



UNIVERSIDAD DEL BÍO-BÍO

UNIVERSIDAD DEL BÍO - BÍO
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES

**OBTENCIÓN DE CEPAS NATIVAS PARA MEJORAR EL PROCESO DE
BIOLIXIVIACIÓN EN CHILE**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIRO EN RECURSOS NATURALES

ALUMNA : FIGUEROA FUENTES MARIA JAVIERA

Profesora Guía : Dra. Jeannette Marisol Vera Araya

Cotutor : Dr. Jorge Enrique Castro Ponce

CHILLAN, 2017

*A mi madre María Luisa Fuentes y
mis hermanos Miguel y Cristian*

Gracias Totales.

Los amo.

Agradecimientos

Sin duda todo lo que he caminado y logrado a lo largo de mi vida universitaria se lo debo a mi madre María Luisa Fuentes Avendaño que me ha acompañado y apoyado en cada uno de mis procesos, desde que decidí entrar a la universidad a bachillerato en ciencias naturales y exactas, luego al ingresar a Ingeniería en recursos naturales sin duda decisiones difíciles que forjaran mi destino de ahora en adelante, espero que todo lo que vivimos en estos años sea bien recompensado y poder darte la vida que te mereces mamita.

Me hubiese gustado compartir estos momentos con mi abuela María Herminda Avendaño Parra (Q.E.P.D) que quizá no alcanzo a verme egresada pero me acompañó en mis primeros años universitarios cada vez que llegaba de la universidad me esperaba con ese calor de abuela que muy pocos pueden disfrutar.

A mis hermanos, Miguel y Cristian que estuvieron ahí para cuando los necesité, consejos, estudios y necesidades (mi beca hermanos), pero más que nada fueron un ejemplo a seguir de personas exitosas e inteligentes.

A mis amigos de la vida Carolina P., Miguel V., Pilar S. y Claudio P. que a su modo estuvieron conmigo compartiendo, riendo, apoyarme y distrayéndome en los momentos que los necesité.

A mis nuevas amigas que me trajo este paso por la universidad agradecerles por su compañía, apoyo, sonrisas y carcajadas a Connie R., Andrea P., Valentina C., Leidy B., María Luisa S. y Carolina F., más que compañeras de trabajos y larga horas de estudio, son amigas que están en las buenas y en las malas, con mucho esfuerzo saldremos egresadas.

Agradezco a mis profesores tutores Dra. Jeannette Vera y Dr. Jorge Castro por darme la oportunidad y la confianza de trabajar con ustedes tanto en mi memoria de título, como en la pasantía, por compartir sus conocimientos, orientarme en este estudio y además de darles las gracias por apoyarme incluso en momentos complejos de mi vida y brindarme apoyo.

Mis agradecimiento, al equipo de trabajo Banco de recursos genéticos microbianos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA Quilamapu, Chillán, por darme la oportunidad de trabajar con ustedes en mi memoria de título, además de su apoyo y por compartir sus conocimientos, Yocelyn Ocares, Jorge Carrasco, Sra. Cecilia Santelices, Karen Parra, Jimena de la Hoz, Lorena Barra y Sra. Lorena Fernández.

Por último, quiero agradecer a la Minera Teck Carmen de Andacollo, por facilitar el mineral para este estudio junto con Karla F., por ayudarme gestionar las solicitudes correspondientes y su amable disposición.

Índice

Agradecimientos.....	II
Resumen.....	VII
Capítulo I.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	3
1.3 Pregunta de investigación.....	5
1.4 Objetivos.....	5
1.5 Justificación.....	6
1.6 Limitaciones de estudio.....	8
Capitulo II.....	9
2.1 Minería en Chile actual.....	9
2.2 Yacimientos mineros de cobre.....	10
2.3 Producción de cobre en Chile.....	11
2.4 Contaminación ambiental.....	11
2.5 Hidrometalurgia.....	12
2.6 Lixiviación de cobre en pila.....	12
2.7 Biominería.....	16
2.8 Microorganismo en la biolixiviación.....	17
2.8.1 Biolixiviación en pila.....	20
2.8.2 Ventajas del proceso de biolixiviación.....	23
2.8.3 Desventajas del proceso biolixiviación.....	23
Capitulo III.....	24
3.1 Mineral.....	24
3.2 Cultivo de mineral en medio líquido 9k.....	24
3.2.1 Aislamiento de microorganismos en medio 9k sólido encontrados en el mineral.....	25
3.2.2 Re-inoculación en medio líquido 9k desde medio de cultivo con mineral.....	26

3.2.2.1 Aislamiento de microorganismos en medio 9k solido a partir de Re-inoculación en medio liquido 3.2.2.....	26
3.3 Aislamiento de microorganismos para identificación morfológica.....	26
3.4 Identificación molecular de microorganismos.....	27
3.4.1 Extracción de ADN.....	27
3.4.2 Amplificación ADN.....	27
3.4.3 Electroforesis.....	28
3.4.4 Secuenciación ADN.....	28
3.4.5 Análisis Filogenético.....	28
3.5 Ensayos crecimiento hongos medio sólido 9k.....	28
3.6 Experimentos de oxidación de sulfato ferroso mediante los microorganismos aislados.....	29
Capitulo IV.....	30
4.1 Cultivo de mineral en medio liquido 9k.....	30
4.2 Aislamiento microorganismo medio 9k sólido encontrados en el mineral....	32
4.3 Re-inoculación en medio liquido 9k desde medio de cultivo con mineral....	34
4.4 Aislamiento microorganismo medio 9k solido a partir de Re-inoculación en medio líquido 4.3.....	36
4.5 Identificación morfológica macroscópica.....	37
4.5.1 Identificación morfológica microscópica.....	39
4.6 Identificación molecular de microorganismos.....	41
4.6.1 Secuenciación ADN.....	42
4.6.2 Análisis Filogenético.....	44
4.7 Ensayos de crecimiento de hongos en medio sólido 9k.....	46
4.8 Experimentos de oxidación de sulfato ferroso mediante <i>Acidiella bohemica</i>	47
4.8.1 Experimentos de oxidación de sulfato ferroso mediante <i>Penicillium simplicissimum</i>	48
4.8.2 Experimentos de oxidación de sulfato ferroso mediante <i>Acidiella bohemica</i> y <i>Penicillium simplicissimum</i>	49
4.9 Discusión.....	51

Capítulo V.....	57
Conclusión.....	57
Glosario.....	58
Referencias.....	59
Anexos.....	67

Resumen

Chile posee una de las economías más intensivas en el uso de recursos naturales, principalmente por la minería, que generan grandes impactos ambientales en todos sus procesos, el principal recurso natural no renovable más explotado en Chile es el cobre; Existen 56 mineras de cobre que producen más de 3 millones toneladas al año de las cuales pierden un 10% del mineral, dejándolo sin extraer ya que solo utilizan técnicas de lixiviación tradicional, para esto, algunas grandes mineras en Chile utilizan la tecnología de biolixiviación, que es el uso de microorganismos lixiviantes para la extracción y recuperación de minerales. Esta tecnología permite recuperar el 10% mineral de forma más amigable con el medio ambiente, impulsando a la minería hacia una producción más sustentable. En este estudio se aislaron e identificaron microorganismos provenientes del mineral facilitado por la minera TECK, Carmen de Andacollo, IV Región de Chile; Con el objetivo de analizar experimentalmente la capacidad oxidar hierro sulfatado. El aislamiento se realizó a partir del mineral en medio líquido 9k titulado en 5 diferentes pH: 1,2 –1,4 –1,6 –1,8 –2, incubado a 28°C y 120 rpm por 5 días, al cual se extrajo una alícuota de 0,1µl con un asa en argolla y fue rayada en placas con medio 9k sólido en los mismos pH extraídos e incubados a 28°C y 120 rpm por 15 días. Los resultados indican la presencia de dos hongos ácido tolerantes: *Penicillium simplicissimum* y *Acidiella bohémica*; Estos microorganismos fueron identificados de forma morfológica y molecular; La capacidad oxidar hierro sulfatado de estos microorganismos se midió mediante la utilización del medio líquido 9k y se realizó mediante experimentos a partir los microorganismos aislados de punta de hifa, se inocularon por separado y de forma mixta, en los cuales solo cambio la coloración del medio donde estos dos microorganismos se encontraban inoculados; Estos microorganismos se desarrollaron presentando una mayor adaptabilidad y crecimiento pH 2 y pH 1,8 tanto en medio líquido como en

el sólido 9k, manifestando cambios físicos en la intensidad de la coloración de los medios de cultivo.

CAPITULO I

1.1 Antecedentes

Introducción

Chile es reconocido mundialmente como un país minero, ya que es uno de los países que produce más cobre a nivel mundial, siendo la actividad de mayor importancia económica del país, además constituye una actividad ancestral, que ha llegado a crear su propia cultura, que se desarrolla en gran parte del territorio nacional, aunque predominantemente en la zona Norte de nuestro país (CONSEJO MINERO 2017).

Chile posee 29% de las reservas cobre del mundo, durante el año 2015 Chile produjo 5.832.551 toneladas metro fino (tmf) de cobre (SERNAGEOMIN 2015), con una participación en la producción mundial del 30% y (CONSEJO MINERO, 2016).

Existen 58 mineras de cobre catastradas por la comisión Chilena del cobre, de las cuales 19 poseen instalaciones para producir cátodos Sx (extracción por solventes) o Ew (electro obtención) y concentrados, 17 solo concentrados y 22 solo cátodos Sx/Ew.

Pero estas y otras tecnologías tradicionales de extracción, también constituyen una presión al medio ambiente, debido a que se trata de actividades altamente disruptivas del suelo y generadora de un tipo especial de residuos, debido a que, los residuos mineros masivos provienen tanto de los procesos asociados a la exploración y explotación, así como de los procesos de transformación pirometalúrgicos, hidrometalúrgicos y refinación de sustancias minerales y de sus productos (Ministerio del Medio ambiente 2011).

Pero otro lado, existe un creciente interés en el desarrollo de Biotecnologías, también conocidas como tecnologías limpias, ya que son alternativas no contaminantes y económicamente factibles que pueden ser utilizadas en la industria minera (Duménigo y *col.* 2006), el crecimiento sostenido de esta industria permite suponer una creciente incorporación de la biominería en los procesos

productivos de obtención de cobre y en la recuperación de otros metales como el oro (Acevedo F. y col. 2005).

La biominería es el término genérico utilizado para describir las tecnologías que utilizan sistemas biológicos (principalmente microorganismos procariotas) para facilitar la extracción y recuperación de metales a partir de minerales y materiales de desecho (Brierley C y col. 2013). De vez en cuando el término se usa como sinónimo de biolixiviación, aunque estrictamente el último se refiere a situaciones en las que se solubiliza el metal (Rawlings D y col. 2003).

En la era moderna de biolixiviación comenzó con el descubrimiento de la bacteria, *Thiobacillus ferrooxidans* (ahora *Acidithiobacillus ferrooxidans*) a mediados de la década de 1940 y de la comprensión inicial de la participación de este microorganismo en la extracción de cobre, en 1958 Kennecott Mining Company patentó el uso de *Thiobacillus ferrooxidans* para la extracción de cobre y aplica en el proceso Biohidrometalurgia para extraer el cobre de bajo grado de la mina de cobre Bingham Canyon, cerca de Salt Lake City, Utah, EE.UU (Zimmerley S. y col. 1958).

Las diferencias entre las tecnologías de biolixiviación dependen del lugar de aplicación, la metodología ocupada, ley de cobre y el tamaño de la partícula o granulometría del mineral principalmente, una categorización amplia según Brierley C. (2008) es la separación de las tecnologías según el método en que se basan para hacer la lixiviación, la biominería es comercialmente aplicada a la ingeniería tradicional de botaderos, pilas lixiviantes y tanques de agitación (Brierley C. 2008).

En Chile solo dos mineras realizan el proceso de biolixiviación: Minera Escondida (BHP Bilinton) y Minera Radomiro Tomic (Anexo N°1)

1.2 Planteamiento del problema

La minería en todos sus procesos, ocupa grandes cantidades de, ácido sulfúrico 7.884,8 miles Tm/ kTM, agua fresca aprox 1.705 L/s, energía 20.751,6 Tj y combustible 4.438,9 Tj además de la emisión de Gases de efecto invernadero (GEI) 0,21 (TM CO₂ Equivalente/TMF)(Comisión Chilena del cobre 2014), lo que hace que la minería sea una actividad muy contaminante, por lo que se debería fomentar la utilización de tecnologías más amigables con el medio ambiente y que ayuden a reducir estos niveles de contaminación.

Por otro lado, las reservas minerales disminuyen en ley y contenido de óxidos a través del tiempo, aumentando la cantidad de sulfuros, lo que hace más difícil la extracción con tecnologías convencionales. Todo este material sulfurado cuyo contenido de cobre no es posible recuperar por métodos químicos tradicionales, ha sido considerado de descarte por décadas y llevado a botaderos, la biolixiviación, practicada industrialmente desde 1960 para el tratamiento de minerales de baja ley en botaderos y pilas, permite el tratamiento de este material que ha permitido incorporar como reservas los millones de toneladas de minerales de descarte acumulados en diversas minas de cobre del mundo (Vergara T. 1999)

No obstante, mientras las tecnologías microbianas han sido aplicadas a varios problemas en la agricultura, minería, medio ambiente etc, con considerable éxito es poco aceptado por la comunidad científica, porque es difícil reproducir consistentemente sus efectos benéfico debido a que los microorganismos son más efectivos cuando están presentes en óptimas condiciones para adecuarse a sustratos, agua disponible, oxígeno (dependiendo si son aerobios o facultativamente anaerobios), condiciones de pH y temperatura del medio ambiente (Higa T. y col. 1995.), por ese motivo es necesario encontrar cepas nativas de cada lugar que se intente explotar, para aprovechar la adecuación propia de los microorganismos, potenciando y facilitando la extracción y recuperación de metales. En Chile en la actualidad, solo dos mineras realizan el proceso de biolixiviación: Minera Escondida (BHP Bilinton) y Minera Radomiro

Tomic (anexo N°1), lo que abre un camino importante para este tipo de estudios, fomentando unos de los objetivos del Consejo minero: invertir nuevas tecnologías amigables con el medio ambiente trabajando con el programa nacional de Minería para la elaboración de una hoja de Ruta I+D+i (Investigación Desarrollo e Innovación) para la minería al 2035 (Reporte minero 2015).

1.3 Pregunta de investigación

¿Es posible aislar microorganismos a partir del mineral, que podrían ser utilizados en el proceso de biolixiviación?

Para contestar la pregunta de investigación se propone la siguiente hipótesis de trabajo

Es posible aislar microorganismos del mineral obtenido de la IV región de Chile que poseen la capacidad de oxidar sulfato ferroso.

1.4 Objetivos

Objetivo general

- Aislar cepas nativas de microorganismos a partir del mineral obtenido de la minera TECK, Carmen de Andacollo, Chile.

Objetivos específicos

- Estandarizar los microorganismos encontrados en condiciones óptimas de pH y crecimiento.
- Determinar si el o los microorganismos aislados poseen actividad biolixivante mediante la capacidad de oxidar sulfato ferroso.
- Identificar los microorganismos aislados con herramientas morfológicas y moleculares.

1.5 Justificación

El año 2015 ha presentado un escenario complejo para la minería chilena, los precios de los metales, sus exportaciones, los proyectos de inversión y el empleo en minería ha caído significativamente, pero la producción se ha mantenido estable. En base a esto existen desafíos que han venido afectando la competitividad desde hace años: Altos costos de electricidad, recursos hídricos limitados, escasez de capital humano calificado, complejidad regulatoria, costos ambientales de los diferentes procesos de extracción (Consejo minero 2015).

El reporte del consejo minero 2015, tiene como objetivos impulsar a la minería actuar de forma más inclusiva y sustentable para el año 2050 (Consejo minero 2015). Una de las formas de aportar a la sustentabilidad en la minería, es mejorar y reducir los costos de producción y contaminación, para esto algunas mineras utilizan la biolixiviación en su proceso (Brierley L. 2013), en donde los microorganismos nativos tienen menos costos de mantención (Higa T. y col. 1995.), que los importados de otros lugares como Australia, Perú, África ya que en ellos se debe invertir en adecuar sus condiciones ideales para poder ser inoculados.

Por otro lado, Chile es el mayor productor de cobre a nivel mundial y este metal se presenta fundamentalmente de dos formas: como minerales oxidados y como minerales sulfurados, los primeros son fácilmente solubles por lo que son tratados por medio de lixiviación ácida, mientras que los minerales sulfurados, principalmente calcopirita (CuFeS_2), calcosina (Cu_2S) y covelina (CuS) en Chile, son insolubles o poco solubles incluso en ácidos concentrados, es en este contexto que la biominería aplicada a la lixiviación se presenta como una opción para recuperar metales de interés a través de su solubilización bajo la acción directa o indirecta de microorganismos desde, pilas y botaderos (Ballester A. 2005).

Los microorganismos potencian la velocidad de extracción y recuperación de los metales que el método químico no puede extraer, estos microorganismos biolixiviadores son en su mayoría autótrofos y utilizan el hierro o el azufre o ambos, como principal fuente de energía y CO₂ como su fuente de carbono, a diferencia de los microorganismos heterótrofos utilizan el carbono orgánico como su principal fuente de energía (Gahan C. y col. 2012), existen reportes de microorganismos que son capaces de lixiviar cobre, oro u otros metales (Acevedo F. y col. 2005) y han aumentado su producción en un +15% (Brierley L. 2013).

1.6 Limitaciones de estudio

Limitación más importante es la falta de desarrollo tecnológico en la industria de la biominería, ya que solo se considera esta tecnología como secundaria o complementaria al proceso de lixiviación química tradicional o de recuperación de minerales en botaderos.

Estudios como estos necesitan de entornos altamente esterilizados para evitar la contaminación de los experimentos, por lo tanto, la investigación en esta área es costosa desde el punto de vista de los materiales requeridos, la infraestructura adecuada y además de necesitar de personal calificado.

Capítulo II

Marco teórico

2.1 Minería en Chile actual

La actividad minera en la actualidad se desarrolla en gran parte del territorio nacional Arica, Tarapacá, Antofagasta, Atacama, Coquimbo, Valparaíso, región Metropolitana, O'Higgins y Aysén, la actividad minera en Chile está dominada por la extracción del cobre, pero también se explotan otros metales necesarios para la economía mundial: oro, plata, molibdenos, entre otros, el aporte nacional de PIB es de un 9% el año 2015 (Anuario de la minería 2015).

