



**MCIA**  
Maestría en Ciencias  
en Ingeniería Ambiental  
UMSNH

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental

Facultad de Biología  
Facultad de Ingeniería Civil  
Facultad de Ingeniería Química

“Biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre”  
Tesis

Que presenta:

**I.BQ. Janitzi Yunuén Meza Ramírez**

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias en Ingeniería Ambiental**

Asesor:

D.C. Juan Manuel Sánchez Yáñez  
Laboratorio de Microbiología Ambiental  
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Coasesor:

D.C. José Luis Rico Cerda  
Laboratorio de Catálisis y Cinética Química  
Posgrado de Ingeniería Química

## *Reconocimiento*



### UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO *Cuna de héroes, crisol de pensadores*

Esta investigación fue desarrollada en las instalaciones de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo:



Asesoría:

D.C. Juan Manuel Sánchez Yáñez  
Laboratorio de Microbiología Ambiental  
Instituto de Investigaciones Químico-biológicas



Coasesoría:

D.C. José Luis Rico Cerda  
Laboratorio de Catálisis y Cinética Química  
Posgrado de Ingeniería Química



Colaborador:  
D.C. Ramiro Escudero García  
Laboratorio de Análisis Químico  
Laboratorio de Procesamiento de Dispersiones  
Instituto de Investigación en Metalurgia y  
Materiales



Apoyo financiero:  
Proyecto 2.7 (2018)  
Coordinación de la Investigación Científica



Programa de Maestría en  
Ciencias en Ingeniería Ambiental  
= 2015-2017 =



Apoyo económico a trabajos de investigación  
realizados en el Laboratorio de Microbiología  
Ambiental

# *Dedicatoria*



A los que en mi creyeron, y de mi dudaron.

# *Agradecimientos*



A Dios, por cada obstáculo que tuve durante esta etapa.

*“Porque la pruebas te hacen fuerte, la penas te hacen humanos y los fracasos te hacen humildes”*

A mis padres, otro logro suyo y no mío.

A mi novio Julio César, por cada momento de apoyo.

A mis compañeros del laboratorio: Celeste, Guidier, Zoila, Alejandra, Andrea, Arely, Jannet, Alberto, Arely,

Al Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez por ser una parte fundamental en mi formación profesional y personal

A mis sinodales: Dr. José Luis Rico, Dr. Rodolfo FaríaS, Dra. Liliana Márquez y M.C. Diana Cecilia, gracias por la paciencia y apoyo en mi

Al Programa de Formación de Alto Nivel para la Administración Pública Federal por el “Convenio Gobierno de la República - CONACYT”, a la Delegación Estatal de la SAGARPA en Michoacán

A mis jefes: M.V.Z. Ignacio Gamiño Moreno e Ing. Jes gracias por su apoyo, confianza y porque sin ellos esto jamás habría sido posible

A todas personas de las recibí apoyo.

## Índice

Índice de figuras .....	8
Índice de tablas.....	10
Resumen .....	12
Abstract .....	13
1. Introducción .....	15
2. Antecedentes.....	16
3. Justificación.....	21
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivos.....	21
6. Materiales y métodos.....	22
6.1 Obtención de muestras de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre 23	
6.2 Caracterización de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre .....	24
<i>Difracción de rayos X</i> .....	24
<i>Espectroscopía de absorción atómica en flama</i> .....	24
<i>Difracción de rayo láser</i> .....	24
6.3 Aislamiento de hongos biolixiviantes de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	24
6.4 Caracterización de hongos aislados a partir de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	25
6.5 Adaptación de los hongos a pH ácido y elevada concentración de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	26
6.6 Lixiviación química de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre con cianuro de sodio (NaCN) .....	26
6.7 Biolixiviación fúngica en agitación de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	27
6.8 Biolixiviación fúngica con adición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	28
6.9 Biolixiviación fúngica con enriquecimiento en el medio de cultivo de piloncillo, peptona de caseína y extracto de levadura para minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre .....	28
6.10 Técnicas analíticas de alta precisión para la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	28

Determinación de ácido cítrico.....	29
7. Resultados.....	31
7.1 Caracterización mineralógica de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	31
7.1.1 Tamaño de partícula (Difracción de rayos láser).....	31
7.2 Caracterización química cualitativa por difracción de rayos X.....	32
7.3 Análisis químico cuantitativo de Au, Ag y Cu en los minerales sulfurados refractarios por absorción atómica.....	33
7.4 Aislamiento microbiano a partir de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	34
7.4.1 Dinámica del pH en el aislamiento de hongos a partir de los MISUREPOCU. 35	
<i>Dinámica del Eh en el aislamiento de hongos.....</i>	36
7.5 Caracterización macroscópica de los hongos aislados a partir de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	37
7.6 Adaptación de los consorcios fúngicos a elevadas concentraciones de minerales y bajos valores de pH.....	43
7.7 Lixiviación química de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre con cianuro de sodio.....	45
7.8 Biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre en agitación.....	49
7.9 Biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre con adición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53
7.10 Optimización de la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	58
7.11 Biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre con enriquecimiento de piloncillo. peptona de caseína y factor de crecimiento.....	60
8. Conclusiones.....	67
9. Referencias.....	68
Anexos.....	77
A. Determinación del tamaño de partícula de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre por difracción de rayos láser.....	78
B. Determinación de la composición química de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre por difracción de rayos X.....	80

## Índice de figuras

Figura 1. Diagrama general de la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	22
Figura 2. Dinámica del pH en la biolixiviación de minerales sulfurados refractarios de Au, Ag y Cu.....	35
Figura 3. Dinámica del Eh en el aislamiento de hongos en suelo y minerales.....	36
Figura 4. Morfología de <i>Penicillium</i> sp: a) aislado de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre, b) <i>Penicillium</i> – Atlas virtual de micología c) Partes de <i>Penicillium</i> : conidias, fiálides y métula. ....	39
Figura 5. Morfología de <i>Aspergillus</i> sp a) aislado de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre, b) <i>Aspergillus</i> – Atlas virtual de micología c) Partes de <i>Aspergillus</i> : conidias, fiálides, métula, vesículas, conidióforos. ....	40
Figura 6. Morfología de <i>Trichoderma</i> sp a) aislado de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre, b) <i>Trichoderma</i> sp – Atlas virtual de micología c) Partes de <i>Trichoderma</i> sp m: conidias, fiálides y conidióforo. ....	41
Figura 7. Dinámica de la extracción de Ag de minerales sulfurados refractarios por la lixiviación química con cianuro de sodio. ....	45
Figura 8. Dinámica de la extracción de Au (ppm) a partir de minerales sulfurados refractarios durante la lixiviación química con NaCN. ....	46
Figura 9. Dinámica de la extracción de Cu (ppm) a partir de minerales sulfurados refractarios durante la lixiviación química con NaCN. ....	47
Figura 10. Dinámica de la extracción de Cu (ppm) a partir de M4 durante la lixiviación química con cianuro de sodio. ....	47
Figura 11. Dinámica del pH durante la biolixiviación fúngica en agitación de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre. ....	49
Figura 12. Dinámica del Eh durante la biolixiviación fúngica en agitación de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre. ....	50
Figura 13. Cuantificación de ácido cítrico producido durante la biolixiviación fúngica en agitación con los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	51

Figura 14. Dinámica del pH en la biolixiviación fúngica con adición de peróxido de hidrógeno de minerales sulfurados refractarios de oro y plata. ....	54
Figura 15. Dinámica del Eh en la biolixiviación fúngica con adición de peróxido de hidrógeno de minerales sulfurados refractarios de oro y plata. ....	55
Figura 16. Cuantificación de la producción de ácido cítrico en la biolixiviación fúngica con adición de peróxido de hidrógeno de minerales sulfurados refractarios de oro y plata. ....	57
Figura 17. Dinámica del pH en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento. ....	61
Figura 18. Dinámica del Eh en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento. ....	62
Figura 19. Cuantificación del ácido cítrico en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento. ....	63
Figura 20. Cuantificación de Au en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento en el medio de cultivo. ....	64
Figura 21. Cuantificación de Ag en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento en el medio de cultivo. ....	65
Figura 22. Cuantificación de Cu en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento en el medio de cultivo. ....	65
Figura 23. Distribución de tamaño de partícula del M1, $d_{80} = 15.7 \mu\text{m}$ . ....	78
Figura 24. Distribución de tamaño de partícula del M2, $d_{80} = 25.3 \mu\text{m}$ . ....	78
Figura 25. Distribución de tamaño de partícula de la "M3" $d_{80} = 15.7 \mu\text{m}$ . ....	79
Figura 26. Distribución de tamaño de partícula del M4, $d_{80} = 27.4 \mu\text{m}$ . ....	80
Figura 27. Difractograma de rayos X de M1. ....	80
Figura 28. Difractograma de rayos X de M2. ....	82
Figura 29. Difractograma de rayos X de M3. ....	83

Figura 30. Difractograma de rayos X de M4.....	84
--	----

## Indice de tablas

Tabla 1. Principales propiedades bioquímicas de la biolixiviación bacteriana de minerales sulfurados de oro, plata. ....	19
Tabla 2. Propiedades bioquímicas de la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados de oro, plata y cobre. ....	20
Tabla 3. Muestras colectadas de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre. ....	23
Tabla 4. Aislamiento de hongos de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre. ....	25
Tabla 5. Diseño experimental de la biolixiviación de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre en agitación, con adición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y/o con enriquecimiento del medio de cultivo con piloncillo, peptona de caseína y extracto de levadura.....	27
Tabla 6. Técnicas analíticas realizadas antes, durante y después de la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	29
Tabla 7. Comparativa de los tamaños de partículas de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	31
Tabla 8. Comparativa de la composición mineralógica de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.....	33
Tabla 9. Cuantificación de oro, plata y cobre por absorción atómica de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre. ....	34
Tabla 10. Morfología colonial de los hongos utilizados en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre. ....	38
Tabla 11. Relación de los géneros y especies consorcios fúngicos en los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre. ....	42
Tabla 12. Dinámica de la adaptación fisiológica de los hongos a elevadas concentraciones de minerales y bajos valores de pH. ....	43
Tabla 13. Comparativa de la extracción de Au, Ag y Cu a partir de minerales sulfurados refractarios a 72 h por lixiviación con NaCN. ....	48

Tabla 14. Concentración de metales al final de la biolixiviación fúngica en agitación de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre. .... 53

Tabla 16. Comparativa de la cuantificación de oro, plata y cobre en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre en agitación y adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 días. .... 59

## Resumen

La extracción de metales a partir de minerales sulfurados refractarios de Au (oro), Ag (plata) y Cu (Cobre) (MISUREPOCU), por métodos fisicoquímicos son costosos y además, causan contaminación ambiental. Una opción ecológica para disminuir el impacto negativo de la extracción de los metales, es la biolixiviación (BLX) por hongos que indirectamente solubilizan metales. Por lo que los objetivos de este trabajo fueron: i) aislar consorcios fúngicos a partir de MISUREPOCU, ii) adaptar los consorcios fúngicos a elevadas concentraciones de MISUREPOCU y iii) optimizar la cinética de la BLX mediante consorcios fúngicos por enriquecimiento del medio de cultivo lixivante. Para ello, muestras de MISUREPOCU, fueron caracterizados cualitativamente y cuantitativamente por absorción atómica, difracción de rayos X y difracción de rayos láser. Las variables respuesta fueron: el potencial redox (Eh), la generación de ácido cítrico por los hongos y los metales en solución. Para ello, los consorcios fúngicos aislados a partir de los MISUREPOCU, fueron utilizados en tres ensayos distintos de BLX: 1) En medio de cultivo estrictamente mineral en agitación por 28 días, 2) En medio de cultivo estrictamente mineral y con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 28 días y 3) En medio de cultivo mineral, enriquecido con una fuente de C orgánico como el piloncillo 5 %, fuente de N orgánico como la peptona de caseína 1 % y un factor de crecimiento como el extracto de levadura 0.5 %, en agitación y con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 21 días. Los resultados de la BLX fúngica, mostraron que el nivel de solubilización de MISUREPOCU aumentó cuando el medio cultivo lixivante se enriqueció con piloncillo, peptona de caseína y un factor de crecimiento, en agitación y con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que generó una cantidad de ácido cítrico suficiente para la máxima lixiviación de Cu 154.25 ppm, Au 0.006 ppm y Ag 0.006 ppm, en comparación con la lixiviación química (LXQQ), lo cual apoya que es posible usar la BLX fúngica como

opción de la BLX bacteriana, así pues, la BLX fúngica es por tanto un nueva alternativa biotecnológica sustentable.

**Palabras clave:** Biolixiviación fúngica, biohidrometalurgia, ácido cítrico, minerales sulfurados refractarios.

### **Abstract**

The metals extraction of sulfur-refractory mineral of Au (gold), Ag (silver) and Cu (Copper) (MISUREPOCU), by physicochemical methods are costly and also cause environmental pollution. An ecological option to reduce negative impact of metals extraction, that is, bioleaching (BLX) by fungi that indirectly solubilize metals. The general objectives are: ii) to adapt the logical consortiums to elevated MISUREPOCU and iii) to optimize kinetics of BLX through fungal consortia for enrichment the leaching culture medium. For this, MISUREPOCU samples were characterized qualitatively and quantitatively by atomic absorption, X-ray diffraction and laser diffraction. The response variables were: the redox potential (Eh), the generation of citric acid by the fungi and the metals in solution. To this end, the fungal consortia isolated from MISUREPOCU were used in three different BLX trials: 1) In a strictly mineral culture medium in agitation for 28 days, 2) In a strictly mineral culture medium and with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition for 28 days. and 3) culture medium with 5% source of organic N as the casein peptone 1% and a growth factor as yeast extract 0.5%, in agitation and with addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 21 days. The results of fungal BLX, demonstrated that level of solubilization of MISUREPOCU showed when leaching culture medium was enriched with brown sugar, casein peptone and a growth factor, in agitation

and with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition, which generated an amount of acid citric sufficient for maximum leaching of Cu 154.25 ppm, Au 0.006 ppm and Ag 0.006 ppm, compared to chemical leaching (LXQ), which supports that it is possible to use fungal BLX as an option of bacterial BLX, thus, the BLX fungal is therefore a new sustainable biotechnological alternative.

Key words: Fungal bioleaching, biohydrometallurgy, citric acid, refractory sulphide minerals.

## 1. Introducción

Actualmente, los procesos hidrometalúrgicos y pirometalúrgicos, son utilizados para la recuperación de metales valiosos como el Au (oro), la Ag (plata) y el Cu (Cobre) a partir de minerales sulfurados refractarios (MISUREPOCU), que utilizan sustancias oxidantes como el O<sub>2</sub> (Oxígeno), HCl (ácido clorhídrico) y HNO<sub>3</sub> (ácido nítrico), donde generalmente, es necesario aumentar temperatura y presión, lo cual, aumenta el costo operativo (Gramatyka *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2011). Así pues, las tecnologías que existen en la actualidad para la obtención de metales a partir de MISUREPOCU son costosas y dañan el ambiente. Una opción que ofrece la biohidrometalurgia, es la aplicación de la lixiviación biológica o biolixiviación (BLX), que utiliza hongos para la solubilización de los minerales (Falco *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2008; Madrigal-Arias *et al.*, 2015). La tendencia general en la investigación de la BLX de MISUREPOCU es la utilización de bacterias quimiolitotróficas en cultivos axénicos como *Acidithobacillus thiooxidans* o *A. ferrooxidans*, sin embargo, el trabajo que a continuación se describe es original, pues se utilizan consorcios fúngicos aislados de MISUREPOCU, que por su metabolismo heterotrófico sintetizan ácidos orgánicos como el ácido cítrico, para la disolución de los minerales en la liberación de los metales. De tal manera que, es mínima la investigación sobre la BLX fúngica de MISUREPOCU con cultivos axénicos, donde se reporta la utilización de una fuente orgánica de C (carbono), sin embargo, en la búsqueda de información no fue encontrado algún trabajo donde se realice la BLX fúngica en consorcios de MISUREPOCU, lo que hace de esta investigación más novedosa, se sabe además, que la autotrofia heterótrofa obliga a los hongos a invertir mayor tiempo y energía para la síntesis de sus componentes (Gómez *et al.*, 1999; Ospina-Correa *et al.*, 2011; Sethurajan *et al.*, 2017) por lo que se sugiere la necesidad de agregar una fuente de carbono orgánico de bajo costo para evitar incrementar su costo operativo.

## 2. Antecedentes

La literatura reporta trabajos relacionados a la BLX de minerales que contienen metales donde utilizan géneros bacterianos en cultivos axénicos, sin embargo, es poca la información publicada sobre el aprovechamiento de hongos que lixivian MISUREPOCU como se realiza en este trabajo:

- Castro *et al.*, (2000) reportaron la BLX fúngica de silicatos de calamina y garnierita con *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp de forma axénica, en un medio de cultivo (g/L) con: sacarosa 150, MgSO 0.25, NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 g, 2,4 ZnCl, 1,3 mg de FeCl. La BLX fúngica fue comparada con la lixiviación química (LXQ) al medio de cultivo que se enriqueció con 0.8 mg/L de ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>). Al término de 15 días, la LXQ recuperó Zn (cinc) y Ni (níquel) en menor proporción con 20 y 24 % respectivamente, en comparación con la BLX fúngica con *Aspergillus* sp que biolixivió hasta 72 y 78 % de Zn y Ni respectivamente, con 7.3 mg/L de C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.
- Valix *et al.*, (2001) reportaron la BLX fúngica de minerales de laterita con *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp y *Candida tropicalis* en cultivos axénicos en el medio de cultivo que se basó en glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) 9.1%, como fuente de carbono, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, KCl 0.04%, MgSO<sub>4</sub>H<sub>4</sub> 0.04% y elementos traza 0.04%; y fue comparada con la LXQ sin hongos pero con ácidos orgánicos como el C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> y oxálico (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>). El experimento se realizó con 10 % de concentración de mineral en el medio de cultivo a 30 °C, durante 60 días y en agitación a 180 rpm, en comparación con la LXQ. Los resultados mostraron que la BLX fúngica logró una máxima la liberación de 79.5 % de Ni, 71 % de Co y 50 % de Fe, con *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp, en comparación con la LXQ que liberó 36 % de Ni, 54 % de Co

y 76 % de hierro (Fe). Con lo anterior, se afirma que la BLX fúngica es más eficaz en comparación con la LXQ.

- Mulligan *et al.*, (2004) investigaron la BLX fúngica de minerales de baja ley con *Aspergillus niger* en cultivo axénico con un medio de cultivo con sacarosa, fructosa, glucosa, lignina, hemicelulosas y almidón con pectinas, tamizados como fuentes de C, esto comparado con la LXQ sin hongos con  $C_6H_8O_7$  y con  $C_2H_2O_4$  10 %. El experimento se realizó con 10 g/L de minerales, a 121 °C, por 20 min y en agitación de 150 rpm. Los resultados demostraron que la BLX fúngica con *A. niger* y el almidón generó la mayor cantidad de ácidos orgánicos para la solubilización de metales, que fue de 68 % de Cu, 46 % de Zn y 34 % de Ni, comparado con la LXQ sin hongos pero con ácidos orgánicos que solubilizaron Cu un 22 %, 10 % de Zn y 60 % de Ni.
- Anjum *et al.*, (2009) reportaron la BLX fúngica de minerales de esquisto negro con *Penicillium notatum*, esto comparado con el enriquecimiento del medio de cultivo con ácidos orgánicos con  $C_6H_8O_7$ ,  $H_2C_2O_4$ , ácido tartárico ( $H_5O_6C_4$ ) y ácido málico ( $C_4H_6O_5$ ). El medio de cultivo para los hongos consistió en (g / L):  $KH_2PO_4$  5,0;  $NH_4NO_3$  2,0;  $NH_4_2SO_4$  4,0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,2; peptona, 2,0; citrato trisódico, 2,5; extracto de levadura, 1,0. El experimento se realizó a 28 °C, durante 33 días, en agitación a 120 rpm y al medio de cultivo se agregó glucosa y melaza como fuente de C para *P. notatum*. Los resultados mostraron que la BLX con *P. notatum* que generó ácidos orgánicos, que permitieron la solubilización de Cu en 49.3 %, Zn 79.11 % y 53.51 % de Co, a diferencia de la LXQ que solubilizó 54.27 % de Co, 35.16 % de Zn y 51.22 % de Cu.

