra previamente oxidada con la bacteria *Acidithiobacillus Ferroxidans*) Se obtuvo una clara diferencia en la recuperación en ambos casos. Teniendo los mismos parámetros en la lixiviación, en la muestra sin oxidar se obtuvo una recuperación de 35.77 %, mientras que la muestra a la que se le oxidó previamente con la bacteria, se obtuvo una recuperación de 77.44%.
- Teniendo la oxidación bacteriana como pre-tratamiento en la lixiviación de minerales refractarios se obtiene un 41.67 % más de recuperación con respecto a la lixiviación al mineral sin tratar; concluyendo que si es factible la aplicación desde este punto de vista.

1.2 RECOMENDACIONES

El estudio de la bacteria *Acidithiobacillus Ferroxidans* es muy amplio, se pueden hacer diversos estudios logrando variados resultados, una de las limitaciones es la inversión para la compra de equipos e insumos para dichos estudios, por lo que se recomienda que se continúen las investigaciones con este tipo de bacteria, no solo a escala laboratorio, sino también a escala piloto e industrial; ya que a través de este tratamiento se puede lograr grandes resultados en las recuperaciones del metal valioso, no solo porque aumenta la recuperación sino también porque es un tratamiento que no contamina el medio ambiente, siendo este un punto muy importante.

CAPITULO VI

FUENTE DE INFORMACION

6.1 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abhilash, B. D., & Pandey, K. A. (2015). *Microbiology for Minerals, Metals, Materials and the Environment*. CRC Press.
- Acevedo, F., & Gentina, J. (2005). *Biolixiviación de minerales de Cobre*. Chile: Editores.
- Alvarez C., J. (2017). “Evaluación de la biooxidación de concentrado arsenopiritico aurifero por pretratamiento con bacterias quimiolitotrofas acidofilas que mejoren la recuperación del oro por cianuración en la empresa minera Eminsol S.A. Bolivia”. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohman. Recuperado el 9 de octubre de 2019, de <https://pdfs.semanticscholar.org/6136/e588c0a35bbb03e8ef28123c09b02091d649.pdf>
- Bernal, C. (2010). *Metodología de la investigación*. Chía: Pearson.
- Brandl, H. (2001). Microbial leaching of metals. *Biotechnology. In: Special Processe, 10*, 191–224.
- Cáceres Arenas, G. (2007). Hidrometalurgia y Electrometalurgia. Atacama, Chile: Universidad de Atacama. Recuperado el 20 de agosto de 2017, de <https://es.slideshare.net/JoseMiguelAliaga/hidrometalurgia-14225553>
- Carrasco, S. (2005). *Metodología de la investigación científica*. Lima: San marcos.
- Castellón Gutiérrez, C. I. (2016). Lixiviación de minerales de cobre con agua de mar. *Geomimet, 43*(324), 21-25. Recuperado el 28 de agosto de 2017, de <https://biblat.unam.mx/pt/buscar/lixiviacion-de-minerales-de-cobre-con-agua-de-mar>
- Chandra, Sekhar, & Gahan. (2012). *Lixiviación recuperación de minerales de cobre*. Chile.
- Coram, N. J., & Rawlings, D. E. (2001). Molecular Relationship between Two Groups of the Genus *Leptospirillum* and the Finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. Dominates South African Commercial Biooxidation Tanks That Operate at 40°C. *Applied and Environmental Microbiology, 68*(2). Recuperado el 10 de octubre de 2019, de <https://aem.asm.org/content/68/2/838.full>
- Dennis R., M. (2016). “Biolixiviación de cobre por bacterias ferrooxidantes a partir de calcopirita en un sistema de columnas de lixiviación por gravedad”, Arequipa: Universidad