En la zona norte del país se extrae principalmente cobre, que está compuesta por un gran número de empresas, lideradas por la Corporación del Cobre de Chile, Codelco, que pertenece en su totalidad al Estado de Chile y es la principal empresa productora de cobre en el mundo, además de otras empresas privadas como TECK, BHP Billinton, Collahuasi, etc; (Comisión Chilena del cobre 2015).

La extracción de cobre produjo 5.832.551tmf de cobre en el año 2015 (SERNAGEOMIN 2015), con una participación en la producción mundial del 30% y además Chile posee 29% de las reservas cobre del mundo (CONSEJO MINERO, 2016).

Respecto de los otros metales relevantes para la economía chilena, las principales empresas productoras de oro son: Barrick, Kinross y Meridian (El Peñón). La minería de la plata en Chile se obtiene como subproducto en la minería del oro y en la refinación del cobre, por otra parte, el grupo CAP es el principal productor de hierro y manganeso del país, en Chile también se extraen otros tipos de recursos

como son los energéticos gas, carbón, petróleo en la zona sur (Comisión Chilena del cobre 2015).

2.2 Yacimientos mineros de cobre

La complejidad de los procesos geológicos que ocurren en la corteza terrestre, hacen que la distribución de los elementos químicos sea heterogénea, generando su enriquecimiento o empobrecimiento, estos fenómenos pueden originar la concentración selectiva de ciertos elementos en determinadas zonas, con valores que superan la media con respecto a la distribución normal de los elementos en la corteza terrestre (COCHILCO 2009). La concentración de elementos minerales es consecuencia de un proceso geomorfológico (ígneo sedimentario o metamórfico) que provoca la concentración de estos elementos, el cual se denomina como yacimiento (Oyarzun L. y col. 2010).

Los yacimientos de cobre se asocian al magma que asciende introduciéndose en las capas superiores de la corteza, en forma intrusivo, este ascenso se relaciona a los diferentes fenómenos que han ocurrido en la corteza desde millones de años atrás, como el fluido de las aguas termales y el movimiento de la placa oceánica-nazca bajo la continental-sudamericana, comenzando a partir de esto procesos geológicos se irán formando dos tipos de mineral mineralizado para los yacimientos de cobre: Los sulfuros y los óxidos (COCHILCO 2009).

En el territorio nacional presenta la mayor mineralización cuprífera del mundo y se encuentran algunos de los depósitos de mayor tamaño conocidos a escala mundial; En la actualidad, el 80% de la producción de este metal proviene de yacimientos del tipo “pórfidos cupríferos” (de origen magmático), siendo estos, esencialmente, depósitos minerales de baja ley y gran tonelaje (Minería Chile 2015).

2.3 Producción de cobre en Chile

Se produce, principalmente, bajo la forma de cátodos, concentrados y refinados a fuego, la cual es efectuada por tres sectores productivos de la minería del cobre: Gran Minería, representada por empresas privadas y una estatal, la Corporación Nacional del Cobre (Codelco); Mediana Minería, representada por empresas principalmente nacionales, que produjeron entre el 4 y el 6%; y Pequeña Minería, que produjo del orden del 2% de dicho total (SERNAGEOMIN 2015).

Tabla N°1.- Definiciones utilizadas por SONAMI para los sectores productivos.

Sectores	Extracción de mineral (*)	
	Ton/año (*)	Ton equiv./mes
Gran minería	Sobre 3.000.000	Sobre 250.000
Mediana minería	100.000 – 3.000.000	8.000 – 250.000
Pequeña minería	Menor a 100.000	Menos a 8.000

() Tratándose de minería del cobre, la producción de la faena más grande de los medianos sería del orden de 40.000 a 50.000 ton/año de cobre fino (depende de la ley del mineral y de la recuperación). De la revisión de diversas normativas y otras definiciones, el corte de la pequeña minería se sitúa en 5.000 o 10.000 ton/mes de mineral. Fuente: SONAMI 2014.*

La producción total del año 2015 alcanzó a 5.832.551 tmf, lo que equivale a un aumento del 1% respecto del año 2014 (SERNAGEOMIN 2015).

2.4 Contaminación ambiental

La actividad minera en sus diferentes etapas (exploración, explotación y procesamiento) ocasiona impactos ambientales significativos tales como:

degradación de ecosistemas y recursos naturales, afectación a cuencas hídricas importantes y la amenaza para la diversidad biológica (Castellón, 2010).

Por otro lado, Shinner F. 2005, mencionan que la contaminación de suelo por metales “pesados se encuentra extendida debido a las industrias, principalmente las de extracción y procesamiento de metal, tenerías, combustión de madera, carbón y aceite mineral.

2.5 Hidrometalurgia

La metalurgia extractiva posee varias ramas entre las que se encuentra la Hidrometalurgia, el nombre se refiere al empleo generalizado de soluciones acuosas como agente de disolución, este proceso generalmente se aplica a los minerales oxidados, es un Conjunto de operaciones caracterizadas por llevarse a cabo en presencia de fase acuosa a temperatura ambiente o levemente superior (Gacés I. 2015).

2.6 Lixiviación de cobre en pila

La lixiviación es el proceso con el cual se puede disolver el cobre del mineral, aplicando una solución de ácido sulfúrico y agua dejando el cobre en forma soluble (Gacés I. 2015), es un proceso hidrometalúrgico bastante antiguo, que ayuda a solubilizar tanto minerales oxidados como sulfurados.

Para el proceso de lixiviación como se muestra en la figura N°1, el mineral extraído del yacimiento se prepara a través del chancado (molienda primaria, secundaria y terciaria), para obtener un tamaño máximo de 1,5 a $\frac{3}{4}$ de pulgada (Codelco educa 2017), esto se realiza para liberar la especie de interés y dejarla expuesta a la infiltración de la solución ácida (Merino R. 2014), en seguida se aglomera con el fin de lograr una buena permeabilidad se añade ácido sulfúrico concentrado y agua, lo que se conoce también como proceso de curado (Beckel J. 2000), proceso el cual inicia la sulfatación del cobre y haciendo que los gránulos finos (granulometría inferior a 0,1 - 0,15 mm) se adhieran a los gruesos (granulometría menor a 38 [mm]) evitando así que las partículas de menor tamaño

segreguen y formen áreas ciegas que disminuyen la percolación, aumentando el tiempo de lixiviación y el consumo de reactivos (Merino R. 2014).

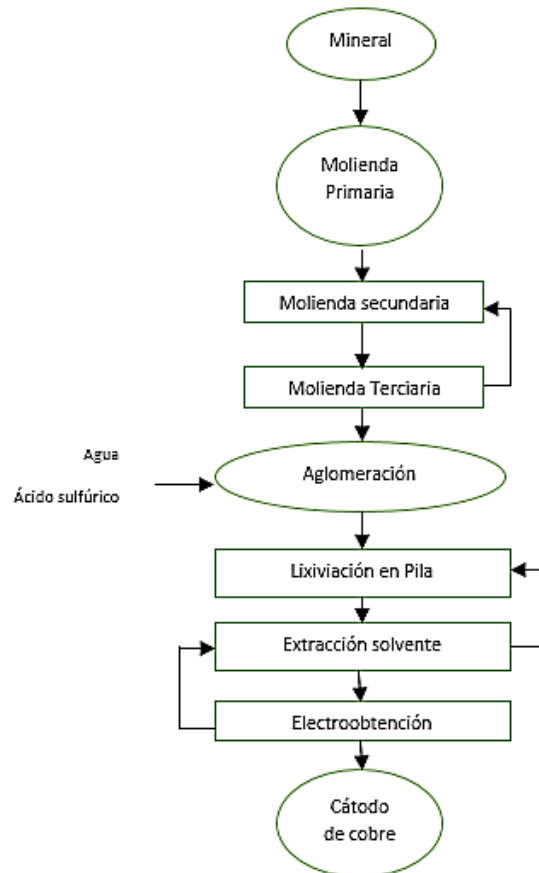


Figura N°1. Diagrama de flujo del proceso de lixiviación en pilas. *Fuente: Gentina J. 2013.*

luego se apila altura que varía entre 2 a 8 metros de alturas en canchas que han sido previamente preparadas impermeabilizando el suelo con materiales de revestimientos y polipropilenos de alta densidad (HDPE), que debe contar con una leve pendiente para recolectar la solución lixivante (Beckel J. 2000), como se muestra en la figura N°2.

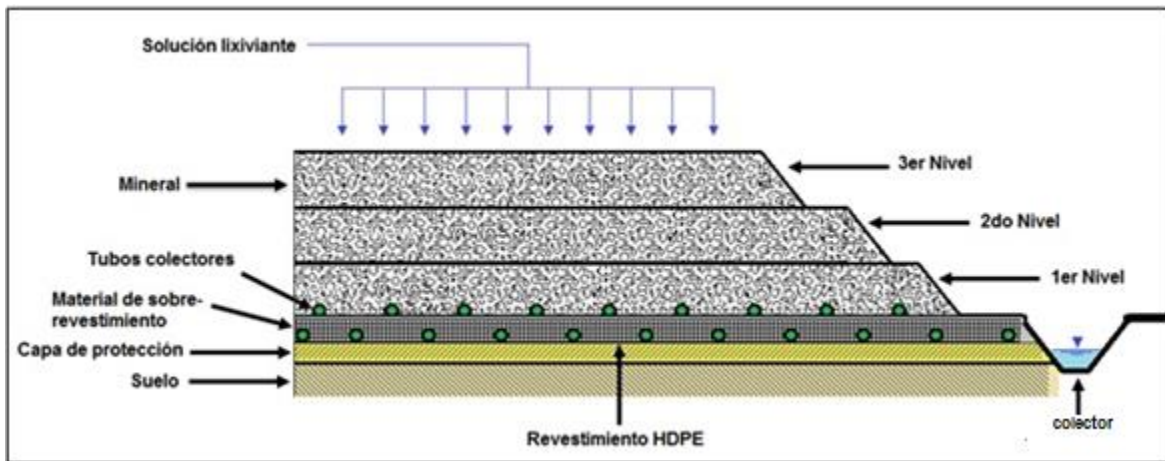


Figura N° 2.- Esquema de una pila de Lixiviación. *Fuente: Broggy I. 2015.*

Una vez montada la pila y previamente curada se debe seguir añadiendo solución lixivante de ácido sulfúrico y agua mediante un sistema de riego por goteo que rega lentamente la superficie de la pila, esta solución se infiltra en la pila hasta su base, actuando rápidamente, la solución disuelve el cobre contenido en los minerales oxidados, formando una solución de sulfato de cobre, la que es recogida por el sistema de drenaje hasta el colector (Codelco educa 2017).

La solución lixivante recogida por el sistema de drenajes es transportada a las piscinas, contiene sulfato de cobre (CuSO_4) con concentraciones de hasta 9 gramos por litro (gpl) denominadas PLS son llevadas a diversos estanques donde se limpian eliminándose las partículas sólidas que pudieran haber sido arrastradas. Estas soluciones de sulfato de cobre limpias son llevadas a planta de extracción por solvente (SX) como se muestra en la figura N°3 (Codelco Educa 2015a).

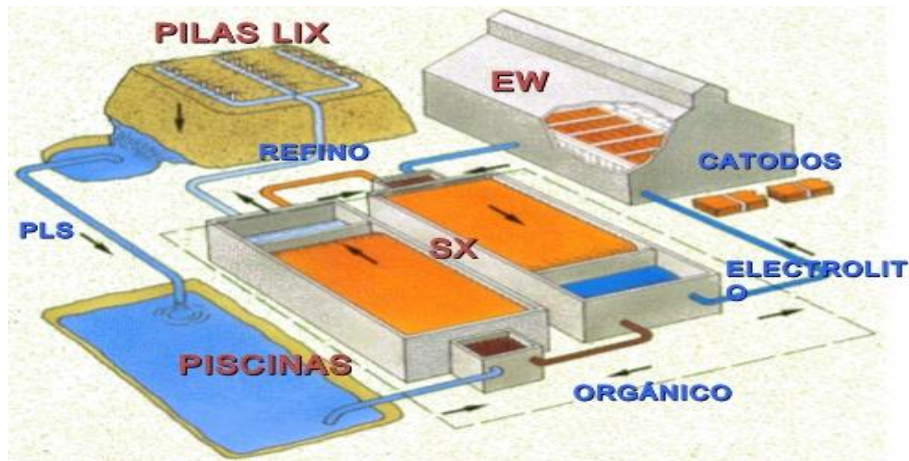


Figura N°3. Planta de proceso de lixiviación. *Fuente: Cáceres G. 2007.*

Según el mismo autor, para extraer el cobre de la solución PLS en la planta de SX, ésta se mezcla con una solución de parafina y resina orgánica. La resina de esta solución captura los iones de cobre (Cu^{+2}) en forma selectiva. De esta reacción se obtiene por un lado un complejo resina-cobre y por otro una solución empobrecida en cobre que se denomina refino, la que se reutiliza en el proceso de lixiviación y se recupera en las soluciones que se obtienen del proceso.

El compuesto de resina-cobre es tratado en forma independiente con una solución electrolito rica en ácido, el que provoca la descarga del cobre desde la resina hacia el electrolito (solución), mejorando la concentración del cobre en esta solución hasta llegar a 45 gpl. Esta es la solución que se lleva a la planta de electroobtención (EW), a solución electrolítica que contiene el cobre en forma de sulfato de cobre (CuSO_4) es llevada a las celdas de electroobtención, estanques rectangulares, que poseen en su interior y sumergidas en solución, unas placas metálicas de aproximadamente 1 a 2 metros cada una aprox., estas placas corresponden alternadamente a un ánodo y un cátodo. Los ánodos son placas de plomo que hacen las veces de polo positivo, por estos introduce la corriente eléctrica, los cátodos son placas de acero inoxidable, que corresponde al polo negativo, por donde sale la corriente, todas las placas están conectadas de manera de conformar un circuito por el que se hace circular una corriente eléctrica continua de muy baja intensidad, el cobre en solución (catión, de carga positiva

+2: Cu^{+2}) es atraído por el polo negativo representado por los cátodos, por lo que migra hacia éstos pegándose partícula por partícula en su superficie en forma metálica (carga cero), este proceso de EW una vez transcurridos seis a siete días, se produce la cosecha de cátodos, en este tiempo se ha depositado cobre con una pureza de 99,99% en ambas caras del cátodo con un espesor de 3 a 4 cm, lo que proporciona un peso total de 70 a 80 kg por cátodo (Codelco Educa 2015b).

La lixiviación en pilas, ocurren ciclos de menos de 90 días para minerales oxidados y de 4 a 18 meses para los minerales sulfurados, tiempo suficiente que es regada la pila por medio de los aspersores para que estos minerales queden en su forma soluble, mientras en la lixiviación en botaderos (mineral de desecho de las pilas de lixiviación el cual se puede volver a lixiviar mediante procesos tradicionales o biohidrometaúrgicos) los ciclos pueden durar entre 2 y 25 años con recuperaciones muy inferiores cobre (Beckel J. 2000).

Por otra parte, el proceso de lixiviación pilas y botaderos puede ser complementado y potenciado por la biominería (Brierley C y col. 2013).

2.7 Biominería

Biominería es un método de extracción de minerales y metales a partir de sus minerales de origen natural usando procesos biológicos (Brierley L. 2015)

Por otro lado, biominería se percibe generalmente como un enfoque mucho más benigno con el medio ambiente (producción limpia) con la participación temperaturas mucho más bajas, por tanto menos costos de energía y una huella de carbono más baja (Barrie J. 2014).

2.8 Microorganismo en la biolixiviación

El número de géneros y especies de microorganismos reportados involucrados en la oxidación de sulfuros de metal ha aumentado sustancialmente desde la década de 1970 (Brierley L. 2013). Este aumento es atribuible en gran medida a un mayor número de investigadores que investigan los microorganismos y sus características fundamentales extracción y recuperación de metales, además al crecimiento sostenible de la industria minera (Acevedo F. y col. 2005); los estudios más completos de ambientes tales como aguas termales, las regiones volcánicas y operaciones mineras que apoyan el crecimiento y las actividades de estos organismos (Brierley L. 2013).

Existen revisiones completas que proporcionan descripciones de las bacterias y arqueas mesófilas (20°C a 40°C), moderadamente termófilas (40°C a 60°C), y extremadamente termófilas (60°C a 80°C) (Johnson D. 2009), involucrados en biohidrometalurgia, han sido escritos por Norris P. 2007, Plumb J 2007, Schippers A. 2007, y Vera M. y col. 2013.

Los microorganismos biolixiviadores son en su mayoría microorganismos autótrofos, que utilizan hierro o de azufre o ambos como su principal fuente de energía y el CO₂ como su fuente de carbono, a diferencia de los microorganismos heterótrofos utilizando carbono orgánico como su principal fuente de energía (Gahan C. y col. 2012).

En la actualidad se sabe que este proceso puede ser catalizado por un elevado número de microorganismos entre los cuales se encuentran hongos, levaduras (*Penicillium purpurogenum* y *Rhodotorula rubra*) y bacterias (*Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*) pero son ciertos géneros de estas últimas las más eficientes (Donati E. 2015).

El mecanismo de solubilización del metal durante la biolixiviación está relacionada a un proceso químico, a pesar de la unión de los microorganismos al mineral puede mejorar la disolución (Deng X. y col. 2012)

Los microorganismos tienen un papel catalítico en la oxidación del ion ferroso (Fe^{+2}) y del azufre elemental producido durante la lixiviación química a ion férrico (Fe^{+3}) e ion sulfato. Los iones férricos corresponden a los agentes químicos oxidantes que disolverán el sulfuro metálico (Ballester A. 2005).

Existen dos mecanismos por los cuales las bacterias lixivian:

Método directo: Esta mediado por la acción de las bacterias y en donde la reacciones químicas son catalizadas enzimáticamente; esta opción, además, supone el contacto físico del microorganismo con el mineral (Rossi G. 1990).

Por ejemplo:

En el mecanismo directo, el sulfuro metálico (MS) insoluble se oxida a sulfato metálico soluble (MSO_4) de acuerdo con la ecuación simplificada:



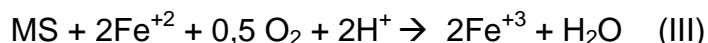
Método Indirecto: Es aquel en el que toman parte las reacciones químicas, enzimáticas y no enzimáticas, no habiendo contacto físico entre los microorganismos y el mineral (Rossi G. 1990).

