

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA
FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y
FORESTAL**



“Tratamiento de drenaje ácido de minas mediante oxidación bacteriana (*Thiobacillus ferrooxidans*) y neutralización química en la compañía minera Ayapata S.A.C. - Puno”

Bach. Nelson Zea Sacachipana


**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AMBIENTAL Y FORESTAL**

ASESOR:

M. Sc. Eliana Mullisaca Contreras

CO-ASESOR:

M. Sc. Eddy Olinda Ludeña Cuba



Juliaca, 2022

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA
FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y
FORESTAL



“Tratamiento de drenaje ácido de minas mediante oxidación bacteriana (*Thiobacillus ferrooxidans*) y neutralización química en la compañía minera Ayapata S.A.C. - Puno”

Bach. Nelson Zea Sacachipana

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AMBIENTAL Y FORESTAL**

ASESOR:

M. Sc. Eliana Mullisaca Contreras

CO-ASESOR:

M. Sc. Eddy Olinda Ludeña Cuba



Juliaca, 2022

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y
FORESTAL**



“Tratamiento de drenaje ácido de minas mediante oxidación bacteriana (*Thiobacillus ferrooxidans*) y neutralización química en la compañía minera Ayapata S.A.C. - Puno”

Bach. Nelson Zea Sacachipana

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AMBIENTAL Y FORESTAL**

ASESOR:

M. Sc. Eliana Mullisaca Contreras

COASESOR:

M. Sc. Eddy Olinda Ludeña Cuba

Juliaca, Perú

2022

Zea, N. (2022) *Tratamiento de drenaje ácido de minas mediante oxidación bacteriana (Thiobacillus ferrooxidans) y neutralización química en la compañía minera Ayapata S.A.C. - Puno*, (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Juliaca.

AUTOR: Nelson Zea Sacachipana

TÍTULO: Tratamiento de drenaje ácido de minas mediante oxidación bacteriana (*Thiobacillus ferrooxidans*) y neutralización química en la compañía minera Ayapata S.A.C. – Puno.

PUBLICACIÓN: Juliaca, 2022

DESCRIPCIÓN: Cantidad de páginas (90 pp)

NOTA: Tesis **Escuela profesional de Ingeniería Ambiental y Forestal** - Universidad Nacional de Juliaca.

CÓDIGO: 01-000018-01/Z54

NOTA: Incluye bibliografía

ASESOR: M.Sc Eliana Mullisaca Contreras

PALABRAS CLAVE:

Oxidación bacteriana, metales pesados, neutralización química.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA
FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y
FORESTAL

“Tratamiento de drenaje ácido de minas mediante oxidación bacteriana (*thiobacillus ferrooxidans*) y neutralización química en la compañía minera Ayapata S.A.C. - Puno”

Presentado por:

Bach. Nelson Zea Sacachipana

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AMBIENTAL Y FORESTAL

M. Sc. Eliana Mullisaca Contreras

ASESOR



Comisión de evaluación de tesis:

M.Sc. Godofredo Huanca Chambi
PRESIDENTE DE JURADO



M.Sc. Siles Nilo Arce Sancho
JURADO (secretario)



M. Sc. Hugo Apaza Aquino
JURADO (Vocal)



DEDICATORIA

Para mi abuelita Isidora, por ser fuente de infinitas enseñanzas, desde ser duro conmigo mismo hasta rendirme los honores yo mismo.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental y Forestal de la Universidad Nacional de Juliaca, por haberme acogido en sus instalaciones y contribuir en mi formación profesional.

A la Mg.Sc Eliana Mullisaca Contreras, por contribuir a la ejecución de la presente tesis como asesora.

Al PhD. Mario Rodrigo Esparza Mantilla, por su mentoría constante en mi vida profesional, por su tiempo, confianza y conocimiento científico.

Al Ing. Edson Roger Pino Silva, por su soporte profesional, por las facilidades ante la minera, por la confianza desde siempre.

Al Ing. Juan Praxides Curro Zevallos, laboratorista de la Universidad Nacional de Juliaca.

Mi eterno agradecimiento para cada uno de ellos, que sin su importante contribución no hubiera sido posible el desarrollo eficiente de la presente tesis.

Nelson Zea Sacachipana

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1. Situación problemática.....	4
1.2. Preguntas de investigación científica.....	6
1.2.1. Pregunta general	6
1.2.2. Preguntas específicas	6
1.3. Objetivos de investigación científica	6
1.3.1. Objetivo general	6
1.3.2. Objetivos específicos.....	6
1.4. Justificación	7
CAPÍTULO II.....	8
REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1. Marco referencial	8
2.1.1. Antecedentes internacionales	8
2.1.2. Antecedentes nacionales	9
2.1.3. Antecedentes regionales y locales.....	10
2.2. Marco teórico	11
2.2.1. Generación de Drenaje ácido de mina DAM	11
2.2.3. Etapas de la generación de DAM.....	11
2.2.4. Tratamientos del drenaje ácido de minas DAM.....	12
2.2.4. Oxidación bacteriana.....	13
2.2.5. Aspectos fundamentales de la bacteria <i>T. Ferrooxidans</i>	14
2.2.8. Neutralización de drenaje ácido de minas.....	18

2.2.9. Diagrama de Pourbaix del Hierro.....	19
2.2.9. Límites máximos permisibles.....	20
CAPÍTULO III	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1. Ámbito de estudio.....	22
3.2. Tipo y diseño de investigación	23
3.2.1. Tipo de investigación	23
3.2.2. Diseño de investigación	23
3.3. Población y muestra.....	25
3.3.1 Población.....	25
3.3.2. Muestra.....	25
3.4. Hipótesis de investigación	26
3.4.1. Hipótesis general.....	26
3.4.2. Hipótesis específicas	26
3.5. Equipos	26
3.6 Materiales.....	26
3.7. Reactivos.....	27
3.8 Metodología.....	28
3.8.1. Aislamiento de bacterias del género <i>T. ferrooxidans</i> presentes en los drenajes ácido de minas de la compañía minera Ayapata S.A.C.	28
3.8.2. Determinación de la capacidad de oxidación bacteriana del género <i>T. ferrooxidans</i> en drenajes ácidos de minas de la Compañía Minera Ayapata S.A.C. .	30
3.8.3. Neutralización química con hidróxido de Calcio.....	33
CAPÍTULO IV	35
RESULTADOS Y DISCUSIONES	35
4.1. Aislamiento de bacterias del género <i>T. ferrooxidans</i> presentes en los drenajes ácido de minas de la compañía minera Ayapata S.A.C.....	35
4.1.1. Caracterización microbiana.....	36

4.1.2. Potencial redox.....	37
4.2. Determinación de la capacidad de oxidación bacteriana del género <i>T. ferrooxidans</i> en drenajes ácidos de minas de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.	38
4.2.1. Potencial redox.....	38
4.2.2. pH.....	41
4.2.3. Oxígeno disuelto	44
4.2.4. Ion ferroso	47
4.2.5. Ion férrico.....	50
4.3. Neutralización química con hidróxido de calcio	53
4.3.1. pH.....	53
4.3.2. Análisis químico de metales.....	57
4.3.3. Porcentaje de remoción de hierro con hidróxido de calcio	57
CAPÍTULO V.....	62
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	16
Tabla 2 LMP para la descarga de efluentes líquidos de actividad minero-metalúrgicas. .	21
Tabla 3 Coordenadas UTM WGS84 de la concesión minera Ayapata SA.C.....	22
Tabla 4 Diseño experimental.....	23
Tabla 5 Diseño experimental Ph.....	24
Tabla 6 Diseño experimental para la neutralización química.....	24
Tabla 7 Diseño experimental pH para la neutralización.....	25
Tabla 8 Medio de cultivo 9k-Fe.	30
Tabla 9 Condiciones del tratamiento de oxidación.	31
Tabla 10 Concentración de reactivos para la determinación de Fe total.	32
Tabla 11 Concentración de reactivos para la determinación de Fe ⁺²	32
Tabla 12 Estándares para curva de calibración de Hierro total.	33
Tabla 13 Estándares para curva de calibración de Ion Ferroso.	33
Tabla 14 Monitoreo del potencial redox en las resiembras S02, S03 y S04.	37
Tabla 15 Prueba de normalidad para el potencial redox.	39
Tabla 16 ANOVA de Friedman para muestras relacionadas.	39
Tabla 17 ANOVA Post-hoc Bonferroni.	40
Tabla 18 Media del monitoreo de pH fase oxidación bacteriana.	42
Tabla 19 Tabla prueba de normalidad para el pH.	42
Tabla 20 ANOVA de Friedman para muestras relacionadas.	43
Tabla 21 ANOVA Post-hoc Bonferroni.	43
Tabla 22 Media del monitoreo de oxígeno disuelto (mg/L) fase oxidación bacteriana. ...	45
Tabla 23 Prueba de normalidad.....	45
Tabla 24 ANOVA de Friedman para muestras relacionadas.	46
Tabla 25 ANOVA Post-hoc Bonferroni.	46
Tabla 26 Monitoreo de Fe ⁺² en fase oxidación bacteriana.	48
Tabla 27 Prueba de normalidad de los resultados de Fe ⁺²	49
Tabla 28 ANOVA de Friedman para muestras relacionadas	49
Tabla 29 ANOVA Post-hoc Bonferroni.....	50
Tabla 30 Concentración de ion férrico.	51
Tabla 31 Prueba de normalidad.....	51
Tabla 32 ANOVA de Friedman para muestras relacionadas.	52

Tabla 33 ANOVA Post-hoc Bonferroni.	52
Tabla 34 Resultados de la medición de pH, fase de neutralización.	54
Tabla 35 Prueba de normalidad.	54
Tabla 36 ANOVA de Friedman para muestras relacionadas.	55
Tabla 37 ANOVA Post-hoc Bonferroni.	55
Tabla 38 Comparación de LMP efluente minero metalúrgico vs DAM.	57
Tabla 39 Resultados de la concentración de Hierro por tratamiento.....	58
Tabla 40 Porcentaje de remoción de Hierro en los tres tratamientos.	58
Tabla 41 Prueba de normalidad.	59
Tabla 42 ANOVA de Friedman para muestras relacionadas.	59
Tabla 43 ANOVA Post-hoc Bonferroni.	60
Tabla 44 Curva de calibración para Fe ⁺²	77
Tabla 45 Monitoreo de Fe ⁺² en fase oxidación bacteriana.	78
Tabla 46 Resultados de la concentración de hierro por tratamiento.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de explotación en la Compañía Minera Ayapata S.A.C.....	4
Figura 2. (a) Confluentes del río Lechemayo, (b) Río Lechemayo.....	5
Figura 3. Curva de crecimiento típica para un sistema cerrado en medio líquido.	15
Figura 4. Diagrama de Pourbaix para Hierro.	20
Figura 5. Mapa de ubicación de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.....	22
Figura 6. flujograma metodológico.	28
Figura 7. Flujograma de fase de neutralización.....	34
Figura 8. Resiembras del aislamiento bacteriano.	35
Figura 9. Visualización microscópica 40 x, siembra 1.....	36
Figura 10. Visualización microscópica 100 x, siembra 1.....	36
Figura 11. (A) Aislamiento bacteriano día 1, (B) Aislamiento bacteriano día 2.....	37
Figura 12. Media del monitoreo de potencial redox fase oxidación bacteriana.	38
Figura 13. En el grafico se aprecia la tendencia del potencial redox en los tres tratamientos.	40
Figura 14. Monitoreo de potencial redox en laboratorio.	41
Figura 15. Tendencia del pH en los tres tratamientos.	44
Figura 16. Tendencia del oxígeno disuelto (mg/L) en los tres tratamientos.	47
Figura 17. Monitoreo de oxígeno disuelto.....	47
Figura 18. Determinación de Fe por espectrofotómetro uv/vis.	48
Figura 19. Tendencia decreciente del Fe ⁺² respecto a los 9 días de tratamiento.	50
Figura 20. Tendencia de los resultados respecto a Fe ⁺³	53
Figura 21. pH vs lechada de cal al 5%.	56
Figura 22. Metales pesados vs LMP de efluentes minero metalúrgicos.	57
Figura 23. Porcentaje de remoción de Hierro por neutralización.....	60
Figura 24. Concentración de metales pesados en el DAM neutralizado vs LMP.	61
Figura 25. Tabulación de curva de calibración.....	77
Figura 26. Curva de calibración para la determinación de hierro.	78

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Panel fotográfico.....	69
Anexo 2. Resultados de monitoreo fase de oxidación bacteriana.....	74
Anexo 3. Resultado de pH en la fase de neutralización.....	75
Anexo 4. Resultados de Hierro Luego de la neutralización con hidróxido de Calcio.....	76
Anexo 5. Determinación de ion ferroso.....	77
Anexo 6. Determinación de hierro.....	78
Anexo 7. Remoción de hierro: para la remoción de hierro se aplicó la siguiente formula	79
Anexo 8. Informe de análisis químico de metales.....	81
Anexo 9. Límites Máximos Permisibles de efluentes minero metalúrgicos.....	82
Anexo 10. Matriz de consistencia.....	83

LISTA DE ACRÓNIMOS

DAM	: Drenaje ácido de mina
DAR	: Drenaje ácido de roca
PAM	: Pasivos ambientales mineros
MINEM	: Ministerio de energía y minas
MINAM	: Ministerio del ambiente
DIGESA	: Dirección General de Salud Ambiental
EPT	: Elementos potencialmente tóxicas
LMP	: Límites máximos permisibles
PBI	: Producto bruto interno
Sig.	: Significancia
R ²	: Coeficiente de determinación
% R Fe	: Porcentaje de determinación de Hierro
<i>T. ferrooxidans</i>	: Thiobacillus ferrooxidans
DO	: Densidad óptica
OD	: Oxígeno disuelto
ORP	: Potencial redox
pH	: Potencial de hidrógeno
FeS ₂	: Pirita
Fe	: Hierro
Fe ⁺²	: Ion ferroso
Fe ⁺³	: Ion férrico
Ca (OH) ₂	: Cal hidratada
CO ₂	: Dióxido de carbono
NH ₄	: Amonio
FeSO ₄ . 7H ₂ O	: Sulfato ferroso heptahidratado
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Sulfato de Amonio
KH ₂ PO ₄	: Fosfato Monopotásico
MgSO ₄ . 7H ₂ O	: Sulfato de Magnesio
H ₂ SO ₄	: Ácido sulfúrico
NH ₄ CH ₃ CO ₂	: Acetato de amonio
C ₁₂ H ₈ N ₂	: O - fenantrolina

NaF	: Fluoruro sódico
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	: Sulfato ferroso amoniacal
FeO	: Óxido de Hierro
Pb	: Plomo
Mn	: Magnesio
Zn	: Zinc
As	: Arsénico
Al	: Aluminio

LISTA DE UNIDADES

cel/L	: Células por litro
mg/L	: Miligramo por litro
g/L	: Gramo por litro
L	: Litros
m/v	: Relación masa volumen
mV	: Milivoltios
°C	: Grados centígrados
μS	: Micro cien
rpm	: Revoluciones por minuto
ppt	: Partes por millón
ppm	: Partes por trillón

RESUMEN

Uno de los problemas ambientales de la minería aurífera es el drenaje ácido de mina (DAM), generado por la oxidación de la pirita y/o calcopirita que, en presencia de oxígeno atmosférico, agua y actividad microbiana, libera componentes ácidos que favorecen la solubilidad de los metales pesados. El objetivo del estudio fue tratar el drenaje ácido de mina mediante oxidación bacteriana seguida de neutralización química en la Compañía Minera Ayapata S.A.C. La metodología se llevó a cabo en tres fases: la primera fase consistió en el aislamiento de bacterias *T. ferrooxidans* del drenaje ácido de mina, seguida de la oxidación bacteriana mediante dos tratamientos y un control relativo, y finalmente la neutralización química, que consistió en 9 experimentos por tratamiento. Los resultados mostraron un recuento final de 12000000 células/L de *T. ferrooxidans*, en cuanto a la oxidación bacteriana, los tratamientos 1 y 2 presentaron una concentración final de Fe^{+3} de 5.33 mg/L y 4.8 mg/L respectivamente, mientras que el control relativo mostró una concentración de 2.15 mg/L de Fe^{+3} , así mismo en la neutralización, se reportó que el tratamiento 1 con un aporte de 1.2 mL de hidróxido de calcio al 5% presentó un pH de 8.17, logrando la neutralización del medio ácido. En conclusión, la oxidación bacteriana con *T. ferrooxidans* permite la oxidación del ion Fe^{+2} a Fe^{+3} , el cual se precipita con la neutralización, acelerando así el proceso de oxidación del hierro y aumentando la eficiencia de la neutralización, lo que permite que los metales presentes en el DAM como As, Fe, Cu y Pb se precipiten y no superen los límites máximos permisibles de los efluentes mineros y metalúrgicos.