- Nacional San Agustín de Arequipa. Recuperado el 5 de octubre de 2019, de <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/1826>
- Domic M., E. (2001). *Hidrometalurgia: fundamentos, procesos y aplicaciones*. Santiago de Chile.
- Donati, E., & Sand, W. (2007). *Microbial Processing of Metal Sulfides*. The Netherlands: Springer.
- Fernández S, S. I. (2007). Optimización del proceso de lixiviación clorurante en medio ácido oxidante de concentrados sulfurados de cobre. *Tesis para optar el grado académico de Magíster en Ingeniería Metalúrgica*. (M. M. Facultad de Ingeniería Geológica, Ed.) Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado el 28 de Agosto de 2017, de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/801/1/Fernandez_ss.pdf
- Gadd, & Geoffrey, M. (2001). *Fungi in Bioremediation*. Cambridge University Press.
- González, R., Gentina, J., & Acevedo, F. (2003). Optimisation of the solids suspension conditions in a continuous stirred tank reactor for the biooxidation of refractory gold concentrates. *Electric Journal of Biotechnology*, 6(3), 233 – 240. Recuperado el 20 de octubre de 2019, de <https://www.redalyc.org/pdf/1733/173314709008.pdf>
- Gordillo E., F., Sanmartín G., V., & Carrión M., F. (2017). “Estudio de microorganismos nativos en procesos de biooxidación de minerales auríferos refractarios”. Recuperado el 25 de Octubre de 2019, de <https://www.aimecuador.org/documentos/biblioteca/articulos/19-estudio-de-microorganismos-nativos-en-procesos-de-biooxidacion-de-minerales-auríferos-refractarios/file.html>
- Groudev, S. N. (1990). Microbiological Transformations of mineral Raw Materials. *Mining, Metallurgy & Exploration*, 16, 19–28. Recuperado el 20 de octubre de 2019, de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03403230#citeas>
- Iglesias, N., Carranza, F., & I., P. (1998). “La biolixiviación como pretratamiento de menas auríferas refractarias en matriz de sulfuros. *Rev. Metal. Madrid*, 34(1). Recuperado el 22 de octubre de 2019, de <https://core.ac.uk/download/pdf/51384519.pdf>
- Juárez A., A. (2004). “Biolixiviación de minerales sulfuro-ferroso en jales: aislamiento caracterización de cultivos puros mixtos de microorganismos involucrados”, Colima, México: Universidad de Colima. Recuperado el 5 de Octubre de 2019, de <http://bvirtual.ucol.mx/consultaxcategoria.php?categoria=3&id=5508&seccion=1>

- Meruane N., G. (2002). Oxidación Bacteriana De Sulfato Ferroso Con Acidithiobacillus Ferrooxidans. Santiago de Chile: Universidad De Chile. Recuperado el 5 de octubre de 2019, de <http://repositorio.conicyt.cl/handle/10533/178933>
- Mohee, R., & Mudhoo, A. (2012). *Bioremediation and Sustainability: Research and Applications*. Canada: Scrivener - Wiley.
- Muñoz, J., Gonzalez, F., Blazquez, M., & Ballester, A. (1995). A study of the bioleaching of a Spanish uranium ore. Part I: A review of the bacterial leaching in the treatment of uranium ores. *Hydrometallurgy*, 38, 39-57. Recuperado el 23 de Octubre de 2019, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0304386X94000396>
- Norman W., L., & Corale L., B. (1978). Bacterial Leaching. *Critical Reviews in Microbiology*, 6(3), 207-262. Recuperado el 15 de Octubre de 2019, de <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10408417809090623>
- Orrantía B., E. (1997). “Aislamiento y caracterización de cepa de thiobacillus ferrooxidans con alta resistencia a arsénico y su utilización en la recuperación de oro a partir de concentrados de pirita y arsenopirita”. Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nueva León. Recuperado el 7 de Octubre de 2019, de <https://docplayer.es/42130235-Universidad-autonoma-de-nuevo-leon-facultad-de-ciencias-biologicas.html>
- Ospina, J., Mejía, E., Osorno, L., Márquez, M., & Morales, A. (2012). Biooxidación de concentrados de arsenopirita por Acidithiobacillus ferrooxidans en Erlenmeyer agitados. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 135-145. Recuperado el 22 de Octubre de 2019, de <https://www.redalyc.org/pdf/776/77624081012.pdf>
- Pal, S., Pradhan, D., Das, T., Sukla, L., & Chaudhury, G. (2009). Bioleaching of low-grade uranium ore using Acidithiobacillus ferrooxidans. *Indian J Microbiol*, 50, 70-75. Recuperado el 2 de octubre de 2019, de <https://link.springer.com/article/10.1007/s12088-010-0015-z>
- Panduro T., I., & Peña Q., M. (2015). “Aislamiento de cepas de acidithiobacillus ferrooxidans para la recuperación de metales de minerales sulfurados”. Huancayo: Universidad Nacional del Centro del Perú. Recuperado el 10 de octubre de 2019, de <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/3745>
- Pimienta, J. (2012). *Metodología de la investigación*. México: Pearson Educación.