Por ejemplo:

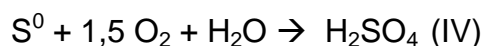
En el modo indirecto de acción bacteriana, el sulfuro metálico (MS) se oxida por ión férrico:



El ion ferroso recién formado es oxidado por *T. ferrooxidans*:



Y se repite el ciclo redox de hierro, este proceso cíclico da como resultado una solubilización cada vez mayor de los metales. El azufre elemental que se ha liberado en la ecuación IV se oxida por *T. ferrooxidans* (ecuación IV). *Thiobacillus thiooxidans* si está presente también oxidará el azufre elemental.



Estos microorganismos, son principalmente llamados extremófilos, obtienen su energía de reacciones de óxido-reducción (III), en donde el dador de electrones es el mineral y el receptor final es el oxígeno, causando el cambio de la composición geoquímica de su entorno, por ejemplo, la acción de los microorganismos facilita la liberación del cobre desde las especies mineralógicas sulfuradas del metal hacia soluciones lixiviantes. Una vez ahí, se lleva adelante el proceso por técnicas mineras convencionales de extracción por solvente y electro obtención (SX/EW) (BIOSIGMA 2015).

Tabla N°2.- Biolixiviación de cobre de la gran minería en Chile año 2008.

Mina	Operador	Producción Ton/año
Lo Aguirre	Sociedad Minera Pudahuel	15.000
Cerro Colorado	BHP Billiton	130.000
Ivan	Minera Milpo	10.000
Quebrada Blanca	Aur Resources	82.000
Chuquicamata	CODELCO	12.500
Andacollo	Aur Resources	22.500
Dos Amigos	Cemin	10.000
Los Bronces	Anglo-American	46.400
	Pucobre S.A.	
Zaldívar	Barrick	147.000
Alliance Copper	CODELCO-BHP Billiton	20.000
Escondida	BHP Billiton	750.000
Spence	BHP Billiton	200.000

Fuente: Gentina J. 2013.

2.8.1 Biolixiviación en pila

La biolixiviación en pila es una práctica generalizada en todo el mundo, para la extracción de minerales secundarios de cobre, que contienen la calcosina mineral (Cu_2S) y covelita (CuS) (Brierley C. 2008).

La biolixiviación de minerales de cobre secundarios se aplica comercialmente a operaciones en Chile, Australia, y Myanmar (Brierley C. 2001).

Biolixiviación en pila se utiliza ampliamente en todo el mundo para la extracción de cobre, con un estimado de 15 +% de cobre del mundo producido a partir de rocas trituradas extraídas del yacimiento del mineral (Brierley L. 2013).

Las operaciones de biolixiviación en pila se llevan a cabo generalmente en condiciones atmosféricas abiertas. Estas actividades mineras a menudo experimentan condiciones ambientales adversas tales como rangos extremos de temperatura (tanto en climas fríos y calientes), radiación solar y la eólica (Panda S. y col. 2012).

La biolixiviación se inicia en la planta de producción de biomasa, con bioreactores que producen distintas soluciones enriquecidas con bacterias y otros microorganismos específicos los cuales son llevados a tanques de oxidación microbiana como se muestra en la figura N°4. Con estas soluciones se riegan las pilas de mineral desde arriba, estas bacterias son capaces de disolver el hierro y el azufre, liberando el cobre y dejándolo en forma soluble (CODELCO 2014).

El proceso de biolixiviación de cobre consiste en su extracción desde rocas mediante su oxidación de +1 a +2, pasando a un estado soluble, el que se logra mediante la reducción de ion hierro desde su estado de oxidación +3 a +2 (este paso es independiente de las bacterias). El papel que cumplen los microorganismos es regenerar los iones de hierro III (Fe^{+3}) mediante la oxidación de iones de hierro II (Fe^{+2}), ganando electrones en el proceso. Los microorganismos presentes en el medio generan sulfato (SO_4^{-2}) a partir de minerales azufrados, como la pirita (FeS_2), obteniendo un medio ácido mediante su formación. La sobresaturación del medio con sulfato permite la formación de

sulfato cúprico (CuSO_4) al reaccionar con el ion cobre II (Cu^{+2}) (Reyes C. 2001). El sulfato cúprico se disuelve en la solución de lixiviación y se filtra a la base de la pila donde se recoge la solución de lixiviación que contiene cobre y es dirigida a una extracción solvente / extracción electrolítica (SX / EW) figura N°4. En Chile actualmente solo dos mineras en Chile realizan el proceso de biolixiviación son: Minera Escondida (BHP Bilinton) y Minera Radomiro Tomic, según la información enviada por COCHILCO 10 de noviembre 2016 (Ver anexos N°1).

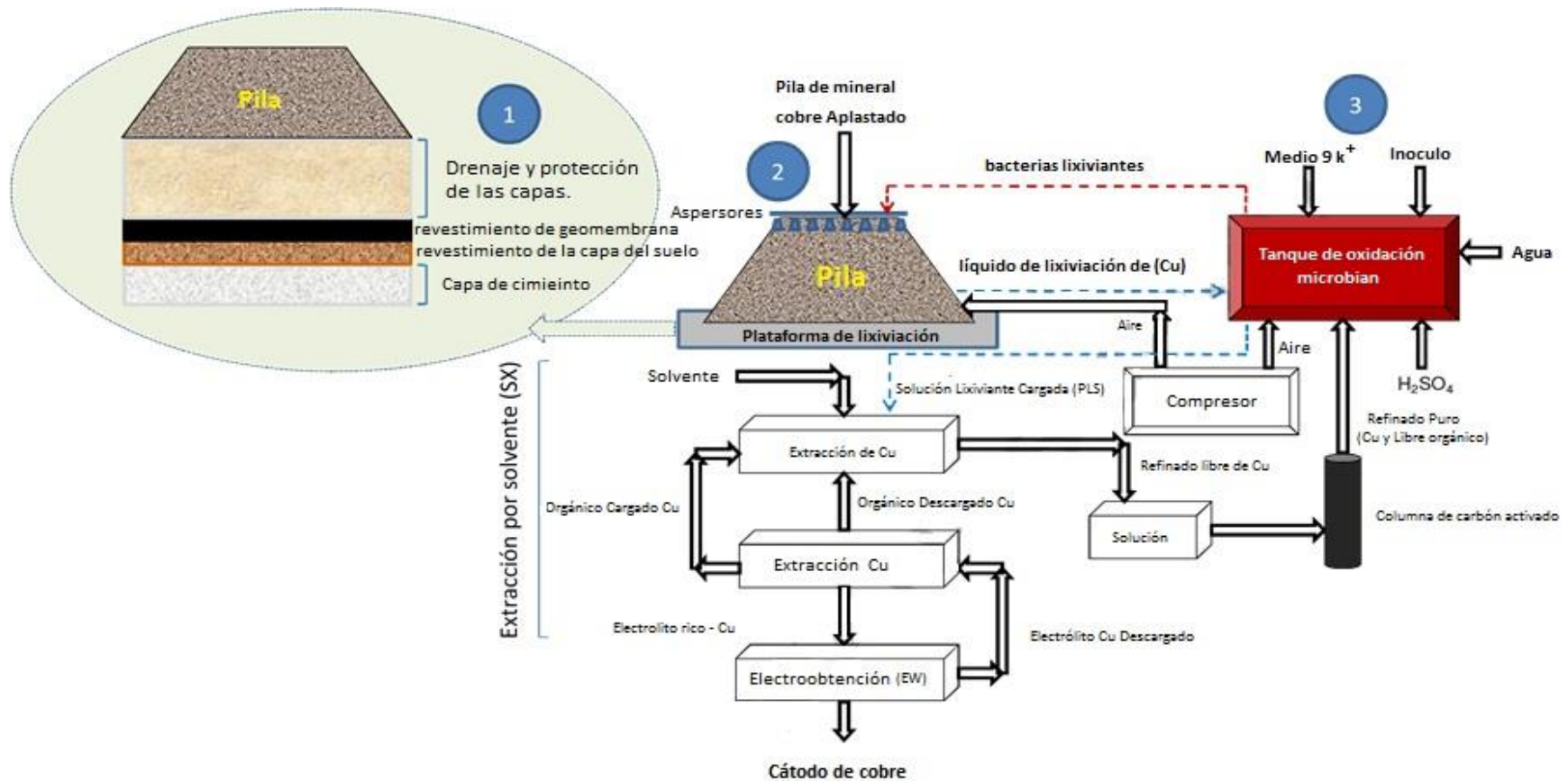


Figura N°4. Descripción general del proceso de Biolixiviación en pilas, (1) Preparación de plataforma de lixiviación con sus componentes antes de amontonar carga; (2) Construcción y carga de la pila; (3) Estanque de lixiviación: preparación tanque de oxidación microbiana. La línea discontinua indica la dirección del flujo de bacterias lixiviantes (roja) y la solución de lixiviación cargada de Cu (PLS). Fuente: Sandeep P. y col. 2015.

2.8.2 Ventajas del proceso de biolixiviación

Los microorganismos en el proceso de biolixiviación traen varias ventajas económicas en el proceso, ya que disminuyen costos energéticos debido a que aumentan la velocidad de extracción complementando proceso tradicional (Barrie J. 2014), mejoran la tasa de solución de sulfuros, disminuyen costos de insumos ácidos debido a que generan ácidos inorgánicos (Walting H. 2014), es un proceso que es fácil de monitorear y controlar (COCHILCO 2009).

2.8.3 Desventajas del proceso biolixiviación

En el proceso de biolixiviación uno de los factores más importantes es la falta de nutrientes de los microorganismos que deben encontrar en su entorno pero algunos son complementados en la solución lixivante pero otros como el fósforo y el nitrógeno pueden ser escasos y afectar el proceso (Gentina J. y col. 2013).

El pH ya que los microorganismos que se han descrito para biolixiviación son $\text{pH} < 3$ (COCHILCO 2009), la Temperatura se debe mantener controlada dependiendo del tipo de microorganismo, mesófilas (20°C a 40°C), moderadamente termófilas (40°C a 60°C), y extremadamente termófilas (60°C a 80°C) (Johnson D. 2009).

Las estructuras minerales pueden ser debilitadas por la acción de los microorganismos que generan ácidos inorgánicos como: ácido nítrico y nitrosos, ácidos sulfúricos y sulfurosos y ácido carbónico si estos no son monitoreados (Walting H. 2014).

El oxígeno es utilizado como oxidante por las bacterias en ambientes de lixiviación, mientras que el dióxido de carbono es utilizado como fuente de carbono para su arquitectura celular. Por esta razón se hace indispensable lograr una buena aireación con adecuados niveles de O_2 y CO_2 , lo cual se logra inyectando aire desde la base de la pila (COCHILCO 2009).

CAPITULO III

Materiales y métodos

Este trabajo de investigación se realizó Banco de Recursos Genéticos Microbianos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA Quilamapu, Chillán.

3.1 Mineral

Para la búsqueda de microorganismos se utilizó mineral del yacimiento proveniente de la faena de la Minera Teck, Carmen de Andacollo, IV región de Chile, posterior a la extracción, este mineral fue chancado con una granulometría de 18mm, sin sufrir ningún tipo de tratamiento en la faena exceptuando el chancado, además este mineral contiene: Cuprita (Cu_2O), Malaquita ($\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$), Covelina (CuS), entre otros, el material fue facilitado con fines de estudio y transportado en bolsas de plástico hasta el Laboratorio de Recursos Naturales de la Universidad del Bío Bío

3.2 Cultivo de mineral en medio liquido 9k

Se utilizó medio de cultivo 9K Silverman y Lundgren (1959), por cuanto la literatura lo describe como el adecuado para el crecimiento microorganismos acidófilos.

Para la preparación del medio liquido 9k se utilizaron dos soluciones A y B; Solución A: 1,5gr de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25gr de K_2HPO_4 , 0,05gr de KCl , 0,25gr de MgSO_4 y 0,005gr de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, se disolvieron los sólidos en 250ml de agua destilada y se esterilizo a 120 libras de presión por 20 minutos.

Por otro lado, en una cámara de flujo laminar con el material previamente esterilizado se prepara una solución B que contiene; 22gr de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, se disolvieron en 250ml de agua destilada la cual se añade a la solución A mediante filtro bacteriológico 0,2 μm (usado para tamizar la solución B). Luego se añadieron 100ml del medio 9k a 5 matraces a los cuales se les ajusto el pH con H_2SO_4 , los pH ajustados fueron pH 1,2 – pH 1,4 – pH 1,6 – pH 1,8 – pH 2.

A cada matraz con pH ajustado se añadieron 10gr de mineral sin procesar previamente tamizado, luego fueron dispuestos en un agitador (Modelo SI-300R) a 120rpm y temperatura 28°C por 5 días aprox. Para este experimento se utilizó como referencia la carta de colores de la Royal Horticultural Society, 2015 (Ver Anexos N°2, N°3, N°4, N°5).

3.2.1 Aislamiento de microorganismos en medio 9k solido encontrados en el mineral.

Para preparar el medio solido 9k se necesitó elaborar tres soluciones:

Solución A: 1,5gr de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25gr K_2HPO_4 , 0,05gr KCl , 0,25gr MgSO_4 , 0,005gr $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, se disolvieron los sólidos en 250ml de agua destilada y se esterilizo a 120 libras de presión por 20 minutos.

Por otro lado, en una cámara de flujo laminar con el material previamente esterilizado se preparó una solución B que contiene 22gr $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, disueltos en 100ml de agua destilada la cual se añade a la solución A mediante filtro de perinola 0,2 μm .

Luego se prepara una solución C: 150 ml agua destilada donde se disuelven 12gr agarosa SE.

Se añade a la solución C a la solución A que contiene además la solución B, luego se mide 100ml del medio a 5 matraces a los cuales se les ajusto el pH con H_2SO_4 , los pH ajustados fueron pH 1,2 – pH 1,4 – pH 1,6 – pH 1,8 – pH 2, enseguida cada matraz fue calentado para luego ser vertidos en placas Petri las cuales fueron incubadas a 28°C por 24hrs para control de esterilidad.

De los matraces previamente incubados con mineral se extrae una alícuota de 0,1 μl la cual se raya en placa Petri de 100x15mm con medio solido correspondiente al mismo pH, se realizan rayados para aislamiento de microorganismos con asas desechables, este proceso se realizó en triplicado por cada pH, las placas fueron dejadas nuevamente en la cámara de incubación a 28°C por 7 días.

3.2.2 Re-inoculación en medio líquido 9k desde medio de cultivo con mineral

Para re-inocular los matraces con mineral, se preparó el medio líquido 9k de la misma forma que se detalló en el punto 3.2 y cada matraz con pH ajustado se añadió 1ml extraído de los matraces inoculados con mineral según pH que corresponde a cada uno y fueron dispuestos en el agitador (Modelo SI-300R) a 120rpm y temperatura 28°C por 5 días aprox. Para este experimento se utilizó como referencia la carta de colores de la Royal Horticultural Society, 2015 (Ver Anexos N°2, N°3, N°4, N°5).

3.2.2.1 Aislamiento de microorganismos en medio 9k sólido a partir de Re-inoculación en medio líquido 3.2.2

Para aislar los microorganismos se preparó medio sólido 9k de la misma forma que se detalló en el punto 3.2.1.

De los matraces previamente incubados con la re-inoculación de matraces 3.2.2.1 se extrae una alícuota de 0,1µl la cual se raya en la placa preterí de 100x15mm con medio sólido correspondiente al mismo pH, se realizan rayados para aislamiento de microorganismos con asas desechables, este proceso se realizó en triplicado por cada pH, las placas fueron dejadas nuevamente en la cámara de incubación a 28°C por 7 días.

3.3 Aislamiento de microorganismos para identificación morfológica

Se preparan placas Petri con medio agar patata dextrosa (PDA), las cuales fueron sometidas a esterilidad por 24 hrs en una cámara de incubación a 28°C.

Para la identificación de los microorganismos a partir de placas Petri medio sólido 9k se extrae una punta de hifa la cual se inocula en las placas con medio PDA descrito para identificación morfológica (Booth 1971), las cuales son incubadas a 28°C. Luego se realizaron frotis fresco (se añadió una gota de agua destilada en porta objeto, con un asa desechable en argolla se toma una muestra del cultivo se

emulsiona en la gota agua destilada y se coloca un cubre objeto) y se observa al microscopio 100x (NIKON ECLIPSE 80), el crecimiento de las estructuras morfológicas fue medido con el software NIS-Elements Documentation 2.3.

3.4 Identificación molecular de microorganismos

La identificación molecular de hongos fue efectuada a partir de cultivos esporulados en medio agar patata dextrosa (PDA), formados a partir de una punta de hifa, una vez que fue visualizado el crecimiento del hongo en toda la placa.

3.4.1 Extracción de ADN

Se procedió a cortar micelio del punto 3.4 con un bisturí que se depositó en un mortero donde fue molido con nitrógeno líquido, posteriormente se agregaron 500µl de Buffer de lisis para extraer la muestra congelada y finalmente se almacena refrigerado en tubos Eppendorf a -20°C, se utilizó el micelio de los tubos eppendorf para extraer el ADN empleando el Kit Fungal DNA mini (Omega Bio-teck) de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor sin modificaciones para muestra congelada o fresca (Omega Bio-teck 2013).

3.4.2 Amplificación ADN

Una vez extraído el material genético de ambos hongos, este fue amplificados con los partidores ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en una mezcla de reacción que contiene para cada muestra 15µl PCR Taq Master Mix 2X (Omega Bio-teck), 11 µl de Agua deionizada esteril, 1µl de partidore forward y reverse para 2µl de ADN de muestra. Utilizando un termociclador (Mastercycler gradient eppendorf), teniendo como programa una desnaturalización inicial de 95°C por 2 min, luego 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s; alineamiento a 50°C por 30s; extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min (White T. *et al* 1990).

3.4.3 Electroforesis

Una vez obtenidos los productos de amplificación se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de buffer TAE (Tris, acetato y EDTA), la electroforesis fue realizada a 80 volts durante 60 min. Se espera un amplicón entre 500 y 600 pares de base (Op De Beeck M. *y col.* 2014) y se utiliza un estándar de peso molecular 100pb en el que se muestran los amplicones para la región 5.8S rRNA de los hongos aislados, el DNA fue teñido con gel red.