Palabra clave: Oxidación bacteriana, Metales pesados, neutralización química.

SUMMARY

One of the environmental problems of gold mining is acid mine drainage (AMD), generated by the oxidation of pyrite and/or chalcopyrite which, in the presence of atmospheric oxygen, water and microbial activity, releases acidic components that promote the solubility of heavy metals. The objective of the study was to treat acid mine drainage by bacterial oxidation followed by chemical neutralisation at Compañía Minera Ayapata S.A.C. The methodology was carried out in three phases: the first phase consisted of the isolation of *T. ferrooxidans* bacteria from acid mine drainage, followed by bacterial oxidation by means of two treatments and a relative control, and finally chemical neutralisation, which consisted of 9 experiments per treatment. The results showed a final count of 12000000 cells/L of *T. ferrooxidans*, in terms of bacterial oxidation it was reported that treatments 1 and 2 showed a final Fe^{+3} concentration of 5.33 mg/L and 4.8 mg/L respectively, while the relative control showed a concentration of 2.15 mg/L Fe^{+3} , likewise in the neutralisation, it was reported that treatment 1 with a supply of 1.2 mL of calcium hydroxide at 5% presented a pH of 8.17, achieving the neutralisation of the acid medium. In conclusion, bacterial oxidation with *T. ferrooxidans* allows the oxidation of the Fe^{+2} ion to Fe^{+3} , which is precipitated with the neutralisation, thereby accelerating the iron oxidation process and increasing the efficiency of the neutralisation, which allows metals present in the DAM such as As, Fe, Cu and Pb to precipitate and not exceed the maximum permissible limits of mining and metallurgical effluents.

Keyword: Bacterial oxidation, heavy metals, chemical neutralisation.

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas de la industria minera a nivel mundial es la generación de drenaje ácido de mina (DAM) (Valente & Gomes, 2009). Dichos residuos provenientes de yacimientos metálicos contienen minerales sulfurados residuales como pirita (FeS_2), calcopirita (CuFeS_2) (Udayabhanu & Prasad, 2010). Estos minerales al estar expuestos al agua, oxígeno y microorganismos generan lixiviados conocidos como drenaje ácido de mina (DAM) (Wang et al., 2021).

La región de Puno es la segunda zona minera artesanal más importante del Perú, con el 12.8 % de la producción metálica (INEI, 2020). Las minas de Carabaya, la Rinconada y Cerro Lunar de la Región Puno realizan actividades de minería aurífera subterráneas centrada en la explotación de mantos, vetillas y filones auríferos con características de abundantes cuarzos, pirita, calcopirita, pirrotita y galena (Quispe, 2013). La compañía minera Ayapata S.A.C., ubicada en la provincia de Carabaya, cuenta con 52 plantas de beneficio, en la cual no se reporta que sus residuos y efluentes (DAM) cuenten con tratamiento o estabilización (IGAFOM, 2017).

En dicho contexto surgió el interés de estudiar el drenaje ácido de mina (DAM). En la actualidad el tratamiento convencional del DAM más utilizado es la neutralización directa con cal u otros agentes neutralizantes; no obstante, esta técnica genera lodos tóxicos muy voluminosos (Wang et al., 2021). La oxidación química o biológica se abre como una alternativa viable para la disminución de lodos tóxicos (Martins et al., 2011).

Por lo anterior expuesto, el estudio en cuestión tuvo por objetivo tratar los drenajes ácidos de mina mediante oxidación bacteriana seguida de una neutralización química en la compañía minera Ayapata S.A.C; la cual busco acelera la oxidación del Fe^{+2} , para una eficiente neutralización química, con lo cual se promovió la precipitación de los metales en solución.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Situación problemática

A nivel nacional la explotación minera está asociada a Pasivos Ambientales Mineros (PAM). Al cierre de agosto del 2020, el Ministerio de Energía y Minas (MINEM) reportó la existencia de cerca de 8000 PAM, presentes en 20 regiones del país, de las cuales la región de Puno registra un 11.6% (Castillo et al., 2021). Los relaves mineros, perteneciente al universo de los PAM, son una fuente directa de la generación de drenajes ácido de mina (DAM), teniendo un potencial alto para causar impactos devastadores a largo plazo en el ambiente (Ballester, 2005).

Las minas de Carabaya en la Región Puno realizan actividades de minería aurífera subterráneas centrada en la explotación de mantos, vetillas y filones auríferos (Quispe, 2013). La minera Ayapata S.A.C. cuenta con 52 plantas de beneficio las cuales cuentan con similares procesos de explotación (Figura 1), cada planta tiene un caudal de uso de agua industrial de 1008 m³/mes (IGAFOM, 2017).

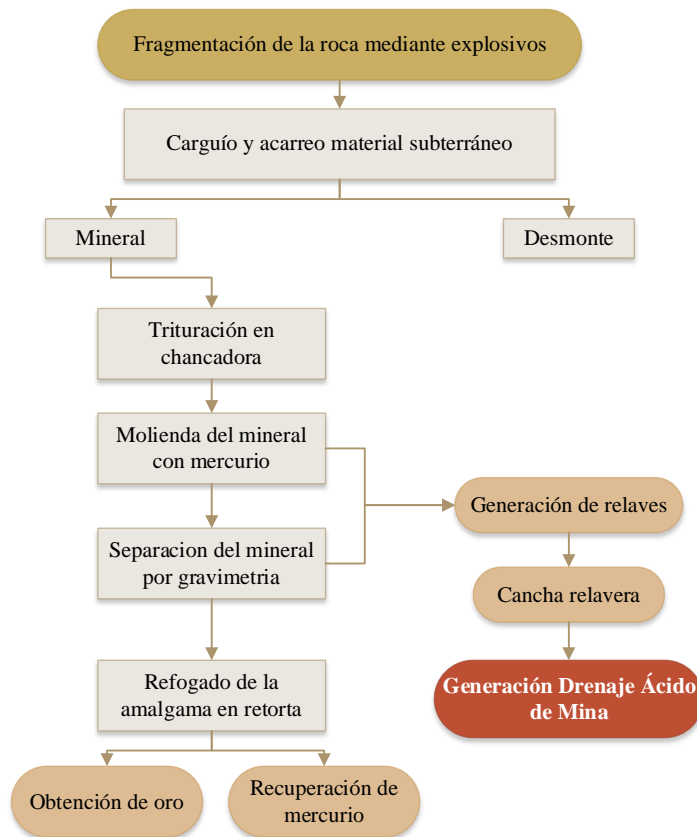


Figura 1. Proceso de explotación en la Compañía Minera Ayapata S.A.C

Fuentes: IGAFOM, 2017.

El punto de captación de agua para consumo industrial de la compañía minera Ayapata S.A.C., se ubica a 250 metros aguas arriba (Figura 2^a), el cual pertenece a los afluentes del río Lechemayo (Figura 2b), dicho río pertenece a la cuenca Huayllumayo (INRENA 2005). Los pobladores del distrito de Ituata – Sector Ituata y zonas aledañas al río Lechemayo, hacen uso del agua para consumo humano y agricultura; dicho recurso hídrico está siendo seriamente afectado por los efluentes de drenaje ácido de mina DAM, que es aparente por el pH y la turbiedad que presenta.



Figura 2. (a) Confluentes del río Lechemayo, (b) Río Lechemayo.

En ese entender es de vital importancia el tratamiento del drenaje ácido de mina, a fin de evitar la contaminación de la cuenca Huayllumayo por DAM y metales pesados; para ello se plantearon diversos tratamientos del DAM, el más utilizado es la neutralización directa con cal u otros agentes neutralizantes para precipitar los metales; no obstante, esta técnica genera lodos tóxicos muy voluminosos (Wang et al., 2021). Por tanto, la oxidación del DAM antes de la neutralización es importante para mejorar la eficiencia de la neutralización y disminuir la formación de lodos (Martins et al., 2011).

El papel más importante de la bacteria *T. ferrooxidans*, se da en el proceso de lixiviación del cobre y en el pretratamiento de oro refractarios; pero su capacidad de oxidar iones ferrosos a iones férricos puede utilizarse como herramienta en el tratamiento de efluentes ácidos (Misari, 2016), la bacteria *T. ferrooxidans* oxida el sulfato ferroso dando una solución con un alto contenido en sulfato férrico el cual precipita con carbonato de Calcio, dicha tecnología es usada en la Planta de

Neutralización de Matsuo, en Japón (Guerrero & Olvera, 1999); En tal sentido se trató los drenajes ácidos de minas mediante oxidación con *T. ferrooxidans* seguida de una neutralización química en la Compañía Minera Ayapata S.A.C, a fin de precipitar los metales como As, Fe, Cu y Pb y que estos no superen los límites máximos permisible en los efluentes mineros metalúrgicos.

1.2. Preguntas de investigación científica

1.2.1. Pregunta general

¿Cuál es el efecto de la oxidación bacteriana seguida de una neutralización química en el tratamiento de los drenajes ácidos de minas en la Compañía Minera Ayapata S.A.C.?

1.2.2. Preguntas específicas

¿Existen consorcios bacterianos *T. Ferrooxidans* en los drenajes ácido de mina de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.?

¿Cuál es la capacidad de oxidación bacteriana del género *T. Ferrooxidans* en muestras de drenajes ácidos de minas de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.?

¿Cuál es el efecto de la neutralización química en el drenaje oxidado por las bacterias *T. Ferrooxidans*?

1.3. Objetivos de investigación científica

1.3.1. Objetivo general

Tratar los drenajes ácidos de minas mediante oxidación bacteriana seguida de una neutralización química en la Compañía Minera Ayapata S.A.C.

1.3.2. Objetivos específicos

Aislar bacterias del género *T. ferrooxidans* presentes en los drenajes ácido de minas de la compañía minera Ayapata S.A.C.

Determinar la capacidad de oxidación bacteriana del género *T. ferrooxidans* en muestras de drenajes ácidos de minas de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.

Evaluar la neutralización química con hidróxido de calcio en el DAM de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.

1.4. Justificación

A nivel ambiental, la inadecuada disposición de relaves mineros son fuentes de generación de drenaje ácido de mina (Jimenez Huallpa, 2017), el cual tiene impactos devastadores a largo plazo en los ríos, arroyos y vida acuática, volviéndose en efecto, una “máquina de contaminación perpetua” (Ballester, 2005). En dicho contexto la presente investigación estudio una alternativa amigable con el medio ambiente, mediante la oxidación bacteriana, seguida de una neutralización química con hidróxido de calcio.

A nivel social, en la actualidad la población del Distrito de Ituata cuenta con 6 341 habitantes los cuales según plan regional de saneamiento de Puno (2021 – 2025) demanda de un 75 % de agua potable. Dichos habitantes demandantes consumen el agua de arroyos naturales y/o ríos. Esta problemática también se ve reflejado en las zonas rurales donde el acceso a un recurso vital como es el agua está supeditado al uso responsable y tratamientos por parte de la minera Ayapata S.A.C., las cuales laboran a aguas arriba.

Finalmente, la justificación a nivel metodológico se sustenta en base a una alternativa de solución de la problemática, que es la generación de DAM en la compañía minera Ayapata S.A.C., ante dicha problemática se planteó el aislamiento de la bacteria *T. ferrooxidans* mencionada bacteria presenta características quimiolitotróficas, autotróficas y acidófilicas; estas características la hacen particular para la oxidación de sulfuros con alto contenido de Hierro. Una vez obtenida biomasa bacteriana se realizó el tratamiento de oxidación de ion ferroso a ion férrico, el ion férrico por su parte es una alto lixivante de metales pesados. Por último, se neutralizo con hidróxido de calcio, cabe mencionar que este neutralizante genera menos residuos si es aplicado eficientemente y cumple dos funciones principales la primera de neutralizar la acidez y la segunda de precipitar metales pesados como hidróxidos de metal, por dichas características se empleó el hidróxido de calcio. Finalmente, el resultado fue de precipitar los metales pesados y tener pH neutro los cuales cumplan con la normativa vigente respecto a efluentes minero metalúrgicos.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Marco referencial

2.1.1. Antecedentes internacionales

Jin et al., (2020), evaluaron un nuevo enfoque de biomineralización antes de la neutralización con cal para tratar el DAM. Los resultados mostraron cinco ciclos de reducción de Hierro por *A. multivorum* seguidos de la oxidación del Hierro por *A. ferrooxidans* con el cual eliminaban completamente el Hierro y casi el 40% del sulfato en DAM, mientras que los metales no ferrosos (Al, Mn, Cu, Ni y Zn) apenas se eliminaban. Finalmente concluyeron que las cantidades de cal requerida y los lodos generados en el posterior proceso de neutralización con cal se redujeron en un 56% y 68%, respectivamente.

Minas, D. (2018), estudio la adaptación individual y conjunta de las bacterias acidófilas y los hongos a sistemas adecuados de agitación y aireación, en los cuales coloco concentraciones distintas de muestras auríferas refractarias a fin de comprobar su efectividad como pretratamiento en los procesos de cianuración. Comprobó la presencia de *Thiobacillus ferrooxidans* en condiciones ácidas y una especie fúngica aún no determinada.

Martins et al. (2017), estudiaron el rendimiento y los cambios en la comunidad bacteriana durante la biorremediación del drenaje ácido de dos minas portuguesas. Observaron una neutralización efectiva (aumento del pH de 2.8 a 6.5) y eliminación de metales (>99%) y sulfato (>72%). Los principales grupos bacterianos fueron *Desulfovibrio sp.*, *Clostridium sp.* y miembros del orden Bacteroidales. Sus resultados mostraron que la fuente de DAM alimentada al sistema fue determinante para el establecimiento de diferentes poblaciones bacterianas.

Corrales et al. (2016), desarrollaron una alternativa para disminuir la contaminación ambiental generada por el empleo de sustancias químicas cuando se extraen metales pesados en la industria minera. Observaron microscópicamente presencia de bacilos gram negativos y cristales. Por otra parte, se confirmó la característica de ser bacterias acidófilas ya que su desarrollo se obtuvo a pH entre 1 y 2.5. Los resultados obtenidos en este estudio permitieron concluir que en estas minas hay presencia de organismos bacterianos con morfología y comportamiento bioquímico compatible

con bacterias biolixiviantes del género *T. ferrooxidans*. El aislamiento y fenotipificación obtenidos in vitro abre la posibilidad de establecer un método óptimo para su conservación y posterior utilización en procesos de biorremediación.

Branlt, H. (2001), evaluaron los intereses ambientales y comerciales en la lixiviación bacteriana de pirita, respondieron dos centrales preguntas de investigación: ¿*T. ferrooxidans* mejora la tasa de lixiviación por encima de la alcanzada por soluciones de sulfato férrico en las mismas condiciones?, y si es así, cómo ¿Afectan las bacterias a tal mejora? En la que concluyeron que la tasa de disolución de pirita con bacterias fue mayor que sin bacterias a las mismas concentraciones de iones ferroso y férrico en solución.

Nikolov et al. (2001), evaluaron el rendimiento de un contactor biológico rotatorio a gran escala utilizado para la oxidación de Hierro ferroso por *T. ferrooxidans*. demostraron que se pueden obtener altas tasas volumétricas, hasta 2.5 g /L-h. También examinaron los efectos de la entrada de Hierro ferroso concentración y tiempo de retención de líquido en el rendimiento del reactor. En general, concluyeron que el biológico rotatorio contratista es una herramienta prometedora para el tratamiento biológico de drenaje ácido de mina que contiene Hierro ferroso.

2.1.2. Antecedentes nacionales

MINEM (2018), realizaron un estudio de los efluentes de mina sin un tratamiento previo se caracterizan por presentar 259mg/L de Fe, 18.1 mg/L de Al, 353 mg/L de Mn, 2.8 mg/L de Pb y 50 mg/L de Zn aproximadamente. Por ello, propusieron establecer tecnologías con la finalidad de recuperar dichos subproductos mejorando la calidad del agua. Emplearon un tratamiento de especiación hidrogeoquímica, porque permite una caracterización química del agua de mina. Especialmente, del Fe^{+2} el cual en contacto con el O_2 se oxida a Fe^{+3} .