- Ramírez O., L. (2015). Biolixiviación del cobre en minerales sulfurados refractarios como proceso preliminar para la lixiviación de oro por cianuración. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado el 17 de Octubre de 2019, de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/5763/Ramirez_ol.pdf?sequence=1
- Rawlings, D. (2005). Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories*, 4(13). Recuperado el 11 de octubre de 2019, de <https://link.springer.com/article/10.1186/1475-2859-4-13#citeas>
- Rawlings, D. E. (1997). *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes*. New York: Springer.
- Schippers, A., Rohwerder, T., & Sand, W. (1999). Intermediary sulfur compounds in pyrite oxidation: implications for bioleaching and biodepyritization of coal. *Appl Microbiol Biotechnol., Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 104–110. Recuperado el 13 de octubre de 2019, de <https://link.springer.com/article/10.1007/s002530051495#citeas>
- Torma, A. (1977). The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in hydrometallurgical processes. *Advances in Biochemical Engineering*, 6, 1-37. Recuperado el 14 de octubre de 2019, de https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-08363-4_1
- Torma, A. (1977). *The role of Thiobacillus ferrooxidans in hydrometallurgical processes*. *Adv. Biochem.*
- Velásquez Yévenes, L. (junio de 2015). “Lixiviación de minerales sulfurados de cobre en medios clorurados”, *Proyecto de investigación*. (U. C. Norte, Ed.) Chile: Departamento de Ingeniería Metalúrgica y Mina. Recuperado el 30 de Agosto de 2017, de <http://www.noticias.ucn.cl/destacado/agua-de-mar-clave-para-la-explotacion-mas-eficiente-de-sulfuros-de-cobre/>

ANEXO

Anexo - 01

TINCIÓN GRAM

La tinción de Gram es un procedimiento bastante usado para buscar la presencia de bacterias en diferentes muestras, estas se caracterizan como Gram positivas o Gram negativas, esto es en base a las propiedades químicas y físicas que presentan sus paredes celulares.

La tinción de Gram, lleva ese nombre por el científico danés Hans Christian Gram (1853 – 1938), quien desarrolló esta técnica en 1882 y la publicó en 1884, ya que lo uso como una técnica para poder distinguir entre dos tipos de bacterias con síntomas clínicos similares que estaba estudiando: las bacterias *Streptococcus pneumoniae* (también conocida como neumococo) y la *Klebsiella pneumoniae*.

Tabla 28. *Materiales y reactivos*

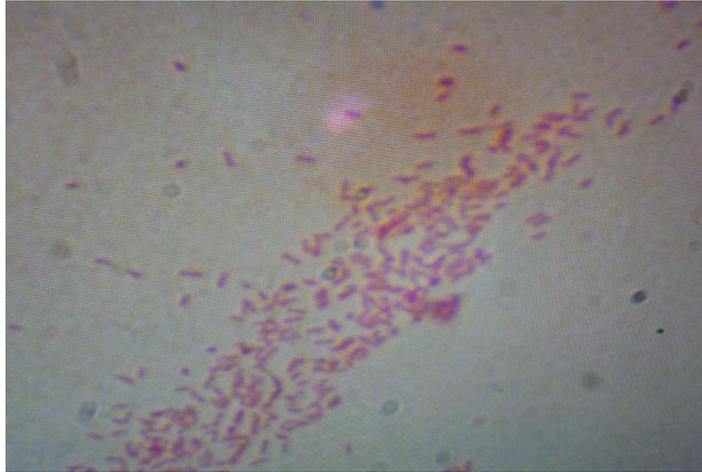
MATERIALES	REACTIVOS
Portaobjetos	Cristal Violeta
Micro pipeta	Lugol
Mechero	Decolorante
Microscopio	Gram
Asa Bacteriológica	Safranina