- Anjum *et al.*, (2010), reportaron los resultados de la BLX fúngica de lutita negra utilizando *A. niger* por su capacidad de generar ácidos orgánicos efectivos para la solubilización de iones metálicos. El medio de cultivo para los hongos consistió en (g / L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5,0;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2,0;  $\text{NH}_4\text{2SO}_4$  4,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2; Peptona, 2,0; citrato trisódico, 2,5; extracto de levadura, 1,0. Se utilizó como sustratos cáscara de mango, salvado de arroz y glucosa. Al término de 36 días, la solubilización máxima de cobre (68.5%), zinc (49.0%) y cobalto (60.4%) se logró en los medios que contienen como sustratos.

En la literatura existente sobre la BLX fúngica, sugiere que la eficiencia de lixiviación de microorganismos heterotróficos como los hongos, depende de la producción de metabolitos orgánicos que se excretan en los medios de cultivo y disminuyen el pH (Kiel y Schwartz, 1980). Las cepas de hongos que se adaptaron a elevadas concentraciones de minerales, mostraron mejores resultados de lixiviación en comparación con aquellos que no fueron adaptados. Esto apoya informes previos de que la adaptación de microorganismos es útil para la mejorar la cinética de la BLX de MISUREPOCU (Valix *et al.*, 2001a). Durante el crecimiento del hongo, los ácidos orgánicos (ácido oxálico, ácido cítrico, ácido glucónico, etc.) se excretan y posteriormente disuelven metales pesados formando sales y quelatos (Tzeferis y Agatzini-Leonardou, 1994; Bosecker, 1985; Avakyan y Rabotnova, 1971; Valix *et al.* Al., 2001b). Este hecho fue confirmado ya que se encontró que *A. niger* produjo más ácido y disolvió más minerales. Los microorganismos solubilidad metales por (i) formación de ácido orgánico, (ii) reacciones de oxidación-reducción, (iii) extracción por agentes de complejidad, (iv) formación de quelatos. (Bosecker, 1985, Avakyan y Rabotnova, 1971, Valix *et al.*, 2000a, 2001b).

En la tabla 1 se muestran las principales propiedades bioquímicas de la BLX bacteriana, de MISUREPOCU la que se basa en el metabolismo quimiolitotrófico de una amplia diversidad genética de géneros y especies, las que generan energía a partir de la oxidación lenta (con una velocidad de crecimiento de 22 días), de elementos y compuestos reducidos del S (azufre) que les permite liberar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> un ácido fuerte, que causa acidez extrema. Lo anterior, favorece la disolución de minerales para la solubilización de metales como Au, Al, Ag, Cu, Co, Zn, se realice eficazmente, durante la oxidación de minerales de S, obtiene la energía para la fijación de CO<sub>2</sub> (autotrofia) usada como fuente de C (carbono), así como para fijar N<sub>2</sub>, para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, sin depender de vitaminas del complejo B como factor de crecimiento. Además de poseer una multiresistencia genética a una amplia variedad de metales, útil en la biohidrometalurgia de MISUREPOCU (Mahopatra *et al.*, 2007).

**Tabla 1. Principales propiedades bioquímicas de la biolixiviación bacteriana de minerales sulfurados de oro, plata.**

<b>Fuente de energía</b>	<b>Oxidación minerales sulfurados (S)</b>
<b>Carbono</b> <b>Nitrógeno</b> <b>Vitaminas complejo B</b> <b>Multiresistencia genética</b>	CO <sub>2</sub> N <sub>2</sub> , NH <sub>4</sub> , NO <sub>3</sub> No requeridas como factor de crecimiento A todo tipo metales
<b>Acido generado de minerales de S</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>pH de crecimiento</b>	1-2
<b>Velocidad de crecimiento (días)</b>	22
<b>Metales solubilizados</b>	Au, Al, Ag, Cu, Co, Zn

Porro *et al.*, 1988; Mahopatra *et al.*, 2007

En la tabla 2 se presentan las propiedades bioquímicas de la BLX fúngica de MISUREPOCU, dado que estos hongos puede realizar la autotrofia heterotrofica una capacidad que les permite crecer en medios de cultivo estrictamente mineral, sin vitaminas de complejo B como factor de crecimiento. Mientras que para mejorar la BLX fúngica el medio de cultivo se enriquece con una forma de carbono orgánico como la glucosa, así como con compuestos orgánicos de N, aunado al factor de crecimiento, con lo cual se favorece un mayor generación de ácidos orgánicos para la disolución y solubilización de MISUREPOCU, dado que además tiene una multirresistencia genética a una amplia variedad de metales, por lo que es posible reducir el tiempo de extracción de esos metales con un menor costo de producción comparado con la LXQ Castro *et al.*, 2000; Mahopatra *et al.*, 2007

**Tabla 2. Propiedades bioquímicas de la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados de oro, plata y cobre.**

<b>Fuente de:</b>	
<b>Carbono</b>	CO <sub>2</sub>
<b>Nitrógeno</b>	Carbohidratos
<b>Vitaminas complejo B</b>	NH <sub>4</sub> , NO <sub>3</sub> , urea, aminoácidos
<b>Multirresistencia genética</b>	No requerida
<b>Ácidos por oxidación de carbohidratos</b>	cítrico > óxálico tartárico > málico
<b>pH de crecimiento</b>	3-7
<b>Velocidad de crecimiento (días)</b>	7-15
<b>Metales lixiviados</b>	Au, Ag, Cu

### **3. Justificación**

La BLX fúngica en consorcio puede ser optimizada al enriquecer al medio de cultivo lixivante con una fuente orgánica de C, N y un factor de crecimiento, como el piloncillo, la peptona de caseína y el extracto de levadura, para la generación de ácidos orgánicos que disuelvan los MISUREPOCU, para la solubilización de metales y disminuir el impacto negativo de la LXQ que emplea ácidos inorgánicos fuertes costosos y altamente contaminantes.

### **4. Hipótesis**

Es posible mejorar la biolixiviación de minerales sulfurados refractarios mediante consorcios fúngicos en un ambiente orgánico para la disolución de los minerales y la solubilización de oro, plata y cobre.

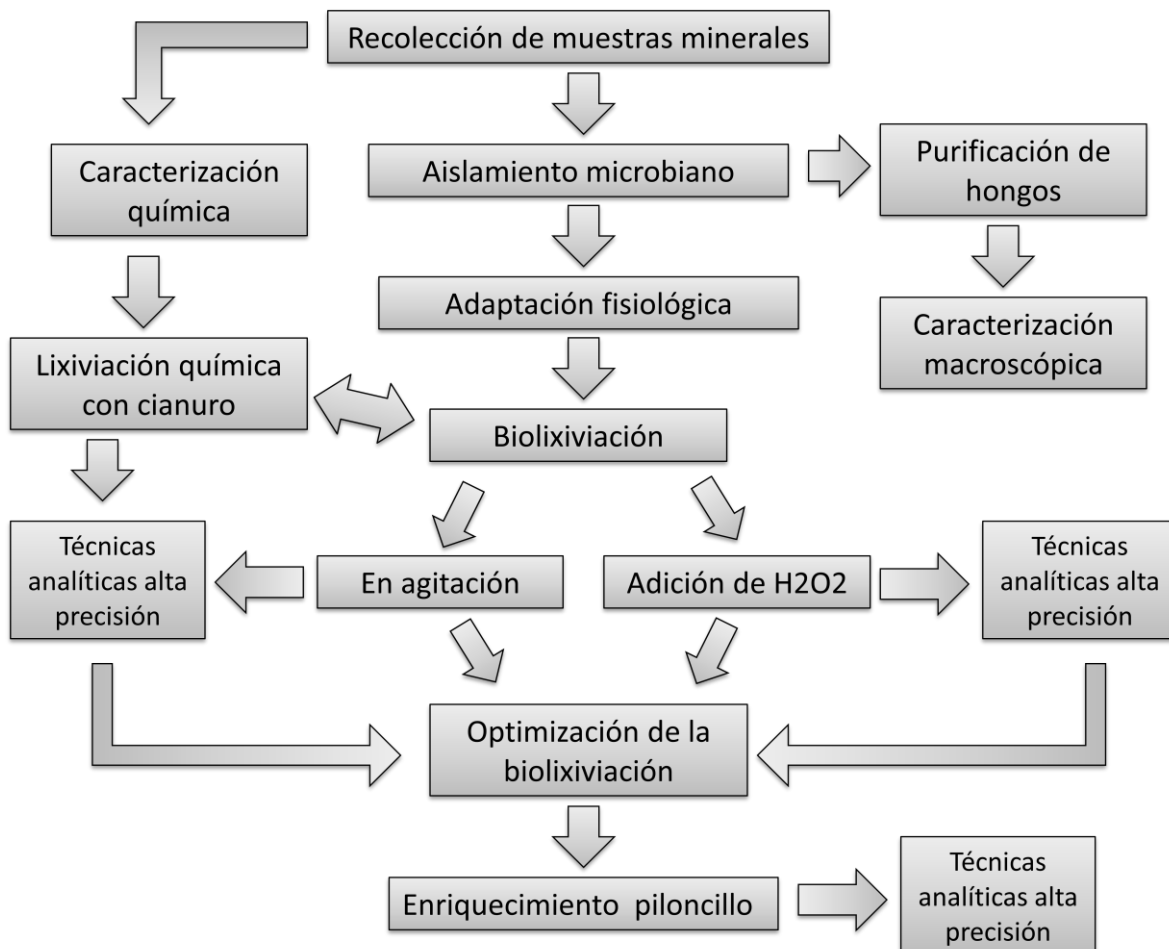
### **5. Objetivos**

- Aislar consorcios fúngicos a partir de MISUREPOCU.
- Adaptar consorcios fúngicos a la máxima concentración de MISUREPOCU y mínimo valor de pH posibles
- Optimizar la cinética de biolixiviación mediante consorcios fúngicos de MISUREPOCU con el enriquecimiento del medio de cultivo con fuente de carbono, nitrógeno y factor de crecimiento.

## 6. Materiales y métodos

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental (LMA) del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, en el Posgrado de Ingeniería Química y en el Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. A continuación, se muestra en la Figura 1, las etapas de la BLX fúngica de los MISUREPOCU realizadas en esta investigación.

**Figura 1. Diagrama general de la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.**



### 6.1 Obtención de muestras de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre

Se colectaron muestras de MISUREPOCU de 3 diferentes vetas (diferente sitio con profundidad de 0 a 30 cm) de la mina "El Águila", en San José de Gracia, Oaxaca, México. Estas muestras (Tabla 3) se colocaron en bolsas de plástico con cierre hermético, su transporte al LMA fue a 12 °C. Las muestras fueron pulverizadas y tamizadas con malla de 100 a 200 micras. Se proporcionó además, una muestra de mineral de Cu de parte del LMA que fue también parte del experimento.

**Tabla 3. Muestras colectadas de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.**

<b>Muestra</b>	<b>Mineral</b>	<b>Identificación</b>
1	La Luz	M1
2	Splay 66	M2
3	Veta Normal	M3
4	De Cobre	M4

## **6.2 Caracterización de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre**

Se realizó la caracterización química cualitativa de compuestos minerales por difracción de rayos X y la caracterización cuantitativa de metales por absorción atómica (Melgarejo *et al.*, 2010; Moosvi 2006). Por difracción de rayos láser se obtuvo la distribución de tamaño de partícula de las muestras a utilizar, como se muestra a continuación:

### ***Difracción de rayos X***

Método de análisis estructural, que permite identificar las especies minerales por su estructura cristalina (Santhiya & Ting, 2005).

### ***Espectroscopía de absorción atómica en flama***

Fundamento en la absorción de radiación de una longitud de onda determinada (Robinson, 1960).

### ***Difracción de rayo láser***

Técnica de medición de tamaño de partícula ampliamente utilizada para materiales que van desde cientos de nanómetros hasta varios milímetros en tamaño.

## **6.3 Aislamiento de hongos biolixivantes de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.**

El aislamiento de los hongos a partir de los MISUREPOCU colectados, se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 ml con medio mineral (MLM) estéril cuya composición en g/L

fue:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.0,  $\text{MgSO}_4$  0.7;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 y  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1.5. Se utilizó el medio 0K por Silverman y Lundgren, 1959, composición y preparación del medio 0K con 121 °C/15 min en autoclave. Cada matraz contenía 200 ml de medio líquido mineral (MLM) y se inoculó con 2 g de diferente MISUREPOCU al que se ajustó el pH a 2.5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 20 %. El aislamiento se realizó por duplicado, durante 30 días. Cada 5 días se tomaron valores de pH.

**Tabla 4. Aislamiento de hongos de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.**

.Ensayos de aislamiento	Medio mineral (200 ml)	Mineral (g/L)			
		M1	M2	M3	M4
<b>Control Absoluto</b>	+	-	-	-	-
<b>Aislamiento 1</b>	+	1	-	-	-
<b>Aislamiento 2</b>	+	-	1	-	-
<b>Aislamiento 3</b>	+	-	-	1	-
<b>Aislamiento 4</b>	+	-	-	-	1

➔ (+) = Se agrega; (-) = No se agrega

#### **6.4 Caracterización de hongos aislados a partir de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre**

La purificación y caracterización macroscópica de los hongos se realizó con la inoculación de 2 ml de cada medio mineral (MLM) (g/L):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.0;  $\text{MgSO}_4$  0.7;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1.5; 18.0 agar-agar. El pH se ajustó 4.0. La siembra se hizo por duplicado, la incubación se realizó a 30°C por 25 días (Sánchez-Yáñez, 2007). Para la caracterización de los hongos aislados, se realizó una identificación macroscópica, enfatizado a aspectos de: forma y tipo de micelio (Thomas Laessoe, 1998).

## **6.5 Adaptación de los hongos a pH ácido y elevada concentración de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre**

Se realizó un adaptación fisiológica de los hongos pues se sabe que la sobrecarga de minerales a lixiviar mostraron mejores resultados de lixiviación en comparación con aquellos que no fueron adaptados (Valix *et al.*, 2001a). La adaptación se realizó mediante ciclos adaptativos con distinta duración (días), como variable respuesta se tuvo el tiempo de crecimiento colonial (Srivastava & Thakur *et al.*, 2006)

## **6.6 Lixiviación química de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre con cianuro de sodio (NaCN)**

- Prueba de rodillo en botella con cianuro de sodio

Una prueba de rodillo de botella con cianuro es el primer paso estándar para evaluar la posibilidad de extraer metales mediante una lixiviación con cianuro de sodio (NaCN) y permite determinar la lixivabilidad de un mineral bajo ciertas condiciones de granulometría, relación líquido:sólido y concentración de agente lixivante. Además, permiten obtener, información sobre el tiempo necesario para alcanzar la máxima extracción de Au y Ag, entre otros (Figueredo-Frías *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2001). Durante la prueba de rodillo de botella el mineral se agita suavemente en un lixivante o en una solución de lixiviado de NaCN. La pruebas se efectúa durante 12, 24, 36 ó 48 horas (Contreras-Lozano *et al.*, 2013; Chávez Flores, 2014), como indicar de forma precisa los resultados que se obtendrán planta piloto y la extracción final de Au principalmente y Ag secundariamente (Ramírez & Carlos, 2013).

## 6.7 Bioliolixiviación fúngica en agitación de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre

Se realizó un experimento de BLX (Tabla 5) con los hongos aislados a pH ácido y elevadas concentraciones de mineral. Se utilizó como variables respuesta la producción por los hongos de ácido cítrico, d. Los ensayos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de medio de cultivo lixiviantes en condiciones asépticas, 30 días en agitador rotatorio a 120 rpm. En todos los experimentos se utilizó un inóculo 10 % (v/v) con 300,000 propágulos UFP/ml, ó un inóculo 10 % (v/v) con 300,000 UFP propágulos/ml, del cultivo fúngico adaptado a los minerales hasta 5 g/L.

**Tabla 5. Diseño experimental de la biolixiviación de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre en agitación, con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y/o con enriquecimiento del medio de cultivo con piloncillo, peptona de caseína y extracto de levadura.**

	Medio mineral (200 ml)	Mineral (g/L)			
		M1	M2	M3	M4
<b>Control Absoluto</b>	+				
<b>Consorcio fúngico aislado de M1</b>	+	4	-	-	-
<b>Consorcio fúngico aislado de M2</b>	+	-	4	-	-
<b>Consorcio fúngico aislado de M3</b>	+	-	-	4	-
<b>Consorcio fúngico aislado de M4</b>	+	-	-	-	4
<b>Consorcio fúngico aislado de MM de MISUREPOCU</b>	+	1	1	1	1

➔ (+) = Se agrega; (-) = No se agrega

### **6.8 Bioliolixiviación fúngica con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre**

Se realizó un experimento de BLX (tabla 5) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno) al 1 %. Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de medio en condiciones asépticas, durante 30 días en agitador rotatorio a 120 rpm. En todos los experimentos se utilizó un inóculo 10 % (v/v) con 300,000 UFP propágulos/ml, del cultivo fúngico adaptado a los MISUREPOCU hasta 5 g/L. Lo anterior para que la concentración máxima de los minerales/metales, no superara el nivel que sería tóxico para los cultivos. Además se agregaron 5 gotas cada 3 días de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como fuente de oxígeno en el medio de cultivo (Nester *et al.*, 1978).

### **6.9 Bioliolixiviación fúngica con enriquecimiento en el medio de cultivo de piloncillo, peptona de caseína y extracto de levadura para minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre**

Se realizó un experimento de BLX fúngica en medio de cultivo lixivante enriquecido (g/L) piloncillo 50, peptona de caseína 15.0 y extracto de levadura 5.0 para MISUREPOCU, en agitación y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 % (3 gotas/día) (tabla 5). En todos los experimentos se utilizó un inóculo 10 % (v/v) con 300,000 UFP propágulos/ml, del cultivo fúngico adaptado a los MISUREPOCU hasta 5 g/L. Además se agregaron 5 gotas cada 3 días de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como fuente de oxígeno en el medio de cultivo (Nester *et al.*, 1978).

### **6.10 Técnicas analíticas de alta precisión para la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre**

En esta investigación, se utilizaron distintas técnicas analíticas antes, durante y después de la BLX fúngica de MISOREPOCU (Tabla 6) para cada uno de sus ensayos que fueron

realizados en agitación, con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y con enriquecimiento en el medio de cultivo de piloncillo, peptona de caseína y extracto de levadura.

**Tabla 6. Técnicas analíticas realizadas antes, durante y después de la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.**

Tiempo de análisis	Antes de la BLX fúngica (Mineral)	Durante la BLX fúngica (Medio de cultivo)	Después de la BLX fúngica (Medio de cultivo)
Difracción de rayos láser	+	-	-
Difracción de rayos X	+	-	-
Difracción por absorción atómica	+	-	+
Monitoreo de pH	+	+	-
Monitoreo de Eh	+	+	-
Cuantificación de ácido cítrico	+	+	-

(+) = Se utilizó (-) = No se utilizó; n=3

Para la cuantificación del ácido cítrico producido se utilizó la técnica de volumetría, que se describe a continuación:

#### **Determinación de ácido cítrico**

La acidez del ácido cítrico se debe a los 3 grupos carboxílicos, cada uno puede perder un protón en solución y convertirse en ion citrato. Para la BLX de minerales sulfurados refractarios, se utilizó la determinación de ácido cítrico y para ello, se utilizó NaOH 0.01 N, fenoftaleína 1 % y la muestra. Se llenó la bureta con NaOH 0.1 N, en seguida se colocó

en un matraz 20 ml de la muestra, se agregaron unas gotas de fenofaleína y se tituló hasta la aparición del color rosa. El valor del volumen gastado se utilizó en la siguiente fórmula:

$$\text{Ácido cítrico (g/L)} = \frac{\text{mL de NaOH} * W_{\text{equivalente del Ac.cítrico}}}{100}$$

Donde:

$$W_{\text{equivalente}} = \text{Peso molecular } C_5H_8O_7 = 72 + 8 + 112 = 192 \text{ g/mol}$$

## 7. Resultados

### 7.1 Caracterización mineralógica de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre

#### 7.1.1 Tamaño de partícula (Difracción de rayos láser)

Para la BLX fúngica de los MISUREPOCU fue necesario reducir el tamaño de partícula de los minerales mediante trituración y molienda, esto para facilitar disolución y solubilización de los metales (Mejía-Restrepo *et al.*, 2011; Qu & Li, 2013) contenidos en M1, M2, M3, M4.