Cruz, D. & Cotrina, C. (2015), Determinaron el efecto de la temperatura y el grado de correlación en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo microbiano biolixivante, trabajaron con muestra de las pilas de lixiviación de la empresa minera Southem Perú Cooper Corporation. Se tuvo 4 tratamientos experimentales de 25, 40, 55y 70°C. En la que concluyeron que la temperatura produce un efecto de incremento en el crecimiento microbiano y en la biolixiviación del cobre a partir de la calcopirita.

(Arias V., Anaya F., Quiñones J., Salazar D., Gil J., 2015), caracterizaron morfológicamente un consorcio de bacterias provenientes de las unidades mineras de Julcani en Huancavelica. Para ello aislaron dichas bacterias en medios de cultivo líquido 9K modificado y medio sólido de FeO, asimismo realizaron la identificación por tinción Gram y observación microscópica. Recomendaron que para obtener una cepa pura es necesario no menos de 8 resiembras en medio líquido y sólido, en modo alternante.

Ayala, F. et al. (2014), determinaron la calidad del agua del río Yauli en la zona del distrito del mismo nombre en el departamento de Junín, impactado por el drenaje ácido de mina (proveniente de los relaves mineros de la actividad minera en la extracción de minerales polimetálico como Cu y Fe. La investigación se realizó en época de estiaje (mayo septiembre) del año 2013. Concluyeron que hay presencia de iones de Fe en las aguas del río Yauli producto del drenaje por la presencia de relaves y bocaminas dejadas sin haberse ejecutado un plan de cierre adecuado.

Rivera, U. et al. (2007), estudiaron la efectividad de un edafosedimento carbonatado y una caliza en el tratamiento del DAM de una mina abandonada. Realizaron una caracterización química, mineralógica, geoquímica y micromorfológica de los dos materiales formados de carbonatos de calcio con diferente origen (edafosedimento y caliza). Sus resultados químicos en el DAM indicaron una retención del 100% de Cu, Fe, Ni, Al y Cd. Concluyendo que el edafosedimento carbonatado resultó ser eficiente en la neutralización y precipitación.

2.1.3. Antecedentes regionales y locales

Huallpa, J. (2017), estudió la remoción del tratamiento de aguas ácidas de mina, mediante neutralización con lechada de cal en la Unidad Minera Arasi – Puno. Su metodología consto de 4 etapas: 1ro se realizó la medición de caudal y la caracterización del agua ácida, la 2da etapa se realizó los ensayos de laboratorio con la neutralización con lechada de cal, en 3er lugar fue el tratamiento con lechada de cal, y por último la 4ta etapa es el análisis de los parámetros físico-químicos e inorgánicos. Finalmente concluyó que al neutralizar el drenaje ácido con lechada de cal existe una eficiencia de remoción considerable de los parámetros físico químico e inorgánico.

Minas, D. (2018), caracterizó y diseñó un tratamiento de los efluentes de aguas ácidas en la mina La Rinconada. Su investigación fue experimental y explicativa empleando la adecuada caracterización físico y química, y para el tratamiento se trabajó con el método activo de neutralización - precipitación con cal como agente neutralizante. Se realizaron ensayos de neutralización con muestras de 500 ml de agua cuyo valor de pH de 3.38 y con concentraciones de metales pesados disueltos como Cu, Fe, Al, Zn, Ni y Mn; en cuyo resultado final de los ensayos de neutralización para un tiempo de 05 a 10 minutos se obtuvo pH de 6.5 y 8.5 con la aceptable precipitación de los metales pesados disueltos como: Fe en 93.84 %, Cu en 80.95 %, Al en 99.37 %, Zn en 86.88 %, Ni en 10.3 %. Donde la dosis óptima es de 0.4 g de cal por litro de agua ácida.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Generación de Drenaje ácido de mina DAM

El drenaje ácido de mina (DAM), es una contaminación multifactorial compleja, formada a partir de interacciones químicas, físicas y biológicas que tienen lugar bajo condiciones ambientales en minas abandonadas y activas (Ighalo & Eletta, 2020). Cuando el agua alcanza cierto nivel de acidez, un tipo de bacteria común llamada “*T. Ferrooxidans*”, puede aparecer acelerando los procesos de oxidación y acidificación, lixiviado aún más los residuos de metales de desecho (Price & Errington, 1998).

2.2.3. Etapas de la generación de DAM

Se identificó tres etapas en la generación de drenaje ácido de mina, dependiendo del pH de la solución del efluente. A medida que el pH disminuye por las reacciones de oxidación, se desarrollan distintas reacciones de neutralización por parte de los minerales consumidores de ácido (Ferguson & Erickson, 1987).

Etapa I: Este puede durar semanas, meses o años dependiendo del potencial de neutralización del contenido. Se desarrolla a un rango de pH casi neutro, la mayor parte de la oxidación es química por el oxígeno del aire. Si la generación de acidez en el tiempo continúa mayor a la capacidad del mineral para neutralizar, el pH continuará acidificando hasta alcanzar las etapas II y III, de la generación del drenaje ácido (Ferguson & Erickson, 1987).

Etapa II: Este tiene el pH del microambiente ha disminuido hasta 4.5, las poblaciones de las bacterias amantes del ácido (acidófilas) como *T. ferrooxidans* comienzan a multiplicarse (Ferguson & Erickson, 1987). La oxidación de estas

bacterias aumenta la velocidad de producción de ácido. En la reacción se produce el sulfato ferroso que al ser oxidado nuevamente se transforma en sulfato férrico, y éste a su vez en contacto con el agua da lugar al ácido sulfúrico y al hidróxido férrico, que es insoluble y es el que provoca la coloración amarilla de las aguas (López et al., 2002).

Etapa III: Cuando el pH alrededor de los sulfuros disminuye por debajo de 3, el Hierro férrico permanece en solución. El Hierro ferroso es convertido por las bacterias en Hierro férrico que a su vez oxida los minerales de sulfuro. La velocidad de formación de ácido es rápida en la última etapa y está limitada por la concentración de Hierro férrico (Ferguson & Erickson, 1987).

Por su parte López Pamo et al., (2002), indica que en el momento que se producen grandes cantidades de ácido, se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

- Si se inhibe la bacteria *T. ferrooxidans* la producción de ácido se reduce al menos en un 75%.
- Si el pH del agua sube por encima de 5, igualmente se inhibe la oxidación.
- Si el pH del agua desciende por debajo de 4.5 debe esperarse que todo el sulfuro de Hierro termina oxidándose.
- Si el pH desciende por debajo de 2.5 se establece un equilibrio en el que la actividad bacteriana se estabiliza, ya que habrá alcanzado su óptimo desarrollo.

2.2.4. Tratamientos del drenaje ácido de minas DAM

El tratamiento del drenaje ácido puede darse por métodos activos o métodos pasivos. Básicamente la elección del tratamiento a implementar se centrará en la caracterización propia del drenaje, su caudal promedio, el uso final del agua tratada y el costo por infraestructura, operación y mantenimiento del tratamiento propiamente dicho (planta, humedal, etc.) (Montesinos, 2017).

a) Tratamiento por métodos activos

Las técnicas de tratamiento activo son las que requieren una operación, mantenimiento y monitoreo continuo y utilizan para su funcionamiento energía externa (energía eléctrica) y reactivos (Montesinos, 2017).

Si bien este tipo de tratamiento no requiere de grandes áreas para su infraestructura, su costo de inversión es elevado pues implica el montaje de una planta de tratamiento químico con diversos equipos. Así mismo, por ser de operación continua, su costo operativo considerará la adición rutinaria de

reactivos requiriendo el monitoreo permanente del personal (Montesinos, 2017). El proceso de neutralización de las aguas ácidas mediante la adición de sustancias alcalinas es el que actualmente se lleva a cabo en la mayoría de las minas que generan efluentes de este tipo (López et al., 2002). Se suele utilizar cal hidratada $\text{Ca}(\text{OH})_2$ que es particularmente útil para tratar grandes caudales en condiciones de alta acidez. Como la cal hidratada es hidrófoba, para conseguir una buena mezcla con el agua, se precisa de un dispositivo de agitación. Cuando se pretende eliminar el Hierro, en el propio proceso de agitación se incorpora la aireación necesaria para lograr la oxidación del Hierro ferroso hasta transformarse en Hierro férrico y conseguir la mayor eliminación de este (Medina, 2018).

b) Tratamiento por método pasivo

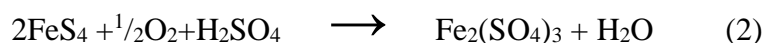
En cuanto a los tratamientos pasivos aeróbicos, la oxidación biológica de Fe^{2+} a Fe^{3+} es uno de los grandes procesos de inmovilización de metales que ocurre en humedales aerobios para el tratamiento de aguas con pH de 4-5 (Johnson & Hallberg, 2005). En el caso de los DAM, los cuales presentan pH de 2-3, los humedales aerobios no son utilizados y han sido reemplazados por la laguna natural de oxidación de Fe, que han dado muy buenos resultados como un pretratamiento al químico, permitiendo eliminar hasta el 38% del Fe^{3+} y co-precipitar hasta un 80% de As (Macías et al., 2012).

2.2.4. Oxidación bacteriana

Las bacterias *T. Ferrooxidans* acelera el proceso de oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} del efluente (Guerrero & Olivera 1999). Lo que ocurre en primera instancia es la oxidación del sulfuro en presencia de oxígeno y agua, el resultado de dicha reacción es sulfato ferroso y ácido sulfúrico (ecuación 1). Seguidamente el sulfato ferroso en presencia de oxígeno y ácido sulfúrico más el medio microbiano que cumple la función de biocatalizador, da como resultado los iones férricos y agua (ecuación 2).



Bacteria



2.2.5. Aspectos fundamentales de la bacteria *T. Ferrooxidans*

a) Características de la bacteria *T. Ferrooxidans*

Las bacterias *T. ferrooxidans*, presentan características singulares, las cuales fueron tomadas como principal referencia para su aislamiento y posterior identificación:

Característica quimiolitotrófica: Que la energía para su crecimiento y mantenimiento se deriva principalmente de la oxidación del Hierro ferroso (Misari, 2016; Drobner et al., 1990).

Característica autotrófica: Que el dióxido de carbono es la fuente de carbono celular. El N y el P también son necesarios como nutrientes secundarios para la síntesis celular junto con los minerales traza de K, Mg, Na y Ca (Misari, 2016; Leduc & Ferroni, 1994).

Característica acidófila: Que su crecimiento se produce a un pH de 1.5 a 6.0 con un óptimo entre 2.0 y 2.5. La supervivencia no suele producirse por encima de un pH de 6.5 ni por debajo de un pH de 1.0 (Misari, 2016; Nematy et al., 1998).

Característica morfológica: Que son bacilos gram negativos de 0.3-0.5x1,0-1.8 μm , se presentan solas o en parejas, raramente en cadenas cortas. Son móviles por medio de un único flagelo polar (Misari, 2016; Leduc & Ferroni, 1994).

b) Crecimiento Bacteriano

El crecimiento bacteriano se da por cuatro fases como se muestra en la figura 3, las cuales describe a continuación:

Fase de latencia: Hay aumento de los componentes macromoleculares y de la actividad metabólica, casi sin división celular, asociado a un incremento de la susceptibilidad a los agentes físicos y químicos. Por lo tanto, la mal llamada fase de latencia implica intensa actividad metabólica (Varela & Grotiuz, 2008).

Fase exponencial: Las células se dividen a velocidad constante, determinada por la naturaleza intrínseca de la bacteria y por las condiciones del medio. Existe gran aumento del número total de células viables, que puede ser expresado en forma exponencial (Varela & Grotiuz, 2008).

Fase estacionaria: Eventualmente el agotamiento de los nutrientes o la acumulación de productos tóxicos determina el cese del crecimiento. Hay

pérdida de células por muerte, la cual es balanceada por la formación de nuevas células (Varela & Grotiuz, 2008).

Fase de muerte: Luego de la fase estacionaria, la tasa de muerte se incrementa, el número de bacterias viables disminuye rápidamente y, por lo tanto, la curva de crecimiento declina.

Las características de la curva de crecimiento pueden variar, dependiendo de las características propias del microorganismo, del estado metabólico del inóculo, del medio de cultivo y de las condiciones de incubación (Varela & Grotiuz, 2008).

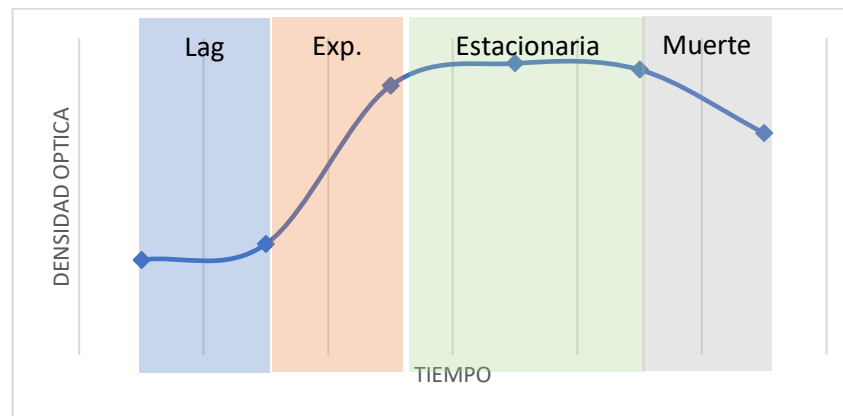


Figura 3. Curva de crecimiento típica para un sistema cerrado en medio líquido.

Fuente. Adaptado de Núñez et al., (2014).

c) **Factores que intervienen en la velocidad de crecimiento de *T. ferrooxidans***

Temperatura: La temperatura óptima para el *T. Ferrooxidans* está en el rango de 25 a 45 °C. La oxidación biológica de sulfuros metálicos cesa alrededor de 50 °C, la temperatura mínima no ha sido determinada, pero generalmente se acepta que la actividad bacteriana cesa en el punto de congelación del medio de cultivo (Misari, 2016).

pH: Es importante mantener el ajuste del valor del medio (pH) correcto para que ocurra un buen crecimiento de las bacterias con las que se hará la lixiviación metálica. Los microorganismos que participan en la oxidación bacteriana de los minerales sulfurados son acidófilos, esto quiere decir que son activos a un pH por debajo de 3.0, se considera un pH óptimo de crecimiento para el *T. ferrooxidans* en el intervalo de 1.5 a 2.5 (Brantl, 2001).

Potencial redox: El potencial redox que se da en la solución, nos indica que existe un metabolismo energético (actividad bacteriana) en el proceso de la biooxidación,

debido a que esta actividad genera una tendencia de la solución ya sea a ser oxidada o a ser reducida. Durante la fase de crecimiento exponencial, el potencial redox del *T. ferrooxidans* tiene la característica de estar entre 320 – 580 mV (Rossi, 1990). Por lo general, cuando el potencial redox de la solución supera los 400 – 450 mV, la oxidación bacteriana alcanza sus mayores velocidades (Gentina y Acevedo, 2013).

Aireación: Refieren que la mayoría de las bacterias que se usan en la oxidación de minerales son aeróbicos y quimiolitotrófica en la naturaleza, la aireación es importante en el proceso, ya que se encarga del suministro tanto del O₂ como del CO₂ al sistema de oxidación. El suministro suficiente de dióxido de carbono sirve como fuente de carbono que es necesaria para la generación de la biomasa (Pal et al., 2010).

Nutrientes: Los nutrientes que requiere la bacteria *T. Ferrooxidans* son los mismos que utiliza un autótrofo quimiosintético. El medio de cultivo que se usan más frecuentemente es el 9k y su composición se muestra en la tabla 1.

El *T. Ferrooxidans* sintetiza sus materiales celulares a partir de fuentes inorgánicas que son: dióxido de carbono (como fuente de carbón para el crecimiento de la célula), sulfato de amonio y fosfato ácido de potasio (como fuente de nitrógeno y fosfato), cloruro de potasio (como factores de crecimiento) (Rodríguez & Guanilo, 2006).

La fuente de energía utilizada por el *T. Ferrooxidans* son los iones ferrosos Fe²⁺ y azufre inorgánico. Esta energía como efecto de la oxidación del ión ferroso a ión férrico, es utilizada para su metabolismo. Esta oxidación se muestra en el cambio de color de la solución nutriente y comprueba de este modo el límite de la concentración para la dilución de un cultivo (Rodríguez & Guanilo, 2006).

Tabla 1

Nutrientes para el aislamiento bacteriano.