PROCEDIMIENTO:

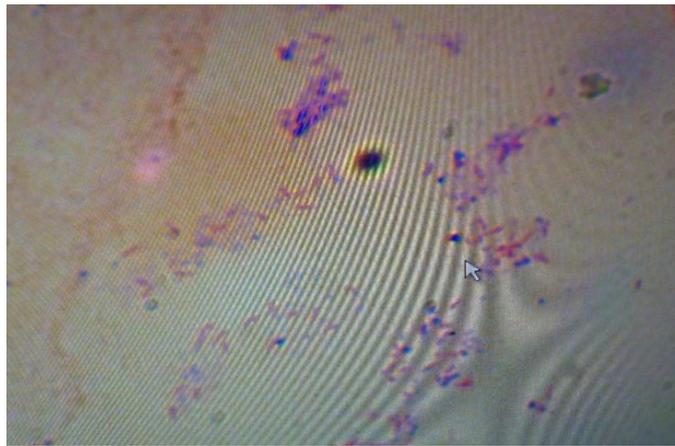
- 1) Con la ayuda de un mechero, flamear un asa bacteriológica y esperar que enfríe un poco.
- 2) Tomar el asa (previamente flameada) y con ésta tomar un poco de muestra.
- 3) Una vez obtenida una pequeña cantidad de la muestra (con el asa), hacer que ésta tenga contacto con una lámina portaobjetos, la cual servirá para depositar la muestra contenida en el asa.
- 4) Proceder a realizar la extensión de la muestra en el portaobjetos mediante movimientos giratorios (dar vueltas con el asa) sobre la lámina, hasta que la muestra quede en la parte media de la lámina.

- 5) Secar la muestra con ayuda del mechero para fijar la muestra, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo (sólo se pasa por la llama), puesto que el calor excesivo puede cambiar la morfología celular de las bacterias a observar. El calor deseable es aquél en el que el portaobjetos sea apenas demasiado caliente para ser colocado sobre el dorso de la mano.
- 6) Adicionar un colorante primario o principal (cristal violeta), éste colorea a los microorganismos cargados negativamente por tratarse de un colorante básico. Enjuagar con agua destilada
- 7) Añadir el mordiente (Iugol), éste determina que el colorante primario actúe con mayor intensidad. El Iugol se combina con un constituyente celular y lo altera de tal modo que ahora podrá colorear el colorante principal. En las células gram negativas, los lípidos de la pared (más abundantes que en las células gram positivas) se disuelven por este tratamiento, lo que permite la salida del complejo de cristal violeta con el yodo del Iugol. Enjuagar con agua destilada.
- 8) Agregar el agente decolorante gram, que es un solvente orgánico (alcohol-cetona). El alcohol y/o acetona empleados para aclarar, deshidrata las paredes de los microorganismos gram positivos, tratados con mordiente, y forma una barrera que la laca no puede atravesar. Enjuagar con agua destilada.
- 9) Finalmente adicionar un color secundario o contracolor (Safranina); tinte básico, cuyo color contrasta con el color primario. Enjuagar con agua destilada

Dependiendo del resultado de esta tinción, las bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos: Gram positiva y Gram negativas. Una vez terminada la técnica de tinción de Gram, las bacterias Gram positivas aparecen de color morado mientras que las Gram negativas presentan un color rosado (Figura 4.43) estas diferencias en la tinción de Gram se deben a diferencias en la estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas de tal modo que el alcohol es capaz de decolorar el celular Gram negativas, pero no las Gram positivas.