**Tabla 7. Comparativa de los tamaños de partículas de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.**

<b>Mineral</b>	<b>Tamaño de partícula (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Porcentaje de partículas cuantificadas</b>
M1	27.4	82.9
M2	25.3	80.0
M3	15.7	80.2
M4	27.4	81.9

En la tabla 7 se muestra la comparativa de los tamaños de partícula de los MISUREPOCU después de la trituración y molienda, donde se observa que el diámetro equivalente de partícula que representó el 80 % (d80) determinado gráfica y estadísticamente, en el M1, el M2, el M3 y el M4, que osciló de entre 25 a 27.5  $\mu\text{m}$ ; por su parte, en el análisis del M3, el 80.2 % de las partículas tienen un

valor inferior a 15.7  $\mu\text{m}$ , del cual, se esperaría una mayor recuperación de metales por la BLX fúngica, pues al tener un menor tamaño de partícula, existe mayor superficie de contacto y con ello mayor disolución de minerales y solubilización de metales (Tuncuk et al., 2012; Valix *et al.*, 2001). Se ha demostrado la necesidad de reducir el tamaño de partícula para facilitar la acción de los hongos en la BLX de MISUREPOCU. Así, los minerales al acercarse al tamaño de los hongos, los ácidos orgánicos producidos por ellos, actúan fácilmente en la disolución de los MISUREPOCU y posteriormente la solubilización de los metales (Porro & Tedesco, 1990; Plumb *et al.*, 2008).

## **7.2 Caracterización química cualitativa por difracción de rayos X**

En la tabla 8 se muestra la comparativa de los tres principales componentes mineralógicos con base en la cantidad disponible a biolixiviarse, los cuales son un factor fundamental para optimizar la cinética de la BLX fúngica de MISUREPOCU, además de controlar los precios relacionados a la energía y reactivos químicos empleados (Huarachi-Olivera *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2011). En todos los casos, se observa la existencia de minerales sulfurados y al  $\text{SiO}_2$  o Cuarzo/Silicato, además de metales pesados contenidos en uno de los componentes principales, así como también la presencia de compuestos sulfurados y/o metales pesados como el Pb en el M1, y menor concentración de sulfuro de cobre (CuS), los que supone una mayor recuperación de Au, Ag y Cu, por la acción tóxica del Pb, que significaría una inhibición de la actividad de BLX en el medio de cultivo y que al mismo tiempo impediría el crecimiento microbiano (Sum 1991; Tortora *et al.*, 2004;

Zhang *et al.*, 2008). Por su parte, en el M2 se observó la presencia de carbonatos como el  $\text{Ca}(\text{CO}_3)$ , y en menor cantidad el  $\text{MgS}$  (sulfuro de magnesio), a diferencia de que en el M3 además del  $\text{SiO}_2$ , se detectaron  $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$  y en menor cantidad el  $\text{Ca}(\text{CO}_3)$ .

**Tabla 8. Comparativa de la composición mineralógica de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.**

Mineral	Composición mineralógica	Identificación mineralógica
M1	$\text{SiO}_2 > \text{Pb} > \text{CuS}$	Geerita
M2	$\text{Ca}(\text{CO}_3) > \text{SiO}_2 > \text{MgS}$	Calcita
M3	$\text{SiO}_2 > \text{NaAlSi}_3\text{O}_8 > \text{Ca}(\text{CO}_3)$	Albita
M4	$(\text{Na,Ca})\text{Al}_2(\text{SiAl})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2\text{H}_2\text{O} > \text{NaOCa Al}$ $\text{Si}_2\text{O}_8 > \text{SiO}_2$	Montmorillonita

### 7.3 Análisis químico cuantitativo de Au, Ag y Cu en los minerales sulfurados refractarios por absorción atómica

En la tabla 9, se muestra la cuantificación de Au, Ag y Cu por absorción atómica de los MISUREPOCU antes de la BLX fúngica en: M1, M2, M3 y M4, donde se detectó que el M2 fue el mineral más rico en Au con 18.3 ppm, seguido del M3 con 11.8 y el M1 con 11 ppm y finalmente, el M4 con 10.1 ppm. En contraste, para el análisis de Ag, donde se observó que la mayor concentración se encontró en el M1 con 4.3 ppm, seguido del M2 con 3.9 ppm y en menor cantidad estuvieron el M4 con 2.3 y el M3 con 2.1 ppm, lo que muestra una muy baja cantidad de Ag para biolixiviarse en los MISUREPOCU. Por su parte, en la identificación del Cu se observaron elevadas cantidades en comparación con el Au y la Ag, donde observó

que el M4 contiene 62,354.4 ppm, superior a lo registrado por el M1 y el M3 con 7,609.2 y 5,535.6 ppm respectivamente y por último el M2 con sólo 0.7 ppm. Así, se esperaría obtener la mayor parte de Au a partir del M2, de Ag a partir del M1 y de Cu a partir del M4, sin considerar aún el tamaño de partícula (Porro *et al.*, 1988).

**Tabla 9. Cuantificación de oro, plata y cobre por absorción atómica de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.**

Mineral / Metal	Au	Ag	Cu
Concentración	ppm	ppm	Ppm
M1	11	4.3	7,609.2
M2	18.3	3.9	0.7
M3	11.8	2.1	5,535.6
M4	10.1	2.3	62,354.4

La cantidad de metales posibles a biolixiviar depende la composición química existente en los minerales

#### **7.4 Aislamiento microbiano a partir de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre**

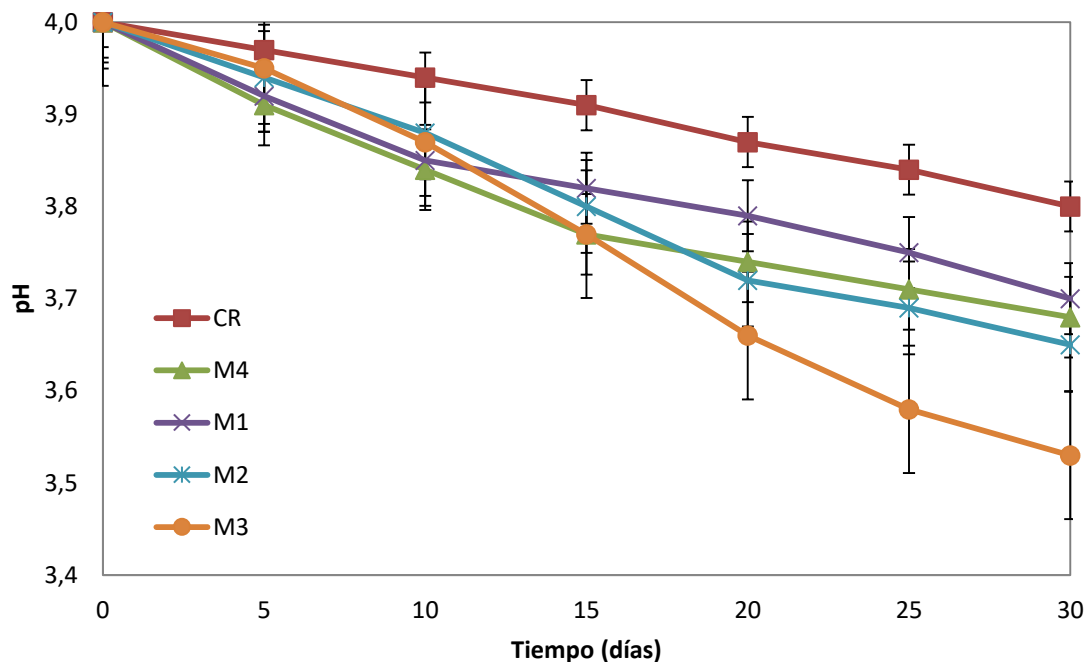
A continuación, se muestran los resultados del aislamiento microbiano a partir de los MISUREPOCU, se aisló una bacteria, además un consorcio fúngico por cada mineral. La bacteria quimiolitotrófica biolixivió MISUREPOCU, sin embargo en la

resiembra del 3er ciclo adaptativo no toleró los 10 g/L de concentración del M1 y murió, razón por la cual se realizó la BLX con hongos.

#### **7.4.1 Dinámica del pH en el aislamiento de hongos a partir de los MISUREPOCU**

En la figura 2 se muestra la dinámica del pH durante el aislamiento de los hongos a partir de los MISUREPOCU con valor inicial de 4.0. En general, se observa una disminución del pH durante los 30 días del ensayo hasta alcanzar valores cercanos a 3.5, hecho que indica un aumento en la actividad microbiana relacionada a una autotrófia heterotrófica, lo cual sugiere un tipo de adaptación a elevadas concentraciones de los MISUREPOCU y bajos valores de pH, condiciones que inducen una mayor producción de ácidos orgánicos y que permiten así, la disolución de minerales y en consecuencia solubilización de metales (Fu *et al.*, 2008). Para la BLX fúngica de MISUREPOCU, existe poca investigación para describir el efecto del pH en la oxidación de estos minerales por los consorcios fúngicos conformados por *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp y/o *Trichoderma* sp.

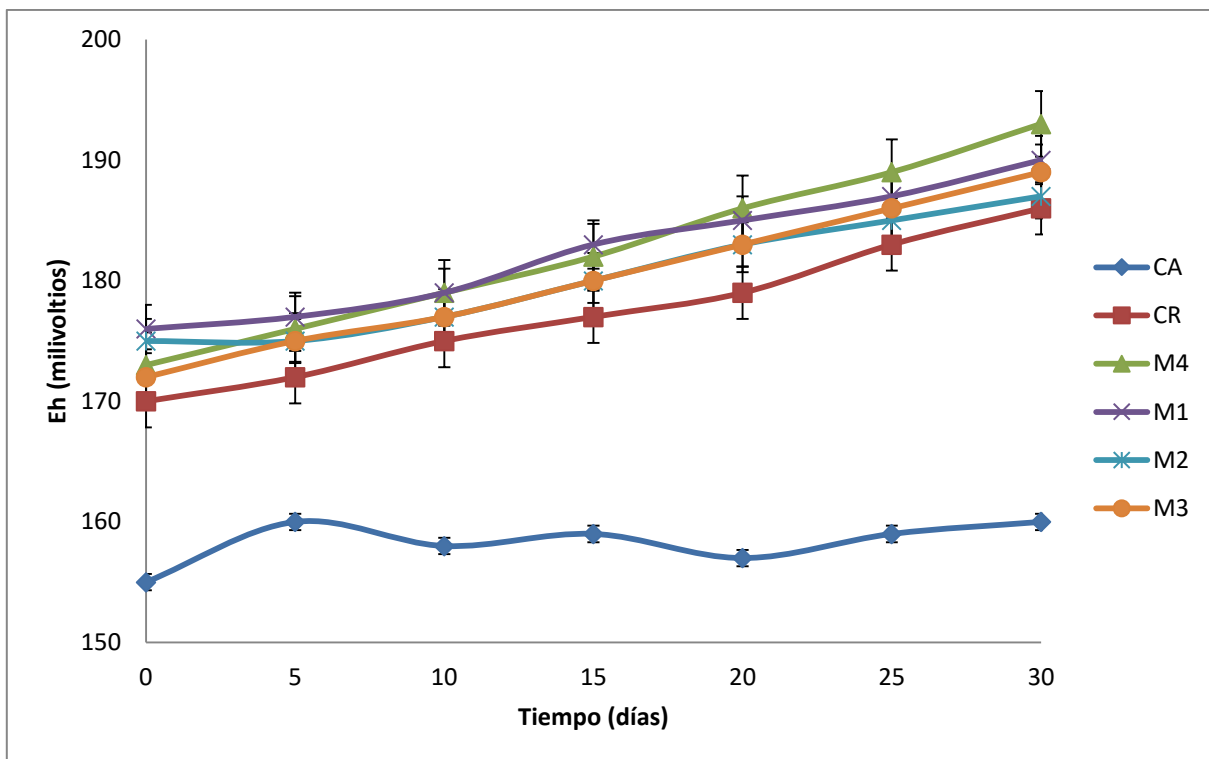
**Figura 2. Dinámica del pH en la biolixiviación de minerales sulfurados refractarios de Au, Ag y Cu.**



### ***Dinámica del Eh en el aislamiento de hongos***

En la figura 3 se muestra la dinámica del Eh, que es un indicador de la actividad microbiana, mientras mayor potencial medido, mayor actividad microbiana y adaptada a las condiciones de BLX fúngica (Plumb *et al.*, 2007; Caciado & Márquez, 2013). En general, los consorcios mostraron un comportamiento similar. Durante el aislamiento, en el medio de cultivo control, el valor final de Eh fue de 160 mV, lo cual indica que no hubo actividad microbiana.

**Figura 3. Dinámica del Eh en el aislamiento de hongos en suelo y minerales.**



### 7.5 Caracterización macroscópica de los hongos aislados a partir de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre

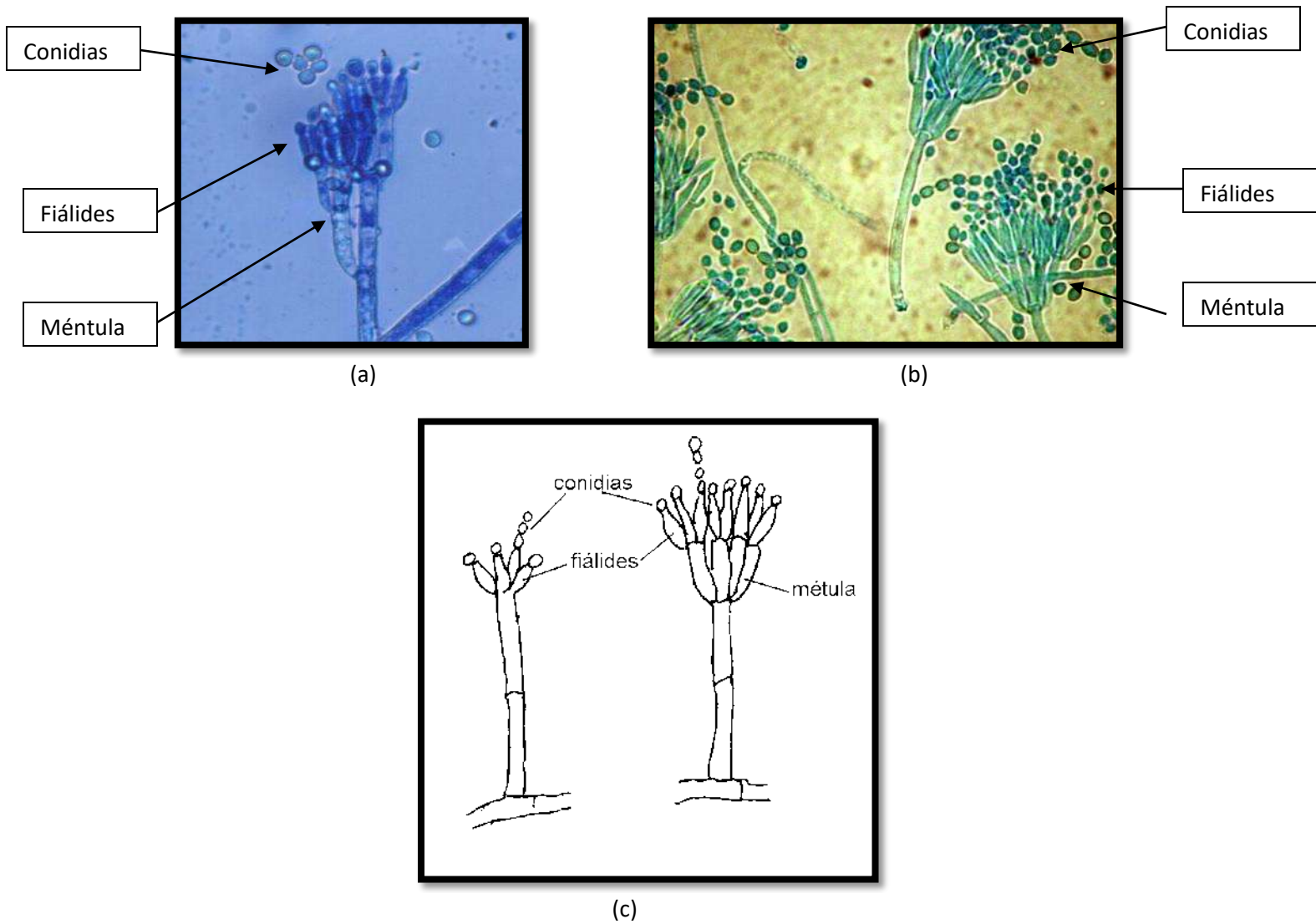
En el Tabla 10, se muestra la caracterización macroscópica de los hongos aislados y utilizados en la BLX de los MISUREPOCU. Los hongos aislados se identificaron por sus características de colonias, morfología de esporas y observaciones microscópicas (Mohapatra, 2007), fueron 3 especies fúngicas que se aislaron a partir de los MISUREPOCU que fueron: a) *Penicillium* sp, a partir del M2, M3, sus morfología colonial fue caracterizada por ser plana y por tener un cambio de color de blanco a verde azul; a) *Aspergillus* sp fue aislado a partir del M1, el M2 y el M4; y c) *Trichoderma* sp, aislado a partir del M1, el M3 y el M2 cuya morfología colonial se caracterizó por ser blanca y cuando envejeció se formó un color amarillento o incluso verde.

**Tabla 10. Morfología colonial de los hongos utilizados en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.**

Mineral	Morfología colonial	Género
Planas		
M2	Aterciopeladas	
M3	Algodonosas	<i>Penicillium</i>
M4	Crecimiento rápido Blanco → verde azul	
Filamentoso		
M1	Crecimiento lento	
M2	Algodonosa blanca	<i>Aspergillus</i>
M4	Verde amarillento → café	
Color blanco		
M1	Verde oscuro o	
M3	amarillento	<i>Trichoderma</i>
M2	Esporulación densa	
Ramificado		

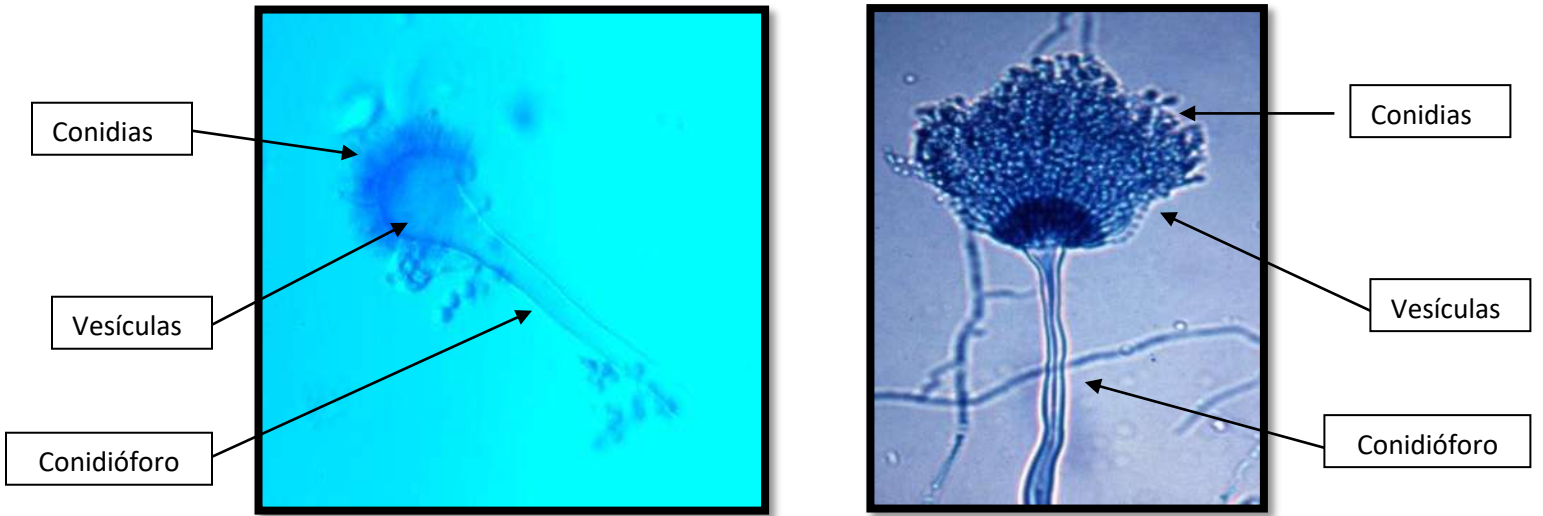
Se muestra en la figura 4 se muestra la morfología a de *Penicillium* sp a) aislado de MISUREPOCU, comparado con b) *Penicillium* obtenido de Atlas virtual de micología, así como las c) partes de *Penicillium*: conidias, fiálides y métula.