Reactivo	Solución A	Solución B
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0	-
KH ₂ PO ₄	0.04	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.04	-
FeSO ₄ . 7H ₂ O	-	33.3

Nota. Fuente: Misari (2016); Silverman & Lundgren (1959).

d) Metabolismo y bioenergética en la oxidación de ion ferroso

Las rutas metabólicas de *T. ferrooxidans* aparentemente corresponden a las rutas estándar en microorganismos quimiolitotrofos. Esta bacteria posee un ciclo de Calvin para la fijación de CO₂, y rutas para la fijación de nitrógeno y fosfato (Inglede, 1982). La fijación de carbono requerida para la síntesis de material celular y crecimiento, al realizarse a través del ciclo de Calvin, requiere de la presencia de ATP (Adenosín Trifosfato) y NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato) en el citoplasma celular.

Para la obtención de las moléculas energéticas requeridas para impulsar este ciclo y las otras funciones metabólicas del microorganismo, la bacteria obtiene la energía asociada al proceso de oxidación de ion ferroso (o compuestos reducidos de azufre según sea el caso) con oxígeno (Meruane, 2002).

La transformación energética asociada al proceso oxidativo de ion ferroso puede ser resumida en dos procesos relacionados: El transporte directo de electrones desde el ion ferroso al oxígeno, que mediante un mecanismo de quimiosmosis produce ATP; y un mecanismo reverso de transporte de electrones que, utilizando una parte de la energía disponible en el transporte directo, transfiere electrones necesarios desde el ion ferroso para la reducción de NADP a NADPH (Meruane, 2002).

Reducción de Ion férrico, de acuerdo con Brock y Gustafson (1976) *T. Ferrooxidans* tiene la potencialidad de reducir ion férrico mientras realiza la oxidación de azufre elemental. La reducción es irreversible solamente en condiciones anaeróbicas de acuerdo con estos autores. El contraste, Sand (1989) sugiere que esta bacteria es capaz de reducir ion férrico en la oxidación de azufre aún en presencia de aire.

En condiciones normales, el ferroso generado en la reducción es rápidamente oxidado haciendo imposible su detección, pero al aumentar la acidez (pH menor que 1,2) se produce la inhibición del proceso oxidativo de ion ferroso, observándose la reducción de férrico. Este proceso inhibitorio es reversible siendo el tiempo de respuesta del cultivo bacteriano relativamente corto (entre uno y dos días). Es decir, bacterias que al ser expuestas a valores de pH menores que 1,2 han dejado de oxidar ion ferroso, reinician la actividad oxidativa de ion ferroso al volver a mayores valores de pH (1,8) (Meruane, 2002).

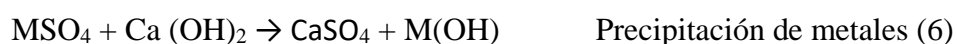
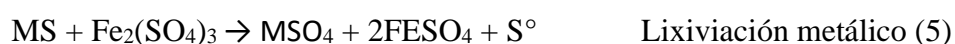
Oxidación bacteriana de ion ferroso, se sabe experimentalmente que la velocidad de oxidación química de ion ferroso con oxígeno (reacción que termodinámicamente es espontánea) aumenta hasta seis ordenes de magnitud en sistemas donde existe una población bacteriana de *T. ferrooxidans*. Este hecho indica que la oxidación se encuentra directamente relacionada con la actividad y crecimiento de esta bacteria (Meruane, 2002).

2.2.8. Neutralización de drenaje ácido de minas

La neutralización se refiere a la disminución de las concentraciones de los iones H^+ y OH^- , hasta valores próximos a los que contiene el agua. En la práctica industrial, la situación no es tan estricta y se considera que el líquido está neutralizado cuando el valor de pH es de 7 a 9. A este intervalo de pH lo denominaremos convencionalmente en el tratamiento de aguas industriales, “zona de neutralización” (García & Rodríguez, 2006).

El proceso de neutralización de las aguas ácidas mediante la adición de sustancias alcalinas es el que actualmente se lleva a cabo en la mayoría de las minas que generan efluentes de este tipo. El tratamiento en las plantas convencionales se realiza en tres etapas: neutralización, oxidación y precipitación (López et al., 2002).

- a. **Cal:** Es el producto que se obtiene de la calcinación de la piedra caliza por debajo de la temperatura de descomposición del hidróxido de calcio. El CaO mezclado con agua forma el hidrato cálcico, cal apagada ($Ca(OH)_2$), se hincha, produce mucho calor y se endurece o como corrientemente se dice, fragua. La cal viva sometida al tratamiento con agua, se llama cal apagada (hidróxido de calcio) (Tejada Mayta, 2017). Las reacciones principales que tienen lugar utilizando el agente alcalino cal son:



M=Metal

En la ecuación 3 se tiene la cal la cual reacciona con el agua obteniéndose el hidróxido de calcio o más conocido como lechada de cal ecuación, seguidamente se tiene el hidróxido de calcio el cual reacciona con el ácido sulfúrico del cual se obtiene el sulfato de calcio más agua ecuación 4, en la lixiviación de metales se tiene el mineral sulfurado más el sulfato férrico reacciona y se obtiene el sulfato del metal más el sulfato ferroso y Azufre elemental ecuación 5, finalmente se tiene la precipitación de metales en el cual se tendrá el sulfato de metal más el hidróxido de calcio el reaccionara y se obtendrá el sulfato de calcio más precipitados de hidróxidos del metal ecuación 6.

La separación de los sólidos insolubles se realiza en decantadores circulares o rectangulares, ayudada por la acción de floculantes. Los agentes alcalinos a emplear son muchos: cal rápida, cal hidratada, roca caliza, caliza en polvo, magnesita, dolomita, sosa cáustica, cenizas de sosa e hidróxido de amonio. Pero, en la práctica los más usados son: la cal, la cal hidratada y la caliza. (Figueroa, 2018). La concentración de metales pesados en el efluente puede reducirse por precipitación como hidróxidos a distintos valores de pH, por ejemplo, el pH mínimo para el Pb^{+2} es 6.3; para el Fe^{+2} es 9.5 y para el Mn^{+2} es 10.6. Hay que tomar precauciones cuando están presentes metales anfóteros como el cinc y el aluminio que se disuelven en la solución si ésta es demasiada alcalina (López et al., 2002).

2.2.9. Diagrama de Pourbaix del Hierro

Un diagrama de Pourbaix es una representación gráfica del potencial (ordenada) en función del pH (abscisa) para un metal dado bajo condiciones termodinámicas estándar (usualmente agua a 25 °C). El diagrama tiene en cuenta los equilibrios químicos y electroquímicos y define el dominio de estabilidad para el electrólito (normalmente agua), el metal y los compuestos relacionados, por ejemplo, óxidos, hidróxidos e hidruros (Takeno, 2005).

Para el caso del Hierro en la Figura 4 se ve el diagrama de Pourbaix para un sistema metal-agua, como es el caso del sistema Hierro-agua a 25 °C. En dicho diagrama puedes observar las regiones de estabilidad termodinámica de las especies de Hierro en agua.

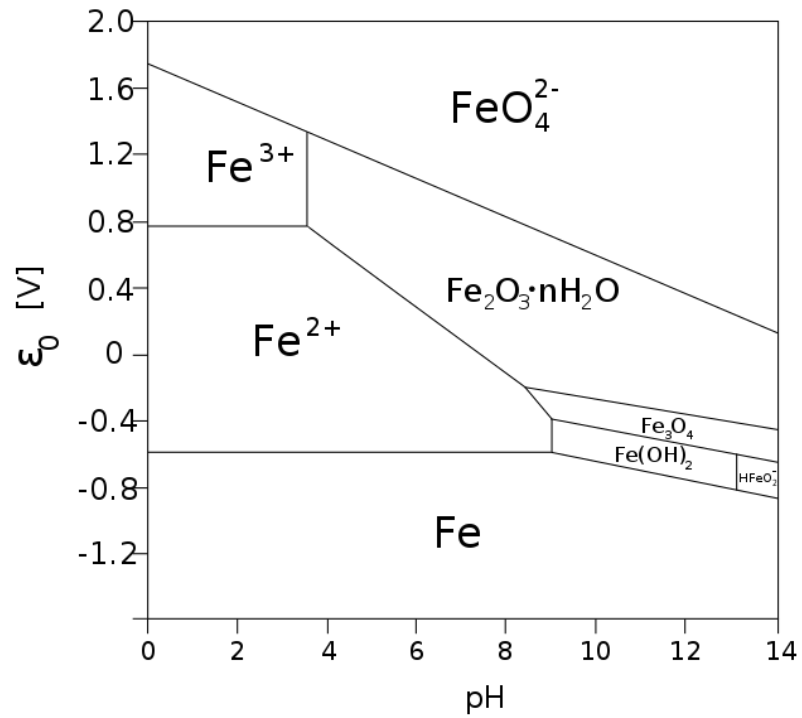


Figura 4. Diagrama de Pourbaix para Hierro.

Fuente. Atlas de diagramas de Eh-pH (2005).

2.2.9. Límites máximos permisibles

El Límite Máximo Permisible – LMP, es la medida de la concentración o grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, que caracterizan a un efluente o una emisión (tabla 1), que al ser excedida causa o puede causar daños a la salud, al bienestar humano y al ambiente (MINAM, 2010).

Tabla 2

LMP para la descarga de efluentes líquidos de actividad minero-metalúrgicas.

Parámetros	Unidad	Límite en cualquier momento	Límite para el promedio anual
pH		6 - 9	6 - 9
Sólidos totales en Suspensión	mg/L	50	25
Aceites y grasas	mg/L	20	16
Cianuro total	mg/L	1	0.8
Arsénica total	mg/L	0.1	0.08
Cadmio total	mg/L	0.005	0.04
Cromo hexavalente (*)	mg/L	0.1	0.08
Cobre total	mg/L	0.5	0.4
Hierro (disuelto)	mg/L	2	1.6
Plomo total	mg/L	0.2	0.16
Mercurio total	mg/L	0.002	0.0016
Zinc total	mg/L	1.5	1.2

Nota. Fuente: LMP de efluente minero metalúrgicos, MINAM (2010)

Es importante mantener el ajuste del valor del medio (pH) correcto para que ocurra un buen crecimiento de las bacterias con las que se hará la lixiviación metálica. Los microorganismos que participan en la oxidación bacteriana de los minerales sulfurados son acidófilos, esto quiere decir que son activos a un pH por debajo de 3.0, se considera un pH óptimo de crecimiento para el *T. ferrooxidans* en el intervalo de 1.5 a 2.5 (Branlt, 2001).

CAPÍTULO III


MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. **Ámbito de estudio**

La Compañía Minera Ayapata S.A.C., políticamente situada en el departamento de Puno, provincia de Carabaya, distrito de Ayapata e Ituata a 2550 m.s.n.m (Figura 5).

Tabla 3

Coordenadas UTM WGS84 de la concesión minera Ayapata SA.C.

Vértice	Coordenadas UTM WGS84		Polígono
	Norte	Este	
1	8 488 871.60	382 356.61	
2	8 483 871.57	382 380.26	
3	8 483 862.12	380 380.24	
4	8 488 862.14	380 356.59	

Nota. Fuente: IGAFOM correctivo (2017).

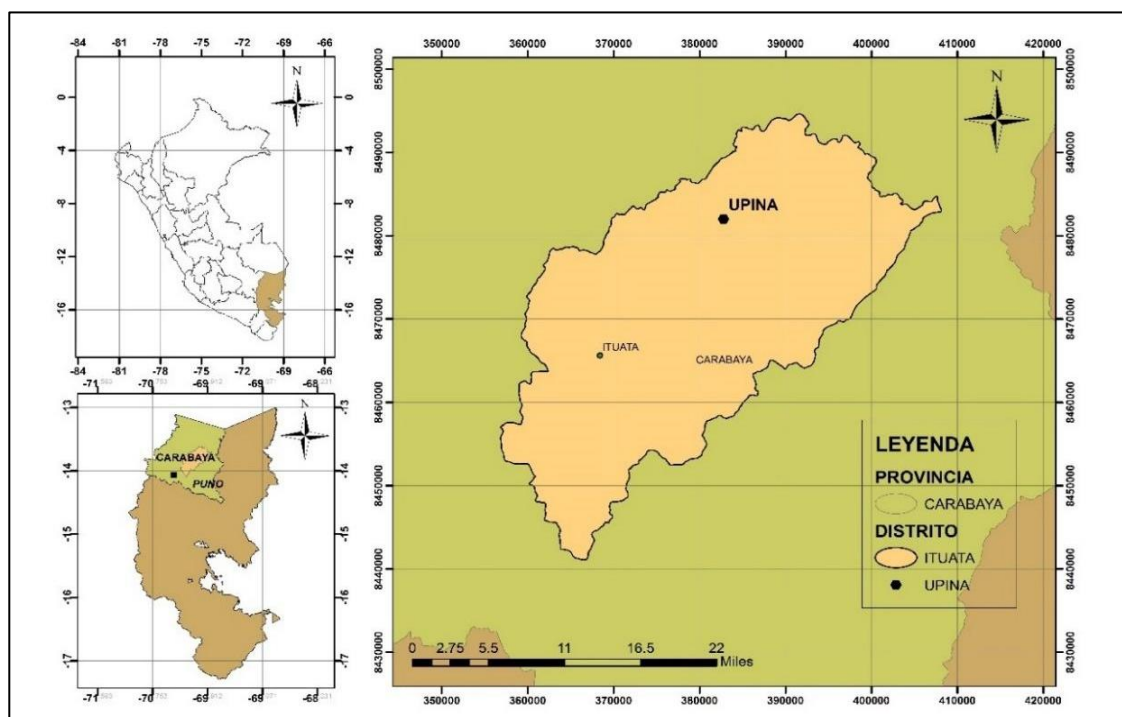


Figura 5. Mapa de ubicación de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.

Fuente. Elaboración propia a través de Qgis.

3.2. Tipo y diseño de investigación

3.2.1. Tipo de investigación

La investigación es del tipo aplicada porque, busca la generación de conocimiento con aplicación directa a los problemas de la sociedad (Murillo, 2011). El presente proyecto beneficiará al Distrito de Ituata con una población 6341 habitantes.

3.2.2. Diseño de investigación

El tipo de investigación es aplicada, experimental a nivel de laboratorio. Por qué existe una causa y efecto entre la variable independiente y dependiente (Murillo, 2011). Se aplicará un diseño experimental por fase:

Fase 1 (Aislamiento bacteriano): Se aplicará un diseño de estudio de caso de una sola medición. Este diseño consiste en administrar un estímulo o tratamiento a un grupo y después aplicar una medición de una o más variables para observar cuál es el nivel del grupo en éstas. Este diseño no cumple con los requisitos de un “experimento” puro. No hay manipulación de la variable independiente (niveles) o grupos de contraste (Collado & Baptista, 2014). El diagrama de este diseño se puede especificar así:

G X O

G: Grupo 1

O: Medición de parámetros fisicoquímicos.

Fase 2 (Oxidación bacteriana): Se aplicará el diseño de 2 factores como se muestra en la tabla 3. En este tipo de diseños “se manipulan dos o más variables independientes en dos o más niveles o modalidades de presencia en cada una de las variables independientes” (Collado & Baptista, 2014).

Tabla 4

Diseño experimental.

		Factor 2		
		Nivel f2.1	Nivel f2.1	Nivel f2.3
Factor 1	Nivel f1.1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
	Nivel f1.2	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6

Nota. Fuente: Collado & Baptista (2014).

En la tabla 4 se ejemplifica el diseño experimental para el pH, cabe resaltar que las pruebas estadísticas son aplicadas por parámetro

Tabla 5

Diseño experimental Ph.

pH	Factor 1		
	P01	P02	TR
Dia 1	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
Dia 2	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
Dia 3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
Dia 4	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
Dia 5	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
Dia 6	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
Dia 7	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
Dia 8	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
Dia 9	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3

Nota. M1, M2 y M3 = Medición 1, 2 y 3 respectivamente. Adecuado de Collado & Baptista (2014).

- a. Fase 3 (neutralización química):** Se aplicará el diseño de 2 factores como se aprecia en la tabla 5. En este tipo de diseños “se manipulan dos o más variables independientes en dos o más niveles o modalidades de presencia en cada una de las variables independientes” (Collado y Baptista, 2014).

Tabla 6

Diseño experimental para la neutralización química.