3.4.4 Secuenciación ADN

Para la secuenciación, los productos de PCR de hongos son purificados empleando el Kit Cycle pure (OMEGA Bio-teck 2014) como lo describe el proveedor y posteriormente, se enviarán los amplicones purificados a la Pontificia Universidad Católica, facultad de Ciencias Biológicas en donde fueron secuenciados los amplicones para el partidor ITS5.

Las secuencias fueron cortadas en los extremos empleando el *software* Chromas 2.4.3, para luego ser llevadas a la herramienta BLAST disponible en www.NCBI.com para su alineamiento y comparación con las secuencias presentes en el Gen Bank.

3.4.5 Análisis Filogenético

El análisis filogenético está basado en el ADN_R 5.8S utilizando cepas de la base de datos de GenBank. Las secuencias fueron alineadas en el software Mega6 con al algoritmo Muscle, el árbol filogenético fue generado con el método estadístico Neighbor Joining Tree con un bootstrap de 1000.

3.5 Ensayos de crecimiento de hongos en medio sólido 9k.

Para medir crecimiento, se toma una placa previamente inoculada se extrae un disco de 0,3mm el cual se inserta placa preterí de 100x15mm con medio 9k solido

en el centro el cual esta previamente determinado mediante una división en forma de cruz para ir midiendo el radio de crecimiento cada 3 días, los datos son anotados en una tabla, se midió el crecimiento de los dos hongos en triplicado y en dos pH, pH 2 y pH 1,8.

3.6 Experimentos de oxidación de sulfato ferroso mediante los microorganismos aislados.

Para medir la capacidad oxidar sulfato ferroso de los hongos aislados se preparó el medio líquido 9k el cual contiene $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ como se describió en el punto 3.2 y se añadieron 50ml por matraz, se observó la capacidad oxidar sulfato ferroso mediante un cambio de coloración en los cinco pH ajustados con H_2SO_4 , pH 1,2 – pH 1,4 – pH 1,6 – pH 1,8 – pH 2, por cada pH se dispusieron 3 matraces más un control, se incubaron por tres semanas a 28°C a 120 rpm, por cada hongo por separado y ambos juntos (mixta). Para inocular los hongos se utilizó un asa desechable por cada procedimiento. Para este experimento se utilizó como referencia la carta de colores de la Royal Horticultural Society, 2015 (Ver Anexos N°2, N°3, N°4, N°5).

Si aparece un color marrón rojizo o un precipitado que es característico de la oxidación con Fe^{+2} la muestra se considera positiva (Zagury G. y col. 1994), es decir que los microorganismos eventualmente son capaces oxidar el hierro presente en el medio 9k.

CAPITULO IV

Resultados

4.1 Cultivo de mineral en medio liquido 9k

Tras cinco días de inoculación a 28°C y 120 rpm los matraces con mineral en agitación constante, se observaron cambios de coloración en los medios como se muestra en la figura N° 5.



Figura N° 5.- **A** 10g de Mineral Chancado con granulometría de 18mm, **B** Matraces con color del medio original 9k con mineral; **C** Matraces tras 5 días de inoculación presentan viraje de color marrón rojizo.

La coloración del medio inicial es verde amarillo claro (145- B, Ver Anexo N°2), En la figura N°5 C se muestran los matraces que cambiaron a una coloración marrón anaranjada (172- C, Ver Anexo N°4), corresponden a los pH 2 – 1,6 – 1,4 y las muestras de pH 1,8 – 1,2 no mostraron cambio de coloración hasta después 8 días, los matraces en general presentan un precipitado en los bordes del matraz a la altura donde el medio llega en estado de agitación, con el transcurso de los días el precipitado aumenta y se torna de un color amarillo, el cual puede ser una biopelícula o biofilm formada por los microorganismos.

Inicialmente las muestras al transcurso de 3 días se logró observar un color amarillo verde amarillo intenso (154- A, Ver Anexo N°3), este cambio de coloración sería los primeros indicios de biotransformaciones causado por microorganismos que participan en el proceso de biolixiviación (Corrales L. y col. 2006).

Las muestra de la figura N°5 C muestran un color marrón rojizo y un precipitado que es característico de la oxidación con Fe^{+2} producto de microorganismos (Zagury G. y col. 1994).



Figura N° 6.- **A** Decoloración de matraces con mineral al cabo de 30 días.

Al observar los matraces inoculados con mineral se vio una disminución completa de su coloración marrón rojizo al cabo de 30 días como se muestra en la figura N°6 A, posiblemente porque el sulfato de hierro se consumió. El precipitado en los bordes del matraz disminuye en los pH 2 – 1,8 – 1,6 – 1,4 – 1,2 posiblemente pudo decantar.

4.2 Aislamiento de microorganismos en medio 9k solido encontrados en el mineral.

A cada matraz por separado se extrajo con una asa en argolla 0,1µl los cuales fueron rayados para aislamiento con asas desechables según cada pH 2 -1,8 -1,6 – 1,4 -1,2 correspondiente en triplicado a cada placa con medio solido 9k como se muestra en la figura N° 7.

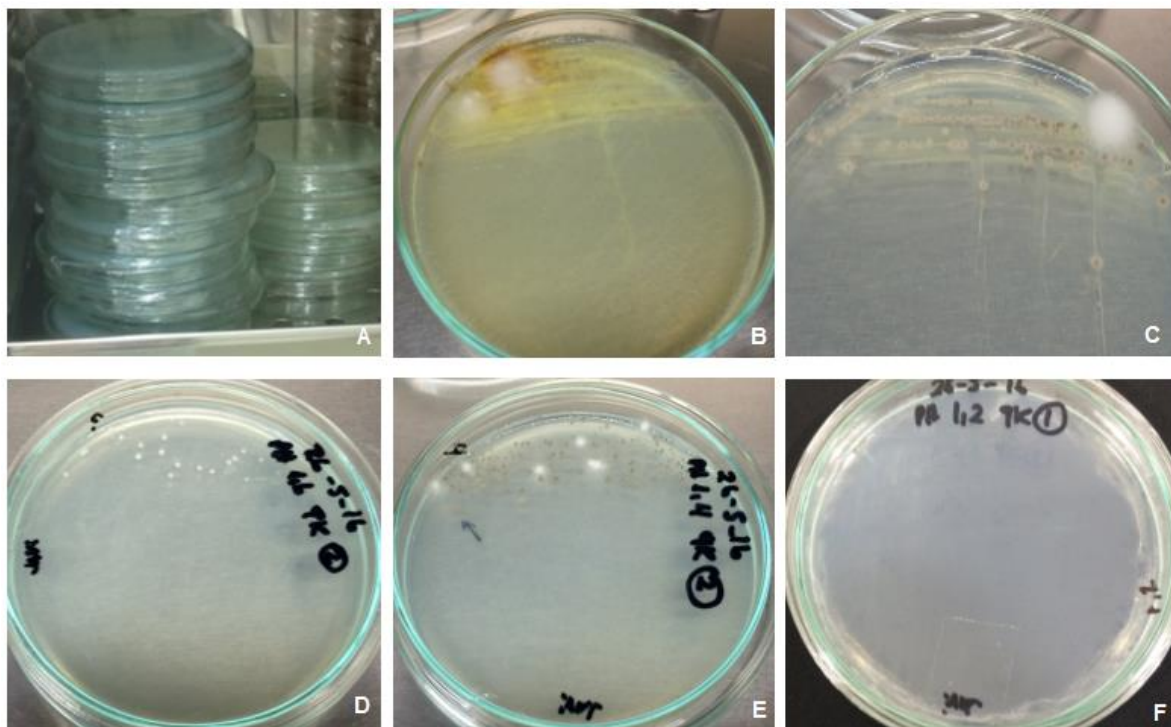


Figura N° 7.- Rayado placas para aislamiento medio liquido 9k con mineral, **A** Placas en incubación a 28°C, **B** placa con pH 2; **C** pH 1,8; **D** pH 1,6.; **E** pH 1,4; **F** pH 1,2

Como se muestra en la figura N°7 cada placa muestra crecimiento de diferentes microorganismos en diferentes etapas de crecimiento y pH debido a que en algunos pH como 2 y 1,8 los microorganismos se presentan de mayor tamaño, en la figura N°7 las placas muestran el crecimiento de microorganismo de 15 días.

En los pH 2 – 1,8 – 1,6 – 1,4 todas las placas en sus triplicados presentan crecimiento de algún microorganismo, solo en las placas de pH 1,2 no se desarrolló ningún tipo de crecimiento microbiano durante todo el periodo que estuvo en incubación. Los pH 2 – 1,8 – 1,6 – 1,4 de mayor titulación desarrollaron microorganismos de mayor tamaño, presencia de una biopelícula amarilla (biofilm) y cambio de coloración del medio a amarillo, todas las placas con el tiempo llegaron a formar las mismas estructuras y coloraciones.

Los microorganismos presentes en las placas presentan características típicas de los hongos, formación de filamentos (micelios), se observan solo dos variedades de microorganismos: color verde oliva y de color blanco, Los microorganismos de color verde oliva presentan micelio ramificado el cual crece por encima del medio pero además penetra el medio 9k, su crecimiento es en forma radial y es de crecimiento lento en comparación a los microorganismos de color blanco, el microorganismo de color blanco presenta desarrollo de micelio el cual crece de forma radial y algodonado por encima del medio 9k, la aparición y desarrollo de este microorganismo es más rápida.

La proporción de los microorganismos en las placas muestra en mayor número de colonias verde oliva como se muestra en la figura N°7 E, pero la manifestación de los microorganismos de color blancos es más temprana en comparación a los microorganismos verde oliva.

4.3 Re-inoculación en medio líquido 9k desde medio de cultivo con mineral.

Con el fin de limpiar y diluir la muestras iniciales de los matraces con mineral se extrajo 1ml del medio y se re-inoculó en matraces nuevos con 100 ml medio 9k líquido, la inoculación se realiza cuando los matraces con mineral cambiaron todos de color como se muestra en la figura N° 8 C.



Figura N° 8.- Matraces de Re-inoculación en medio líquido 9k: **A** matraces iniciales, **B** matraces con 4 días de inoculación, **C** matraces con 12 días de inoculación.

La coloración de los medios inicialmente varía dependiendo de la cantidad de ácido sulfúrico que contengan como se muestra en la figura N°8 A que van de un color verde amarillo claro (145-D, Ver Anexo N°2) para los pH 2 y pH 1,8; los demás matraces el color del medio es transparente; Según la titulación del pH de mayor a menor como se muestra en la figura N°8 B al cabo de 4 días en los pH 2 y 1,6, poseen una coloración marrón intensa (172- A, Ver Anexo N°4), pH 1,8 coloración rojiza anaranjada oscura (172- B, Ver Anexo N°4), pH 1,4 muestra una coloración verde amarilla intenso (154- A, Ver Anexo N°3), pH 1,2 muestra una coloración verde amarillo claro (145- C, Ver Anexo N°2), al pasó 12 días como se muestra en la figura N°8 C, todos los matraces cambiaron a una coloración marrón, pero pH 2 y 1,6 bajaron la intensidad a una coloración rojiza anaranjada los oscura (172- B, Ver Anexo N°4), los otros pH 1,8, pH 1,4 y pH1,2 aumentaron la intensidad de su coloración marrón intensa (172- A, Ver Anexo N°4), posiblemente dado a la oxidación del hierro como se explicó en el punto 4.1.

Todos los matraces presentan un mayor precipitado en las paredes del matraz a un amarillo intenso con el tiempo, en donde posiblemente los microorganismos generaron algún biofilm y aumentaron la cantidad de este, pero se presenta en mayor cantidad pH 2 y pH 1,8 esto puede deberse a que estos cambiaron su coloración con mayor rapidez que en los otros pH, pero con el tiempo fue decantando depositado en el fondo del matraz.

4.4 Aislamiento microorganismo medio 9k solido a partir de Re-inoculación en medio líquido 4.3

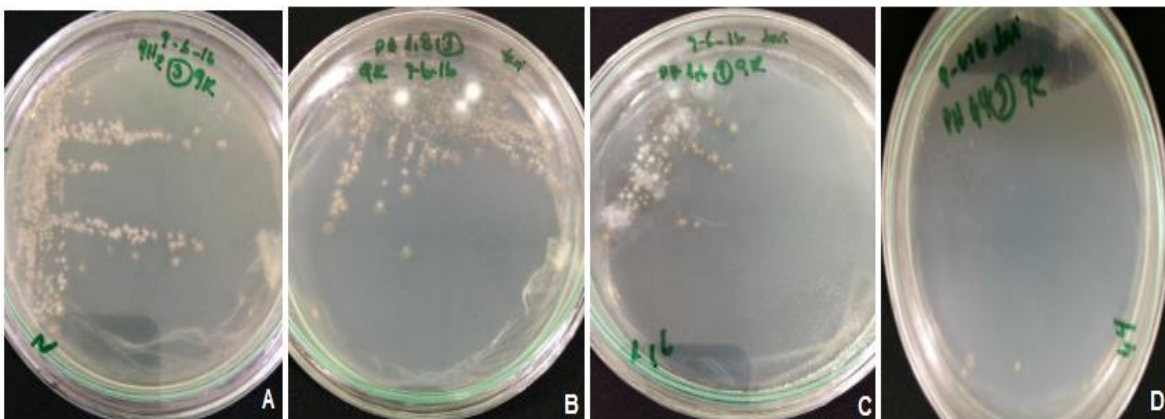


Figura N° 9.- Rayado placas para aislamiento medio 9k solido a partir Re-inoculación en medio líquido 9k; **A** pH 2; **B** pH 1,8; **C** pH 1,6; **D** 1,4.

Tras 20 días de inoculación placas como se muestra en la figura N°9 se observa gran cantidad de microorganismos en las placas pero en mayor proporción y desarrollo en los pH 2 y pH 1,8; En las placas B y C de la figura N° 9 se visualizan los microorganismos blancos, y en todas las placas los hongos verde oliva, ambos microorganismos presentan crecimiento en forma radial, el crecimiento del micelio del microorganismo blanco pasa por encima de los microorganismos verde oliva, los microorganismos verde oliva que se encuentran en el tercer rayado al estar aislados se desarrollan de mayor tamaño y en la placa de pH 1,2 nuevamente no se desarrollaron microorganismos.

4.5 Identificación morfológica macroscópica

A partir de los cultivos de punta de hifa se realizó la identificación morfológica observación ojo desnudo en la placas con PDA como se muestra en la figura N° 10.

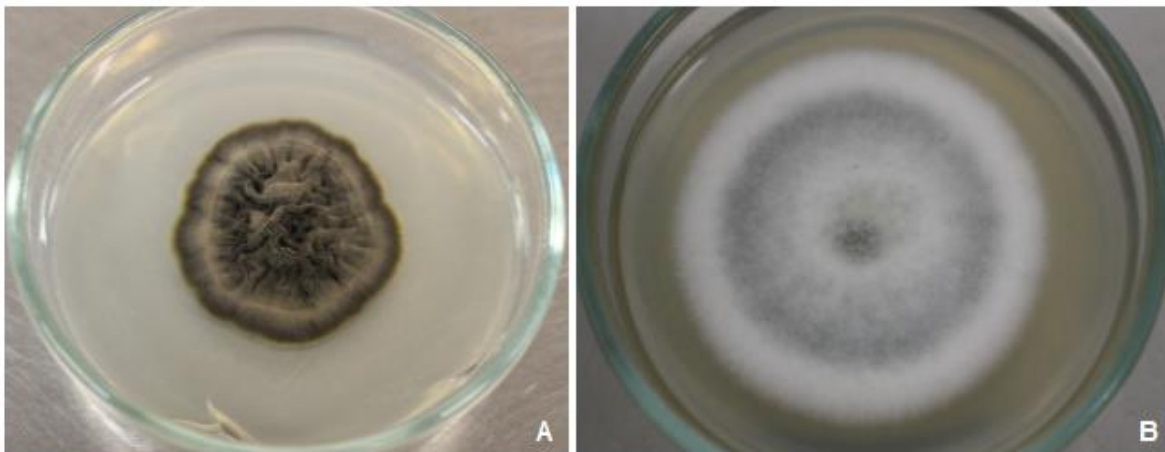


Figura N° 10.- Cultivos de hongos punta de hifa en medio PDA; **A** Hongo verde; **B** Hongo blanco.

En la figura N°10 A, Tras 20 días de inoculación a 28°C se muestra el hongo verde en medio PDA, el cual presenta una morfología de crecimiento distinta al medio 9K, presenta un centro colmado o ceberiforme, hacia el exterior es plano y con una textura aterciopelada, su coloración es verde oliva, con halos blanco en la parte exterior y en centro, por la orilla donde se encuentra la zona de crecimiento presenta halo amarillo y en la zona de crecimiento se observa micelios separados de coloración verde oliva.

En la figura N°10 B, tras 12 días de inoculación a 28°C se muestra crecimiento de Hongo blanco en medio PDA, presenta coloración verde plomiza en el centro, un halo blanco seguido de otro halo uno verde plomizo, en la zona más externa presenta un halo blanco en la zona de crecimiento, es te textura algodonosa se puede observar claramente el crecimiento del micelio desnudo.

Por otro lado, se debe mencionar que los microorganismos observados no se desarrollan de la misma forma en medio 9k como se mencionó en el punto 4.2 y 4.4.

No obstante cabe mencionar que el medio 9k no está descrito como el mejor para hacer una identificación morfológica, por lo cual solo se utilizara como evidencia como se muestra en la figura N° 11.