**Figura 4. Morfología de *Penicillium* sp: a) aislado de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre, b) *Penicillium* – Atlas virtual de micología c) Partes de *Penicillium*: conidias, fiálides y métula.**



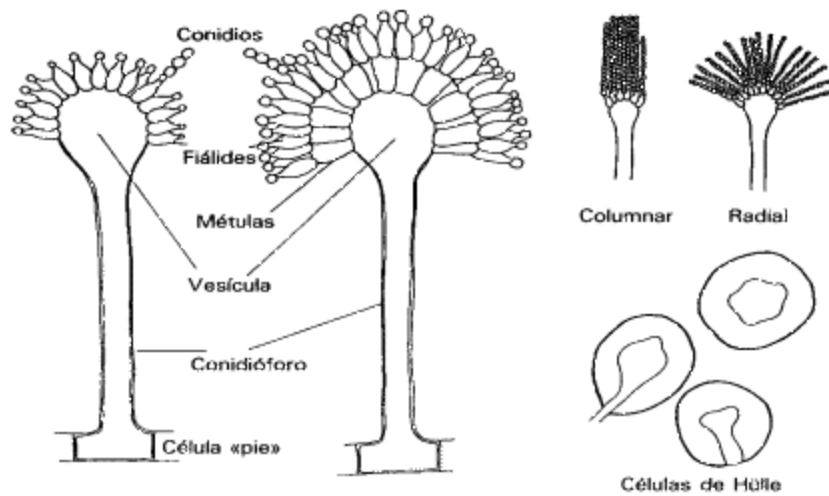
Se muestra en la figura 5 se muestra la morfología de *Aspergillus* sp a) aislado de MISUREPOCU, comparado con b) *Aspergillus* obtenido de Atlas virtual de micología, así como las c) partes de *Aspergillus*: conidias, fiálides y métula.

**Figura 5. Morfología de *Aspergillus* sp a) aislado de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre, b) *Aspergillus* – Atlas virtual de micología c) Partes de *Aspergillus*: conidias, fiálides, métula, vesículas, conidióforos.**

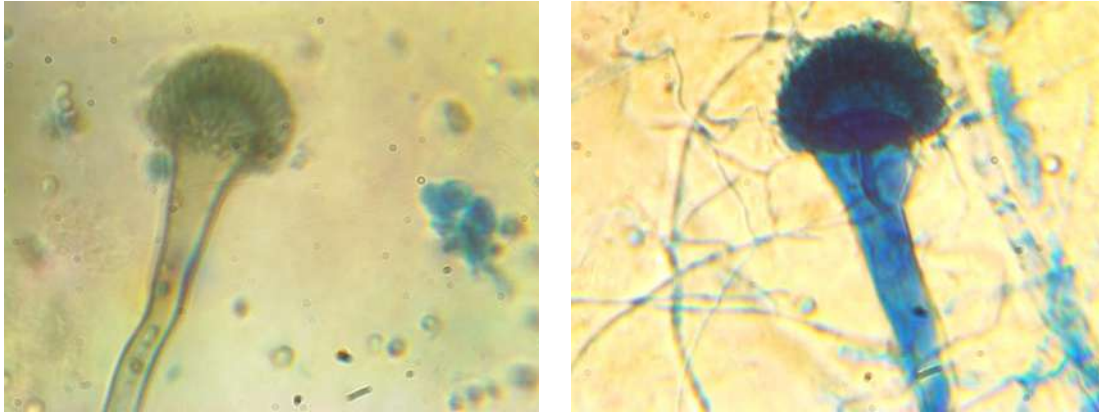


(a)

(b)

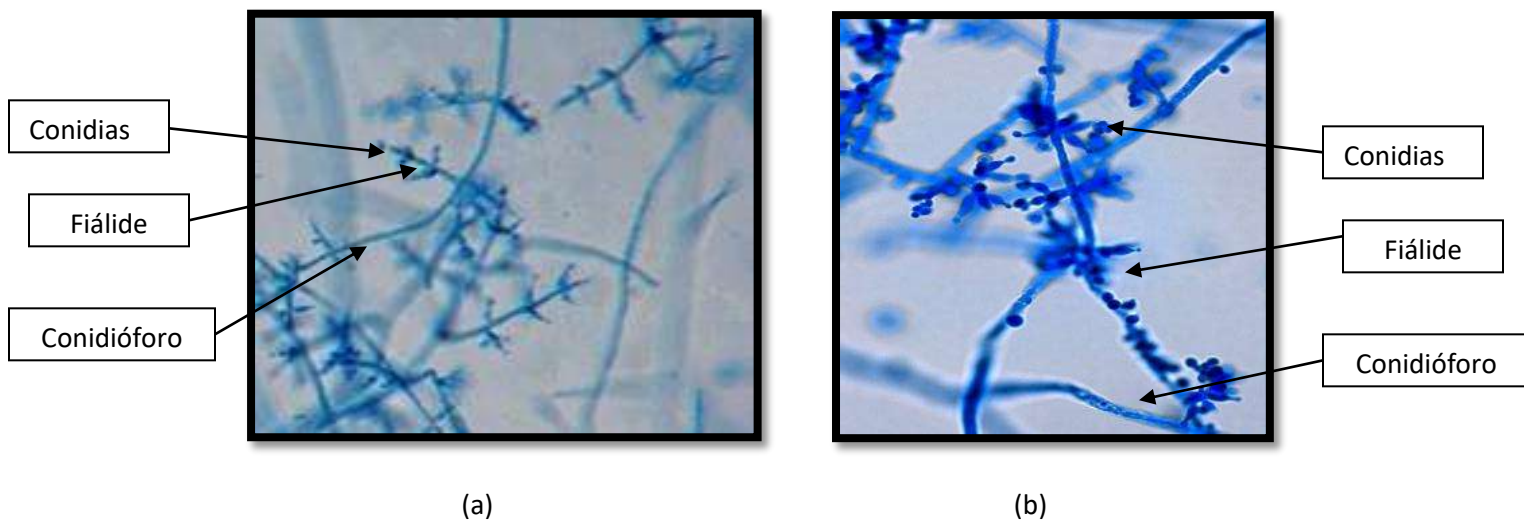


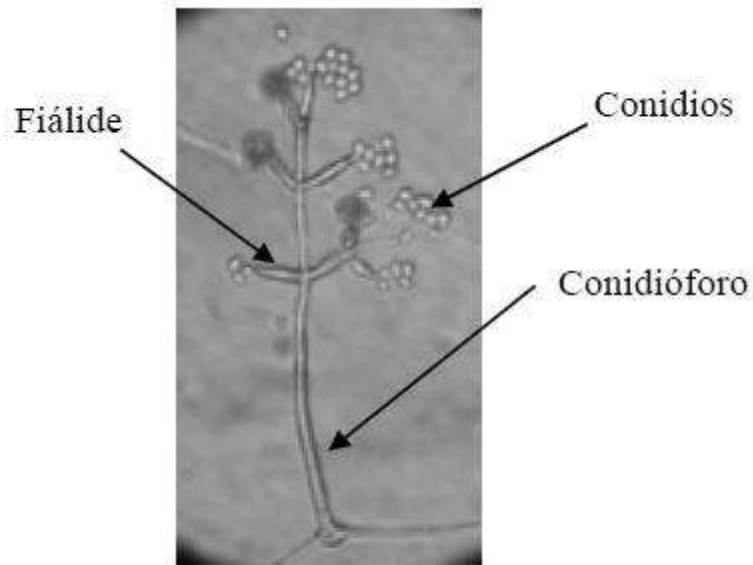
(c)



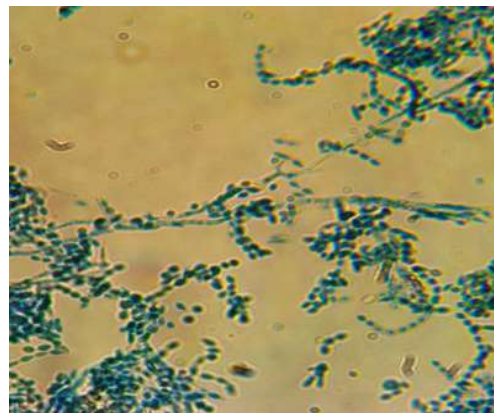
Se muestra en la figura 6 se muestra la morfología de *Trichoderma* sp a) aislado de MISUREPOCU, comparado con b) *Trichoderma* obtenido de Atlas virtual de micología, así como las c) partes de *Trichoderma* conidias, fiálides y métula.

**Figura 6. Morfología de *Trichoderma* sp a) aislado de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre, b) *Trichoderma* sp – Atlas virtual de micología c) Partes de *Trichoderma* sp m: conidias, fiálides y conidióforo.**





©



Se observa en la tabla 11, los consorcios fúngicos conformados por *Aspergillus* sp, *Trichoderma* sp y *Penicillium* sp aislados e identificados en el M1, M2, M3 y M4, utilizados para su BLX fúngica de los MISUREPOCU.

**Tabla 11. Relación de los géneros y especies consorcios fúngicos en los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.**

Mineral	Consorcio	Posible género
---------	-----------	----------------

	<b>fúngico</b>	<b>identificado</b>
<b>M1</b>	1	<i>Aspergillus, Trichoderma</i>
<b>M2</b>	2	<i>Penicillium, Trichoderma</i>
<b>M3</b>	3	<i>Penicillium, Trichoderma</i>
<b>M4</b>	4	<i>Penicillium, Aspergillus</i>

### 7.6 Adaptación de los consorcios fúngicos a elevadas concentraciones de minerales y bajos valores de pH

En la tabla 12 se muestra adaptación de los hongos en ciclos adaptativos a bajos valores de pH y elevadas concentraciones de MISUREPOCU. La etapa de la adaptación fisiológica tuvo una duración de 162 días divididos en 11 ciclos adaptativos.

**Tabla 12. Dinámica de la adaptación fisiológica de los hongos a elevadas concentraciones de minerales y bajos valores de pH.**

<b>Ciclo adaptativo</b>	<b>Tiempo de crecimiento (días)</b>	<b>pH</b>	<b>Mineral (g/L)</b>
1°	22	5.0	5.0
2°	22	4.9	7.0
3°	19	4.8	10.0
4°	17	4.5	12.0
5°	17	4.3	15.0
6°	15	4.2	18.0
7°	13	4.0	21.0
8°	11	3.8	25.0

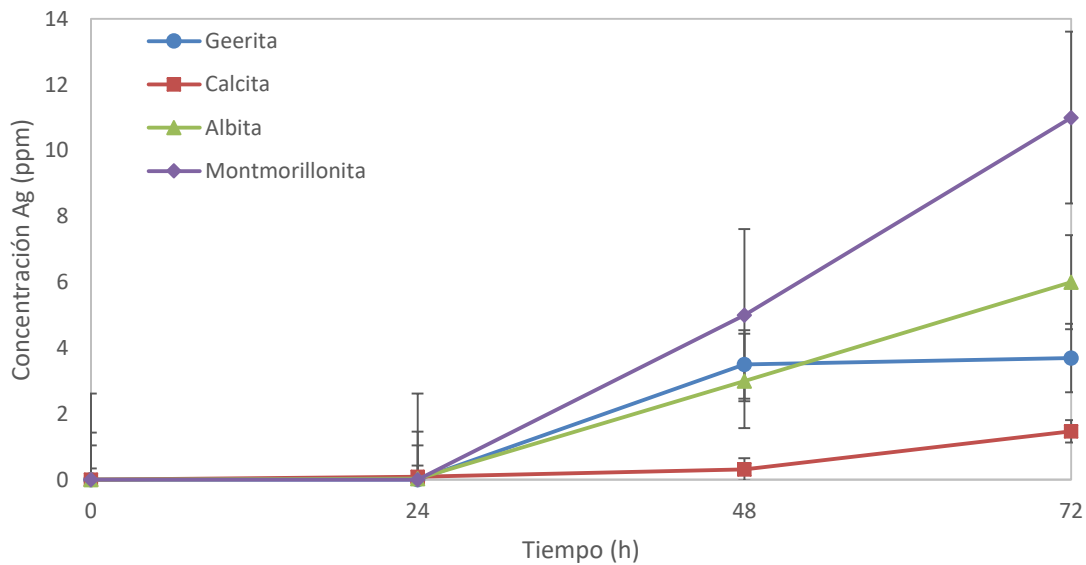
9°	11	3.5	27.0
10°	9	3.1	29.0
11°	6	3.0	30.0

La selección de hongos a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivo puro rico en MISUREPOCU y con pH menores de 5, es una estrategia eficiente para la adaptación de los hongos tolerantes a concentraciones altas de MISUREPOCU y mejora la actividad microbiana en ambientes de la BLX fúngica (Atlas *et al.*, 1991; Valix *et al.*, 2000; Madrigal-Arias *et al.*, 2015).

### 7.7 Lixiviación química de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre con cianuro de sodio

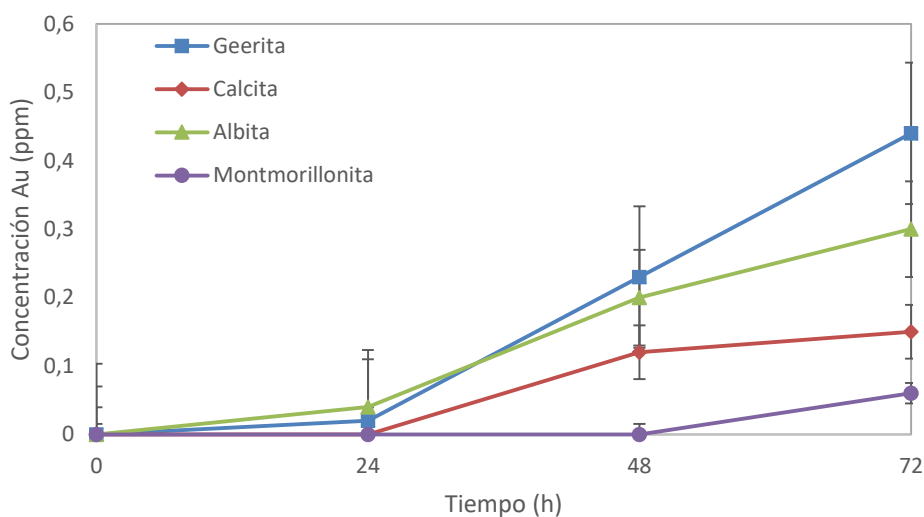
Se muestra a continuación la LXQQ por NaCN de los MISUREPOCU en la prueba de botella. En la figura 7 se muestra la dinámica de la extracción de Ag (ppm) a partir de los MISUREPOCU durante la LXQQ con NaCN, medida cada 24 h durante 3 días. Se observa que a las 24 h de la LXQQ con NaCN, no existió extracción de Ag sino hasta las 48 h fue que comenzó la diferencia en los distintos MISUREPOCU para la extracción de Ag. Al término del experimento se mostró que la mayor extracción se observó en la LXQQ con NaCN del M4 con 10.3 ppm, seguido del M3 y M1 con 5.8 y 3.9 ppm respectivamente, y la menor extracción fue en el M2 con apenas 1.1 ppm.

**Figura 7. Dinámica de la extracción de Ag de minerales sulfurados refractarios por la lixiviación química con cianuro de sodio.**



En la figura 8 se muestra la dinámica de la extracción de Au (ppm) a partir de los MISUREPOCU durante la LXQ con NaCN. Se observa que a las 24 h de la LXQQ con NaCN, fue mínima la extracción de Cu en todos los casos, sin embargo hasta las 48 h fue que comenzó la diferencia en la concentración de Au extraído durante la LXQQ de los MISUREPOCU para la extracción de Au. Al término de las 72 h del experimento se mostró que la mayor extracción se observó en la LXQQ con NaCN fue con M1 con 0.43 ppm, seguido del M3 con 0.29 ppm y en menor concentración, el M2 y el M4 con solo 0.15 y 0.08 ppm de Au extraído por LXQQ con NaCN.

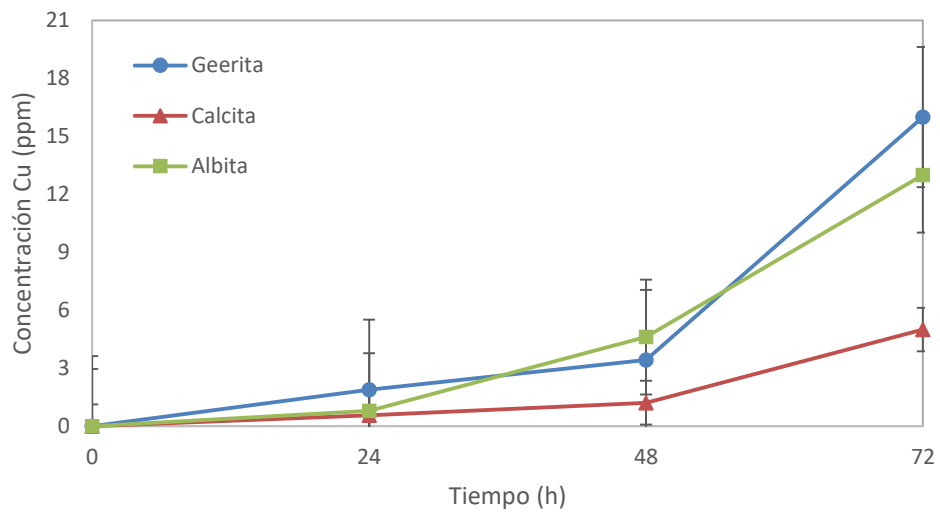
**Figura 8. Dinámica de la extracción de Au (ppm) a partir de minerales sulfurados refractarios durante la lixiviación química con NaCN.**



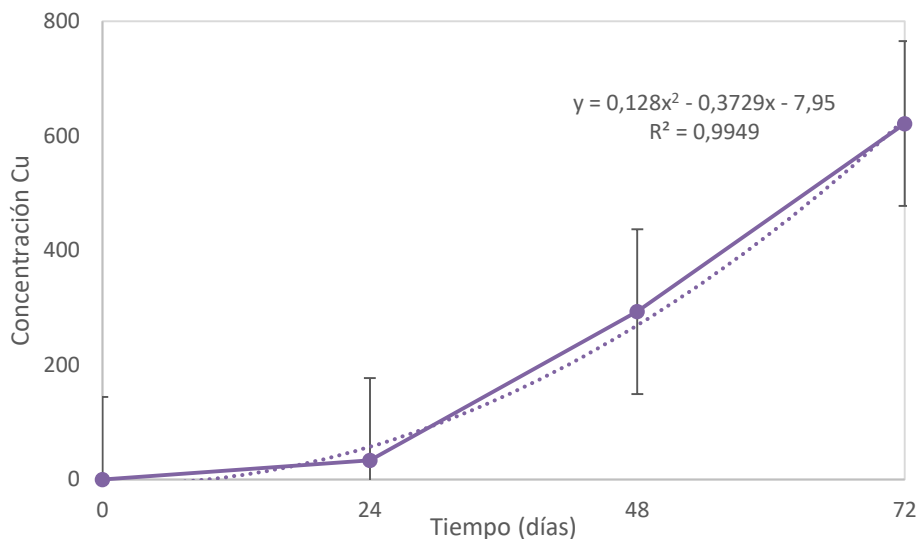
En la figura 9 se muestra la dinámica de la extracción de Cu (ppm) a partir del M1, el M2 y el M3 durante la LXQQ con NaCN en un ensayo de 72 h. Se observa que a las 24 h de la LXQQ con NaCN, existe una insignificante diferencia en la concentración de la extracción de Cu (ppm) y donde al término del ensayo se

registraron 16 ppm en la LXQQ del M1, seguida del M3 con 13 ppm y finalmente la recuperación de 4.5 ppm en la LXQQ del M2, valores muy por debajo de la concentración de Cu extraída en la LXQQ del M4 mayor a los 600 ppm (figura 18)

**Figura 9. Dinámica de la extracción de Cu (ppm) a partir de minerales sulfurados refractarios durante la lixiviación química con NaCN.**



**Figura 10. Dinámica de la extracción de Cu (ppm) a partir de M4 durante la lixiviación química con cianuro de sodio.**



En la tabla 13, se muestra la comparativa de la extracción de Au, Ag y Cu a partir de los MISUREPOCU a las 72 h de la LXQ con NaCN, donde se muestra que la mayor extracción de Au fue a partir del M1 con 0.44 ppm; por su parte, la mayor extracción de Ag fue a partir del M3 con hasta 6 ppm y finalmente, la mayor recuperación de Cu fue registrada a partir del M4.