		Factor 2		
		Nivel f2.1	Nivel f2.1	Nivel f2.3
Factor 1	Nivel f1.1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
	Nivel f1.2	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6

Nota. Fuente: Reproducido de Collado & Baptista (2014).

En la tabla 6 se ejemplifica el diseño experimental para el pH, cabe resaltar que las pruebas estadísticas son aplicadas por parámetro.

Diseño experimental pH para la neutralización.

	pH	Factor 1		
		P01	P02	TR
Factor 2 (Lechada de cal al 5%)	0.2	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
	0.3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
	0.4	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
	0.5	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
	0.6	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
	0.8	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
	1	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
	1.2	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
	1.6	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3
	2	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3	M1, M2 y M3

Nota. M1, M2 y M3 = Medición 1, 2 y 3 respectivamente. Fuente: Adecuado de Collado & Baptista (2014).

3.3. Población y muestra

3.3.1 Población

La compañía minera Ayapata S.A.C. cuenta con 52 plantas de beneficio, cada planta tiene un caudal de uso de agua industrial de 1008 m³/mes según IGAFOM correctivo 2017. Sin embargo, también se cuenta con fuentes de precipitaciones pluviales.

3.3.2. Muestra

Punto de muestreo 1: Las muestras biológicas para el aislamiento de los microorganismos se realizaron del drenaje de una relavera de la compañía minera Ayapata S.A.C., donde se observaron evidencias de mayor actividad microbiana. Esto se refiere al *pH* menor a 3.5, olor (por desprendimiento de H_2S) y color amarillento del relave. De este punto se obtuvo una muestra de 2 litros de DAM.

Punto de muestreo 2: Las muestras de DAM para tratamiento mediante oxidación seguida de una neutralización química se tomaron de una de las relaveras en actividad

de la compañía minera Ayapata S.A.C., el cual contaba con un pH menor a 3.5 y no presentaba signos físicos de oxidación.

3.4. Hipótesis de investigación

3.4.1. Hipótesis general

Es factible tratar los drenajes ácidos de minas mediante oxidación bacteriana seguida de una neutralización química en la Compañía Minera Ayapata S.A.C.

3.4.2. Hipótesis específicas

Es posible aislar bacterias del género *T. Ferrooxidans* en los drenajes ácidos de mina de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.

Las bacterias poseen alta capacidad de oxidación en los drenajes ácido de minas en la Compañía Minera Ayapata S.A.C.

El hidróxido de calcio tendrá un efecto neutralizante en los drenajes ácidos de minas en la Compañía Minera Ayapata S.A.C.

3.5. Equipos

- Balanza analítica Mettler Toledo
- Microscopio óptico eléctrico Leica
- Multiparámetro Phoenix EC-10
- Oxímetro PSY OD2000
- Espectrofotómetro UV/VIS Único
- Agitador magnético Velp
- Calentador Velp
- Centrífuga Sorvall Legend
- Autoclave JP Selecta
- Oxigenador Sobo
- micropipetas Hirschman

3.6 Materiales

- Frascos de 1 L estériles.
- Cooler

- Guantes de latex Medilatex®
- Mascarilla N95 3M®
- Puntas de micropipeta 1mL y 5mL
- Probeta Brand® de 100 mL, 500 mL 1000 mL.
- Matraz Brand® de 250 mL, 500 mL y 1L.
- Vaso de Precipitado Brand® de 50 mL, 100 mL, 250mL, 500 mL y 1 L.
- Cintas de pH, rango 0 – 14 Merck®
- Cámara de Neubauer Marienfeld®
- Láminas cubre objeto Marienfeld®.
- Algodón estéril.

3.7. Reactivos

- Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) QP Merck®
- Sulfato amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) QP Merck ®
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) QP Merck®
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (99%) Merck®
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)
- Agarosa Cleaver Scientific®
- 1,10-fenantrolina $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ Merck®
- Hidroxilamina H_3NO
- Solución estándar de Hierro
- Acetato de amonio $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$

3.8 Metodología

La metodología se compuso de 3 fases, en la figura 6 se detalla cada fase.

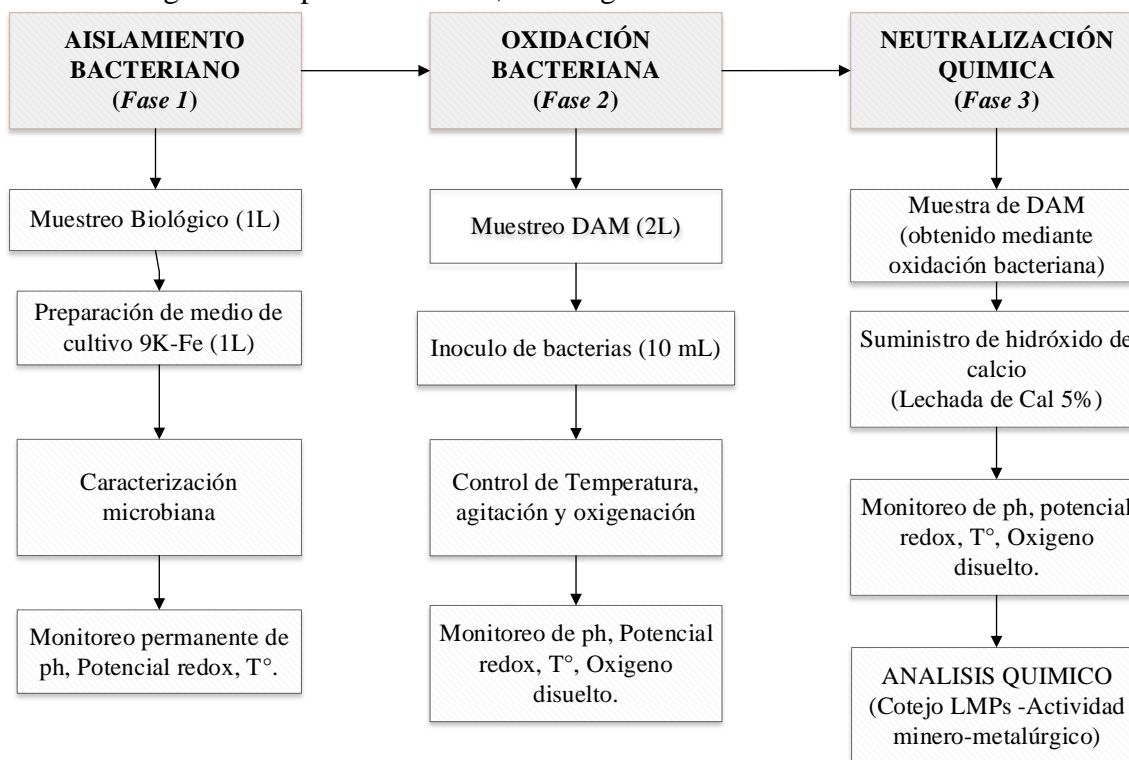


Figura 6. flujograma metodológico.

Fuente. Elaboración propia.

3.8.1. Aislamiento de bacterias del género *T. ferrooxidans* presentes en los drenajes ácido de minas de la compañía minera Ayapata S.A.C.

a) Muestreo

Las muestras biológicas para el aislamiento de los microorganismos se realizaron del drenaje de una relavera en la compañía minera Ayapata S.A.C., en dicho punto de muestreo se observó: olor (por desprendimiento de H_2S), color amarillo-rojizo del relave y pH menor a 3.5.

b) Caracterización bacteriana

La caracterización de los microorganismos aislados se basó en el crecimiento en medio sólido y medio líquido, estos fueron evaluados bajo 4 características fundamentales que presentan las bacterias *T. ferrooxidans*, estas son:

- Característica quimiolitotróficas: Que la energía para su crecimiento y mantenimiento se deriva principalmente de la oxidación del Hierro ferroso (Misari, 2016; Drobner et al., 1990).

- Característica autotrófica: Que el dióxido de carbono es la fuente carbono celular. El N y el P también son necesarios como nutrientes secundarios para la síntesis celular junto con los minerales traza de K, Mg, Na y Ca (Leduc & Ferroni, 1994);
- Característica acidófila: Que su crecimiento se produce a un pH de 1.5 a 6.0 con un óptimo entre 2.0 y 2.5. La supervivencia no suele producirse por encima de un pH de 6.5 ni por debajo de un pH de 1.0 (Nemati et al., 1998);
- Característica morfológica: Que son bacilos gram negativos de 0.3-0.5x1,0-1.8 μm , se presentan solas o en parejas, raramente en cadenas cortas. Son móviles por medio de un único flagelo polar (Leduc & Ferroni, 1994).

c) Morfología bacteriana

Como identificación preliminar de la morfología se aplicó la metodología propuesta por Cruz & Cotrina (2015); Arias (2012) y (Minas, 2018), quienes aplicaron la tinción de gram como identificación preliminar de *T. Ferrooxidans* cuyo procedimiento consiste: 1. hacer el frotis de manera regular 2. Fijarlo a la flama 3. Cubrir con cristal violeta durante 1 minuto y después lavar ligeramente con agua corriente 4. Cubrir con yodopovidona (Lugol) durante 1 minuto 5. Lavar con agua corriente 6. Decolorar con alcohol-acetona (1:1) 7. Lavar con agua corriente 8. Cubrir con safranina durante 30 segundos 9. Lavar con agua corriente 10. Dejar secar y observar al microscopio (Rodríguez & Arenas, 2018).

d) Ciclo de adaptación (Resiembra)

Una vez realizado la identificación bacteriana se definió únicamente determinados tipos morfológicos, denominados cepas tipo, sin llegar a su identificación taxonómica, siendo estos empleados posteriormente en la adaptación o resiembra en medios cultivo 9k-Fe para continuar el proceso de adaptación y tolerancia a ion ferroso y condiciones ácidas que presentan el medio de cultivo.

e) Medio de cultivo 9k-Fe

Este medio fue compuesto por dos soluciones A (80%) y B (20%) como se muestra en la tabla 7. La solución A en volumen de 800 ml se disolvió en 1L de agua destilada (p/p= 80%), luego se procedió a regular el pH de la solución hasta un rango de 1.5 - 2 con solución de ácido sulfúrico al 97%. Finalmente, se auto clavo la solución A para ser esterilizada. Luego se preparó la solución B, la cual estuvo compuesta de 33.3 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 200 ml de agua destilada

ácida (pH 1.5-2), ello con la finalidad de prevenir la oxidación del Fe, agitándose lentamente hasta disolver.

Tabla 8

Medio de cultivo 9k-Fe.

Reactivo	Solución A	Solución B
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0	-
KH ₂ PO ₄	0.04	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.04	-
FeSO ₄ . 7H ₂ O	-	33.3

Nota. Fuente: Misari (2016); Silverman & Lundgren (1959).

f) Condiciones de cultivo

El medio de cultivo estuvo dispuesto en un vaso precipitado de 1L, una vez añadido 75mL de DAM y 675 mL de medio de cultivo 9k-Fe se procedió a la agitación 180 rpm y una temperatura de 35 °C mediante un agitador magnético; la oxigenación por su parte fue de 3L/min suministrado por un aireador.

g) Monitoreo de potencial redox y pH

La característica quimiolitotrófica singular de *T. Ferrooxidans* es un indicador determinante en la oxidación del Fe⁺² (Misari, 2016; Drobner et al.,1990). En tal sentido se realizó un monitoreo permanente del potencial redox (mV) y pH mediante un multiparámetro marca Multiparámetro Phoenix EC-10.

3.8.2. Determinación de la capacidad de oxidación bacteriana del género *T. ferrooxidans* en drenajes ácidos de minas de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.

a) Tratamiento de oxidación

La oxidación bacteriana estuvo compuesta de 2 tratamientos y un testigo relativo como se muestra en la tabla 8, estos estuvieron sujetos a diferentes condiciones.

Tabla 9

Condiciones del tratamiento de oxidación.

Parámetros	Tratamientos		
	P01	P02	Testigo relativo
DAM	490 mL	490 mL	500 mL
Inoculo de bacterias	10 mL	10 mL	0 mL
Agitación	180 rpm	No	No
Oxigenación (>5 mg/l)	3L/min	No	No
Temperatura (>20 °C)	Si	Si	Si
Monitoreo (pH, Potencial redox)	Si	Si	Si
Ion férrico y ion ferroso	Si	Si	Si

Nota. Fuente: Elaboración propia.

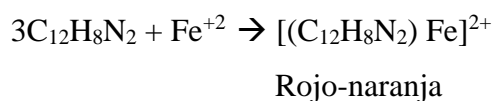
b) Monitoreo de parámetros fisicoquímicos

Para el monitoreo de los parámetros fisicoquímicos como son: Potencial redox (ORP), temperatura y pH se utilizó el Multiparámetro Phoenix EC-10. Y para la determinación del oxígeno disuelto (OD) se utilizó el oxímetro de marca YSI-OD2000.

c) Determinación de Fe⁺² y Fe⁺³

Para la determinación del Fe⁺² se utilizó el método de la Fenontraleina (INH, 1984) y la determinación del Fe⁺³ se determinó por diferencia entre el Hierro total y Fe⁺². Las concentraciones para la determinación del Hierro total se muestran en la tabla 9 y concentración para el Fe⁺² se muestra en la tabla 10.

La determinación de Hierro mediante la reacción del Fe⁺² con un compuesto orgánico (o-Fenantrolina) para formar un complejo de Hierro rojo-naranja. La ecuación para la formación del complejo de Hierro es:



Sin embargo, antes de que se forme el complejo de Fe^{+2} colorido, todos los Fe^{+3} presentes se deben reducir a Fe^{+2} . La reducción se alcanza usando un exceso de clorhidrato de hidroxilamina:

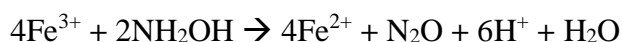


Tabla 10

Concentración de reactivos para la determinación de Fe total.

Compuesto	Concentración	Preparación
Acetato de amonio	1 M	10.9 g en 100 ml
Hidroxilamina hidroclorada	10 % (m/v)	10 g en 100 ml de sol.
o-fenantrolina	1.0 % (m/v)	0.25 g en 250 ml de sol.
Fluoruro sódico	5 M	21 g en 100 ml de sol.
Solución estándar de Hierro	1mL=0.050mg Fe	Sulfato ferroso amoniacal 0.07 g + 2ml ácido sulfúrico (97%) + aforar a 1000 ml

Nota. Fuentes: INHV (1984).

Tabla 11

Concentración de reactivos para la determinación de Fe ⁺².

Compuesto	Concentración	Preparación
Acetato de amonio	1 M	10.9 g en 100 ml
o-fenantrolina	1.0 % (m/v)	0.25 g en 250 ml de sol.
Fluoruro sódico	5 M	21 g en 100 ml de sol.
Solución estándar de Hierro	1mL=0.050mg Fe	Sulfato ferroso amoniacal 0.07 g + 2ml ácido sulfúrico concentrado + aforar a 1000 ml

Nota. Fuentes: INHV (1984).

Una vez preparada las soluciones según las concentraciones requeridas en la tabla 11, se procedió a la determinación del Hierro total y ion ferroso.

Tabla 12

Estándares para curva de calibración de Hierro total.

Código	Hierro estándar (1ml = 0.05 mg Fe)	Acetato de sodio 1M NH₄CH₃CO₂	clorhidrato de hidroxilamin a 10 %	Fenontrolin a 1 %	Volumen final (Aforar)
I	0 ml	4 ml	0.5 ml	2 ml	15 ml
II	0.5 ml	4 ml	0.5 ml	2 ml	15 ml
III	1 ml	4 ml	0.5 ml	2 ml	15 ml
IV	1.5 ml	4 ml	0.5 ml	2 ml	15 ml
V	2 ml	4 ml	0.5 ml	2 ml	15 ml
VI	2.5 ml	4 ml	0.5 ml	2 ml	15 ml
Muestras	0.5 ml	4 ml	0.5 ml	2 ml	15 ml

Nota. Fuentes: INHV (1984).

Tabla 13

Estándares para curva de calibración de Ion Ferroso.

Código	Hierro estándar	Acetato de sodio 1M	Fluoruro sódico 0.5M	Fenantrolina 1 %	Volumen (Aforar)
I	0 ml	4 ml	5 ml	2 ml	15 ml
II	0.5 ml	4 ml	5 ml	2 ml	15 ml
III	1 ml	4 ml	5 ml	2 ml	15 ml
IV	1.5 ml	4 ml	5 ml	2 ml	15 ml
V	2 ml	4 ml	5 ml	2 ml	15 ml
VI	2.5 ml	4 ml	5 ml	2 ml	15 ml
Muestras	0.5 ml	4 ml	5 ml	2 ml	15 ml

Nota. Fuente: INHV (1984).