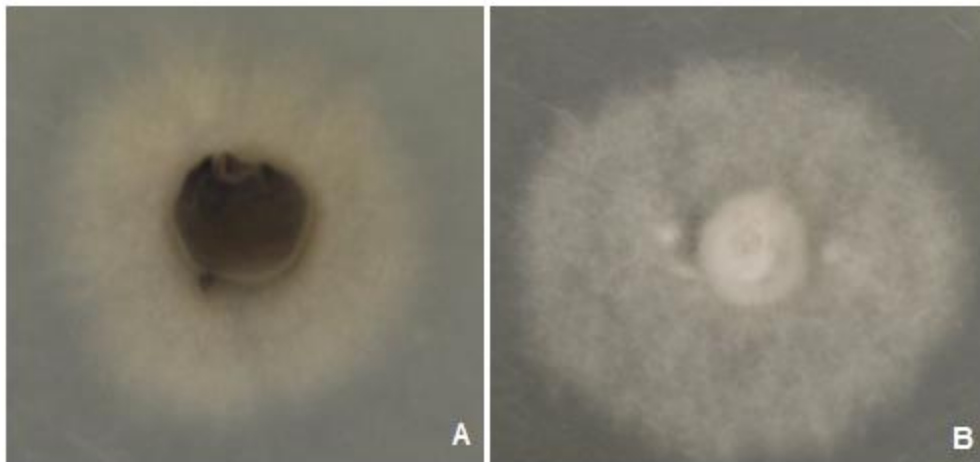


Figura N°11.- Crecimiento de hongos medio 9k: **A** hongo verde; **B** Hongo Blanco

Como se muestra en la figura N°11 A, tras 12 días de inoculación el hongo verde presenta un crecimiento radial y micelio ramificado lo que contrasta con figura N°10 A, que esta inoculada en medio PDA, presenta una estructura ceberiforme y aterciopelada, el cultivo del microorganismo de la figura 11 A, se

realizó a partir de un cultivo de punta de hifa en PDA similar al de la figura 10 A, al cual se extrajo un disco de 0,3 cm e inoculado en medio 9k sólido.

Como se muestra en la figura N°11 B, tras 12 días de inoculación el hongo blanco presenta un crecimiento radial y micelio algodonado no tan compacto como el que se presenta en la figura N°10 B, el cultivo del microorganismo de la figura N°11 B, se realizó a partir de un cultivo de punta de hifa en PDA similar al de la figura N°10 B, al cual se extrajo un disco de 0,3 cm e inoculado en medio 9k sólido.

4.5.1 Identificación morfológica microscópica

Para poder observar los microorganismos en el microscopio se realizaron frotis fresco a partir de muestras con 23 días de incubación como se muestra en la figura N° 12.

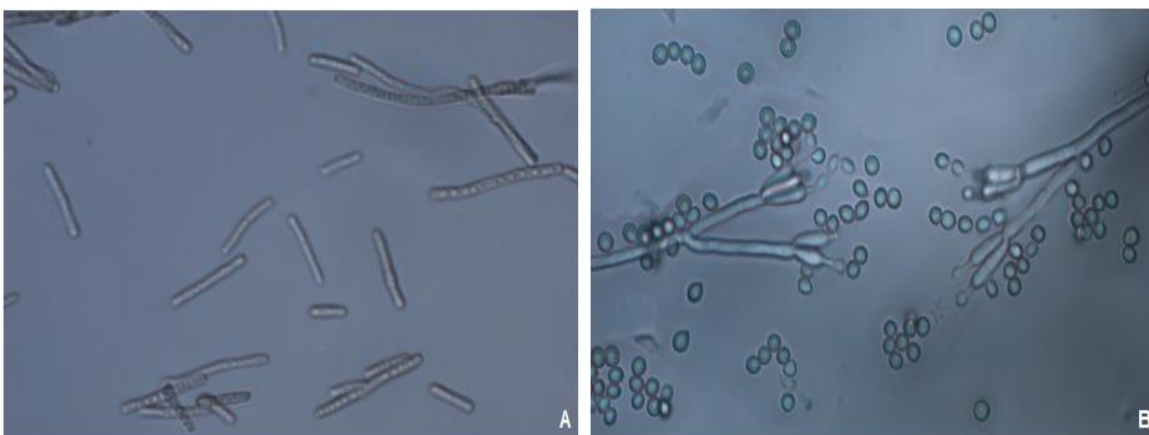


Figura N° 12.- Hongos observados al microscopio, objetivo 100x (NIKON ECLIPSE 80i): **A** Hongo verde; **B** Hongo blanco.

En la figura N°12 A, se observa gran cantidad de micelio fragmentado de diferentes tamaños, en la figura N°12 B, se observan claramente las estructuras presentes en el preparado, gran cantidad de conidios dispersos y nueve fialides, en las tablas N°3 y N°4 se presentan las diferentes medidas de las estructuras observadas, por cada estructura nombrada se realizaron 30 mediciones.

Tabla N°3.- Medidas de las estructuras morfológicas de hongo verde.

Estructuras	Promedio	Desv. Sta	Mínimo	Máximo
<i>Hongo verde</i>	(μm)	(μm)	(μm)	(μm)
Micelio fragmentado	2,27	0,27	1,73	2,92

Tabla N°4.- Medidas de las estructuras morfológicas de hongo blanco.

Estructuras	Promedio	Desv.Sta	Mínimo	Máximo
Hongo blanco	(μm)	(μm)	(μm)	(μm)
Conidios ancho	2,7	0,34	2,03	3,34
Conidios largo	3,32	0,37	2,51	3,97
Fiálides	9,93	1,59	7,04	13,3

Por otro lado, se observó microscópicamente los microorganismos en medio 9k solido utilizando la misma técnica de frotis fresco. No obstante cabe mencionar que el medio 9k solido no está descrito como el mejor para hacer una identificación morfológica, además la textura del medio hace muy difícil tomar las muestras por lo cual solo se utilizara como evidencia.

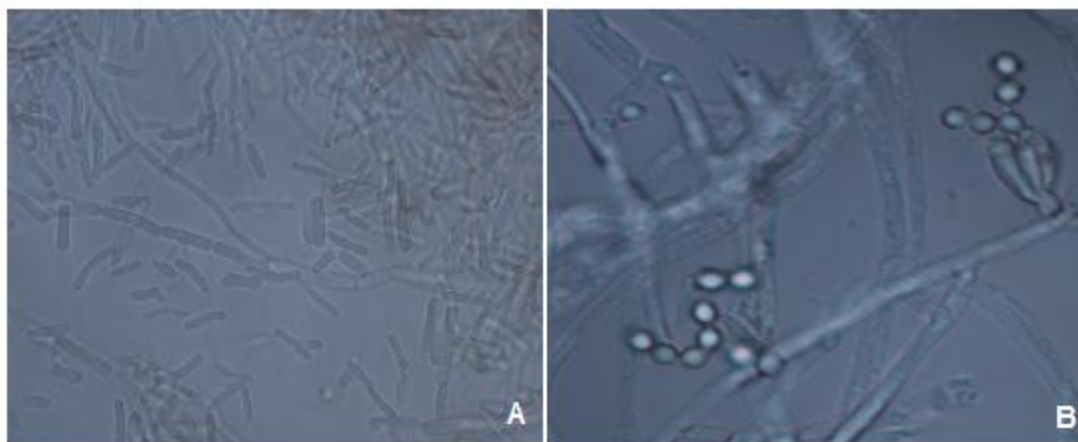


Figura N° 13.- Hongos observados al microscopio en medio 9k, objetivo 100x (NIKON ECLIPSE 80i): **A** Hongo verde; **B** Hongo blanco.

Como se observa en la figura N°13 A, tras 23 días de inoculación podemos observar el hongo verde presenta micelio fragmentado en mayor concentración que en la figura N°12 A.

Como se observa en la figura N°13 B, tras 23 días de inoculación podemos observar el hongo blanco presenta algunas estructuras definidas conidios y fialides menor concentración que en la figura N°12 B.

Pese a que estos microorganismos se desarrollan de diferente forma en los medios PDA y 9K solido microscópicamente se observan las mismas estructuras en ambos casos.

4.6 Identificación molecular de microorganismos

El volumen final de ADN fue diluido en un volumen 100 µl y posteriormente fue cuantificado el ADN en un espectro fotómetro (Epoch UV-Vis) y diluido a una concentración de trabajo de 30 ng/µl, posteriormente se guardó el ADN -20°C hasta su uso en la PCR y su producto de amplificación fue visualizado mediante una electroforesis en el gel de agarosa al 1.5 % de buffer TAE como se muestra en la figura N° 14.

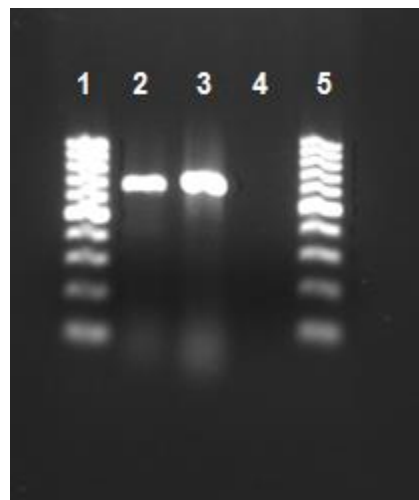


Figura N°14.- Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % TAE, en el que se muestran los amplicones para la región 5.8S de los hongos aislados. Carril 1:

Marcador de peso 100pb; Carril 2: Cepa Hongo verde; Carril 3: Cepa hongo blanco; Carril 4: Control negativo; Carril 5: Marcador de peso 100pb.

En la electroforesis hubo una amplificación positiva para las dos cepas evaluadas como se puede observar en el carril 2 y carril 3 en la figura N° 14.

4.6.1 Secuenciación ADN

Ambas secuencias de ADN se secuenciaron de 5' a 3' por medio partidor ITS5 como se muestra en la figura N° 15 y la figura N°16 para ser comparadas con las secuencias presentes en el Gen Bank.

```

ACATTACCGAGTGAGGGCCTCCGGTCCGACCTCCAACCCTTATCTGACCTCTGTTGCCT
CGGGGGCGACCCGGCCCTCGCGCCGGGGCCCCCGTGGACCACCCTTTGAAACTCTTGCA
TCTTTGCGTCTGAGTATGATTTTGAATCAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT
CCAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTC
GAGCGTCATTAACACCACTCAAGCCTCGTCTTGGTATTGGGCGCCCGCGGGGTCACACCC
GCGCGCCTCAACGTCTCCGGCCGAGCCGTCCGTCTAAGCGTTGTGGAAACAGTTTCGC
TTGCGAGTGCGGGCCGGTTCGTGAGCCGACCGAAGCCTTTTTTATTCCAAGGTTGACCTC
GGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAA
    
```

Figura N°15.- Secuencia parcial 5.8S rRNA Hongo verde

Los resultados obtenidos de la secuencia de la figura N°15, con un 99% de identidad identifica la cepa hongo verde con *Acidiella bohemica*, además las cinco

primeras posiciones de las secuencias poseen alineamientos significativos también coinciden con *Acidiella bohemica*, esta secuencia posee 520 pares de bases, está dentro del rango que se esperaba de un amplicon entre 500 y 600 pares de base región ITS5 para hongos (Op De Beeck M. y col. 2014).

```
CATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATCGTACCTTGTTG
CTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCCGCCGGGGGGCACCCGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCG
AAGACACCATTGAACTCTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAGCGATTAGCTAAATCAGTAAA
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAC
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCT
GGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTG
TTGGGCCCCGCCCCCGATCCCGGGGGGGCGGGCCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCC
GGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCCGTAGGCCCGGCCGGCGCCCGCCGGC
GACCCCATCAATCTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA
GCATATCA
```

Figura N°16.- Secuencia parcial 5.8S rRNA Hongo blanco

Los resultados obtenidos de la secuencia de la figura N°16, con un 100% de identidad identifica la cepa hongo Blanco con *Penicillium simplicissimum*, esta secuencia posee 548 pares de bases está dentro del rango que se esperaba de un amplicon entre 500 y 600 pares de base región ITS5 para hongos (Op De Beeck M. y col. 2014).

4.6.2 Análisis Filogenético

Con el fin de demostrar la identidad de los microorganismos identificados se realizó un árbol filogenético por cada uno de los microorganismos encontrados como se muestra en la figura N°17 y figura N°18.

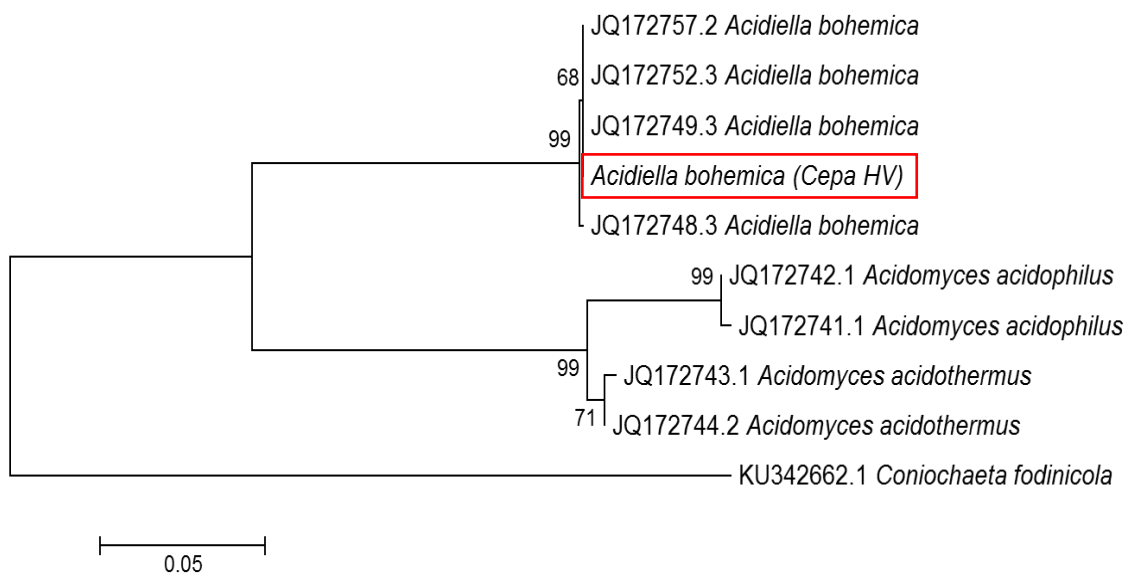


Figura N°17.- Árbol filogenético de cepa *Acidiella bohemica*; Basado en el ADNR 5.8S utilizando cepas de la base de datos de GenBank.

El árbol filogenético muestra la identidad de la cepa encontrada *Acidiella bohemica* o hongo verde (HV), con único reporte existente hasta la fecha reportadas por Hujslová M. y col. 2013, Además se incluyeron otras especies de microorganismos acidofilos pertenecientes a la misma clase Terathosphaeraceae, las cepas *Acidomyces acidothermus* y con otro tipo de microorganismos perteneciente al reino fungí con el fin de demostrar la relación de estos *Coniochaeta fodiniocola* (levadura), cada cepa que fue incluida en el árbol filogenético como se muestra en la Figura N°17 posee código accesión de la base de datos GenBank.

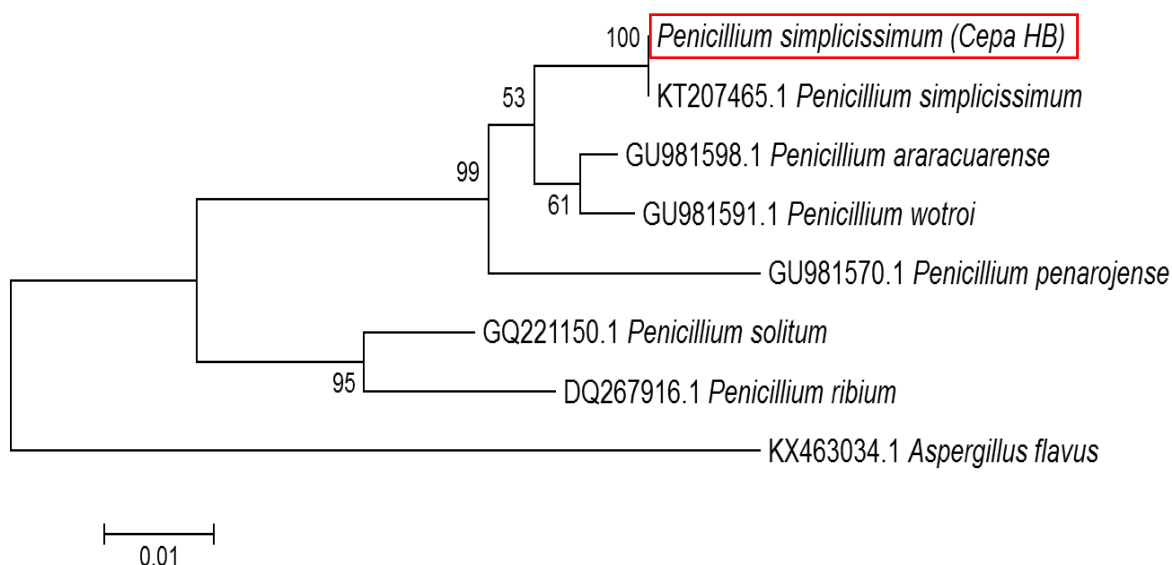


Figura N°18: Árbol filogenético de cepa *Penicillium simplicissimum*; Basado en el ADNR 5.8S utilizando cepas de la base de datos de GenBank.

El árbol filogenético muestra la identidad de la cepa encontrada *Penicillium simplicissimum* o hongo Blanco (HB) con otra especie de *Penicillium simplicissimum* reportada en GenBank con la cual obtuvo 100% identidad; Además en la figura N°18 se relacionaron otras especies del genero *Penicillium* (*P. araracuarensis*, *P. wotroi*, *P. penarojense*, *P. solitum*, *P.ribium*) con el fin de demostrar la relación de estos y con otro microorganismos perteneciente al reino fungí *Aspergillus flavus* (Hongo), cada cepa que fue incluida en el árbol filogenético

como se muestra en la Figura N°18 posee código acceso de la base de datos GenBank.

4.7 Ensayos de crecimiento de hongos en medio sólido 9k.

EL radio de crecimiento se midió en medio solido 9k para dos pH distintos 2 y 1,8 como se muestra en la figura N°19, debido a que estas muestras presentaron mayor rapidez en el cambio coloración en los medios líquidos.

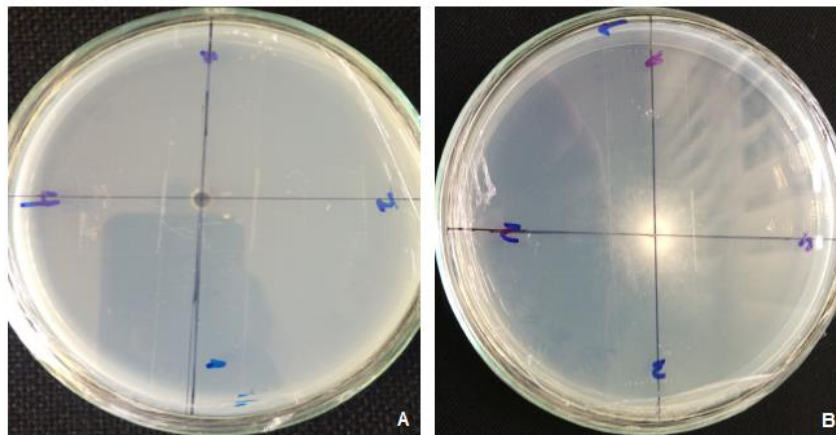


Figura N°19.- Crecimiento de hongos medio 9k a 28°C; **A** cepa *Acidiella bohemica*, **B** *Penicillium simplicissimum*.