**Tabla 13. Comparativa de la extracción de Au, Ag y Cu a partir de minerales sulfurados refractarios a 72 h por lixiviación con NaCN.**

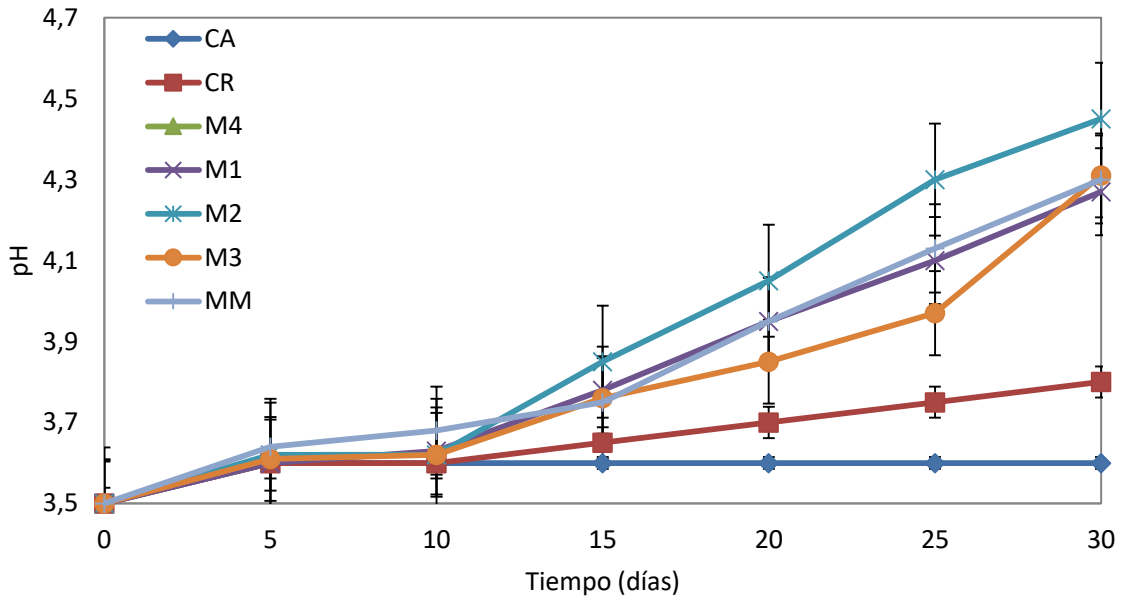
Mineral	Metal extraído (ppm)		
	Au	Ag	Cu
M1	0.44 <sup>a*</sup>	3.7 <sup>c</sup>	16 <sup>b</sup>
M2	0.15 <sup>b</sup>	1.47 <sup>d</sup>	5 <sup>c</sup>
M3	0.3 <sup>d</sup>	6 <sup>b</sup>	13 <sup>b</sup>
M4	0.06 <sup>c</sup>	11 <sup>a*</sup>	621 <sup>a*</sup>

\*ANOVA/Tukey (p=0.05) Letras distintas representan diferencia estadística.

### **7.8 Biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre en agitación.**

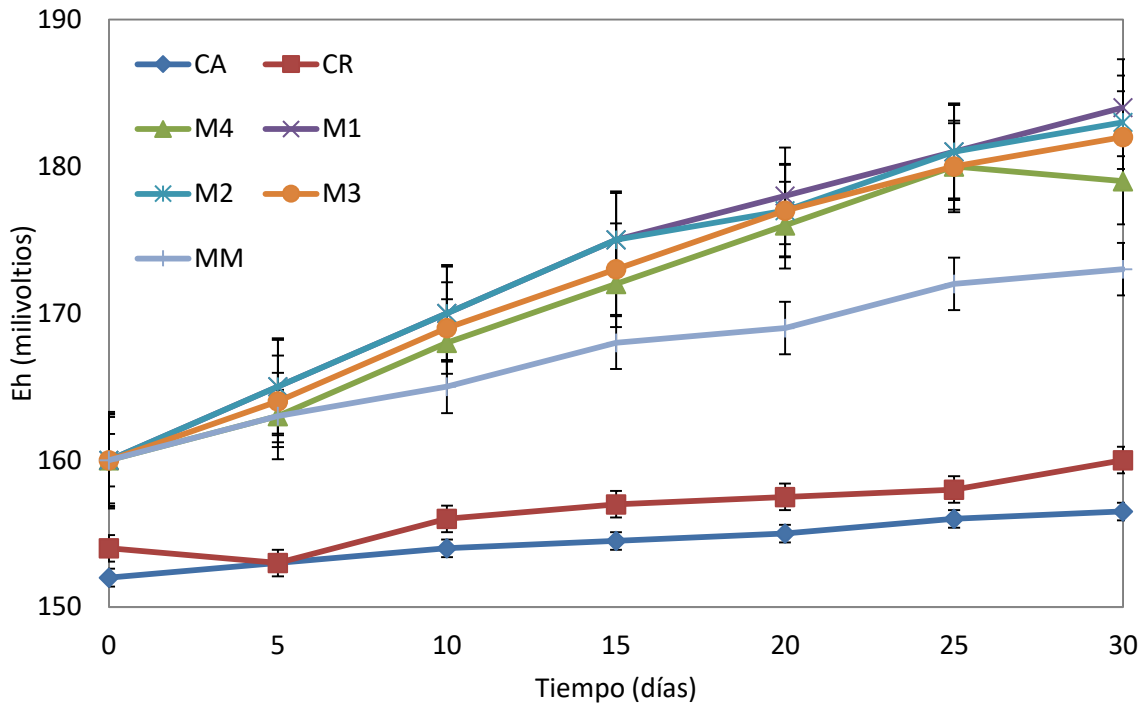
Se muestra en la figura 11, la dinámica del pH durante la BLX fúngica de los MISUREPOCU en medio de cultivo estrictamente mineral en agitación en el ensayo de 30 días donde se detecta un notable aumento en todos los casos a partir de los 15 días de ensayo. El ensayo inició a tiempo cero con pH = 3.5 y al término se registraron valores superiores a 4.0, la BLX fúngica de MM de los MISUREPOCU y del M4. Como resultados de la autotrófica heterotrofia se generó glucosa de donde se sintetizaron los ácidos orgánicos como el cítrico con en los cuales se silubilizaron en consecuencia de ambas situaciones, los hongos generaron proteínas de protección para evitar el efector oligodinámico derivado del aumento de por lo que el pH en lugar de que bajara, aumento por proteínas de protección que al ser a los metales en solución se desnaturalizaron con producción de pequeñas cantidad de urea y luego ánimio , lo que neutralizó parte de la acidez y origino un aumento de pH hasta 4.1 (Santhiya & Thing *et al.*, 2005; Islam & Ting, 2009; Qu & Lian, 2013).

**Figura 11. Dinámica del pH durante la biolixiviación fúngica en agitación de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.**



**Control** = Medio mineral; **M1** = Medio mineral + M1 + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp; **M2** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M3** = Medio mineral + M3 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M4** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp; **MM** = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp.

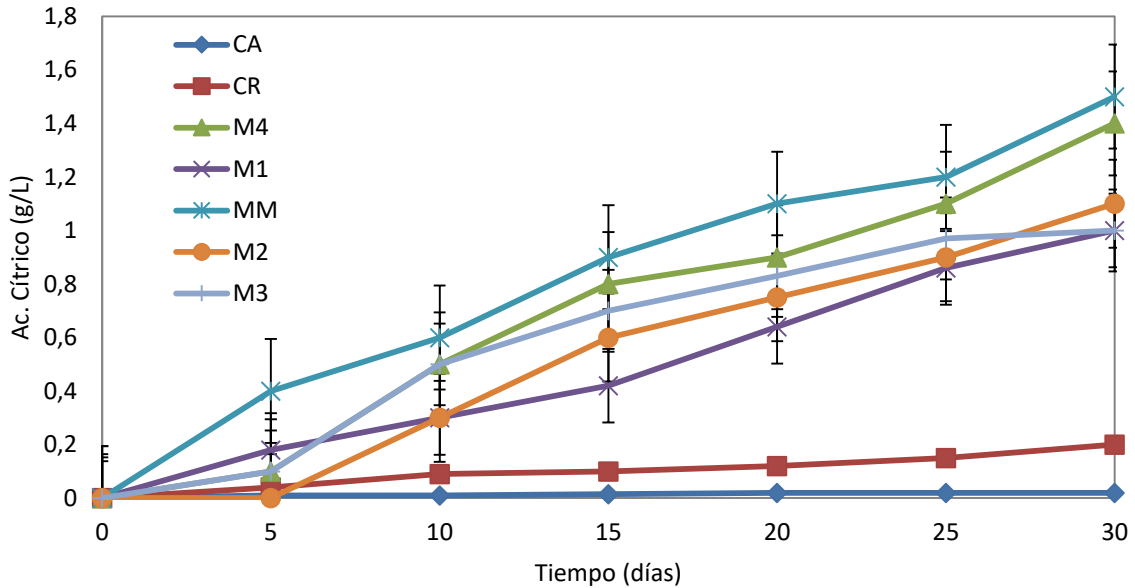
**Figura 12. Dinámica del Eh durante la biolixiviación fúngica en agitación de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.**



**Control** = Medio mineral; **M1** = Medio mineral + M1 + *Aspergillus sp* + *Trichoderma sp*; **M2** = Medio mineral + M2 + *Penicillium sp* + *Trichoderma sp*; **M3** = Medio mineral + M3 + *Penicillium sp* + *Trichoderma sp*; **M4** = Medio mineral + M2 + *Penicillium sp* + *Aspergillus sp*; **MM** = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium sp* + *Aspergillus sp* + *Trichoderma sp*.

En la figura 13 se muestran los valores de la medición de la concentración de  $C_6H_8O_7$  en la BLX de MISUREPOCU, donde se aprecia una notable diferencia entre la producción de  $C_6H_8O_7$  en la BLX y en la LXQ. Por su parte, en la tabla 14 se muestra la BLX fúngica cuando el medio de cultivo lixivante no se enriqueció con alguna fuente de C, orgánico lo que sugiere que el crecimiento de consorcio fue consecuencia de un fijación de  $CO_2$  heterotrófica algo poco común en los hongos pero posible en ambiente estrictamente mineral (Anjum *et al.*, 2010; Delvasto *et al.*, 2010)

**Figura 13. Cuantificación de ácido cítrico producido durante la biolixiviación fúngica en agitación con los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.**



**Control** = Medio mineral; **M1** = Medio mineral + M1 + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp; **M2** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M3** = Medio mineral + M3 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M4** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp; **MM** = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp.

Se muestra en la tabla 14, la concentración de Cu biolixiviado en el ensayo en agitación durante 30 días, por los consorcios fúngicos, donde se puede observar que únicamente se logró la BLX de los MISUREPOCU en el M3 y M4, esto comparado con lo reportado con Castro *et al.*, 2000 en la BLX fúngica de silicatos con *A. niger* de 2 mM de ácido cítrico, que la sacarosa es la fuente de carbono para los hongos de los consorcios que la hidrolizaron para generar fructosa y glucosa la que fue oxidada via Ciclo de Krebs para la generación de  $C_6H_8O_7$  luego la fructosa se convirtió en glucosa y se repitió lo anterior de esa forma se libero  $C_6H_8O_7$  para solubilizar los metales de los MISUREPOCU (Valix *et al.*, 2001; Mulligan *et al.*, 2004; Ochoa-Carreño & Montoya-Retrepo, 2010).

**Tabla 14. Concentración de metales al final de la biolixiviación fúngica en agitación de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre.**

Minerales	Cu
M3	0,008 <sup>d</sup>
M4	0,31 <sup>a*</sup>
MM	0,18 <sup>b</sup>

\*ANOVA/Tukey (p=0.05) Letras distintas representan diferencia estadística.

**M1** = Medio mineral + M1 + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp; **M2** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M3** = Medio mineral + M3 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M4** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp; **MM** = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp.

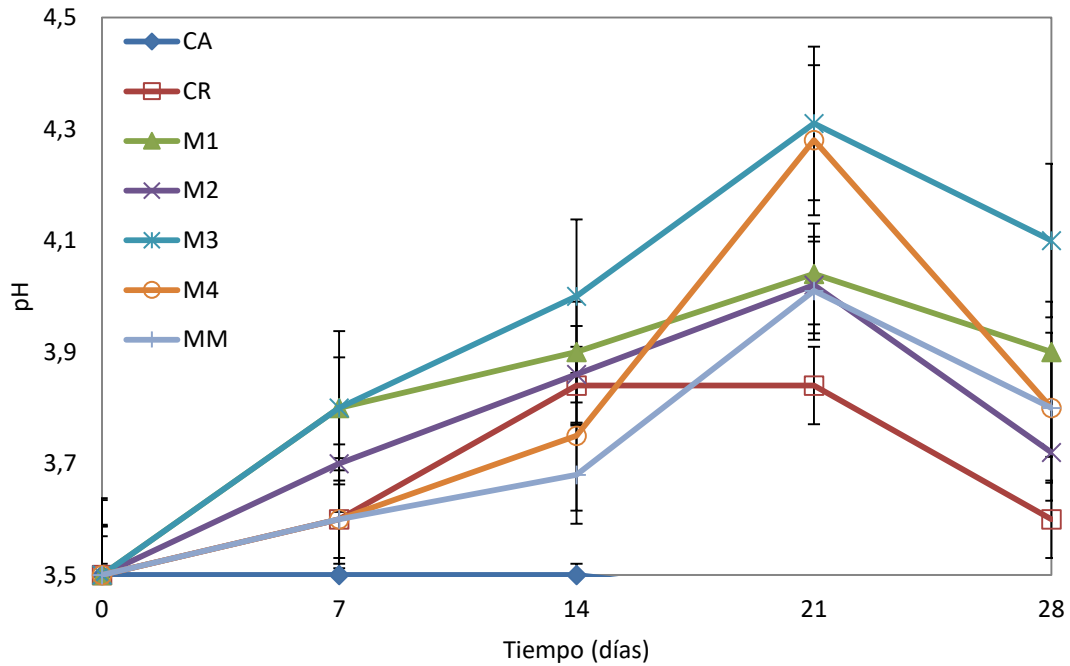
\*ND = No detectable

### 7.9 Biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En la figura 14 se muestra la dinámica del pH durante BLX fúngica de MISUREPOCU con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para estimular la actividad biolixivante por 30 días inicia el pH con un valor de 3.5 y se observa un aumento durante los primeros 15 días hasta alcanzar valores cercanos de 4.0 en el caso de la BLX fúngica del M1, M2 y la MM de los MISUREPOCU; y de 4.3 en la BLX fúngica de M4 y M3, seguido de una disminución del pH en día 20, con valores de M3 4.1, M2 3.9, MM y M4 3.8 y M1 3.7. Posteriormente, se registró un aumento en el pH hasta el final del ensayo, en el día 30. esto sugiere, la existencia de dos etapas de fijación de CO<sub>2</sub> heterotrófica por los hongos biolixivantes por parte de los hongos biolixivantes para la generación de glucosa que oxidada genero los acido orgánicos que disolvieron y solubilizaron los metales, en respuesta, el hongo

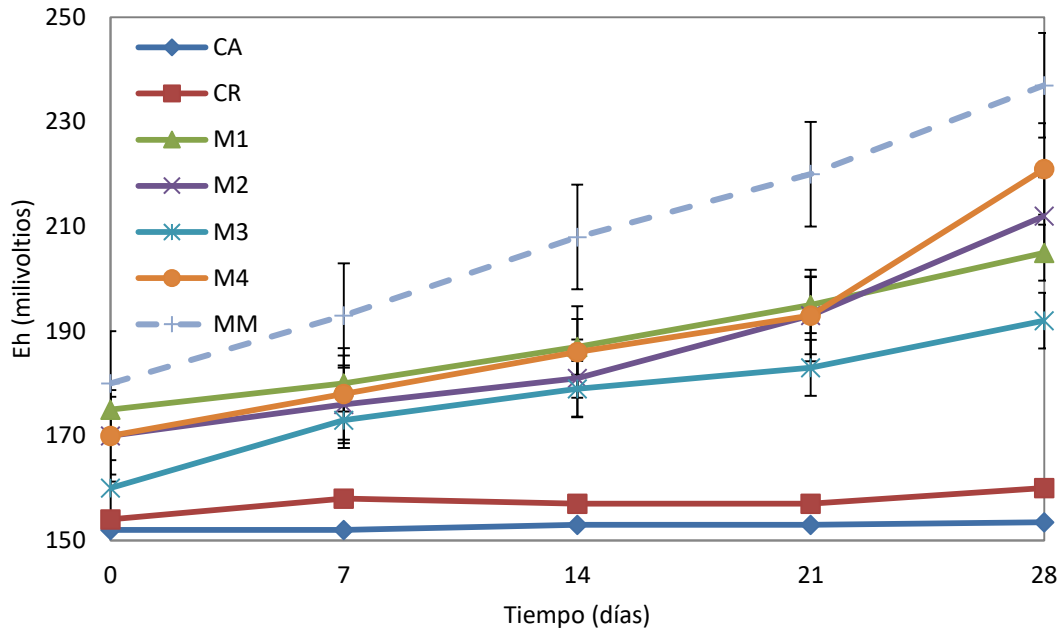
sintetizo proteínas para evitar el efecto oligodinámicos, las que al desnaturalizarse generaron  $\text{NH}_4$ , con lo que genero un aumento de ph de tanto, pues con el aumento se pH se sugiere el aumento de la producción de ácidos orgánicos y con ello, la síntesis de las proteínas de protección. Y relacionado con la figura 16, donde se muestra la cuantificación del ácido cítrico durante la BLX fúngica de los MISUREPOCU con adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 1% al medio de cultivo estrictamente mineral, donde se observa un aumento uniforme en la producción de ácido cítrico y donde posteriormente, se muestran valores sin mayor aumento. Esto sugiere, que los ácidos orgánicos que disuelven los MISUREPOCU, posteriormente solubilizan los metales y con ello, se genera un respuesta de los hongos por sintetizar las proteínas de protección que permitirán neutralizar el exceso de metales que se encuentran en solución y que estas proteínas realizan un efecto quelante, es decir, evitar la toxicidad de los metales para los hongos (Gramalyka *et al.*, 2007; Katz & Salem, 1993; Mejía *et al.*, 2017).

**Figura 14. Dinámica del pH en la biolixiviación fúngica con adición de peróxido de hidrógeno de minerales sulfurados refractarios de oro y plata.**



**Control** = Medio mineral; **M1** = Medio mineral + M1 + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp; **M2** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M3** = Medio mineral + M3 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M4** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp; **MM** = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp.

**Figura 15. Dinámica del Eh en la biolixiviación fúngica con adición de peróxido de hidrógeno de minerales sulfurados refractarios de oro y plata.**

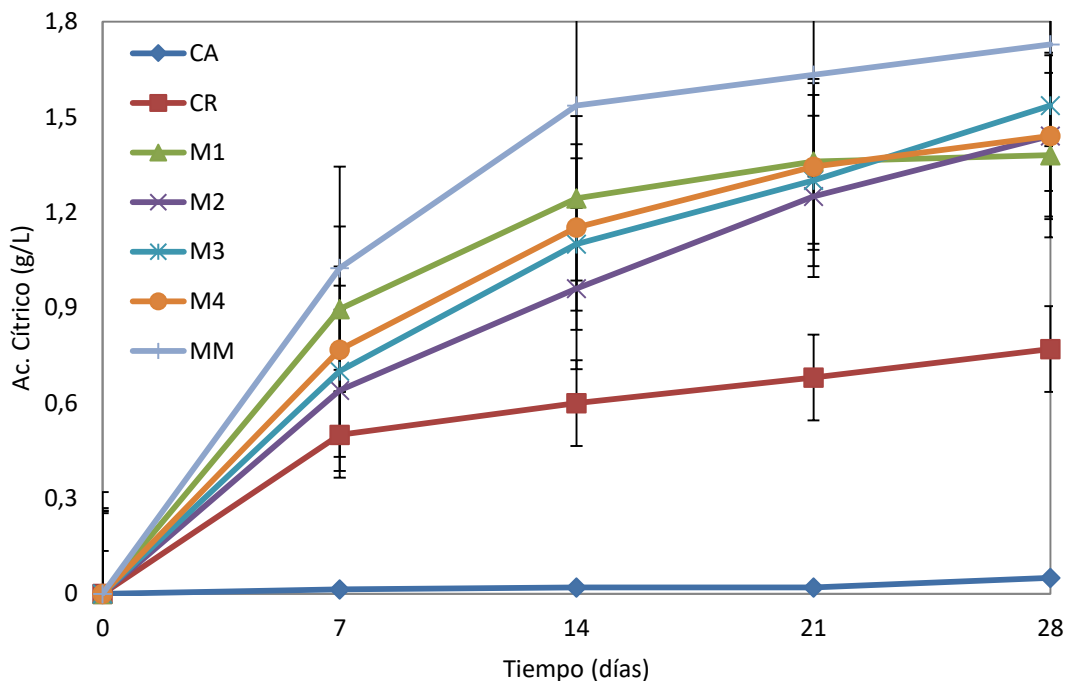


**Control** = Medio mineral; **M1** = Medio mineral + M1 + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp; **M2** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M3** = Medio mineral + M3 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M4** = Medio mineral + M4 + *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp; **MM** = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp.