3.8.3. Neutralización química con hidróxido de calcio

La neutralización química se realizó con hidróxido de calcio, para lo cual se diluyo las siguientes concentraciones de la cal al 5%: 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL, 0.5mL, 0.6 mL, 0.8mL, 1 mL, 1.2 mL, 1.4 mL, 1.6 mL y 2 mL. En la figura 7 se aprecia el proceso de neutralización, el cual consto de una agitación permanente de la lechada Cal a 180 rpm, la extracción se realizó con una micropipeta graduada en las concentraciones ya mencionadas, para esto la muestra de 50 mL también estuvo en

agitación a 180 rpm, por un lapso de 5 min, luego se dejó precipitar para su posterior medición de pH y determinación de Hierro.

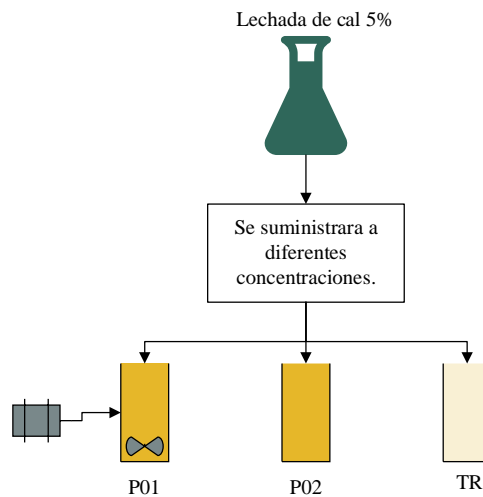


Figura 7. Flujograma de fase de neutralización.

Fuente: Elaboración propia.

a) **Determinación y remoción de Hierro total**

El Hierro total se determinó de la misma manera que en la fase de oxidación según (INHV, 1984).

La remoción se entiende como la capacidad del sistema para eliminar parte de la concentración de contaminantes que se encuentra en el agua contaminada (Romero et al., 2010), para tal efecto se aplicó la siguiente ecuación:

$$\% R Fe = \frac{Ci - Cf}{Ci} \times 100$$

Donde:

Ci: Concentración inicial de Fe.

Cf: Concentración final de Fe.

%R Fe: Porcentaje de remoción de Hierro.

b. **Análisis químico de metales**

Para el análisis químico de los metales presentes en el DAM, las muestras fueron derivadas a los laboratorios Analíticos del sur, ubicado en la ciudad de Arequipa. Los métodos utilizados fueron EPA 200.7 (Determinación de metales y elementos traza en agua y aguas residuales por ICP-OES).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Aislamiento de bacterias del género *T. ferrooxidans* presentes en los drenajes ácido de minas de la compañía minera Ayapata S.A.C.

La primera siembra presentó cambios físicos a los 7 días como se muestra en la figura 6, y se presentó la coloración anaranjado-rojiza característica típica de la oxidación de F^{+2} a Fe^{+3} como lo indican (Misari, 2016; Guerrero & Olivera, 1999). Sin embargo, llegó a su punto máximo de oxidación al día 14 con un potencial redox máximo de 592 mV.



Figura 6. Siembra número numero1 con código (S01)

En la figura 8 se muestra las resiembras codificadas S02, S03 y S04, en la que se obtuvo una constante de 5 días el medio bacteriano ya aislado.

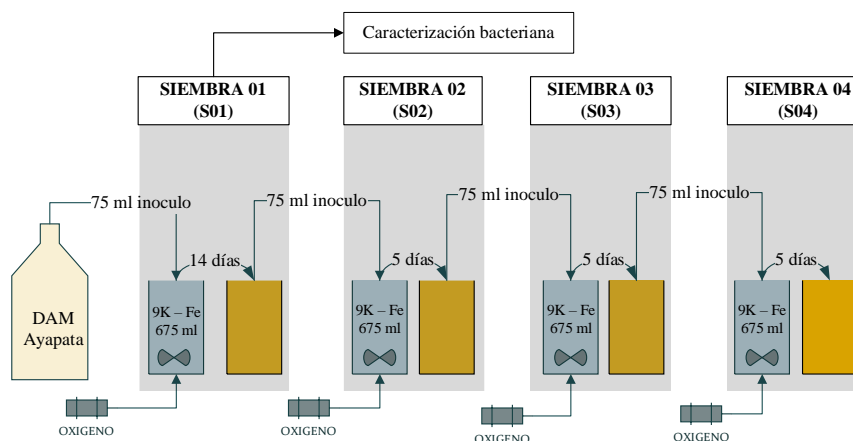


Figura 8. Resiembras del aislamiento bacteriano.

Fuente: Elaboración propia.

4.1.1. Caracterización microbiana

Como identificación preliminar de la morfología se aplicó la metodología propuesta por Cruz & Cotrina (2015); Arias (2012) y (Minas, 2018), quienes aplicaron la tinción de gram como identificación preliminar de *T. Ferrooxidans* como prueba preliminar (figura 9), la cual fue visualizada con microscopio óptica a 40 x y a 100x (figura 10) se aprecia grupos bacilares gran negativas. Para la estimación de la concentración de bacterias por ml, se utilizó la cámara de Petroff-Hauser en un microscopio de contraste de fases (Leica®) a 1000 aumentos, obteniéndose como resultado 12000000 cel/L en la muestra del día 14.



Figura 9. Visualización microscópica 40 x, siembra 1.

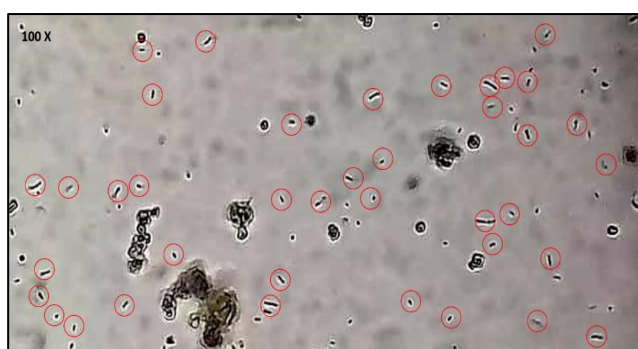


Figura 10. Visualización microscópica 100 x, siembra 1.

Para Misari, (2016); Drobner et al. (1990) las bacterias *T. ferrooxidans* presentan 4 características que la hacen atípica respecto al resto, estas características son: Característica quimiolitotróficas: Que la energía para su crecimiento y mantenimiento se deriva principalmente de la oxidación del Hierro ferroso característica autotrófica: Que el dióxido de carbono es la fuente carbono celular. El N y el P también son necesarios como nutrientes secundarios para la síntesis celular junto con los minerales traza de K, Mg, Na y Ca (Leduc & Ferroni, 1994);

característica acidófila: Que su crecimiento se produce a un pH de 1.5 a 6.0 con un óptimo entre 2.0 y 2.5. La supervivencia no suele producirse por encima de un pH de 6.5 ni por debajo de un pH de 1.0 (Nemati et al., 1998); característica morfológica: Que son bacilos gram negativos de 0.3-0.5x1,0-1.8 μm , se presentan solas o en parejas, raramente en cadenas cortas. Son móviles por medio de un único flagelo polar (Leduc & Ferroni, 1994).

4.1.2. Potencial redox

La medición de la primera siembra del potencial redox se realizó los días 1, 7 12 y 14 con un valor de ORP de: 356 mV, 373 Mv, 589 mV y 592 mV respectivamente en la tabla 13 se aprecia el monitoreo de potencial redox de las siembras 2, 3 y 4. Como se observa al 5to día, en la cual se tuvo el máximo valor, indicando una alta actividad microbiana y por consiguiente la oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} .

Tabla 14

Monitoreo del potencial redox en las resiembras S02, S03 y S04.

Día	S02 (mV)	S03 (mV)	S04 (mV)
1	271	280	279
3	419	590	596
5	596	651	648

Con respecto al potencial redox, Gentina y Acevedo (2013) sostiene que las variaciones en una solución oxidada, indica que existe un metabolismo energético (actividad bacteriana), debido a que esta actividad genera una tendencia a la oxidación y reducción. El estudio concuerda con Rossi (1990) quien afirma que el potencial redox del *T. ferrooxidans* presentan valores que oscilan entre 320 – 680.

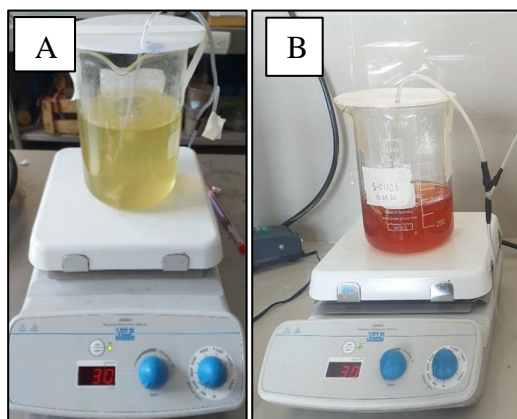


Figura 11. (A) Aislamiento bacteriano día 1, (B) Aislamiento bacteriano día 2.

El potencial de óxido-reducción puede relacionarse con el crecimiento y la actividad bacteriana. Un rápido incremento en este se puede deber a una buena adaptación de los microorganismos al mineral, indicando indirectamente que los iones solubilizados aparentemente no inhiben la capacidad bacteriana de oxidar el ion ferroso (Mejía *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2008). Asimismo, el aislamiento en medio líquido presenta las 3 fases características en las curvas de crecimiento bacteriano: fase lag (los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales), fase de crecimiento exponencial (las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima, y su velocidad de crecimiento es la máxima) y fase estacionaria (no se incrementa el número de bacterias, los microorganismos entran en fase estacionaria bien porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea inhóspito) (Madigan *et al.*, 2003).

4.2. Determinación de la capacidad de oxidación bacteriana del género *T. ferrooxidans* en drenajes ácidos de minas de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.

4.2.1. Potencial redox

En la tabla 13 se muestran los resultados del potencial redox (mV), la medición se realizó cada 24 horas durante 9 días en los tres tratamientos (P01, P02 y TR), el día cero se reportó un potencial redox de 358 mV en las dos pruebas y 320 mV en el testigo relativo.

Figura 12

Media del monitoreo de potencial redox fase oxidación bacteriana.

Día	P01	P02	TR
1	513	442	362
2	541	460	395
3	556	502	424
4	562	541	431
5	569	576	432
6	572	591	430
7	574	613	431
8	578	620	431
9	574	618	426

TR=Testigo relativo

A continuación, se muestra la prueba de normalidad (figura 15), aplicada a los resultados del potencial redox, en cual se rechaza la Ho: Existe evidencia estadística de que los datos no son normales. A un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 15

Prueba de normalidad para el potencial redox.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	G1	Sig.
P01	0.810	9	0.027
P02	0.880	9	0.155
TR	0.650	9	0.000

En la tabla 16 se observa el ANOVA de Friedman para muestras relacionadas en la cual se concluye que se rechaza la Ho: Existe evidencia estadística de que la mediana del potencial redox en los 3 tratamientos es igual, con un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 16

ANOVA de Friedman para muestras relacionadas.

N total	9
Estadístico de contraste	13.556
Grados de libertad	2
Sig. Asintótica (Prueba bilateral)	0.001

En la tabla 17 se desarrolló la prueba de ANOVA post-hoc de Bonferroni para comparar las medias entre factores. El testigo relativo vs los tratamientos P01 y P02 con una significancia ajustada de 0.007 y 0.003 son menores a un nivel de significancia de 0.05. Por consiguiente, se rechaza la Ho: Existe evidencia estadística de que el TR vs los tratamientos P01 y P02 son iguales. Sin embargo, los tratamientos P01 y P02 con una significancia ajustada de 1.000 siendo mayor a un nivel de significancia de 0.05. Por lo que se acepta la Ho: Existe evidencia estadística de que los tratamientos P01 vs P02 son iguales.

Tabla 17

ANOVA Post-hoc Bonferroni.

M1-M2	Estadístico de contraste	Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. Ajuste
TR - P01	1.444	0.471	3.064	0.002	0.007
TR - P02	1.556	0.471	3.300	0.001	0.003
P01 - P02	0.111	0.471	0.236	0.814	1.00

En la figura 14 se aprecia la tendencia del potencial redox, en la cual se visualiza que el tratamiento P01, presento valores mínimos y máximos de 513 mV y 574 mV respectivamente; mientras que el tratamiento P02, presento valores mínimos y máximos de 442 mV y 618 mV respectivamente, en cuanto al testigo relativo, este tuvo valores mínimos y máximos de 362 mV y 426mV respectivamente; todos estos valores fueron registrado durante el primer y noveno día.

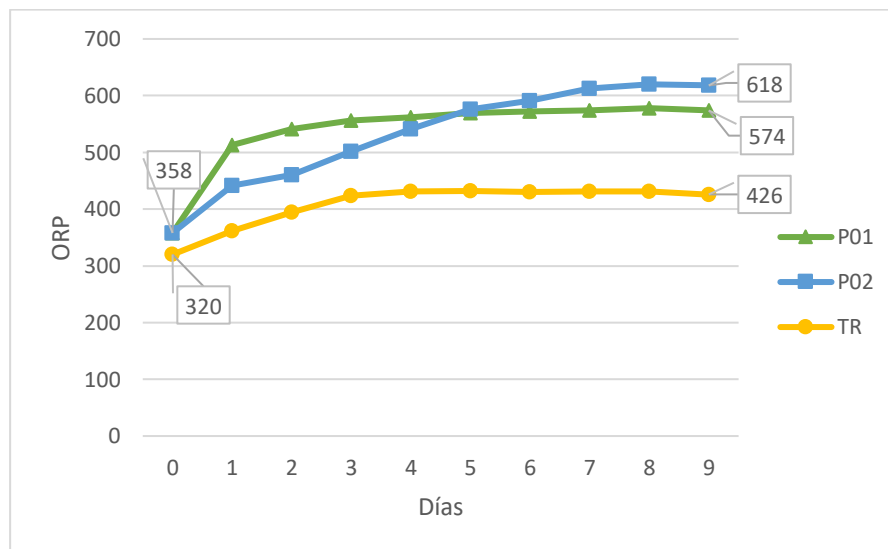


Figura 13. En el grafico se aprecia la tendencia del potencial redox en los tres tratamientos.

El monitoreo de laboratorio del potencial redox de los dos tratamientos y el testigo relativo se aprecia en la figura 15.



Figura 14. Monitoreo de potencial redox en laboratorio.

En cuanto al potencial redox Gentina & Acevedo (2012) manifiestan, que un alto potencial redox es indicativo de un metabolismo energético (actividad bacteriana), debido a que esta actividad genera una tendencia de la solución a ser oxidada o reducida. Mientras que Misari (2016); Rossi (1990) afirman que, durante la fase de crecimiento exponencial, el potencial redox del *T. ferrooxidans* presenta valores que oscilan entre 320 – 680 mV. Sin embargo, Chambe (2008) confirma que existe una relación directamente proporcional entre la remoción de los metales pesados del DAM con respecto al potencial de óxido reducción ya que al estar más clarificada y libre de metales el agua tiene un comportamiento similar a un agua de uso doméstico en el que los niveles de ORP se encuentran por debajo de los 0 mV.

Para otros investigadores la tendencia del potencial redox se relaciona con la tasa de crecimiento bacteriano y su capacidad de oxidar el Fe^{2+} (Misari, 2016; Gentina y Acevedo, 2012). Esta capacidad oxidativa aumentó a través del tiempo en los tres tratamientos de oxidación, donde las bacterias alcanzaron valores de Eh alrededor de 618 mV en una temporalidad de 9 días. El aumento del Eh sugiere que en presencia de bacterias hay un transporte constante de electrones en el sistema, como la transformación de Fe^{2+} a Fe^{3+} , función principal de *T. ferrooxidans* (Rossi, 1990; Kodali et al., 2004).

4.2.2. pH

En la tabla 18 se muestran los resultados del pH, la medición se realizó cada 24 horas durante 9 días en los tres tratamientos (P01, P02 y TR), en el día cero se reportó un pH de 3.45 para la prueba 1 y 2 y para el testigo relativo un pH de 4.12.

Tabla 18

Media del monitoreo de pH fase oxidación bacteriana.