Como se muestra en la figura N°19 tras 3 días de incubación, los microorganismos presentan un crecimiento radial, la cepa *Acidiella bohemica* presenta un crecimiento mucho más lento que *Penicillium simplicissimum*, en la tabla N° 5 y

N°6 se observa el promedio de crecimiento, de tres muestras por cada pH y microorganismo, tras 18 días de inoculación en sus cuatro radios de crecimiento, en ambos casos a mayor pH mayor es su desarrollo.

Tabla N°5.- Crecimiento *Penicillium simplicissimum*.

Microorganismo	pH	Promedio (cm)	Desv. sta	Mínimo (cm)	Máximo (cm)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	1,8	0,79	± 0,63	0,3	1,9
<i>Penicillium simplicissimum</i>	2	2,29	± 0,94	1	3,5

Tabla N°6.- Crecimiento *Acidiella bohemica*.

Microorganismo	pH	Promedio (cm)	Desv. sta	Mínimo (cm)	Máximo (cm)
<i>Acidiella bohemica</i>	1,8	0,25	± 0,15	0,1	0,5
<i>Acidiella bohemica</i>	2	0,37	± 0,22	0,1	0,7

4.8 Experimentos de oxidación de sulfato ferroso mediante *Acidiella bohemica*.

Para poder observar la capacidad de oxidar sulfato ferroso la cepa *Acidiella bohemica* como se observa figura N°20, debe ser capaz de cambiar su coloración inicial translúcida a una coloración marrón rojiza característica, producto de la oxidación Fe^{+2} a Fe^{+3} mediante la acción de microorganismos.

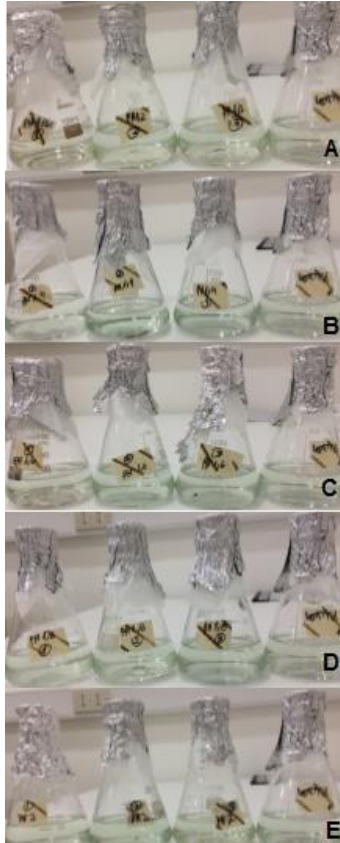


Figura N°20. Experimentos capacidad lixiviante *Acidiella bohemica*, A pH 1,2; B 1,4; C pH 1,6; D pH 1,8; E pH2

Como se observa en la figura N°20; tras quince días de inoculación las muestras no presentaron cambio en su coloración, pero se observa un aumento de la masa de *Acidiella bohemica* pero en los pH de mayor titulación pH 2 y pH 1,8.

4.8.1 Experimentos de oxidación de sulfato ferroso mediante *Penicillium simplicissimum*.

Para poder observar la capacidad de oxidar sulfato ferroso la cepa *Penicillium simplicissimum* como se observa figura N°21, debe ser capaz de cambiar su coloración inicial translúcida a una coloración marrón rojiza característica, producto de la oxidación Fe^{+2} a Fe^{+3} mediante la acción de microorganismos.

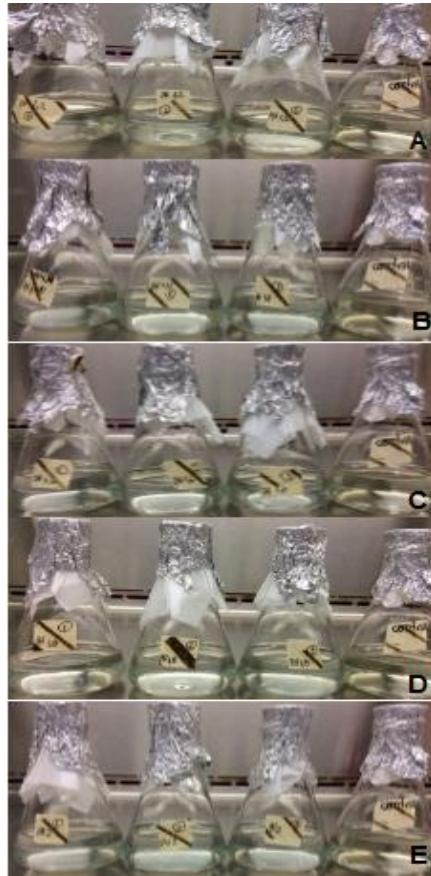


Figura N°21.- Experimentos capacidad lixiviante *Penicillium simplicissimum*:
 A pH 1,2; B 1,4; C pH 1,6; D pH 1,8; E pH 2

Como se observa en la figura N°21; tras quince días de inoculación las muestras no presentaron cambio en su coloración dando negativo para oxidación de Fe^{+2} , pero se observa un aumento de la masa de *Penicillium simplicissimum* pero en los pH de mayor titulación pH 2 y pH 1,8.

4.8.2 Experimentos de oxidación de sulfato ferroso mediante *Acidiella bohemica* y *Penicillium simplicissimum*.

Para poder observar la capacidad de oxidar sulfato ferroso mediante *Acidiella bohemica* y *Penicillium simplicissimum* como se observa figura N°22, debe ser capaz de cambiar su coloración inicial traslúcida a una coloración marrón rojiza

característica, producto de la oxidación Fe^{2+} a Fe^{3+} mediante la acción de microorganismos.



Figura N°22. Experimento capacidad lixiviante mixto de *Penicillium simplicissimum* y lixiviante *Acidiella bohemica* tras 15 días de inoculación: A pH 1,2; B 1,4; C pH 1,6; D pH 1,8; E pH 2

Como se observa en la figura N°22; tras 15 días de inoculación las muestras si presentaron cambio en su coloración, como se muestra figura N°11 E, el pH 2 muestra una coloración naranja intensa (172- C, Ver Anexo N°5), en los pH 1,8 y pH 1,6 como se muestra figura N° 22 C y D, presentaron una coloración naranja moderada (172- D, Ver Anexo N°5) y en los pH 1,4 y 1,2 no presentaron ningún cambio de coloración como se muestra en la figura N° 22 A y B.

Las muestras se dejaron en incubación durante un total de 23 días en donde aumento la coloración pH 1,8 y pH 1,6 a una naranja más intensa (172- C, Ver

Anexo N°5), no así en pH 2 que comenzó a disminuir su coloración a un naranja moderado (172- D, Ver Anexo N°5) como se muestra en la Figura N°23, fenómeno similar al ocurrido en la figura N°6 A, además en la Figura N°22 E, se observa la formación de biopelícula.

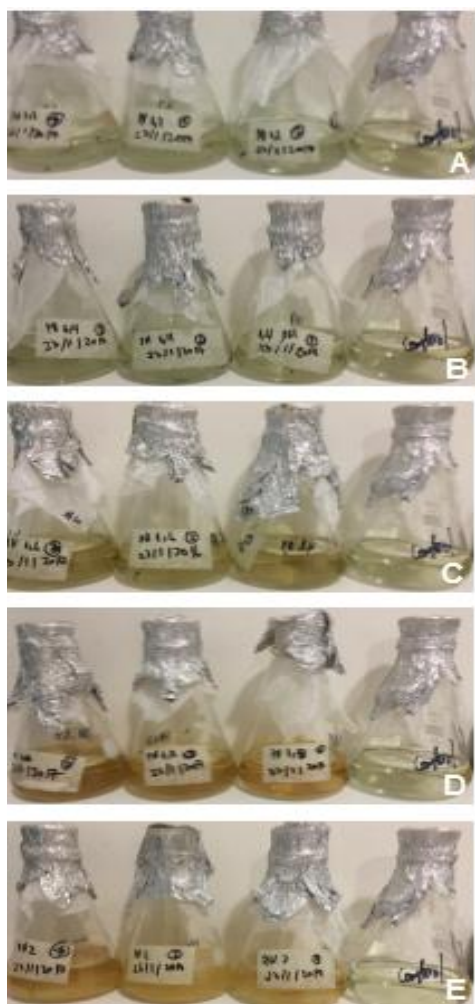


Figura N°23. Experimento capacidad lixivante mixto de *Penicillium simplicissimum* y *Acidiella bohémica* tras 23 días incubación: A pH 1,2; B 1,4; C pH 1,6; D pH 1,8; E pH 2.

4.9 Discusión

Los resultados obtenidos permitieron encontrar cepas nativas probablemente con capacidad de oxidar sulfato hierro (II), a partir del yacimiento mineral de cobre, facilitado por la minera TECK, Carmen de Andacollo, ubicada en la región de Coquimbo Chile, mineral que fue chancado a 18mm y listo para ser utilizado en

una pila de lixiviación, lo que sugiere que estos microorganismos podrían solubilizar metales y participar en el proceso de biolixiviación (Rawlings D. y col. 2003).

En la figura N°5 C y figura N°8 B, presentan una mayor intensidad de color marrón y es en estos matraces donde se muestran los primeros indicios de la posible oxidación de hierro según (Corrales L. y col. 2006 & Zagury G. y col. 1994).

Como se observa en la figura N°5 C y figura N°8 C la intensidad del color es mucho mayor que en la figura N°22 C, D y E esto puede deberse a que en los matraces de las figuras N°5 C y figura N°8 C puede a ver existido un consorcio microbiano de más microorganismos, los cuales no fueron capaz de expresarse en el medio solido 9k (Bills G. y col. 2004) o que al encontrarse los microorganismos con el mineral enriquecido estos pudiesen encontrar más de algún nutriente extra para su metabolismo.

En la placas de las figura N° 7 B, figura N°7 C y matraces figura N°8 B, figura N°8 C, se puede observar una biopelícula amarilla formada por los microorganismos en las paredes de los matraces y en la superficie del medio sólido, donde se puede inferir, que el biofilm formado puede ser producido por hifas, que son el elemento eucariótico dominante de los biofilms acidófilos y proporcionan una columna vertebral de estas estructuras y la ayuda anclarse al sedimentos y sirven de superficie para los organismos procariotas (Hujslová M. 2016).

En cuanto a *Acidiella bohémica* (Hongo Verde), es importante mencionar que es un microorganismo que no se ha descrito en Chile, solo en la República Checa y en España, el cual pertenece a microorganismos suelos ácidos pH <3 y con metales pesados (Hujslová M. y col. 2013), ya que la identificación molecular indica que la secuencia obtenida Figura N°15, posee un 99% de identidad con las cinco primeras accesiones que entrega Gen Bank que además pertenecen a los autores de la publicación Hujslová M. 2013, mismas secuencias que fueron utilizadas en el árbol filogenético con el fin de demostrar y corroborar la identidad de este microorganismo, además fue comparado con otras secuencias

pertenecientes a la misma clase de *acidiella bohemica* y una levadura con fin de demostrar lejanía con otra especie como se muestra en la figura N° 17.

Las características morfológicas de *Acidiella bohemica* descubiertas en este estudio, indican que es capaz de sobrevivir a pH 1,4 a 2, desarrollarse a una temperatura 28°C, presenta micelio fragmentado como se observa figura N° 12 y su ancho mide 2,27 μm (Tabla N° 3) y presenta su mayor tasa de crecimiento a pH 2 como se muestra en la tabla N° 6.

Pero Hujslová M. 2013, indica que *Acidiella bohemica* puede soportar pH <3 clasificándola como ácido tolerante según Zak J. y col. 2004.

Por otro lado, a la identificación morfológica de *Penicillium simplicissimum* (Hongo blanco) se pueden observar claramente en la figura N° 12 B, la formación de estructuras como conidios, estructuras ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiogénicas, además posee dos fiálides por verticilio y dos verticilo por conidióforo este hongo se considera biverticiliado dando claras luces de pertenecer al género *penicillium* (Carrillo L. 2003). La identificación molecular indica con un 100% de identidad que pertenece *Penicillium simplicissimum* como se muestra secuencia de la figura N°16, además se demuestra mediante un árbol filogenético la identidad de *Penicillium simplicissimum* con otra secuencia de la misma especie y la relación con que tiene con otros microorganismos del mismo género y además de una especie diferente de hongo para demostrar lejanía en los clados como se muestra en la figura N°18.

Por otro lado existen reportes de *Penicillium simplicissimum* en suelos salinos y ácidos de la república Checa (Hujslová M. 2010.), Drenaje de aguas ácidas de una minera condado Pima Arizona, Estados Unidos (Lindeberg J. 1972) por lo cual también puede inferir que es una especie cosmopolita, además es capaz de decolorar colorantes de la industria textil (Torralba B. y col. 2009), solubilizó hasta un 80% del titanio en rocas graníticas pero menos de 2% del titanio en rocas basálticas (Silverman M. y col. 1971), biodegrada polietileno (Yamada K. y col. 2001), Además es capaz de captar metales (biosorción) como Zinc (II), Cadmio (II) y Plomo (III) (Fan T. y col. 2008) y por último se ha descrito que *Penicillium*

simplicissimum es capaz de secretar ácido cítrico y eficaz al oxidar el Zinc (Franz A. y col. 1991).

Por otro lado algunos reportes de *Penicillium simplicissimum* indican que la influencia de la composición del medio pH inicial y concentración de glucosa influyen un 20% en la extracción del aluminio (Mehta A. y col. 1979).

Pero Silverman y Muñoz 1970 reportaron *Penicillium simplicissimum* solubilizo 64% de hierro, lo que puede indicar que la muestra 4.8.1 posiblemente faltó nutrición del medio con una fuente de glucosa para aumentar la velocidad de oxidación.

Estos datos confirman, que el microorganismo encontrado pertenece a *Penicillium simplicissimum*, el cual se puede encontrar en suelos ácido pH <3 (Hujslová M. 2013) y posee demostradas capacidades lixiviantes entre otras nombradas anteriormente.

Igarashi Y. y col. 2000, indica que *Penicillium simplicissimum* posee una capacidad antibiótica (Xanteopocin), la cual no permite el crecimiento de bacterias gram positivas y levaduras lo que pudo influir en haber encontrado solo dos microorganismos.

Penicillium simplicissimum fue reportado en Chile y aislado desde el follaje y hojarascas de *Nothofagus pumilio* en el Parque Nacional Puyehue, X Región Chile (Valenzuela y col. 2001), en el suelo del Parque Nacional Tolhuaca, IX Región Chile (Martínez O. y col. 2007).

Es posible que *Acidiella bohemica* influya en potenciar la oxidación del sulfato de hierro (II) como se muestra en la figura N°22 ya que en conjunto al cabo de 15 días de inoculación mostraron un cambio de coloración.

Ambos microorganismos tanto *Acidiella bohemica* como *Penicillium simplicissimum* están dentro del rango que se esperaba la secuencia, un amplicon entre 500 y 600 pares de base para región ITS5 para hongos (Op De Beeck M. y col. 2014).

La estación de monitoreo clima más cercana a la minera TECK que se encuentra aledaño pueblo de Andacollo, es las Cardas según los datos obtenidos por agromet.inia.cl indica que el rango de temperatura entre 1 enero 2016 y 4 de abril 2017 fue 13° y 33°C en la superficie del suelo (Ver anexo N°6), considerando que los microorganismos son nativos de la zona y fueron incubados a 28°C y existen reportes 24°C (Hujslová M. y col. 2013), puede inferir que estos microorganismos están en el rango de mesófilos (20°C a 40°C) (Johnson D. 2009).

El utilizar un medio selectivo para microorganismos ácidos como lo es medio 9K, acota el desarrollo de microorganismos que pudiesen encontrarse en el suelo (mineral extraído) y evita gastos innecesarios en la investigación.

Por otro lado, como se muestra en la figura N°11 los microorganismos presentan una morfología diferente al desarrollarse en medio 9k que en medio PDA como se muestra figura N°11, pero al ser observados al microscopio como se muestra figura N° 12 y figura N°13 presentan las mismas estructuras solo varían en la cantidad que se presentan sus estructuras, en cuanto a tamaño no se puede describir ya que el medio 9k es complejo realizar extracciones dado la fragilidad del medio, ya que a diferentes pH la solides del medio varia.

Los microorganismos en medio 9K generan micelio ramificado y algo algodonado a diferencia de su expresión medio PDA que presenta una estructura ceberiforme, se dice que una adaptación es una variante fenotípica que resulta de un conjunto específico de variantes en un medio ambiente definido (Reeve H. 1993). Podemos inferir que *Acidiella bohémica* podría presentar una plasticidad fenotípica, dependiendo del medio ambiente en el que se desarrolle (Sánchez S. 2007).

Para comprender el proceso de lixiviación fúngica es necesario comprender las reacciones químicas que tienen lugar en la parte abiótica del sistema, así como los procesos reguladores que determinan el metabolismo del hongo. Los componentes abióticos principales del sistema son el material de lixiviación insoluble (una parte de los cuales consiste en compuestos metálicos) en donde se

pueden observar cuatro mecanismos de solubilización de compuestos metálicos sólidos en procesos de lixiviación con hongos: acidolisis, complejólisis, redoxólisis (Berthelin J. 1983) y el micelio funcionando como un "sumidero" (Weed S. y col. 1969).

Los componentes del medio y los metabolitos excretados, que son por ejemplo protones así como aniones procedentes de los ácidos orgánicos (los ácidos suelen tener el doble efecto de aumentar la disolución del metal al disminuir el pH y aumentar la carga de metales solubles por complejación / quelación en complejos orgánicos y metálicos solubles (Vasan y col. 2001)

Además, están presentes células fúngicas que influyen en los equilibrios de la reacción a través de reacciones metabólicas activas y propiedades de adsorción pasiva (Burgstaller W. y col. 1993).