En la figura 16, se muestra la cuantificación de la producción de ácido cítrico durante la BLX fúngica. Donde se observa una elevada concentración de ácidos orgánicos, es producto del Ciclo de Krebs, la cual es una respuesta de los hongos para evitar que los metales en solución tengan un efecto tóxico sobre ellos, por lo que además de estos ácidos, el hongo comienza a sintetizar proteínas de protección que permitirán la unión con los metales donde se produce una desnaturalización de su estructura, que es una respuesta del hongo en relación a la alta producción del ácido que favoreció su adaptación (Llyas *et al.*, 2007; Lock 2012; Kuhad *et al.*, 2004) .Por otro lado, el agotamiento de oxígeno se debe a la oxidación de la glucosa generada por la autotrófica heterotrófica que genero glucosa, así pues, la disminución del pH, está asociado con el agotamiento del

oxígeno al término fijación de CO<sub>2</sub> y la oxidación de la glucosa para la producción de los ácidos orgánicos (Coto 2005; Lee *et al.*, 2006; Ibañez *et al.*, 2011).

**Figura 16. Cuantificación de la producción de ácido cítrico en la biolixiviación fúngica con adición de peróxido de hidrógeno de minerales sulfurados refractarios de oro y plata.**



**Control** = Medio mineral; **M1** = Medio mineral + M1 + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp; **M2** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M3** = Medio mineral + M3 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M4** = Medio mineral + M4 + *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp; **MM** = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp.

En la tabla 15 se muestra la cuantificación por absorción atómica de Ag y Cu de la BLX fúngica de los MISUREPOCU con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, donde se observa la que la BLX fúngica del M2 generó Ag 0.01 ppm y Cu 0.24 ppm, a diferencia del M3 de la cual se obtuvo 1.19 de Cu, y de la M4 se recuperó 0.02 ppm de Ag y de la MM de minerales se obtuvo 0.08 ppm de Ag.

**Tabla 15. Cuantificación por absorción atómica de oro, plata y cobre en la biolixiviación fúngica con adición de peróxido de hidrógeno de minerales sulfurados de oro, plata y cobre.**

Mineral		
	Ag	Cu
M2	0,01 <sup>b</sup>	0,24 <sup>d</sup>
M3	ND	1,19 <sup>a*</sup>
M4	0,02 <sup>b</sup>	ND
MM	0,08 <sup>a*</sup>	ND

\*ANOVA/Tukey (p=0.05) Letras distintas representan diferencia estadística.

**Control** = Medio mineral; **M1** = Medio mineral + M1 + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp; **M2** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M3** = Medio mineral + M3 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M4** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp; **MM** = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp.

\*ND = No detectable

### 7.10 Optimización de la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre

Con base en los resultados mostrados en las tablas 8 y 9 que hacen referencia a los metales biolixiviados en el ensayo de la BLX fúngica en agitación y BLX fúngica con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y con el conocimiento de que los hongos son heterótrofos, se optó por agregar al medio de cultivo, sustancias nutritivas como materia orgánica rica en carbohidratos, lípidos, proteínas, péptidos y demás. Así pues se agregó piloncillo en 5%, pues es rico en sacarosa que contiene minerales y vitaminas del complejo B, fructuosa y glucosa, entre otros compuestos; peptona de caseína en 1 %, ya que se utiliza en la formulación de medios de cultivo por su elevado contenido de N; además de un factor de

crecimiento 0.5 %. Por otro lado, la importancia del enriquecimiento del medio de cultivo lixivante en la BLX fúngica de la MISUREPOCU fue posible observar una clara influencia del enriquecimiento del medio de cultivo lixivante sobre los resultados del ensayo final en los que la presencia de piloncillo (minerales y vitaminas, fructuosa y glucosa) ejerció una notable mejora en la BLX fúngica de los MISUREPOCU, de tal manera que el tiempo del ensayo fue menor y la concentración de metales aumento considerablemente. Así, el enriquecimiento con fuente de C, N y factor de crecimiento, sugieren un aumento en la velocidad de crecimiento celular, así como una mayor producción de ácido cítrico y con ello, mayor solubilización de los MISUREPOCU (Ahmad *et al.*, 2006; Bish & Post, 1989; Cervantes *et al.*, 2006)

**Tabla 15. Comparativa de la cuantificación de oro, plata y cobre en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refratarios de oro, plata y cobre en agitación y adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 días.**

		En agitación/30 días			Con adición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
		(ppm)			t=30 días (ppm)		
	<b>Consortios fúngicos</b>	<b>Au</b>	<b>Ag</b>	<b>Cu</b>	<b>Cu</b>	<b>Ag</b>	
M3	<i>Penicillium Trichoderma</i>	ND	ND	0,004	0,008	ND	
M4	<i>Penicillium Arpergillus</i>	ND	ND	0,17	0,31	ND	

MM	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Trichoderma</i>	ND	ND	0,11	0,18	ND	
----	--	----	----	------	------	----	--

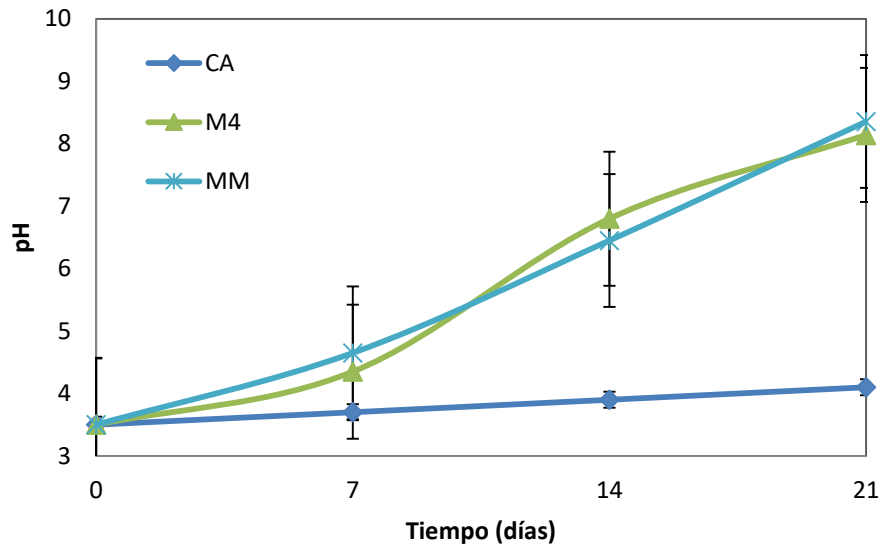
**Control** = Medio mineral; **M1** = Medio mineral + M1 + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp; **M2** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M3** = Medio mineral + M3 + *Penicillium* sp + *Trichoderma* sp; **M4** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp; **MM** = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp.

\*ND=Concentración No Detectable

### 7.11 Biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento

Se muestra en la figura 24, la dinámica de la BLX fúngica de los MISUREPOCU con enriquecimiento del medio de cultivo con piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento donde se utilizó únicamente los MISUREPOCU donde se observó la mayor extracción de metales en los ensayos anteriores, que fueron M4 y MM de todos los MISUREPOCU, comparado con el medio de cultivo control. El ensayo tuvo una duración de 21 días y comenzó con pH = 3.5, desde los primeros días se observó un aumento de forma general, de tal forma que al término del ensayo se registraron valores superiores a 8 en la BLX fúngica del M4 y la MM de los MISUREPOCU, comparado con el medio de cultivo control que registró un valor final de pH=3.6. Castro *et al.*, (2000) afirmaron que el incremento del pH observado en la BLX fúngica por el mecanismo indirecto se debe al consumo de protones en el medio de cultivo lixivante, convirtiendo cada mineral en sales metálicas solubles. Esto revela que la cantidad de protones producida en este caso excede la demanda para las reacciones de la BLX fúngica.

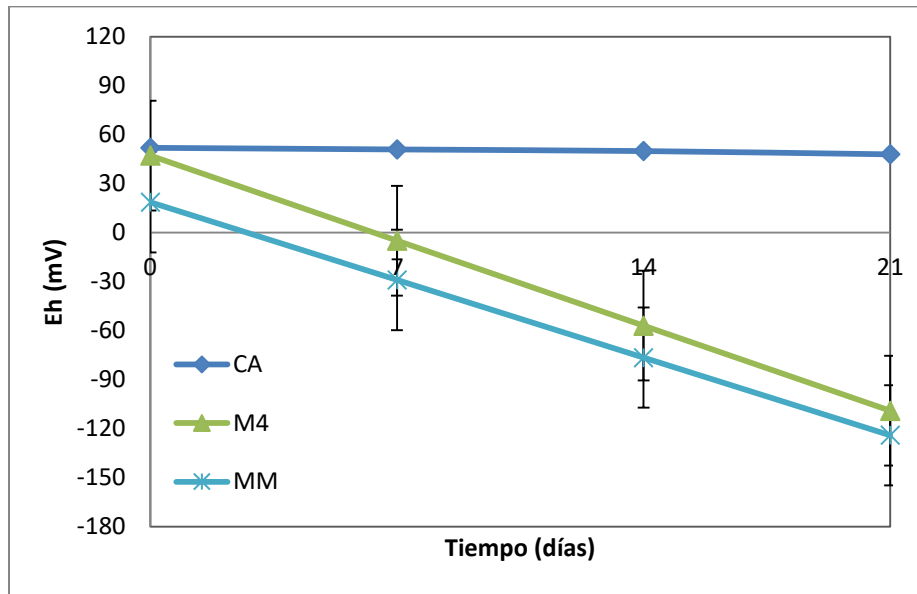
**Figura 17. Dinámica del pH en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento.**



**Control** = Medio mineral; **M4** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp; **MM** = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp.

En la figura 18 se muestra la dinámica del Eh en la BLX fúngica de MISUREPOCU con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento durante 21 días, donde se observa un valor inicial de 60 mV, con una disminución en forma general hasta valores cercanos de -120 mV. Como referencia útil de la bioquímica, el Eh da un papel de en los procesos energéticos biológicos. Un número negativo de este potencial, indica un agente reductor, se deduce que un gran potencial redox negativo seguido de valores positivos, indica un consumo de oxígeno en el medio de cultivo, pues existe un aumento en la concentración de glucosa para ser utilizada como fuente de C y que forma parte de la respiración celular en todas las células aeróbicas (Le *et al.*, 2006).

**Figura 18. Dinámica del Eh en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refratarios de oro, plata y cobre con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento.**

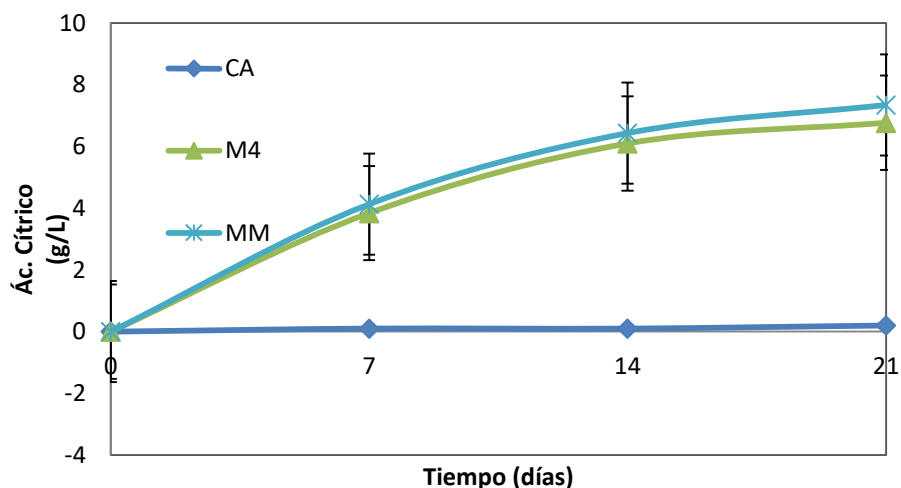


**Control** = Medio mineral; **M4** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp; **MM** = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp.

En la figura 19, se muestra la cuantificación del ácido cítrico en la BLX fúngica del M4 y la MM de los MISUREPOCU con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento, donde se registra un aumento en ambos casos, relacionado al crecimiento microbiano, con valores de 6.8 g/L en la BLX fúngica del M4 y 7.4 g/L producto de un sucesión de reacción química, la producción de ácido orgánicos, entre ellos el ácido cítrico, derivado de la oxidación de carbohidratos. Durante el crecimiento de los hongos, la fuente de carbono sufre oxidación microbiana que inicia producción de ácidos cítrico, oxálico, tartárico y málico que juegan un papel fundamental en la movilidad de los metales (Anjum *et al.*, 2009). Algunos de estos ácidos actúan como agentes complejantes con 2 o más donantes de electrones para metales. Los ácidos cítrico, oxálico y tartárico tienen propiedades quelantes (Anjum *et al.*,

2009; Qu & Lian, 2013). Estos ácidos son buenos quelantes metálicos que pueden formar complejos con iones metálicos. El ácido orgánico se llama quelante si tiene dos o más grupos de donantes de electrones. Por lo tanto, se forman uno o más anillos y luego el ácido orgánico puede denominarse como agente quelante y el complejo resultante se denomina quelante metálico.

**Figura 19. Cuantificación del ácido cítrico en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refratarios de oro, plata y cobre con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento.**

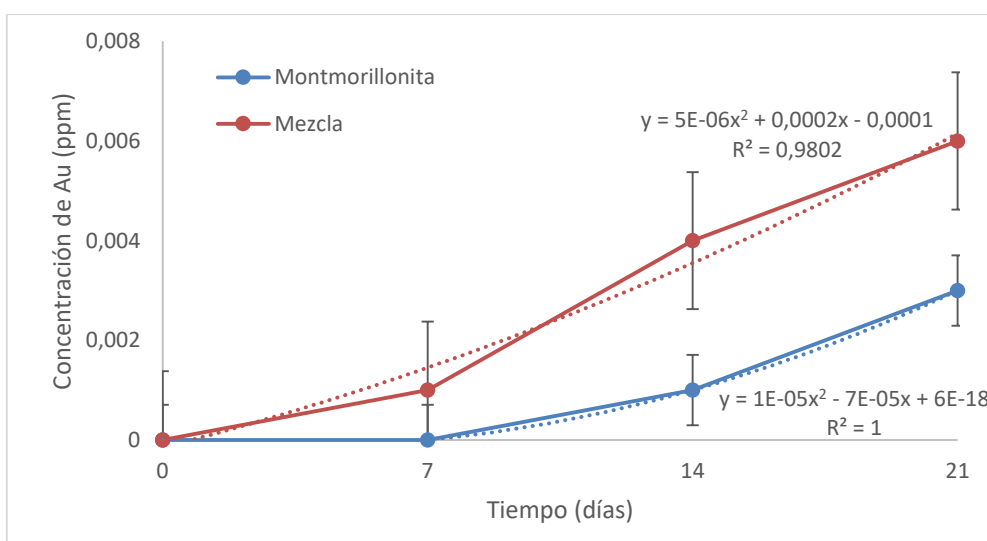


**Control** = Medio mineral; **M4** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp; **MM** = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp.

A continuación, se muestra por separado, la extracción de Au, Ag y Cu a partir de los MISUREPOCU, durante la BLX fúngica en consorcios con enriquecimiento en el medio de cultivo. Es sabido, que *Aspergillus* y *Penicillium* sp son capaces de

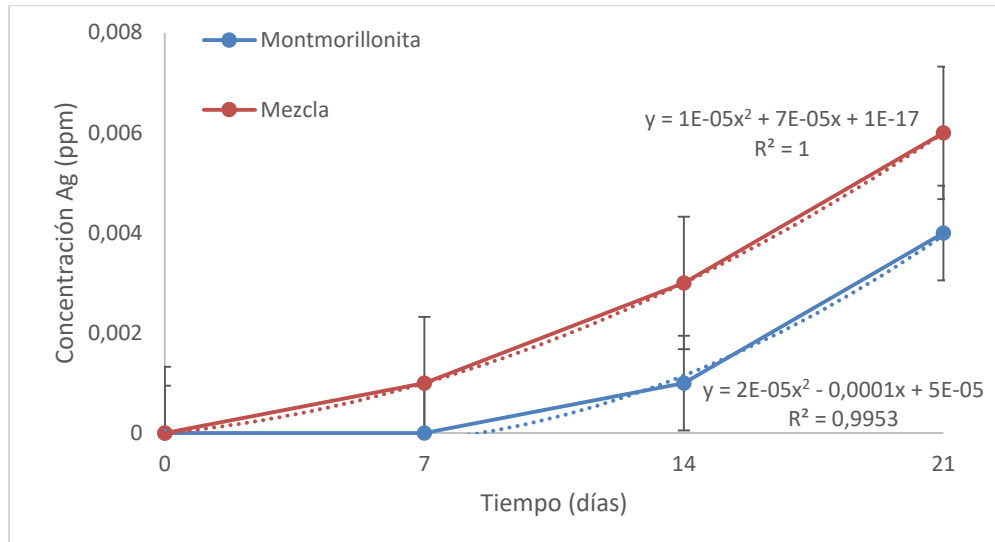
reducir y disolver los metales a partir de los MISUREPOCU. Sin embargo, como consorcios, *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* y/o *Trichoderma sp*, en los resultados del análisis espectrofotométrico de absorción atómica muestran que la concentración más alta de metales se alcanzó utilizando el consorcio fúngico con mas especies diferente en la BLX. Esto se debe probablemente a la cantidad de metabolitos producidos por los consocios (Castro *et al.*, 2000). Además, analizados en conjunto, los resultados expresados en la Tabla 12 parecen sugerir que la eficiencia del proceso de lixiviación utilizando *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* y/o *Trichoderma sp* puede variar de acuerdo con el metal que se extrae y la composición mineralógica de los MISUREPOCU.

**Figura 20. Cuantificación de Au en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento en el medio de cultivo.**



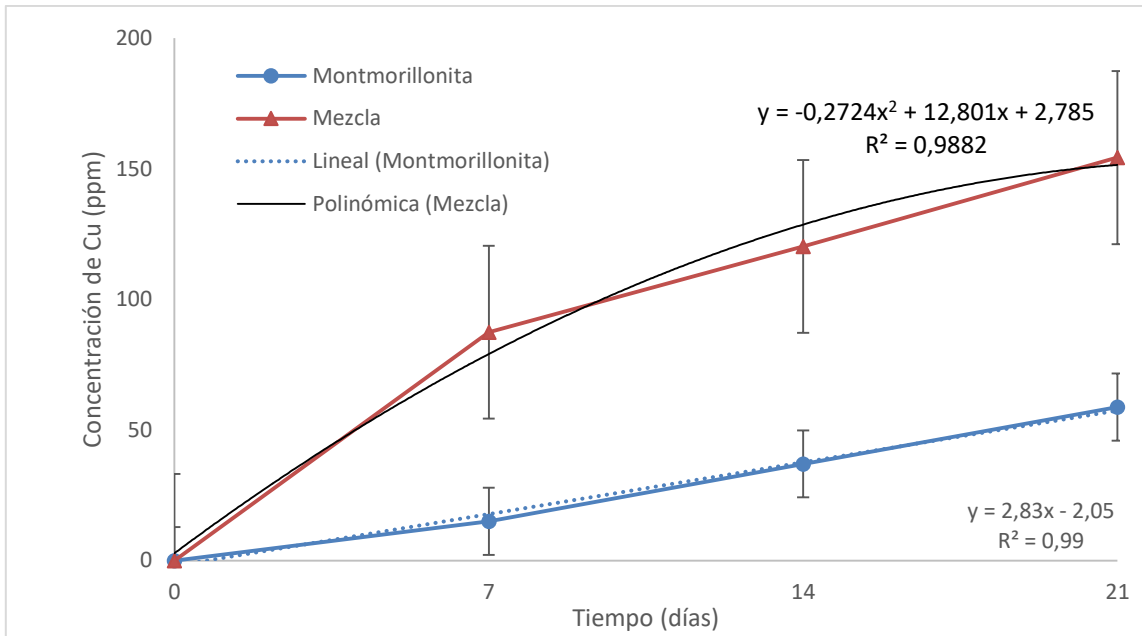
**Montmorillonita = M4 = Medio mineral + M2 + *Penicillium sp* + *Aspergillus sp*; Mezcla= MM = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium sp* + *Aspergillus sp* + *Trichoderma sp*.**

**Figura 21. Cuantificación de Ag en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento en el medio de cultivo.**



**Montmorillonita = M4 = Medio mineral + M2 + *Penicillium sp* + *Aspergillus sp*; Mezcla= MM = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium sp* + *Aspergillus sp* + *Trichoderma sp*.**

**Figura 22. Cuantificación de Cu en la biolixiviación fúngica de minerales sulfurados refractarios con enriquecimiento de piloncillo, peptona de caseína y factor de crecimiento en el medio de cultivo.**



**Montmorillonita = M4** = Medio mineral + M2 + *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp; **Mezcla= MM** = Medio mineral + M1+M2 + M3 + M4+ *Penicillium* sp + *Aspergillus* sp + *Trichoderma* sp.