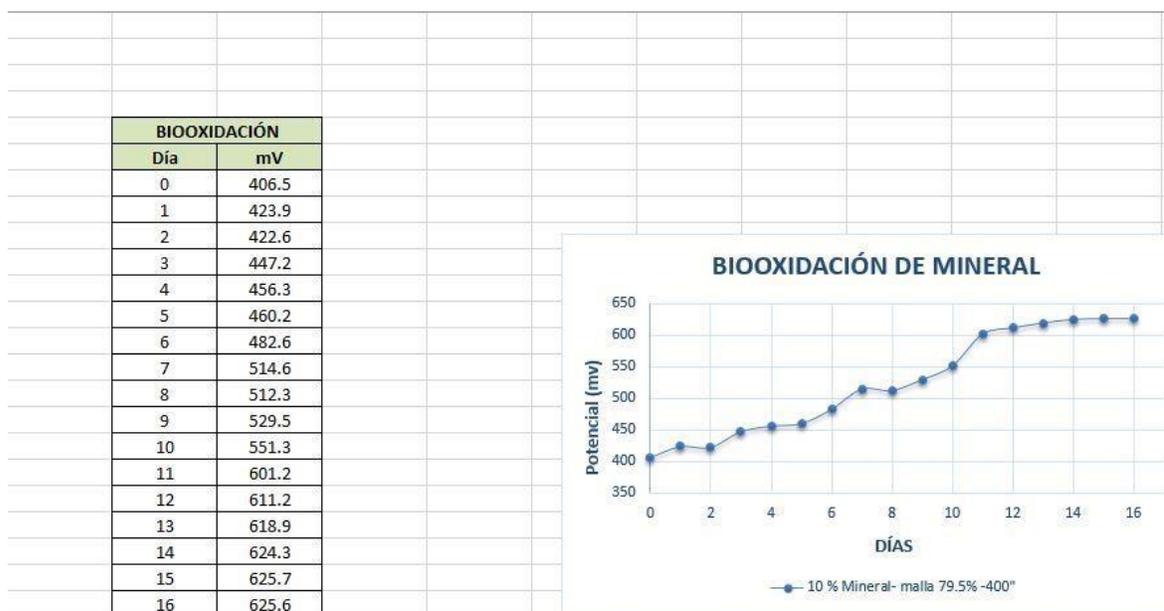


*Fig. 38. Comparación Imagen de bacterias de orden Gram Negativas en microscopio, identificadas por su color rosado.
Fuente Propia.*



**Fig. 39. Comparación. Imagen de bacterias Gram Negativas (color rosado) y bacterias Gram Positivas (color morado).
Fuente Propia.**

Anexo - 02



➤ Reactivos

- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – Sulfato de hierro heptahidratado
- NH_4SO_4 - Sulfato de amonio
- K_2HPO_4 - Fosfato ácido de potasio
- $MgSO_4$ - Sulfato de magnesio
- $NaCN$ - Cianuro de Sodio
- $AgNO_3$ - Nitrato de plata