La solubilización del hierro con hongos es posible de dos maneras: reduciendo el hierro férrico al hierro ferroso (catalizado por un metabolito excretado) o solubilizando el hierro férrico con protones o agentes complejantes (Burgstaller W. y col. 1993), *P. simplicissimum* fue utilizado por Silverman y Muñoz (1970.) para la solubilización de varias rocas ígneas y metamórficas, donde el hierro fue el elemento que se solubilizó en la mayor medida (máximo 64%) en donde la producción de ácido estaba directamente relacionada con la solubilización de metales.

Como perspectivas de trabajo en este estudio, se debe cuantificar analíticamente la oxidación Fe^{+2} a Fe^{+3} , mediante medición de potencial redox (ORP) ya que el aumento del potencial está asociado a la oxidación de Fe^{+2} y además de cuantificar mediante espectrometría de emisión de plasma la oxidación Fe^{+2} a Fe^{+3} (Zagury G. y col. 1994).

Para esto se debe preparar una solución: 100 ml agua desionizada, 2,5g de mineral con 5% $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$, además de ajustar a pH 4 con H_2SO_4 , enseguida incubar a 140 rpm a 24°C. Se debe medir con un voltímetro 48 y 72 hrs hasta que el potencial aumente 500V una vez alcanzado el potencial se debe re inocular 1 ml

de esta solución en 150 ml agua desionizada con 2,5 gr mineral con 5% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Este paso se debe repetir sucesivamente hasta que la velocidad de aumento de ORP inicial a 500 mV se maximice en dos transferencias, para que los microorganismos se adapten completamente. Esta técnica se denomina aclimatación de microorganismo está basada en (Biais y col. 1993).

Una vez aclimatados los microorganismos y observado el potencial oxido reducción se debe prepara otra solución para cuantificar espectroscópicamente la oxidación, esta debe contener: 150ml agua desionizada, 15 gr mineral con 5% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 5% de la solución de los microorganismo aclimatados e incubar a 140 rpm a 24°C, se debe medir potencial de oxidación-reducción (ORP) y el pH cada dos días hasta observar un cambio de coloración marrón rojizo y extraer 10 ml para el análisis químico centrifugar a 3000g durante 30 min para separar sólidos de líquidos, para luego medir por espectroscopía de emisión de plasma (ICP) de forma cuantitativa la oxidación Fe^{+2} a Fe^{+3} (Zagury G. y col. 1994).

Capítulo V

Conclusión

Encontrar microorganismos nativos para los diferentes procesos productivos es primordial, ya que estos generan un menor impacto ambiental y reducen costos de producción, ya que no requieren de una mayor inversión productos de adaptarlos a las condiciones del medio supliendo la falta de nutrientes o condiciones físico químicas.

La explotación minera genera grandes impactos ambientales, por esto es primordial buscar nuevas formas de extracción y de recuperación más ecológicas, que ayuden a la minería a tener una participación más sustentable y amigable con el medio ambiente, debido a los múltiples usos que se les da a los diferentes metales extraídos.

Se logró aislar e identificar del mineral IV región de Chile, dos cepas de microorganismos *Acidiella bohemica* y *Penicillium simplicissimum* capaces de tolerar pH 2 - 1,8 – 1,6 y 1,4 y su crecimiento es mayor a pH 2 y posible mente poseen la capacidad de oxidar sulfato ferroso.

Las cepa *Acidiella bohemica* no se han reportado en Chile solo en dos sectores Republica Checa y España en el año 2013 por Hujslová M. y col. 2013, donde solo posee descripción morfológica y molecular, no así su posible capacidad colaborar en proceso de oxidación de Fe⁺².

Penicillium simplicissimum ha sido reportado en diferentes lugares y múltiples usos en diferentes sectores productivos, como también se ha reportado su capacidad biolixivante.

Ambos microorganismos pueden ser calificados como acido tolerantes y mesófilos.

Glosario

µl:	Micro litro.
µm:	Micrómetro.
Cm:	Centímetros.
Desv. Sta:	Desviación estándar.
EW:	Electro obtención.
GEI:	Gases de efecto invernadero.
Gpl:	Gramos por litro.
Gr:	Gramos.
GWH:	Giga watts hora.
HPDE:	Polipropileno de alta densidad.
Hrs:	Horas.
Kg:	Kilogramos.
kTM:	Kilo (miles de) toneladas métricas.
L/s:	Litros por segundo
LX:	Lixiviación en pila.
MI:	Mililitros.
Mm:	Milímetros.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
PDA:	Agar papa dextrosa.
pH:	Coeficiente que indica el grado de acidez o basicidad de una solución acuosa.
PIB:	Producto Interno Bruto.
PLS:	Solución lixiviación cargada.
Rpm:	Revoluciones por minuto.
SE:	Extracción por solvente.
Tj:	Tera Julio
Tm:	Tonelada métrica

TMF o tmf: Tonelada métrica fina

Ton: Tonelada

Referencias

1. Consejo Minero 2017. "Chile país minero", recuperado 5 de enero 2017 en: <http://www.consejominero.cl/chile-pais-minero/>
2. COCHILCO 2009. "Biolixiviación: desarrollo actual y sus expectativas", Dirección de Estudios y Políticas Públicas, Comisión Chilena del Cobre.
3. SERNAGEOMIN 2015. "Anuario de la Minería de Chile 2015", Servicio Nacional de Geología y Minería, Providencia, Región Metropolitana de Santiago, Chile.
4. Consejo minero 2016. "Minería en Cifras", recuperado 28 de febrero 2017 en: http://www.consejominero.cl/wp-content/uploads/2016/03/Miner%C3%ADa-en-Cifras_Febrero-2016.pdf
5. Duménigo M., Bugallo F. & Diaz A. 2006. "Biotecnología. Tecnología emergente para el tratamiento de minerales, minerales de baja ley, concentrados y colas de manera sostenible". Congreso Iberoamericano de Metalurgia y Materiales, La Habana, Cuba.
6. Acevedo F. & Gentina J. 2005. "Fundamentos y perspectivas de tecnologías Biomineras", Ediciones universitarias de Valparaíso, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
7. Coram N. & Rowlings D. 2002. "Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40°C". *Appl. Environ. Microbiol.* 68: Pp838-845
8. Brierley C. & Brierley J. 2013, "Progress in bioleaching. Part B. Applications of microbial processes by the minerals industry". *Appl Microbiol Biotechnol* , 97:7543-7552.
9. Rawlings D., Dew D. & Plessis C. 2003. "Biomining of metal-containing ores and concentrates". *Trends Biotechnol* 21:38-44.
10. Zimmerley S., Wilson D. & Prater J. 1958. "Cyclic leaching process employing iron oxidizing bacteria"; US2829964[P].

11. Brierley C. 2008. "¿How will biomining be applied in future?, Trans. Nonferrous Met, Soc, China 18(2008) 1302-1210, Science Pres.
12. Ministerio del Medio ambiente 2011. "Informe del estado del medio ambiente resumen ejecutivo", Capitulo II Contaminación de suelos, Ministerio del medio ambiente, Chile.
13. Comisión Chilena del cobre 2014. "Anuario de estadísticas del cobre y otros minerales 1995- 2014", COCHILCO, Santiago de Chile.
14. Vargas T. 1999. "Aspectos tecnológicos y perspectivas: Lixiviación bacteriana de minerales de cobre en pilas". Latinominería, Informe técnico pp 56-59.
15. Higa T. & Parr J. 1994. "Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment". International Nature Farming Research Center Atami, Japan Pp 5.
16. Consejo minero 2015. "Reporte anual 2015", recuperado 5 de enero 2017 en: <http://www.consejominero.cl/wp-content/uploads/2016/05/Reporte-Consejo-Minero-2015.pdf>
17. Coram N. & Rowlings D. 2002. "Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40°C". *Appl. Environ. Microbiol.* 68 : 838-845
18. Ballester A. 2005. "Mecanismo de biolixiviación". En: "Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras" Editado por Acevedo F. y Gentina J.C. 1a Edición, Ediciones Universitarias de Valparaíso, Valparaíso, 9-24.
19. Oyarzun R. Higuera P. & López J. 2010. "Yacimientos minerales, minería y producción de metales: de la Naturaleza al consumidor y una breve historia geológica de San Quítin", Recuperado el 20 de marzo 2017 en: http://www.aulados.net/GEMM/Documentos/San_Quintin_Innova/Yacimientos_Minerales_Historia_SQ.pdf
20. Minería Chile 2015. "Compendio de la Minería 2015", Ed. EDITEC. S.A Recuperado 5 de marzo 2017 en: <http://www.mch.cl/wp-content/uploads/sites/4/2015/12/Muestra-CMCH-2015.pdf>

21. SONAMI 2014. "Caracterización de la pequeña y mediana minería en Chile, gerencia de investigación y desarrollo, Sociedad Nacional Minería Chile. Pp: 3-4
22. Castellón, M. (2010). Minería e impactos ambientales. Bogotá: AMB
23. Shinner F. & Klauser T. 2005. "Feasibility Studies for Microbial Remediation of Metal Contaminated Soil". Monitoring and Assessing Soil Bioremediation, Vol. 5 of the series Soil Biology, pp 155-159.
24. Gacés I. 2015. "Metalurgia del cobre", Recuperado 3 de diciembre 2015 en: <<http://www.uantof.cl/cobre/pdfs/capitulo%20dos.pdf>>
25. Merino R. 2014. "Estudio del comportamiento térmico en pilas de biolixiviación", Universidad de Chile, Santiago.
26. Gentina J. & Acevedo F. 2013. "Application of bioleaching to copper mining in Chile", Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.
27. Beckel J. 2000. "El proceso hidrometalúrgico de lixiviación en pilas y el desarrollo de la minería cuprífera en Chile", red de reestructuración y competitividad, división de desarrollo productivo y empresarial, CEPAL- Serie de desarrollo productivo N°79, Santiago de Chile.
28. Broggy I. 2015. "Lixiviación fundamentos y aplicaciones". Recuperado 18 de diciembre 2015 en: <https://hydrometallurgyperu.wordpress.com/2015/04/21/autores-selectos/>
29. Brierley L. 2015. "Microbes and mining technology for sustainable mine production" Recuperado 15 de diciembre 2015 en: <http://www.coe.miami.edu/cms/file/coralelec.pdf>
30. Codelco Educa 2017 "Lixiviación en Pilas" Recuperado 27 de enero 2017 en: https://www.codelcoeduca.cl/procesos_productivos/escolares_lixiviacion.asp#1
31. Codelco Educa 2015a "Extracción por Solventes (SX)" Recuperado 15 de diciembre 2015 en: https://www.codelcoeduca.cl/procesos_productivos/tecnicos_lixiviacion_extraccion.asp
32. Cáceres G. 2007. "Hidrometalurgia y electrometalurgia", Universidad de Atacama, Chile.

33. Codelco Educa 2015b “Electroobtención” (EW)” Recuperado 15 de diciembre 2015 en: https://www.codelcoeduca.cl/procesos_productivos/tecnicos_electroobtencion_cel_daselectroliticas.asp
34. Norris P. 2007. “Acidophile diversity in mineral sulfide oxidation. In: Rawlings DE, Johnson B (eds) Biomining”. Springer, Heidelberg, pp 199–216.
35. Barrie J. 2014. “Biomining: biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials”, Current Opinion in Biotechnology, Vol.30 pp.24–31
36. Plumb J., Hawkes R. & Franzmann P. 2007. “The microbiology of moderately thermophilic and transiently thermophilic ore heaps. In: Rawlings DE, Johnson B (eds) Biomining”. Springer, Heidelberg, pp 217–235
37. Schippers A. 2007. “Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. In: Donati ER, Sand W (eds) Microbial processing of metal sulfides”. Springer, Houten, pp 3–33.
38. Vera M. & Schippers A, Sand W 2013. “Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation”. Part A. Appl Microbiol Biotechnol. doi:10.1007/s00253-013-4954-2
39. Gahan C; Srichandan H; Kim & Akcil A. 2012. “Biohydrometallurgy and Biomineral Processing Technology: A Review on its Past, Present and Future”. International Science Congress Association, Vol N°10, 85-99.
40. Donati E. 2015. “Biominería: Una tecnología Alternativa” Recuperado 3 de diciembre 2015 en: <http://fundamin.com.ar/index.php/component/content/article?id=105>
41. Deng X., Chai L., Yang Z., Tang C., Wang, Y. & Shi Y. 2012. “Bioleaching mechanism of heavy metals in the mixture of contaminated soil and slag by using indigenous *Penicillium chrysogenum* strain F1”. Journal of Hazardous Materials, pp: 107-114.
42. Ballester A. 2005. Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras “Capítulo 1: Mecanismos de la biolixiviación” Editado por Acevedo F. y Gentina J.C. 1^{era} Edición, Ediciones Universitarias de Valparaíso, Valparaíso, Pp: 9-24.

43. Biosigma 2015. "Tecnologías de Biolixiviación" Recuperado 18 de diciembre 2015 en: <http://www.biosigma.cl/productos-y-servicios/tecnologias-de-biolixiviacion/>
44. Brierley C. 2001. "Bacterial succession in bioheap leaching", *Hydrometallurgy* 59 pp: 249–255
45. Panda S., Parhi P., Pradhan N., Mohapatra U., Sukla L. & Park, K. 2012. "Extraction of copper from bacterial leach liquor of a low grade chalcopyrite test heap using LIX 984N-C". *Hydrometallurgy* pp: 121-124, 116-119.
46. Codelco 2014 "BioSigma crea tecnología industrial para producir cobre gracias a bacterias" Recuperado 27 de junio 2016 en: https://www.codelco.com/biosigma-crea-tecnologia-industrial-para-producir-cobre-gracias-a-bacterias/prontus_codelco/2014-08-26/133613.html
47. Reyes C. 2012. "Predicción de líneas evolutivas a partir de rusticianina de *Acidithiobacillus ferrooxidans*", Memoria para optar a título profesional bioquímico, Universidad de Chile, Santiago, pp 1-4.
48. Sandeep P., Ata A., Pradhan N. & Deveci H. 2015. "Current scenario of chalcopyrite bioleaching: A review on the recent advances to its heap-leach technology". *Bioresource Technology*.
49. Watling H. 2014. "Review of Biohydrometallurgical Metals Extraction from Polymetallic Mineral Resources", *Minerals* 2015, Vol. 5, pp: 1-60.
50. Watling H. 2006. "The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides - A review". *Hydrometallurgy*, vol. 84, no. 1-2, p. 81-108.
51. Brandl H. 2001. "Biotechnology: Special Processes", Volume 10, Second Edition, pp.191-224.
52. Silverman M. & Lundgren D. 1959. "Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*", I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacteriol*, 77, pp: 642-647.
53. Royal Horticultural Society 2015. "Colour chart", 6ta edition, published by RHS media, 80 Vincent Square, London SW1P, UK
54. Booth C. 1971. "The genus *Fusarium*", CABI/CMI, Kew.

55. OMEGA Bio-teck 2013. "E.Z.N.A.®Fungal DNA Mini Kit" Innovations in nucleic acid isolation, product manual, pp: 9 – 12. Recuperado 18 noviembre 2015 en: <http://omegabiotek.com/store/wp-content/uploads/2013/09/D3390-Fungal-DNA-Mini-Kit-Combo-May-2013-Online.pdf>
56. White T., Bruns T., Lee S., & Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
57. Op De Beeck M., Lievens B., Busschaert P., Declerck S. & Vangronsveld J., 2014. "Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal", Metabarcoding Studies. PLoS ONE 9(6): e97629. doi:10.1371/journal.pone.0097629
58. OMEGA Bio-teck 2014. "E.Z.N.A.®Cycle Pure Kit", Innovations in nucleic acid isolation, product manual, Recuperado 18 noviembre 2015 en: http://omegabiotek.com/store/wp-content/uploads/2013/09/D6492_D6493-Cycle-Pure-Kit-Combo-Omega.pdf
59. Zagury G., Subba N., & Tyagi R. 1994. "Adaptation of indigenous iron-oxidizing bacteria for bioleaching of heavy metals in contaminated soils", environmental technology, Vol. 15, 517-530.
60. Corrales L., Sánchez C., Sánchez P., Sánchez A., Sánchez V. & Zárata J. 2006. "Estudio piloto de aislamiento y fenotipificación de bacterias que participan en los procesos de biolixiviación, en zonas mineras del departamento de Bocaya", ISSN: 1794-2470 Vol. 4.
61. Bills G., Christensen M., Powell M. & Thorn G. 2004. "Saprobic soil fungi. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (eds) Biodiversity of fungi", inventory and monitoring methods, London, pp 271-302.
62. Hujšlová M., Kubátová A., Kostovčík M. & Kolařík M. 2016. "Extremely Acidic Soils are Dominated by Species-Poor and Highly Specific Fungal Communities", Microb Ecol. Vol 73. pp: 321-337.

63. Hujšlová M., Kubátová A., Kostovčík M. & Kolařík M. 2013. "Acidiella bohemica gen. et sp. nov. and Acidomyces spp. (Teratosphaeriaceae), the indigenous inhabitants of extremely acidic soils in Europe". *Fungal Divers* vol. 58 pp:33–45
64. Zak J. & Wildman G. 2004. Fungi in stressful environments. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (eds) *Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods*, London, pp: 303-315.
65. Carrillo L. 2003; "Los hongos de los alimentos y forrajes", Universidad nacional de Salta, Argentina. Cap. N°5, pp 61- 68.
66. Hujšlová M., Kubátová A., Kostovčík M. & Kolařík M. 2010. "Diversity of fungal communities in saline and acidic soils in the Soos National Natural Reserve, Czech Republic", *Mycol Progress* Vol.9, pp:1–15.
67. Lindeberg J. 1972. "Characterization of penicillium simplicissimum isolated from acid mine water", Recuperado 14 abril 2017 en: http://arizona.openrepository.com/arizona/bitstream/10150/555275/1/AZU_TD_BOX66_E9791_1972_517.pdf
68. Torralba B., Nishikawa M., Baptista D. Magalhaes D., Y silva M. 2009. "Decolorization of different textile dyes by penicillium simplicissimum and toxicity evaluation after fungal treatment", *Brazilian Journal of Microbiology* Vol. 40, pp: 808-817.
69. Silverman M. & Muñoz E. 1971. "Fungal Leaching of Titanium from Rock", *applied microbiology*, pp: 923-924.
70. Yamada K., Mukomoto H., Katsuyaya Y., Saiganji A., & Tani Y. 2001. "La degradación de polietileno por un hongo, Penicillium simplicissimum YK" *Polymer degradation and stability* Vol. 72, pp: 323-327.
71. Fan T., Liu Y., Feng B., Zeng G., Yang C., Zhou M., Zhou H., Tan Z. & Wang X. 2008. "Biosorption of cadmium (II), zinc(II) and lead(II) by Penicillium simplicissimum: Isotherms, kinetics and thermodynamics", *journal of Hazardous Materials* Vol. 160, pp 655–661
72. Franz A., Burgstaller W. & Schinner F. 1991. "Leaching with Penicillium simplicissimum: Influence of Metals and Buffers on Proton Extrusion and Citric Acid Production", *applied and environmental microbiology*, pp: 769-774.