## **8. Conclusiones**

- La acción de los hongos durante la BLX fúngica de MISUREPOCU puede ser optimizada al enriquecer el medio de cultivo con una fuente de carbono y de nitrógeno orgánicas, así como un factor de crecimiento, lo que permite aumentar la disolución de los minerales y con ello, la solubilización del oro, la plata y el cobre.
- Fue factible la BLX fúngica de MISUREPOCU en un ambiente mineral mediante una autotrófica heterotrófica que genero suficiente concentración de ácido cítrico para la solubilidacion de minerales y disolución de metales.

## 9. Referencias

- Ahmad, I., M.I. Ansari and F. Aqil. 2006. Biosorption of Ni, Cr and Cd by metal tolerant *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. using single and multi-metal solution. *Indian Journal of Experimental Biology* 44:73-76. Disponible en línea: [http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/6341/1/IJEB%2044\(1\)%2073-76.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/6341/1/IJEB%2044(1)%2073-76.pdf)
- Anjum, F., Bhatti, H. N., Ghauri, M. A., Bhatti, I. A., Asgher, M., & Asi, M. R. (2009). Bioleaching of copper, cobalt and zinc from black shale by *Penicillium notatum*. *African Journal of Biotechnology*, 8(19); pp. 5038-5045, 5. ISSN 1684–5315 © 2009 Academic Journals. Disponible en línea: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/65211/52913>
- Anjum, F., Bhatti, H. N., & Ghauri, M. A. (2010). Enhanced bioleaching of metals from black shale using ultrasonics. *Hydrometallurgy*, 100(3-4), 122-128. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2009.10.016>
- Atlas virtual de micología – Disponible en línea: <https://phytusclub.com/materiais-didaticos/trichoderma-que-fpatogenos-ele-controla/> Consulta: 13 de febrero de 2018.
- Avakyan, Z. A., & Rabotnova, I. L. (1971). Comparative toxicity of free ions of copper and copper complexes with organic acids for *Candida utilis*. *Mikrobiologiya*, 40(2), 305-310.
- Bish, D. L., & Post, J. E. (1989). *Modern powder diffraction* (Vol. 20). Washington, DC: Mineralogical Society of America.
- Bosecker, K. (1985). Leaching of lateritic nickel ores with heterotrophic microorganisms. *Acta Biotechnologica*, 7(5), 389-399.
- Caicedo, G. A., & Márquez, M. A. (2013). Mecanismo de selección de consorcios bacterianos compatibles con *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* en procesos de biodesulfurización de carbón. *Revista Facultad de Ingeniería*, (52), 88-94.

Disponible en línea:  
<http://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/ingenieria/article/view/14807/12959>

- Castro, I. D. M., Fietto, J. L. R., Vieira, R. X., Trópia, M. J. M., Campos, L. M. M. D., Paniago, E. B., & Brandão, R. L. (2000). Bioleaching of zinc and nickel from silicates using *Aspergillus niger* cultures. *Hydrometallurgy*, 57(1), 39-49. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00088-8)
- Chavez Flores. P. O. (2014). Determinación de la dosificación óptima de cianuro para lograr la mayor recuperación de oro y plata en el proceso de lixiviación intensiva de concentrados. URI: <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/3954>.
- Ochoa Carreño, D. C., & Montoya Restrepo, A. (2010). Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *Revista Facultad de Ciencias Económicas: Investigación y Reflexión*, 18(2), 55-74. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfce/v18n2/v18n2a04.pdf>
- Castrillón, M., García, C., & Paucar, C. (2007). Evaluación de la influencia del tamaño de partícula y el tiempo de tratamiento térmico sobre las características físico-mecánicas de un compuesto de alúmina sinterizada infiltrada con un vidrio de lantano. *Dyna*, 74(152), 159-165. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v74n152/a14v74n152.pdf>
- Cervantes, C., Espino-Saldaña, A. E., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I. L., Rivera-Cano, M. E., Ávila-Rodríguez, M., & Moreno-Sánchez, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista latinoamericana de microbiología*, 48(2), 203-210. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/profile/Francisco\\_Javier\\_Acevedo-Aguilar/publication/6259274\\_Microbial\\_interactions\\_with\\_heavy\\_metals/links/543d5f200cf240f04d104285.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Francisco_Javier_Acevedo-Aguilar/publication/6259274_Microbial_interactions_with_heavy_metals/links/543d5f200cf240f04d104285.pdf)

- Contreras Lozano. J. R.. & López León. F. H. (2013). Efecto de la granulometría y sales de plomo en la recuperación de oro y plata por medio de una lixiviación alcalina con cianuro de sodio en un mineral arsenopiritoso. URI: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3442> ; Disponible en línea: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3442>
- Coto, O., Peguero, M., Abín, L., Bruguera, N., Marrero, J., & Bosecker, K. (2005). Bioleaching of laterite by *Aspergillus niger* strain O5, an acidophilic, nickel and cobalt resistant fungus. In *Proceedings of the 16th International Biohydrometallurgy Symposium. Cape Town, South Africa* (pp. 357-364).
- Delvasto, P., Valverde, A., Ballester, A., Munoz, J. A., González, F., Blazquez, M. L., ... & García-Balboa, C. (2008). Diversity and activity of phosphate bioleaching bacteria from a high-phosphorus iron ore. *Hydrometallurgy*, 92(3-4), 124-129.
- Falco, L., Pogliani, C., Curutchet, G., & Donati, E. (2003). A comparison of bioleaching of covellite using pure cultures of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* or a mixed culture of *Leptospirillum ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Hydrometallurgy*, 71(1-2), 31-36. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(03\)00170-1](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(03)00170-1). Disponible en línea: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304386X03001701>.
- Frías. M. F.. Pérez. M. P.. Suárez. J. C.. Fernández. I. G.. Cabrera. I.. Alcalá. R.. ... & Meralla. R. C. Ensayos De Cianuración En Botellas Por Agitación. De Menas Auríferas Oxidadas De Baja Ley. Disponible en línea: [http://www.redciencia.cu/geobiblio/paper/2011\\_%20Figueredo\\_Frias\\_MIN5-P22.pdf](http://www.redciencia.cu/geobiblio/paper/2011_%20Figueredo_Frias_MIN5-P22.pdf)
- Fu, B., Zhou, H., Zhang, R., & Qiu, G. (2008). Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus* spp. and *Leptospirillum ferriphilum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(2), 109-115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.06.018>. Disponible en línea: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830507001837>

- Gomez, E., Ballester, A., Gonzalez, F., & Blazquez, M. L. (1999). Leaching capacity of a new extremely thermophilic microorganism, *Sulfolobus rivotincti*. *Hydrometallurgy*, 52(3), 349-366. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(99\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(99)00027-4). Disponible en línea: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304386X99000274>
- Gramatyka, P., Nowosielski, R., Sakiewicz, P., (2007). Recycling of waste electrical and electronic equipment. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*. 20(1-2), 535-538. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/profile/P\\_Sakiewicz/publication/42253354\\_Recycling\\_of\\_waste\\_electrical\\_and\\_electronic\\_equipment/links/562bfc4308ae518e3481025c.pdf](https://www.researchgate.net/profile/P_Sakiewicz/publication/42253354_Recycling_of_waste_electrical_and_electronic_equipment/links/562bfc4308ae518e3481025c.pdf)
- Huarachi-Olivera, R., Dueñas-Gonza, A., Yapó, U., Almanza, M., Manuel, D., Lazarte-Rivera, A., ... & Esparza, M. (2017). Biolixiviación de mineral cuarzo por *Acidithiobacillus ferrooxidans* en reactor de columna por gravedad. *Revista de Metalurgia*, 53(2), 096. DOI: <http://orcid.org/0000-0002-3504-3399>. Disponible en línea: <http://revistademetalurgia.revistas.csic.es/index.php/revistademetalurgia/article/view/1411>
- Ibanez, J. P., Ipinza, J., Collao, N., & Ahlborn, G. (2007). Metallurgical behavior of fine fractions of copper sulfide minerals in a combined process of modified flotation and agitated bio leaching. *Revista de Metalurgia*, 43(2), 125-132.
- Islam, M., & Ting, Y. P. (2009). Fungal bioleaching of spent hydroprocessing catalyst: effect of decoking and particle size. In *Advanced Materials Research* (Vol. 71, pp. 665-668). Trans Tech Publications. DOI: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.71-73.665>
- Katz, S. A., & Salem, H. (1993). The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *Journal of Applied Toxicology*, 13(3), 217-224. DOI: 10.1002/jat.2550130314. Disponible en línea: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jat.2550130314/full>

- Kiel, H., & Schwartz, W. (1980). Leaching of a silicate and carbonate copper ore with heterotrophic fungi and bacteria, producing organic acids. *Journal of Basic Microbiology*, 20(10), 627-636.
- Klug, H. P., & Alexander, L. E. (1954). X-ray diffraction methods for polycrystalline and amorphous materials.
- Kuhad, R. C., Sood, N., Tripathi, K. K., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. *Advances in applied microbiology*, 56, 185.
- Laessøe, T. (1998). *Mushrooms. The visual guide to over 500 species of mushroom from around the world*. Dorling Kindersley.
- Lee, J., Acar, S., Doerr, D. L., & Brierley, J. A. (2006). Comparative bioleaching and mineralogy of composited sulfide ores containing enargite, covellite and chalcocite by mesophilic and thermophilic microorganisms. *Hydrometallurgy*, 105(3-4), 213-221.
- Lock, D. H. (2012). Aplicaciones en la biometalurgia. *Revista de Química*, 23(1-2), 25-30. Disponible en línea: <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/3453/3309>
- Llyas, S., Amwar, M., Niazi, S., Afzal, M., 2007. Bioleaching of metals from electronic scrap by moderately thermophilic acidophilic bacteria. *Hydrometallurgy*. 88 (1-4), 180-188. DOI: doi:10.1016/j.hydromet.2007.04.007 ; Disponible en línea: [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/41809900/Bioleaching\\_of\\_metals\\_from\\_electronic\\_sc20160131-13812-muzih4.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1520493092&Signature=9RVUxAN0jssmgYeTjv4E1gzwRZE%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DBioleaching\\_of\\_metals\\_from\\_electronic\\_sc.pdf](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/41809900/Bioleaching_of_metals_from_electronic_sc20160131-13812-muzih4.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1520493092&Signature=9RVUxAN0jssmgYeTjv4E1gzwRZE%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DBioleaching_of_metals_from_electronic_sc.pdf)
- Madrigal-Arias, J. E., Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Mendoza-López, M., García-Barradas, O., Cruz-Sánchez, J. S., & Jiménez-Fernández, M. (2015).

Bioleaching of gold, copper and nickel from waste cellular phone PCBs and computer goldfinger motherboards by two *Aspergillus niger* strains. Brazilian Journal of Microbiology, 46(3), 707-713. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246320140256> . Disponible en línea: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822015000300707&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822015000300707&script=sci_arttext)

- Mejía, E., Ospina, J. D., Márquez, M. A., & Morales, Á. L. (2017). Biolixiviación de la esfalerita: Minerología del proceso. Revista CINTEX, 16, 52-62. Disponible en línea: [pascualbravo.edu.co](http://pascualbravo.edu.co)
- Mejía, E., Ospina, J. D., Osorno, B. L., Márquez, M. A., & Morales, A. L. (2011). Adaptación de una cepa compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre concentrados de calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>), esfalerita (ZnS) y galena (PbS). Revista Colombiana de Biotecnología, 13(1). Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/html/776/77621348018/>
- Melgarejo, J. C., Proenza, J. A., Galí, S., & Llovet, X. (2010). Técnicas de caracterización mineral y su aplicación en exploración y explotación minera. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana, 62(1), 1-23. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/bsgm/v62n1/v62n1a2.pdf>
- Mohapatra, S., Bohidar, S., Pradhan, N., Kar, R. N., & Sukla, L. B. (2007). Microbial extraction of nickel from Sukinda chromite overburden by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Aspergillus* strains. Hydrometallurgy, 85(1), 1-8.
- Moosvi, S. J. (2006, October). Ecological importance of solar saltworks. In Proceedings of the 1st International Conference on the Ecological Importance of Solar Saltworks: 20-22 October 2006 (pp. 243-248). Santorini.
- Mulligan, C. N., Kamali, M., & Gibbs, B. F. (2004). Bioleaching of heavy metals from a low-grade mining ore using *Aspergillus niger*. Journal of Hazardous Materials, 110(1-3), 77-84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.02.040>

- Nester, E. W., Roberts, C. E., Pearsall, N. N., & McCarthy, B. J. (1978). Microbiology . Holt, Rinehart and Winston.( 02); 345-357. Disponible en línea: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19782215075>
- Ospina Correa, J. D., Osorno Bedoya, L., Giraldo Builes, J., Mejía Restrepo, E., & Márquez Godoy, M. A. (2016). Aplicaciones biotecnológicas en minería aurífera: Estado del arte sobre la oxidación bacteriana de arsenopirita (FeAsS). Disponible en línea: [http://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/3242/1/aplicaciones\\_biotecnologicas.pdf](http://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/3242/1/aplicaciones_biotecnologicas.pdf)
- Plumb, J. J., Muddle, R., & Franzmann, P. D. (2008). Effect of pH on rates of iron and sulfur oxidation by bioleaching organisms. Minerals Engineering, 21(1), 76-82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2007.08.018>
- Porro, S., Boiardi, J. L., & Tedesco, P. H. (1988). Biolixiviación de minerales argentinos M4. Revista de Metalurgia (Madrid), 24. Disponible en línea: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/29466>; URI: <http://hdl.handle.net/10915/29464>
- Porro, S., & Tedesco, P. H. (1990). Biolixiviación de un mineral de manganeso y plata. Revista de Metalurgia (Madrid), 26. Disponible en línea: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/29466> ; URI: <http://hdl.handle.net/10915/29466>
- Qu, Y., & Lian, B. (2013). Bioleaching of rare earth and radioactive elements from red mud using *Penicillium tricolor* RM-10. Bioresource technology, 136, 16-23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.070>
- Ramirez. C.. & Carlos. R. (2013). Lixiviación de relaves oxidados de cobre y oro de la Minera Manuela Ite-Tacna (Doctoral dissertation). Disponible en línea: <http://200.37.105.196:8080/handle/unjbg/136>

- Robinson, J. W. (1960). Atomic absorption spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 32(8), 17A-29A. disponible en línea: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60164a712?journalCode=ancham>. DOI: 10.1021/ac60164a712
- Rodríguez, Y., Blázquez, M. L., Ballester, A., González, F., & Muñoz, J. A. (2001). La biolixiviación al comienzo del siglo XXI. *Revista de metalurgia*, 37(5), 616-627. DOI: <https://doi.org/10.3989/revmetalm.2001.v37.i5.528> . Disponible en línea: <http://revistademetalurgia.revistas.csic.es/index.php/revistademetalurgia/article/view/528>
- Sánchez-Yáñez, J. M. (2007). Breve tratado de microbiología agrícola teoría y práctica. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, COSUSTENTA, SA de CV, Centro de Investigación y Desarrollo del Estado de Michoacán, Morelia, Mich. México, 130-133.
- Santhiya, D., & Ting, Y. P. (2005). Bioleaching of spent refinery processing catalyst using *Aspergillus niger* with high-yield oxalic acid. *Journal of biotechnology*, 116(2), 171-184.
- Sethurajan, M., Lens, P. N., Rene, E. R., Van de Vossenberg, J., Huguenot, D., Horn, H. A., ... & Van Hullebusch, E. D. (2017). Bioleaching and selective biorecovery of zinc from zinc metallurgical leach residues from the Três Marias zinc plant (Minas Gerais, Brazil). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92(3), 512-521. DOI: 10.1002/jctb.5026
- Silverman, M. P., & Lundgren, D. G. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*: I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of bacteriology*, 77(5), 642.
- Srivastava, S. and I.S. Thakur. 2006. Isolation and process parameter optimization of *Aspergillus* sp. for removal of chromium from tannery effluent. *Biores. Technol.* 97(10):1167-1173. Disponible en línea: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852405002725>. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.012>

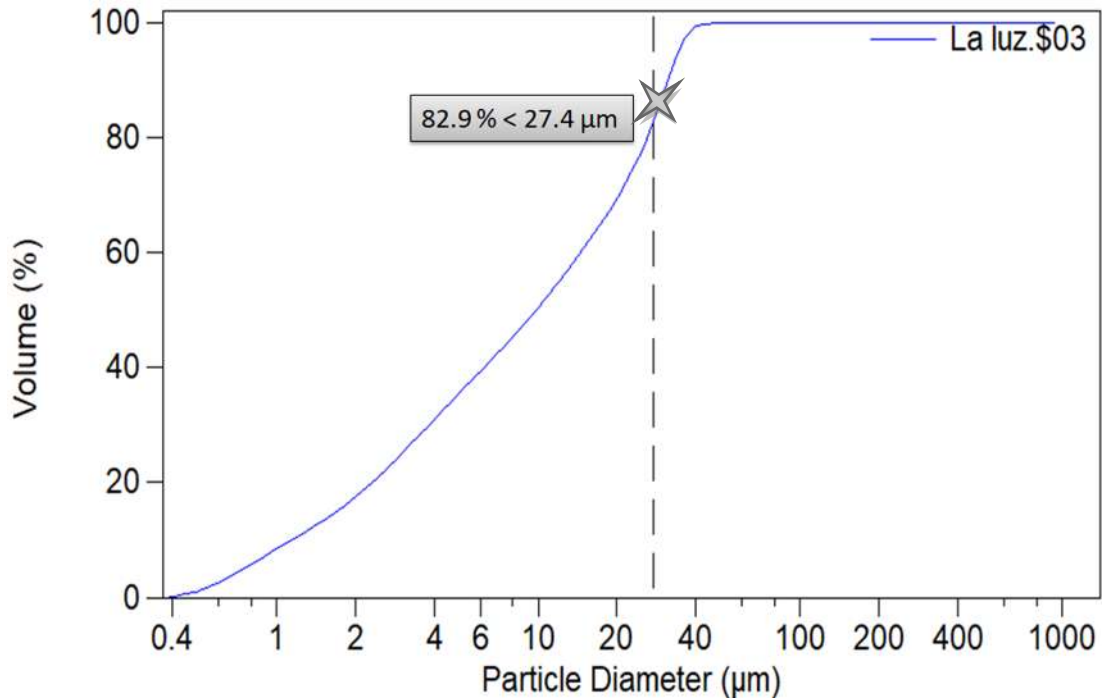
- Sum, E.Y.L., 1991. The recovery of metals from electronic scrap. *Journal of Metallurgy*, 43 (4), 53-61. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03220549>
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L., & Johnson, T. R. (2004). *Microbiology: an introduction*. San Francisco, CA: Benjamin Cummings, 9, (104-156). Disponible en línea: [homepage.smc.edu](http://homepage.smc.edu)
- Tuncuk, A., Stazi, V., Akcil, A., Yazici, E.Y., Deveci, H., 2012. Aqueous metal recovery techniques from e-scrap: Hydrometallurgy in recycling. *Minerals Engineering*, 25 (1), 28-37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2011.09.019>.
- Tzeferis, P. G., & Agatzini-Leonardou, S. (1994). Leaching of nickel and iron from Greek non-sulphide nickeliferous ores by organic acids. *Hydrometallurgy*, 36(3), 345-360.
- Valix, M., Usai, F., & Malik, R. (2001). Fungal bio-leaching of low grade laterite ores. *Minerals Engineering*, 14(2), 197-203. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0892-6875\(00\)00175-8](https://doi.org/10.1016/S0892-6875(00)00175-8)
- Zhang, Y. S., Qin, W. Q., Jun, W. A. N. G., Zhen, S. J., Yang, C. R., Zhang, J. W., ... & Qiu, G. Z. (2008). Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed culture. *Transactions of nonferrous metals society of China*, 18(6), 1491-1496. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(09\)60031-5](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(09)60031-5).
- Zhou, Y., Wu, W., & Qiu, K. (2011). Recycling of organic materials and solder from waste printed circuit boards by vacuum pyrolysis-centrifugation coupling technology. *Waste management*, 31(12), 2569-2576. Disponible en línea 2017: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X11003072> . DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.07.002>