PRUEBA DE LIXIVIACIÓN DE MINERAL REFRACTARIO PREVIA OXIDACIÓN													
Datos:												FCN= $0.25 \cdot \text{AgNO}_3 / \text{Vmuestra}$	%
% So:	20.00%	PH:		10.8						Ph Mineral:		2.14	
Wmineral:	120	Vel. Agitació		400 RPM									
Wagua:	480	NaCN:		2000 ppm		0.8 gr		inical		8 ml CN al 10%			
Vmuestra	5 ml												
			CIANURO DE SODIO (gr)				Volumen	Agua			consumo	Consumo	
Hora	Vmuestra	AgNO ₃ (ml)	Libre	Removido	Consumido	Agregar	(ml)	Añadir	Ph	Cal (gr)	(Kg/tn)	(Kg/Tn)	
0	0	0			0.8	0.8	8.0		10.9	5.164	43.03	6.67	
1	5	0.4	0.096	0.001	0.704	0.705	7.1	-2.1	8.5	0.777	6.48	5.87	
2	15	1.6	0.384	0.012	0.416	0.428	4.3	10.7	10.34	0.36	3.00	3.47	
4	15	2.1	0.504	0.016	0.296	0.312	3.1	11.9	10.61	0.089	0.74	2.47	
6	5	2	0.480	0.005	0.32	0.325	3.3	1.8	10.5	0.266	2.22	2.67	
8	15	2.6	0.624	0.020	0.176	0.196	2.0	13.0	11.83	0	0	1.47	
12	15	2.7	0.648	0.020	0.152	0.172	1.7	13.3	10.72	0.06	0.5	1.27	
24	22.5	1.6	0.384	0.018	0.416	0.434	4.3	18.2	10.78	0.04	0.333333	3.47	
32	5	1.5	0.360	0.004	0.44	0.444	4.4	0.6	10.66	0.128	1.066667	3.67	
48	15	1.5	0.360	0.011	0.44	0.451	4.5	10.5	10.63	-	-		
											31.00		

Anexo – 03: Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLE	METODOLOGÍA	POBLACIÓN Y MUESTRA
General	General	General	Independiente		
¿En qué medida afectará la recuperación del oro a partir de un mineral aurífero refractario, aplicando la biooxidación como pre-tratamiento a comparación del método de lixiviación convencional?	Proponer la aplicación de un pre tratamiento como es la biooxidación para dar una mejora a la lixiviación de un mineral aurífero refractario.	La biooxidación como pre tratamiento a un mineral refractario para su posterior lixiviación nos ayudará a mejorar la recuperación del oro a comparación del método de lixiviación convencional.	<ul style="list-style-type: none"> • Sustratos • Inoculo de bacteria • Concentración de Cianuro • Tiempo 		
Específico	Específico	Específico	Dependiente		
<ul style="list-style-type: none"> • ¿En qué medida afectará el aislamiento de bacteria acidithiobacillus ferrooxidans en la biooxidación como pre-tratamiento en comparación del método de lixiviación convencional sobre la recuperación de oro a partir de un mineral aurífero refractario? • ¿En qué medida afectará la aplicación de bacteria acidithiobacillus ferrooxidans en la biooxidación como pre-tratamiento en comparación del método de lixiviación convencional sobre la recuperación de oro a partir de un mineral aurífero refractario? 	<ul style="list-style-type: none"> • Evaluar en qué medida afectará el aislamiento de bacteria acidithiobacillus ferrooxidans en la biooxidación como pre-tratamiento en comparación del método de lixiviación convencional sobre la recuperación de oro a partir de un mineral aurífero refractario. • Evaluar en qué medida afectará la aplicación de bacteria acidithiobacillus ferrooxidans en la biooxidación como pre-tratamiento en comparación del método de lixiviación convencional sobre la recuperación de oro a partir de un Mineral aurífero refractario 	<ul style="list-style-type: none"> • Afectará el aislamiento de bacteria acidithiobacillus ferrooxidans en la biooxidación como pre-tratamiento de un mineral aurífero refractario para su posterior lixiviación nos ayudara a mejorar la recuperación de oro en comparación del método de lixiviación convencional. • Afectará la aplicación de bacteria acidithiobacillus ferrooxidans en la biooxidación como pre-tratamiento de un mineral aurífero refractario para su posterior lixiviación nos ayudará a mejorar la recuperación de oro a partir del método de lixiviación convencional. 	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento bacteriano • Grado de oxidación del mineral refractario • % Recuperación 	La investigación es netamente experimental, ya que para la obtención de datos se realizarán pruebas en laboratorio	<p>Población: La población es el relave aurífero refractario proveniente de yacimientos mesotermales.</p> <p>Muestra: La muestra representativa será muestreada lo suficiente para realizar las pruebas a nivel laboratorio.</p>