Día	P01	P02	TR
1	2.96	2.98	3.91
2	2.67	2.74	3.54
3	2.4	2.48	2.86
4	2.39	2.45	2.72
5	2.34	2.42	2.69
6	2.2	2.3	2.65
7	2.24	2.34	2.62
8	2.15	2.35	2.63
9	2.22	2.39	2.69

TR=Testigo relativo

A continuación, se muestra el desarrollo de las pruebas estadísticas, en la tabla 19 se muestra la prueba de normalidad de los resultados del potencial redox, en cual se rechaza la Ho: Existe evidencia estadística de que los datos no son normales. A un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 19

Tabla prueba de normalidad para el pH.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístic	G1	Sig.
	o		
P01	0.838	9	0.055
P02	0.794	9	0.017
TR	0.686	9	0.001

En la tabla 20 se desarrolló el ANOVA de Friedman para muestras relacional, en la cual se concluye que se rechaza la Ho: Se rechaza la Ho: Existe evidencia estadística de que la mediana del pH en los 3 tratamientos es igual, con un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 20

ANOVA de Friedman para muestras relacionadas.

N total	9
Estadístico de contraste	18.00
Grados de libertad	2
Sig. Asintótica (Prueba bilateral)	0.00

En la tabla 21 se desarrolló la prueba de ANOVA post-hoc de Bonferroni para comparar las medias entre factores. Los tratamientos P01 vs P02 con una significancia ajustada de 1.000 siendo mayor a un nivel de significancia de 0.05. Por lo que se acepta la Ho: Existe evidencia estadística de que los tratamientos P01 vs P02 son iguales. El testigo relativo vs el tratamiento P01 con una significancia ajustada de 0.00 son menores a un nivel de significancia de 0.05. Por consiguiente, se rechaza la Ho: Existe evidencia estadística de que el TR vs los tratamientos P01 y P02 son iguales. El testigo relativo vs el tratamiento P02 con una significancia ajustada de 0.102 es mayor a un nivel de significancia de 0.05. Por lo que se acepta la Ho: Existe evidencia estadística de que los tratamientos TR vs P02 son iguales. Los niveles de significancia se han ajustado mediante las correcciones de Bonferroni para varias pruebas.

Tabla 21

ANOVA Post-hoc Bonferroni.

M1-M2	Estadístico de contraste	Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. Ajuste
P01 - P02	-1.000	0.471	-2.121	0.034	0.102
P01 - TR	-2.000	0.471	-4.243	0.000	0.000
P02 - TR	-1.000	0.471	-2.121	0.034	0.102

En la figura 16 se muestra la diferencia entre la tendencia del pH. El tratamiento 1 (P01), empezó en el día 1 con 2.96 llegando a un máximo el día 9 a un 2.22; el tratamiento 2 (P02), empezó en el día 1 con 2.98 llegando a un máximo el día 9 a un 2.39; el tercer tratamiento, empezó con el día 1 con 3.91 llegando a un máximo el día 9 a un 2.69.

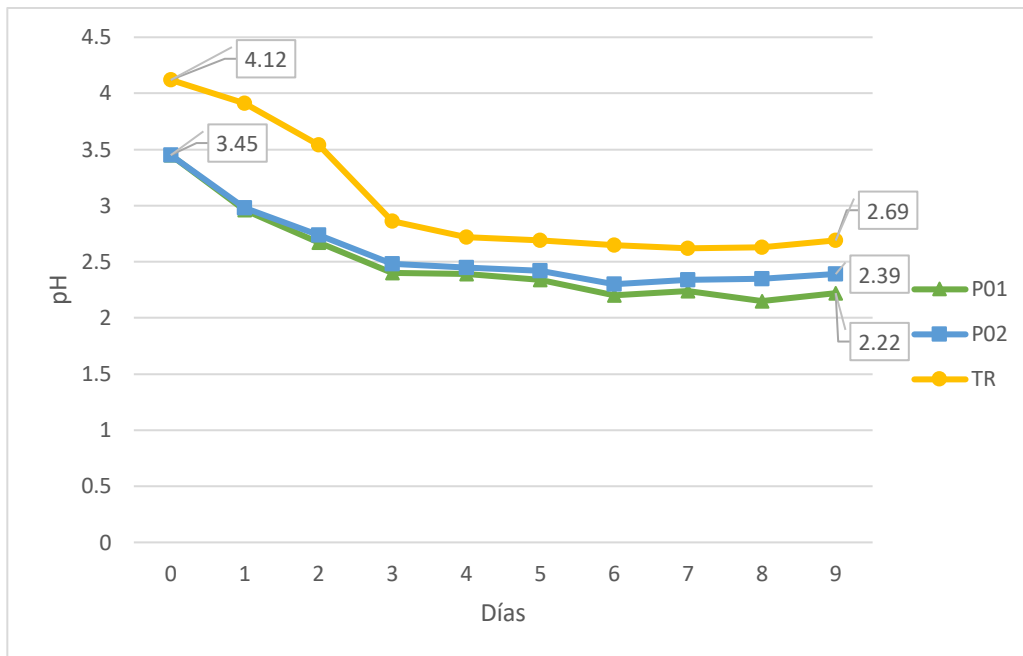


Figura 15. Tendencia del pH en los tres tratamientos.

El decrecimiento en el valor del pH en la etapa de oxidación indica un incremento en la concentración de H^+ producido por la actividad bacteriana (Mejía et al., 2011). En relación al pH, Panduro & Trinidad (2015) aseveran que también se puede encontrar dicha bacteria en unas zonas con mayor pH al óptimo, esto se debe a la presencia de minerales como la calcita ($CaCO_3$), que podrían neutralizar el ácido sulfúrico. Mientras tanto, Gentina y Acevedo (2013) indican que no se debe permitir pH menores a 1.0 ya que la viabilidad de las células se vería afectada. Para Branlt (2001), los microorganismos que participan en la oxidación bacteriana de los minerales sulfurados son acidófilos, esto quiere decir que tienen una influencia del pH sobre la actividad del *T. Ferrooxidans* ha un rango de 1 a 5. Fue reportado que los valores óptimos de pH están situados entre 2.3 y 2.5 para la chalcopirita, sulfuro de zinc, covelita y hierro ferroso (Misari, 2016).

4.2.3. Oxígeno disuelto

En la tabla 22 se muestran los resultados del oxígeno disuelto (mV), la medición se realizó cada 24 horas durante 9 días en los tres tratamientos (P01, P02 y TR).

Tabla 22

Media del monitoreo de oxígeno disuelto (mg/L) fase oxidación bacteriana.

Día	P01	P02	TR
1	5.55	3.30	3.23
2	5.54	3.31	3.42
3	5.54	3.35	3.74
4	5.67	4.64	4.33
5	5.58	5.24	4.73
6	5.81	5.46	5.69
7	6.03	5.20	5.69
8	6.12	5.20	5.48
9	6.28	5.20	5.53

A continuación, se muestra el desarrollo de las pruebas estadísticas, en la tabla 23 se muestra la prueba de normalidad de los resultados de oxígeno disuelto, en cual se rechaza la H_0 : Existe evidencia estadística de que los datos no son normales. A un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 23

Prueba de normalidad.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.
P01	0.847	9	0.068
P02	0.754	9	0.006
TR	0.867	9	0.113

En la tabla 24 se desarrolló el ANOVA de Friedman para muestras relacionales, en la cual se concluye que se rechaza la H_0 : Existe evidencia estadística de que la mediana del oxígeno disuelto en los 3 tratamientos es igual, con un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 24

ANOVA de Friedman para muestras relacionadas.

N total	9
Estadístico de contraste	14.000
Grados de libertad	2
Sig. Asintótica (Prueba bilateral)	0.001

En la tabla 25 se desarrolló la prueba de ANOVA post-hoc de Bonferroni para comparar las medias entre factores. El TR vs el tratamiento P02 con una significancia ajustada de 1.000 siendo mayor a un nivel de significancia de 0.05. Por lo que se acepta la Ho: Existe evidencia estadística de que los tratamientos el testigo relativo vs el tratamiento P02 son iguales.

El tratamiento P02 y P01 con una significancia ajustada de 0.001 son menores a un nivel de significancia de 0.05. Por consiguiente, se rechaza la Ho: Existe evidencia estadística de que el testigo relativo vs los tratamientos P01 son iguales.

El TR vs el tratamiento P01 con una significancia ajustada de 0.014 es mayor a un nivel de significancia de 0.05. Por lo que se acepta la Ho: Existe evidencia estadística de que los tratamientos P02 vs P01 son iguales. Los niveles de significancia se han ajustado mediante las correcciones de Bonferroni para varias pruebas.

Tabla 25

ANOVA Post-hoc Bonferroni.

M1-M2	Estadístico de contraste	Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. Ajuste
P02 - TR	-0.333	0.471	-0.707	0.480	1.000
P02 - P01	1.667	0.471	3.536	0.000	0.001
TR - P01	1.333	0.471	2.828	0.005	0.014

En la figura 17 se muestra la diferencia entre de la tendencia del oxígeno disuelto. El tratamiento 1 (P01), empezó con en el día 1 con 5.55 mg/L llegando a un máximo el día 9 a un 6.28 mg / L; el tratamiento 2 (P02), empezó en el día 1 con 3.3 mg/L llegando a un máximo el día 9 a un 5.2 mg/L; el tercer tratamiento (TR), empezó con el día 1 con 3.23 mg/L llegando a un máximo el día 9 a un 5.53 mg/L.

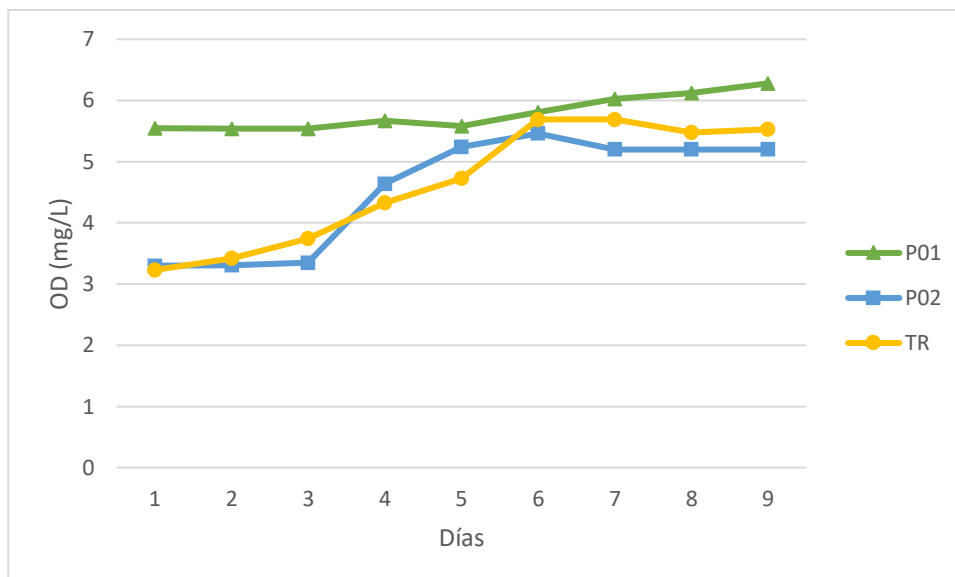


Figura 16. Tendencia del oxígeno disuelto (mg/L) en los tres tratamientos. En la figura 18 se aprecia el monitoreo de Oxígeno disuelto mediante un oxímetro.



Figura 17. Monitoreo de oxígeno disuelto. Para Cautivo & Gentina (2009), los microorganismos que participan en las operaciones de biolixiviación necesitan oxígeno molecular y dióxido de carbono para crecer y mantenerse viables. El primero es utilizado por las células como aceptor final de electrones de su ruta metabólica energética. El segundo es utilizado por las células como única fuente de carbono. Sin embargo, Misari (2016) indica que el oxígeno disuelto como tal, también puede oxidar los iones ferrosos, es por ellos que los tratamientos uno y dos difieren en el suministro de oxígeno.

4.2.4. Ion ferroso

Un indicador de una alta actividad bacteriana se da por la oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} a través de la coloración anaranjado-rojizo del medio, es por eso que se determinó las

concentraciones de iones ferroso y férrico mediante el método de la fenontraleina por colorimetría con un espectrofotómetro de UV/VIS.

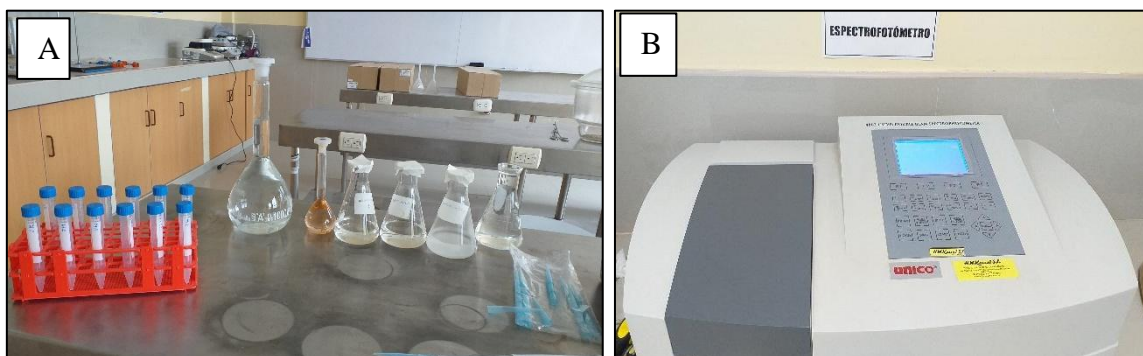


Figura 18. Determinación de Fe por espectrofotómetro uv/vis.

En la tabla 26 se muestran los resultados de Fe^{+2} (mg/L), el análisis se realizó cada 24 horas durante 9 días en los tres tratamientos (P01, P02 y TR).

Tabla 26

Monitoreo de Fe^{+2} en fase oxidación bacteriana.

Día	Dilución (a)	Abs 510 diluido (b)	Abs 510 (a*b)	P01 mg/L	P02 mg/L	TR mg/L
1	1:5	0.087	0.43539673	5.68	5.610	5.65
2	1:5	0.082	0.41067834	5.47	5.570	5.64
3	1:5	0.077	0.38595996	5.26	5.150	5.61
4	1:5	0.068	0.33770025	4.85	4.160	5.13
5	1:5	0.063	0.31298186	4.64	3.780	5.10
6	1:100	0.288	0.28826347	4.43	3.110	4.95
7	1:100	0.235	0.2352955	3.98	2.790	4.82
8	1:100	0.152	0.15172381	3.27	2.150	4.80
9	1:100	0.066	0.06579799	1.55	2.050	4.73

A continuación, se muestra el desarrollo de las pruebas estadísticas, en la tabla 27 se muestra la prueba de normalidad de los resultados de Fe^{+2} , en cual se rechaza la H_0 : Existe evidencia estadística de que los datos no son normales. A un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 27

Prueba de normalidad de los resultados de Fe⁺²

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
P01	0.886	9	0.183
P02	0.910	9	0.315
TR	0.847	9	0.069

En la tabla 28 se desarrolló el ANOVA de Friedman para muestras relacionales, en la cual se concluye que se rechaza la Ho: Existe evidencia estadística de que la mediana del Fe⁺² en los 3 tratamientos es igual, con un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 28

ANOVA de Friedman para muestras relacionadas

N total	9
Estadístico de contraste	12.667
Grados de libertad	2
Sig. Asintótica (Prueba bilateral)	0.002

En la tabla 29 se desarrolló la prueba de ANOVA post-hoc de Bonferroni para comparar las medias entre factores. Los tratamientos P02 vs P01 con una significancia ajustada de 0.472 siendo mayor a un nivel de significancia de 0.05. Por lo que se acepta la Ho: Existe evidencia estadística de que los tratamientos P02 vs P01 son iguales.

El tratamiento P02 vs TR con una significancia ajustada de 0.001 son menores a un nivel de significancia de 0.05. Por consiguiente, se rechaza la Ho: Existe evidencia estadística de que el tratamiento P02 vs testigo relativo son iguales.

Los tratamientos P01 vs TR con una significancia ajustada de 0.102 es mayor a un nivel de significancia de 0.05. Por lo que se acepta la Ho: Existe evidencia estadística de que los tratamientos P01 vs testigo relativo son iguales. Los niveles de significancia se han ajustado mediante las correcciones de Bonferroni para varias pruebas.

Tabla 29

ANOVA Post-hoc Bonferroni.