73. Mehta A., Torma A. & Murr L. 1979. "Effect of environmental parameters on the efficiency of biodegradation of basalt rock by fungi", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXI, Pp. 875-885
74. Silverman M. & Munoz E. 1970. "Fungal Attack on Rock: Solubilization and Altered Infrared Spectra", *Science*. 1970 Sep 4;169(3949):985-7.
75. Valenzuela E., Leiva S. & Godoy R. 2001. "Varacion estacional y potencial enzimático de microhongos asociados con la descomposición de la hojarasca de *Nothofagus pumilio*", *Revista Chilena de Historia natural*, Vol. 74, pp: 737-749.
76. Martínez O., Valenzuela E. & Godoy R. 2007. "Hongos aislados desde suelos de bosques Araucaria-Nothofagus post-incendio", segundo simposio internacional suelos, ecología y medio ambiente, sociedad chilena de la ciencia del suelo Universidad de la Frontera, Temuco IX Region de Chile, Boletín N°23, pp: 393-396.
77. Igarashi Y., Kuwamori Y., Takagi K., Ando T., Fudou R., Furomay T. & Oki T. 2000. "Xanthoepocin, un nuevo antibiótico a partir de IFO5762 *Penicillium simplicissimum*", *J Antibiot (Tokyo)*. 2000 Sep; 53 (9): 928-33
78. Reeve H. 1993. "Adaptation and the goals of evolutionary research", *Rev. Biol.* pp: 68:1-9.
79. Sánchez S. 2007. "El medio ambiente y su influencia en la adaptación de las especies (Environment media and your influence in the adaptation of the species)", REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504 ,Vol. 8 N° 12B
80. Berthelin, J. 1983. "Microbial weathering processes. In: Krumbein", W.E. Ed, *Microbial Geochemistry*. Blackwell, Oxford, pp: 223-262.
81. Weed S., Davey C. & Cook M. 1969. "Weathering of mica by fungi". *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 33, pp: 702-706.
82. Vasan S., Modak M. & Natarajan K. 2001. "Some recent advances in the bioprocess of Bauxite" *Int. J. Miner Process* pp: 173- 186.
83. Burgstaller W. & Schinner F. 1993. "Minireview Leaching of metals with fungi". *Journal of Biotechnology*, Vol. N°27, pp: 91-116
84. Biais J., Tyagi R. & Auclair J. 1993. "Metals removal from sewage sludge by indigenous ironoxidizing bacteria. *J. Environ. Sci. Health*, Vol. 28, pp: 443-467.

Anexos

1. Solicitud catastro de mineras de cobre que realizan los procesos de lixiviación y biolixiviación en Chile.



D.J. N° 619

SANTIAGO, 10 NOV. 2016

SRA. MARÍA JAVIERA FIGUEROA FUENTES
jalefax@gmail.com

De mi consideración:

Por medio de la presente, acuso recibo de su solicitud de información, conforme a la Ley N° 20.285, en cuya virtud requirió: "información sobre cuantas empresas de la gran minería de cobre hay actualmente, cuantas mineras realizan el proceso de lixiviación tradicional de cobre y biolixiviación de cobre".

Al respecto, cumpla con señalar a Ud., que existen 58 operaciones catastradas por nuestra Institución las que no consideran a los pequeños productores de la minería del cobre. De estas 58 operaciones, 19 poseen instalaciones para producir cátodos SxEw y concentrados, 17 solo concentrados y 22 solo cátodos SxEw.

Del grupo que producen tanto cátodos SxEw como concentrados, una tiene su línea de óxidos cerrada (Collahuasi), mientras que del grupo que solo produce cátodos SxEw hay 3 operaciones cerradas (Callejas Zamora, Santa Margarita y Sierra Miranda), y 2 paralizadas (Sagasca y Pampa Camarones).

Por su parte, las dos operaciones de biolixiviación existentes en Chile son Escondida y Radomiro Tomic (grupo de las productoras mixtas o de cátodos SxEw y concentrados).

La presente respuesta, se realiza por el Fiscal de la Comisión Chilena del Cobre, conforme a lo dispuesto en la Resolución Exenta N° 1190, de 10 de noviembre de 2010, la cual fuera modificada por Resolución Exenta N° 165, de 23 de febrero de 2012.

Sin otro particular, saluda atentamente a Ud.,

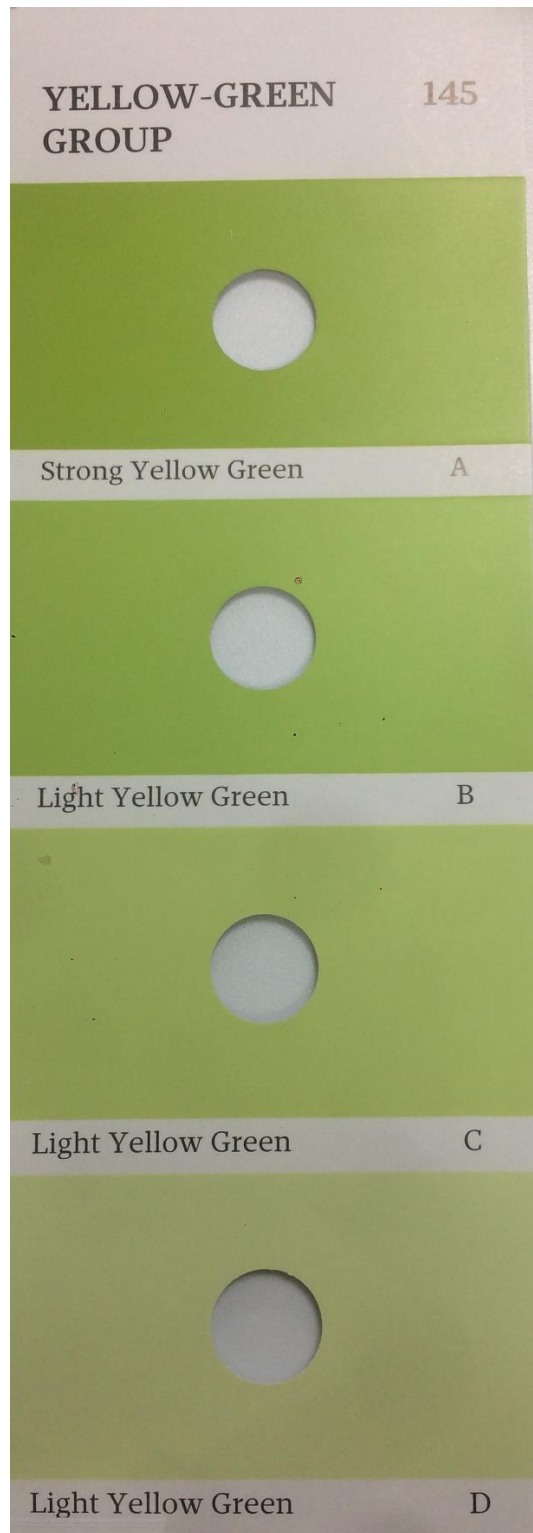
ALEX MATUTE JOHNS
Fiscal



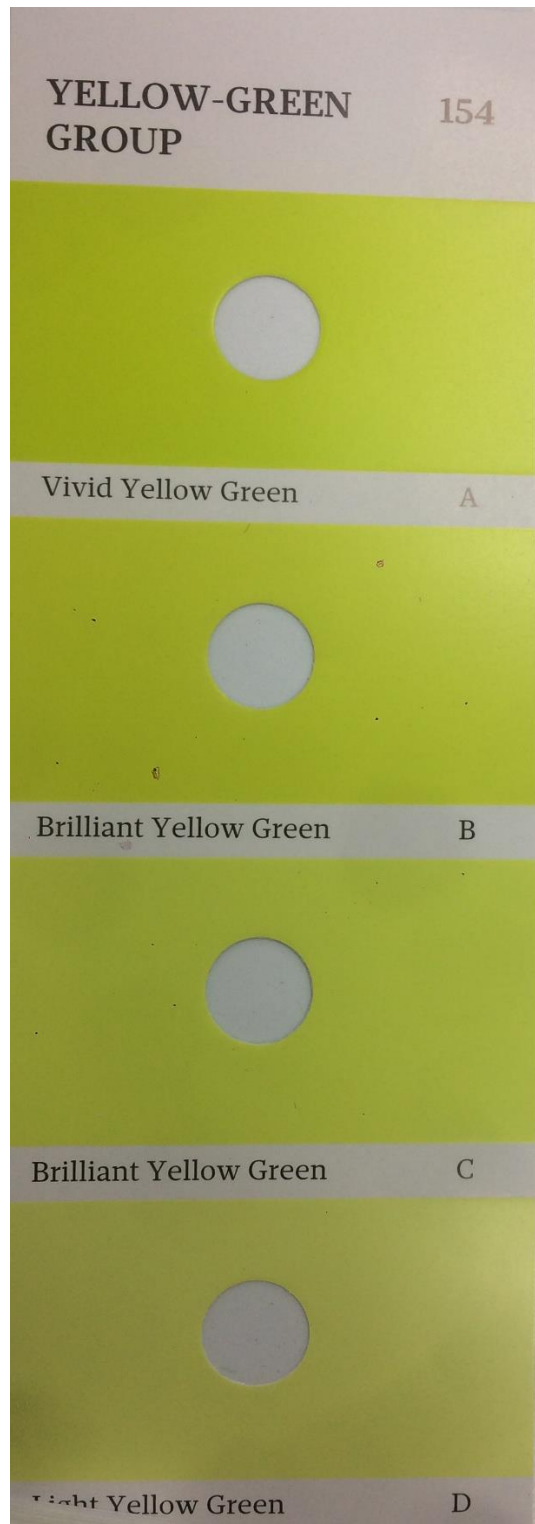
me
AMJXDE

Agustinas 1161 4° piso | Santiago de Chile | Fono: (56-2) 2382.8100
Fax: (56-2) 2382.8300 | www.cochilco.cl

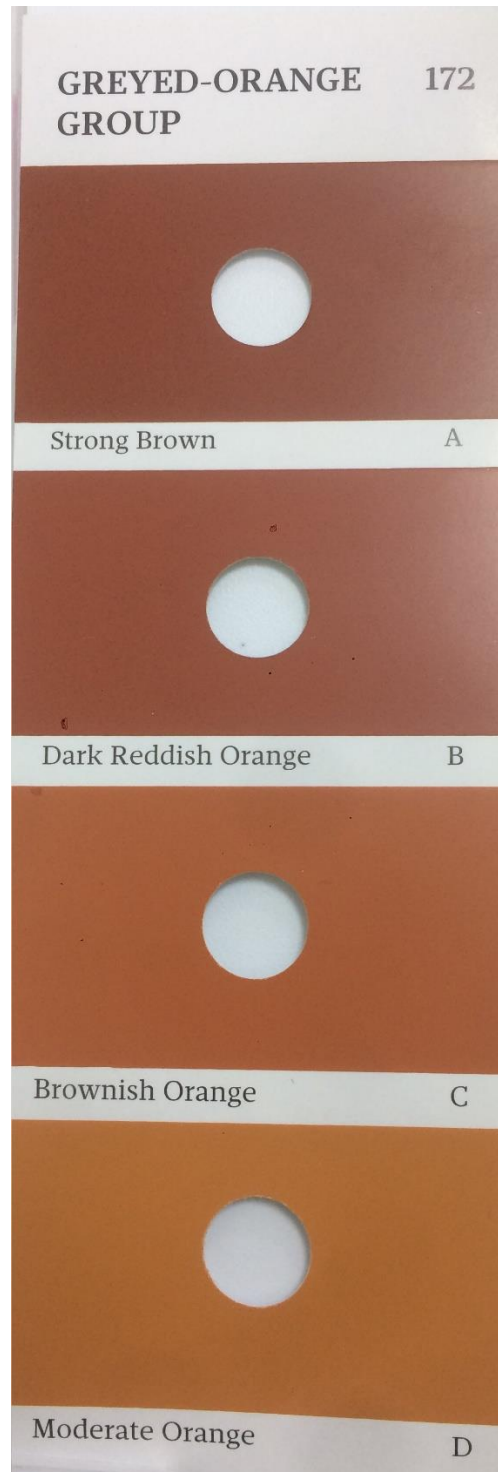
- Royal Horticultural Society 2015. "Colour chart", FAN3 Yellow-Green group N° 145, 6ta edition, published by RHS media, 80 Vincent Square, London SW1P, UK



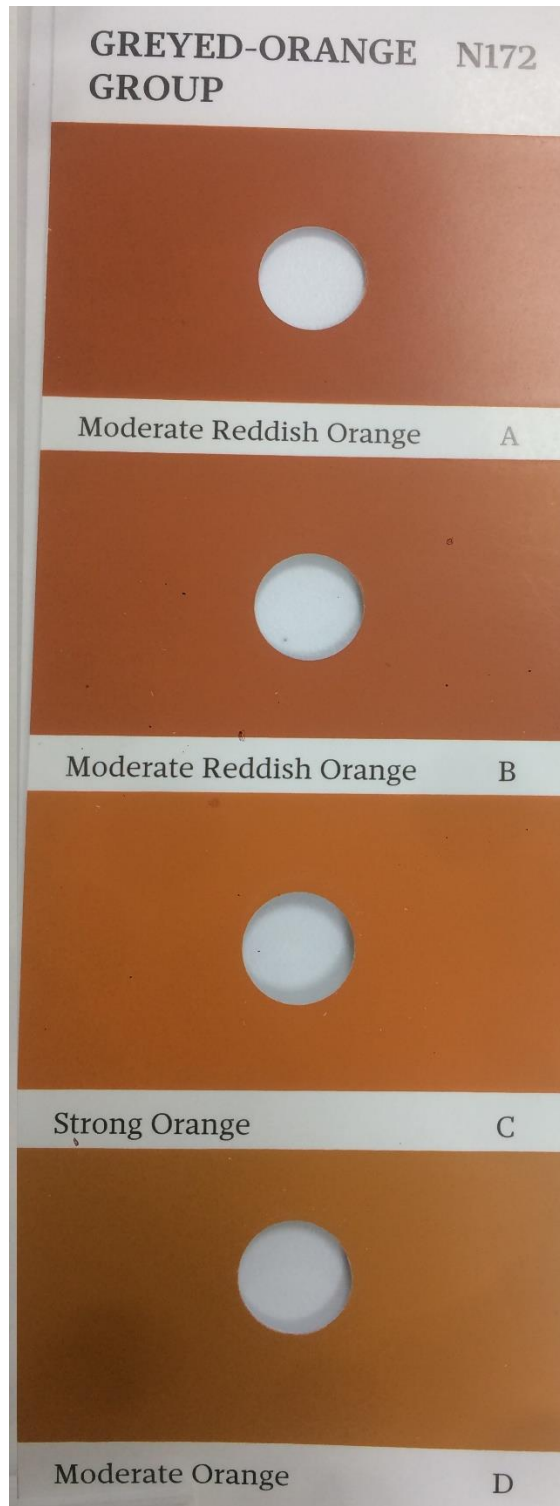
- Royal Horticultural Society 2015. "Colour chart", FAN3 Yellow-Green group N° 154, 6ta edition, published by RHS media, 80 Vincent Square, London SW1P, UK.



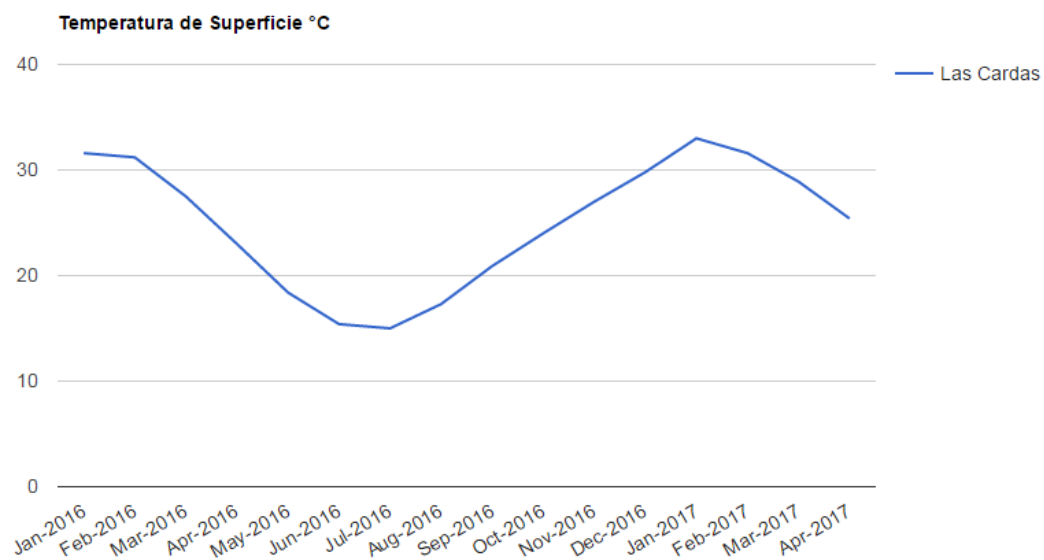
- Royal Horticultural Society 2015. "Colour chart", FAN4 Greyed-Orange group N° 172, 6ta edition, published by RHS media, 80 Vincent Square, London SW1P, UK.



- Royal Horticultural Society 2015. "Colour chart", FAN4 Greyed-Orange group N°172, 6ta edition, published by RHS media, 80 Vincent Square, London SW1P, UK.



6. Temperatura de Superficie °C central monitoreo las Cardas, Coquimbo, IV Región de Chile, Promedio temperatura mensual de 1 enero 2016 a 4 abril 2017.



Fuente: <http://agromet.inia.cl/estaciones.php>