# *Anexos*



**A. Determinación del tamaño de partícula de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre por difracción de rayos láser**

**Figura 23. Distribución de tamaño de partícula del M1,  $d_{80} = 15.7 \mu\text{m}$ .**



**Figura 24. Distribución de tamaño de partícula del M2,  $d_{80} = 25.3 \mu\text{m}$ .**

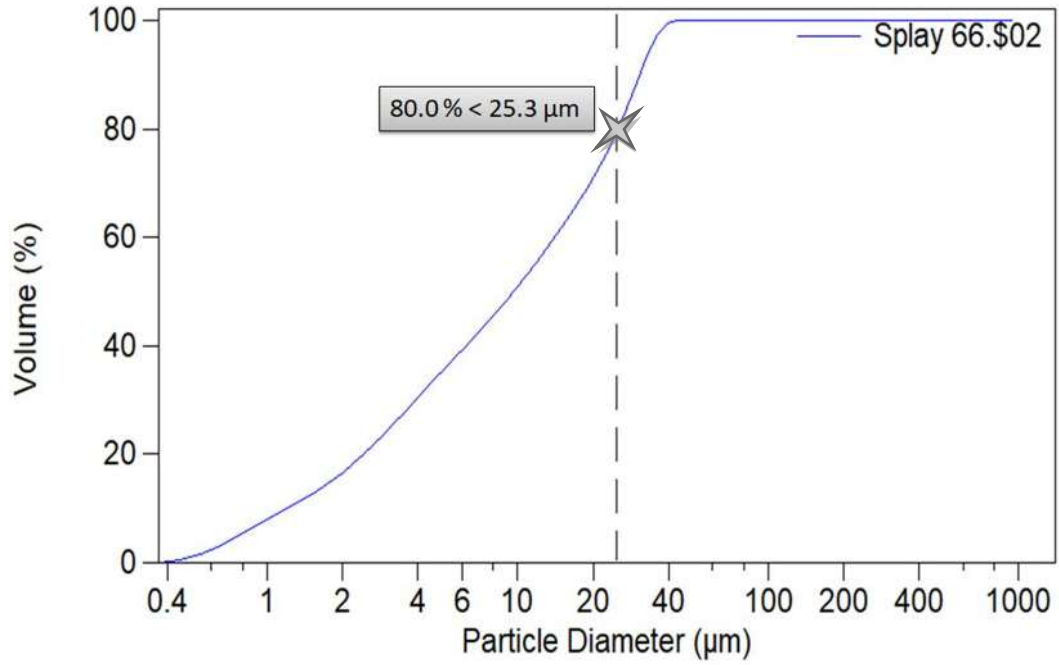


Figura 25. Distribución de tamaño de partícula de la “M3”  $d_{80} = 15.7 \mu\text{m}$ .

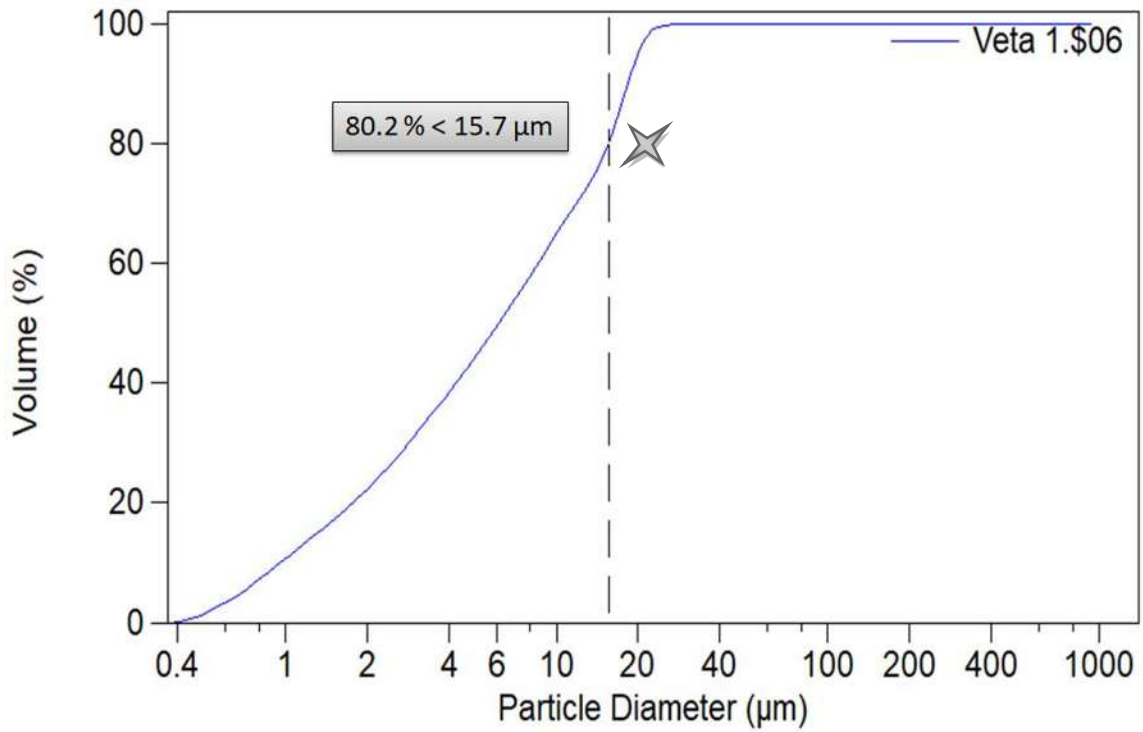
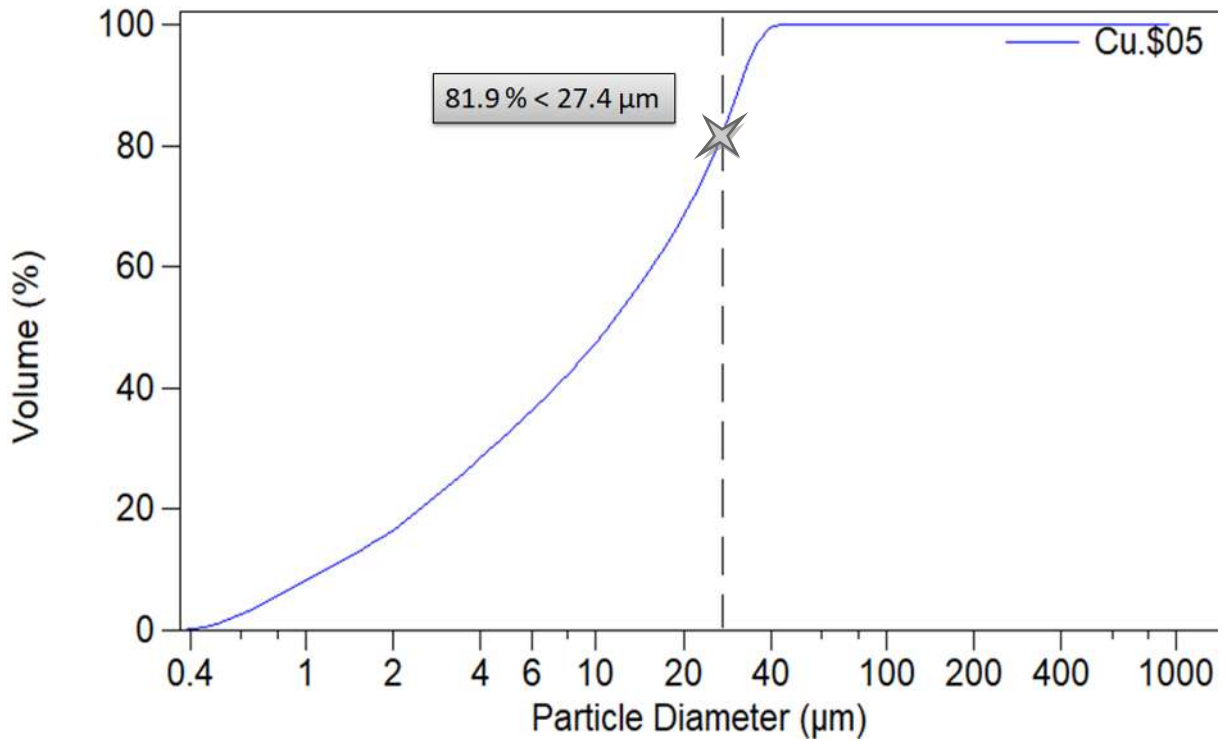


Figura 26. Distribución de tamaño de partícula del M4,  $d_{80} = 27.4 \mu\text{m}$ .



**B. Determinación de la composición química de los minerales sulfurados refractarios de oro, plata y cobre por difracción de rayos X.**

Figura 27. Difractograma de rayos X de M1.

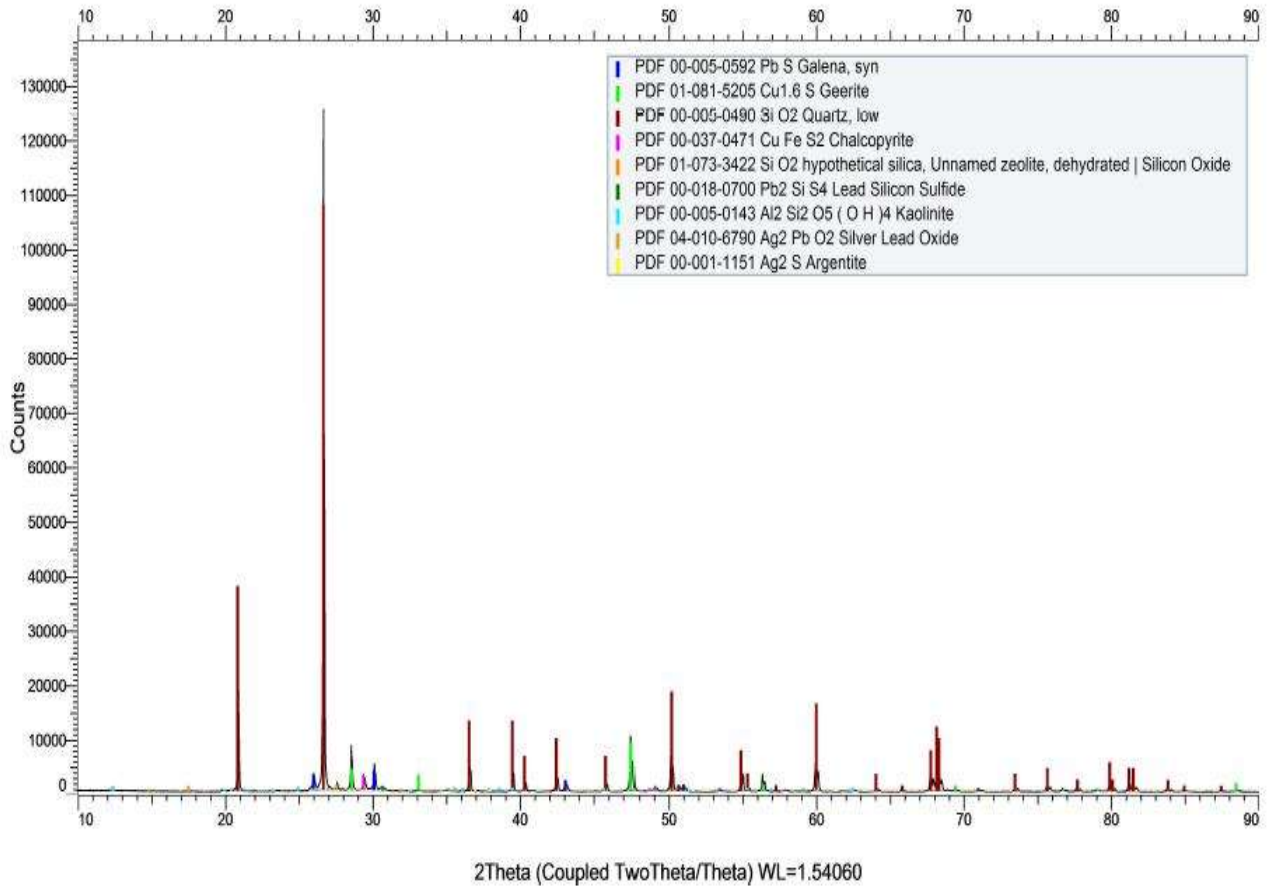


Figura 28. Difractograma de rayos X de M2.

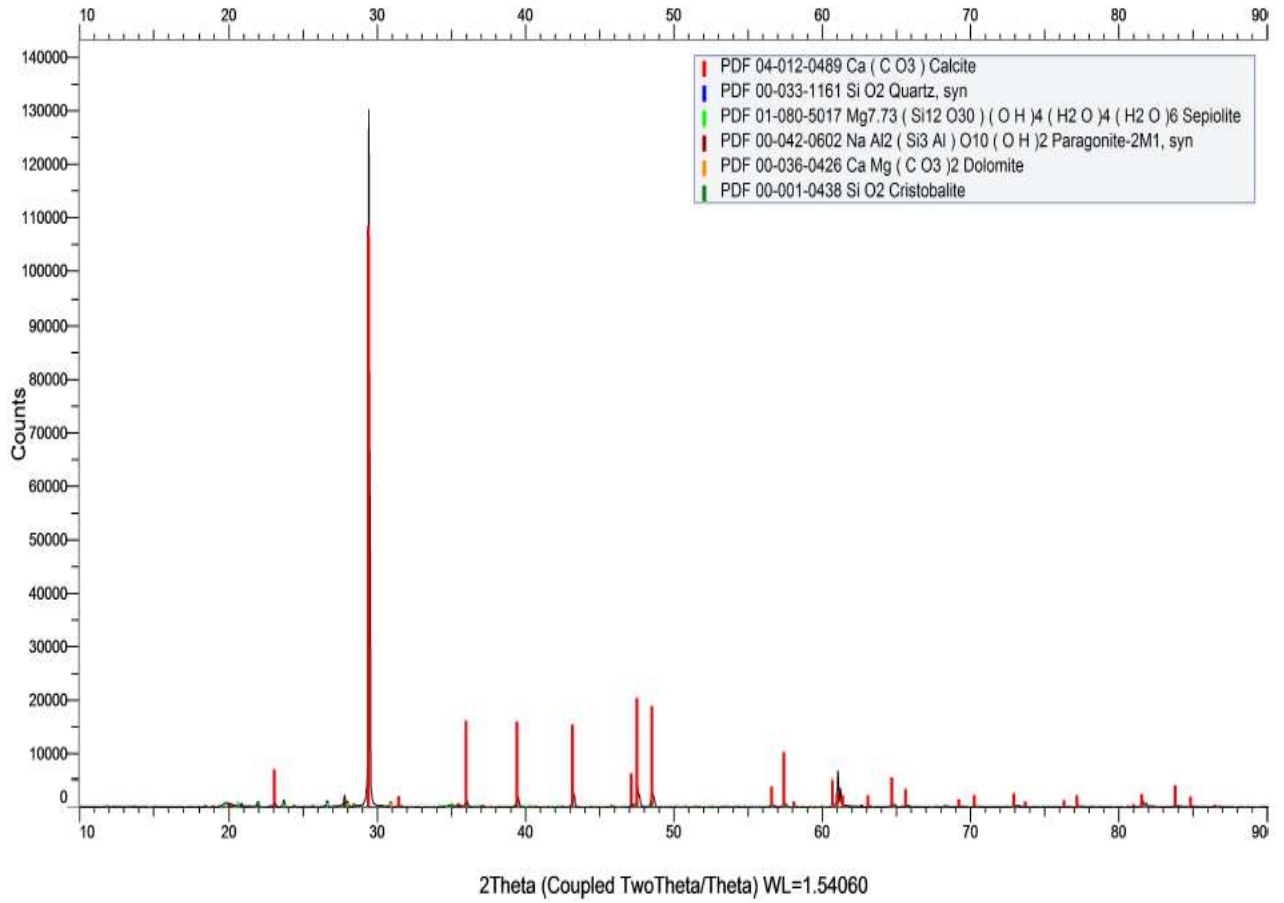


Figura 29. Difractograma de rayos X de M3.

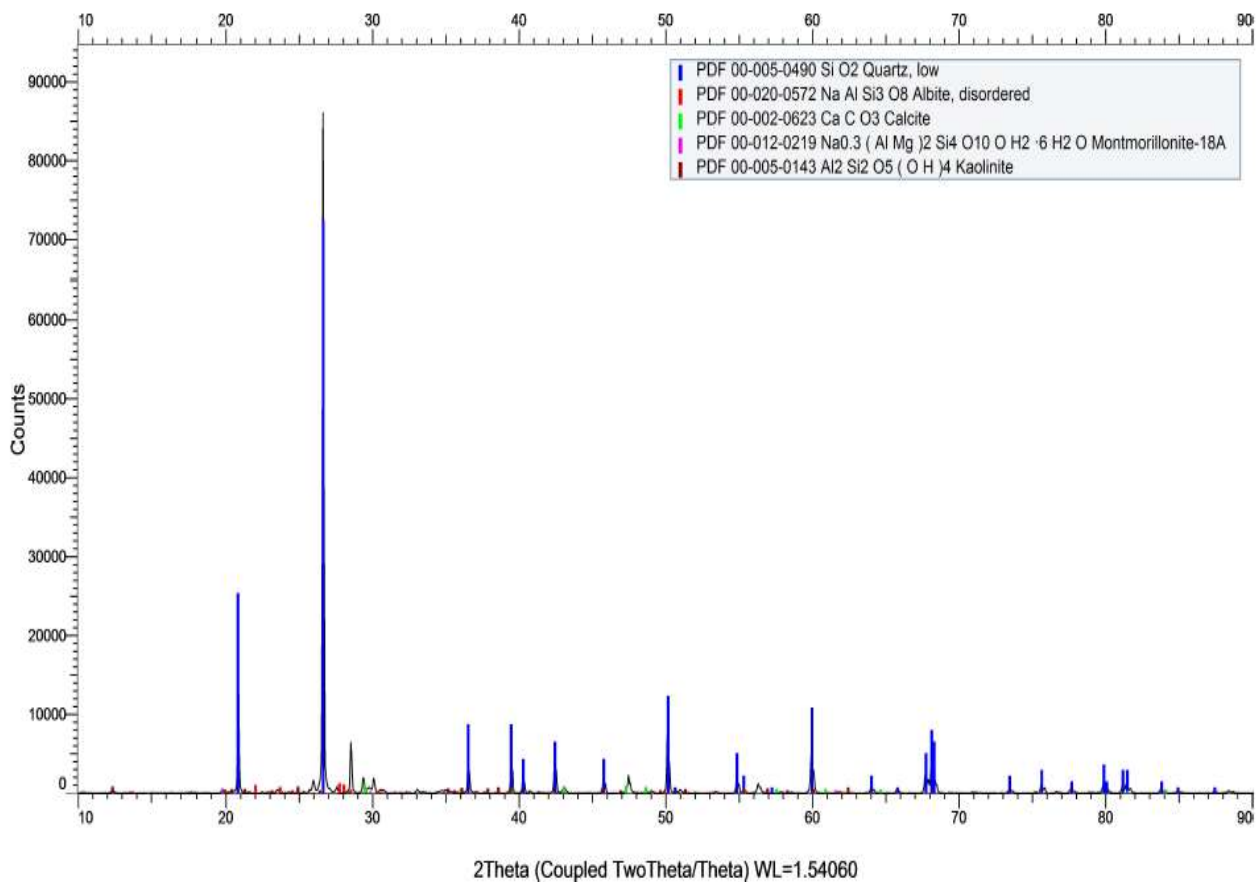


Figura 30. Difractograma de rayos X de M4.