M1-M2	Estadístico de contraste	Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. Ajuste
P02-P01	0.667	0.471	1.414	0.157	0.472
P02-TR	-1.667	0.471	-3.536	0.000	0.001
P01-TR	-1.000	0.471	-2.121	0.034	0.102

En la figura 20 se muestra la tendencia del Fe^{+2} . El tratamiento 1 (P01), empezó en el día 1 con 5.68 mg/L, llegando el día 9 a un 1.55 mg/L; el tratamiento 2 (P02), empezó en el día 1 con 5.61 mg/L llegando el día 9 a un 2.05 mg/L; el tercer tratamiento (TR), empezó con el día 1 con 5.65 mg/L, llegando el día 9 a un 4.73 mg/L.

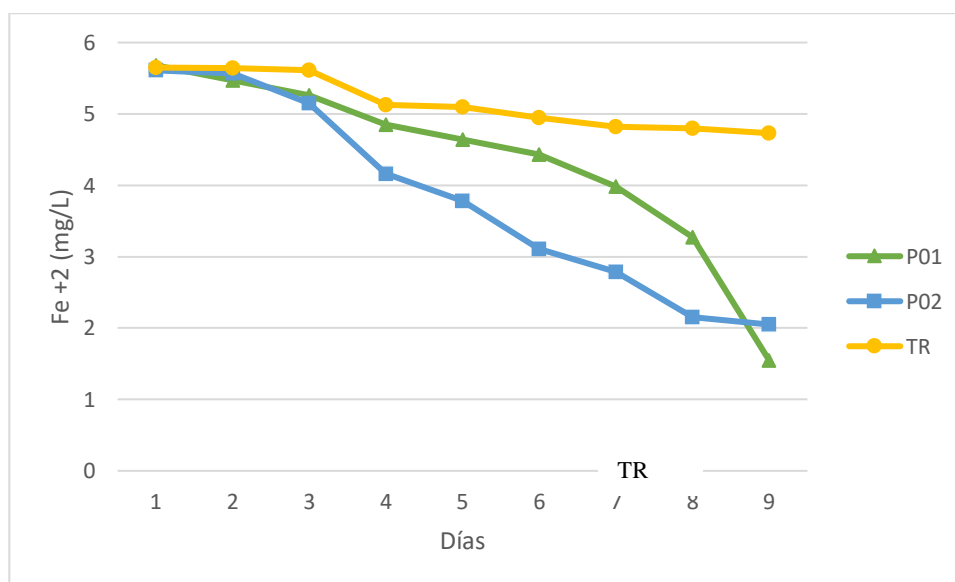


Figura 19. Tendencia decreciente del Fe^{+2} respecto a los 9 días de tratamiento.

4.2.5. Ion férrico

Para la determinación del Fe^{+3} se determinó por diferencia entre el Hierro total e ion ferroso. Obteniendo en las muestras un Hierro total de 6.88 mg/L. En la tabla 30 se muestra el resultado de dicha diferencia.

Tabla 30

Concentración de ion férrico.

Día	P01 mg/L	P02 mg/L	TR mg/L
1	1.2	1.270	1.23
2	1.41	1.310	1.24
3	1.62	1.730	1.27
4	2.03	2.720	1.75
5	2.24	3.100	1.78
6	2.45	3.770	1.93
7	2.9	4.090	2.06
8	3.61	4.730	2.08
9	5.33	4.830	2.15

A continuación, se muestra el desarrollo de las pruebas estadísticas, en la tabla 31 se muestra la prueba de normalidad de los resultados del Fe^{+3} , en el cual se rechaza la H_0 : Existe evidencia estadística de que los datos no son normales. A un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 31

Prueba de normalidad.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
P01 mg/L	0.886	9	0.183
P02 mg/L	0.910	9	0.315
TR mg/L	0.847	9	0.069

En la tabla 32 se desarrolló el ANOVA de Friedman para muestras relacionales, en la cual se concluye que se rechaza la H_0 : Existe evidencia estadística de que la mediana del Fe^{+3} en los 3 tratamientos es igual, con un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 32

ANOVA de Friedman para muestras relacionadas.

N total	9
Estadístico de contraste	12.667
Grados de libertad	2
Sig. Asintótica (Prueba bilateral)	0.002

En la tabla 33 se desarrolló la prueba de ANOVA post-hoc de Bonferroni para comparar las medias entre factores. El testigo relativo vs P01 con una significancia ajustada de 0.102 siendo mayor a un nivel de significancia de 0.05. Por lo que se acepta la Ho: Existe evidencia estadística de que el testigo relativo vs P01 son iguales.

El TR vs P01 con una significancia ajustada de 0.001 son menor a un nivel de significancia de 0.05. Por consiguiente, se rechaza la Ho: Existe evidencia estadística de que el testigo relativo vs P01 son iguales.

Los tratamientos P01 vs P02 con una significancia ajustada de 0.472 es mayor a un nivel de significancia de 0.05. Por lo que se acepta la Ho: Existe evidencia estadística de que los tratamientos P01 vs P02 son iguales. Los niveles de significancia se han ajustado mediante las correcciones de Bonferroni para varias pruebas.

Tabla 33

ANOVA Post-hoc Bonferroni.

M1-M2	Estadístico de contraste	Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. Ajuste
TR-P01	1.000	0.471	2.121	0.034	0.102
TR-P02	1.667	0.471	3.536	0.000	0.001
P01-P02	0.667	0.471	1.414	0.157	0.472

En la figura 21 se muestra la diferencia entre los resultados de Fe⁺³ vs tiempo (días). El tratamiento 1 (P01), empezó en el día 1 con 1.2 mg/L, llegando el día 9 a un 5.33 mg/L; el tratamiento 2 (P02), empezó en el día 1 con 1.27 mg/L llegando el día 9 a un 4.83 mg/L; el tercer tratamiento (TR), empezó con el día 1 con 1.23 mg/L, llegando el día 9 a un 2.15 mg/L.

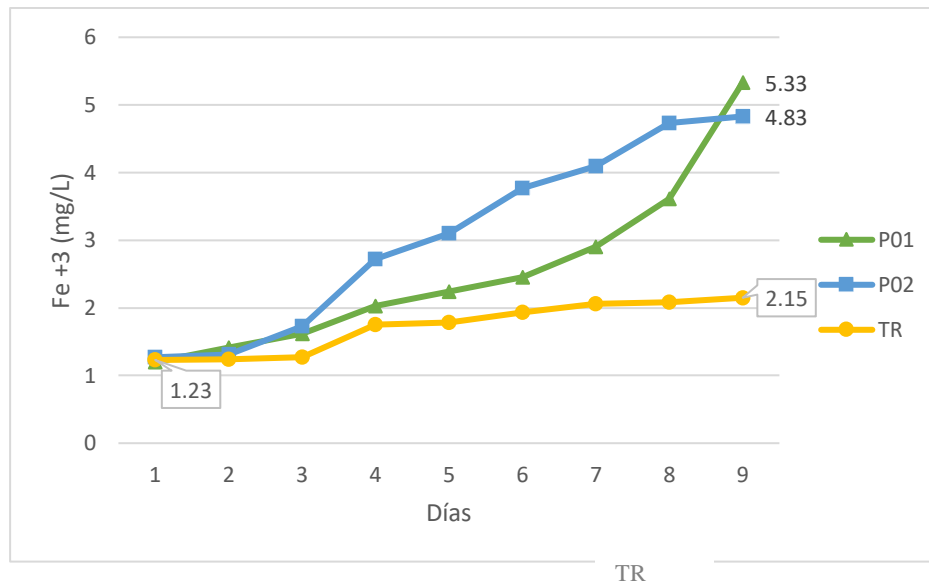


Figura 20. Tendencia de los resultados respecto a Fe^{+3}

Panduro Trinidad (2015) expresa que, durante el transcurso de la reacción, el ión ferroso es oxidado por la bacteria para producir el ión férrico. Como resultado es posible seguir el progreso de la reacción al medir, ya sea la disminución en la concentración del ión ferroso o el aumento de la concentración del ión férrico en el tiempo. Hirato (1986) indica que el monitoreo del ion férrico y ferroso es indispensable en los procesos de oxidación. Misari (2016) por su parte resalta que el método de oxidación bacteriano es significativamente más económico respecto a los tratamientos químicos de oxidación, señalando por ejemplo a la minera de la Zanja la cual utiliza como oxidante químico el cloruro férrico y la mina Kosovo - Alemania, el cual utilizan peróxido de hidrogeno.

4.3. Neutralización química con hidróxido de calcio

La fase de neutralización química se realizó con lechada de cal al 5% m/v, a cada uno de los tratamientos se le añadió 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL, 0.5 mL, 0.6 mL, 0.8 mL, 1 mL, 1.2 mL, 1.4 mL, 1.6 mL y 2 mL, respectivamente.

4.3.1. pH

En la tabla 34 se muestran los resultados del pH respecto a la fase de neutralización, la medición se realizó luego de la neutralización con cal los tratamientos (P01, P02 y TR).

Tabla 34

Resultados de la medición de pH, fase de neutralización.

Cal 5%	P01	P02	TR
0.2	2.45	2.65	10.6
0.3	2.54	2.72	11.47
0.4	2.56	3.14	11.74
0.5	2.59	6.12	12
0.6	2.66	8.48	12.08
0.8	2.85	11.49	12.24
1	8.17	-	-
1.2	9.86	-	-
1.4	10.25	-	-
1.6	10.28	-	-
2	10.82	-	-

A continuación, se muestra el desarrollo de las pruebas estadísticas, en la tabla 35 se muestra la prueba de normalidad de los resultados del pH, en cual se rechaza la H_0 : Existe evidencia estadística de que los datos no son normales. A un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 35

Prueba de normalidad.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Prueba 1	0.713	7	0.005
Prueba 2	0.881	7	0.230
TR	0.832	7	0.084

En la tabla 36 se desarrolló el ANOVA de Friedman para muestras relacional, en la cual se concluye que se rechaza la H_0 : Existe evidencia estadística de que la mediana del pH en los 3 tratamientos es igual, con un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 36

ANOVA de Friedman para muestras relacionadas.

N total	9
Estadístico de contraste	14.000
Grados de libertad	2
Sig. Asintótica (Prueba bilateral)	0.001

En la tabla 37 se desarrolló la prueba de ANOVA post-hoc de Bonferroni para comparar las medias entre factores. Los tratamientos P01 vs P02 con una significancia ajustada de 0.184 siendo mayor a un nivel de significancia de 0.05. Por lo que se acepta la Ho: Existe evidencia estadística de que los tratamientos P01 vs P02 son iguales.

El tratamiento P01 vs testigo relativo con una significancia ajustada de 0.001 son menores a un nivel de significancia de 0.05. Por consiguiente, se rechaza la Ho: Existe evidencia estadística de que el tratamiento P01 vs testigo relativo son iguales.

Los tratamientos P02 vs testigo relativo con una significancia ajustada de 0.184 es mayor a un nivel de significancia de 0.05. Por lo que se acepta la Ho: Existe evidencia estadística de que los tratamientos P02 vs testigo relativo son iguales. Los niveles de significancia se han ajustado mediante las correcciones de Bonferroni para varias pruebas.

Tabla 37

ANOVA Post-hoc Bonferroni.

M1-M2	Estadístico de contraste	Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. Ajuste
P01-P02	-1.000	0.535	-1.871	0.061	0.184
P01- TR	-2.000	0.535	-3.742	0.000	0.001
P02- TR	-1.000	0.535	-1.871	0.061	0.184

El principal efecto de la lechada de cal se aprecia en la variación del pH, el cual tiene una tendencia positiva. En la figura 22 se muestra la tendencia de pH, de los tres tratamientos respecto a la lechada de cal 5% m/v y el rango del LMP efluente minero metalúrgico. Se aprecia que en el tratamiento 1 la concentración de 1.2 mL de lechada

de cal al 5% (m/v) llega a un pH mayor a 8, luego de este punto a la tendencia sigue siendo creciente llegando a un máximo pH 11 con 2 mL lechada de cal (m/v). El tratamiento 2 empieza a incrementarse el pH cuando se añade 0.4 mL de lechada al 5 % (m/v), llegando a un máximo de 11.49 pH con una concentración de 1 mL de lechada de cal. Para el tratamiento 3 al añadir sólo 0.2 mL de lechada de cal el pH se incrementa bruscamente hasta un 10.6, llegando a un máximo de 12.24 a una concentración de cal al 5% mv de 1 mL.

Dentro de los 3 tratamientos, el tratamiento número 1 y 2 entra dentro de los rangos de los límites máximos permisibles para efluentes minero metalúrgicos el cual es de 6 a 9. El tratamiento 1 muestra el punto más eficiente a una concentración dichos tratamientos muestran un punto eficiente de 1.2 de lechada de cal al 5% m/v y el tratamiento 2 muestra dos puntos eficientes los cuales son a una concentración e 0.6 mL y 0.6 mL de lechada de cal al 5% m/v.

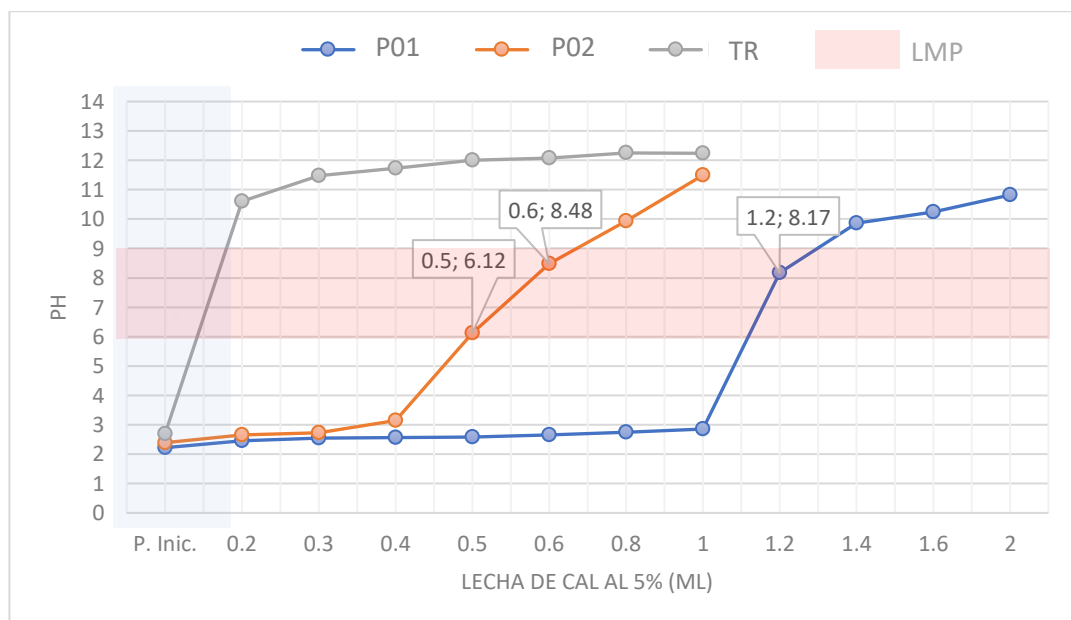


Figura 21. pH vs lechada de cal al 5%.

Según los LMP de efluentes minero metalúrgicos MINAM (2010) el pH tiene que encontrarse en el rango de 6 a 9, para Garcia & Rodriguez, (2006) el líquido esta neutralizado a un pH de 7 a 9. En concordancia con la normativa actual se toma los resultados que se encuentran en el rango de 6 a 9. Además de una óptima neutralización, la combinación de sulfato férrico e hidróxido de calcio da como resultado un coagulante muy efectivo para la clarificación del DAM con alto índice de turbidez según Calidra, (2002).

4.3.2. Análisis químico de metales

Los resultados del análisis químico se observan en la tabla 14, la misma que hace una comparación con los límites máximos permisibles de efluentes minero-metalúrgicos.

Tabla 38

Comparación de LMP efluente minero metalúrgico vs DAM.

Elemento	Unidad	LMP (*)	DAM
Arsénico	mg/L	0.1	0.0885
Hierro	mg/L	2	6.88
Cobre	mg/L	0.5	0.0283
Plomo	mg/L	0.2	0.0047

Nota. Medición en cualquier momento según LMP efluente minero metalúrgico.

Fuente: Informe de ensayo LAS01-AG-21-0096, MINAM (2010).

Según la figura 12 se observa, que el metal que supera los LMP de efluentes minero metalúrgicos es el Hierro con 6.88 mg/L mientras que el Arsénico, Cobre y Plomo se encuentran dentro del rango de la normativa en mención.

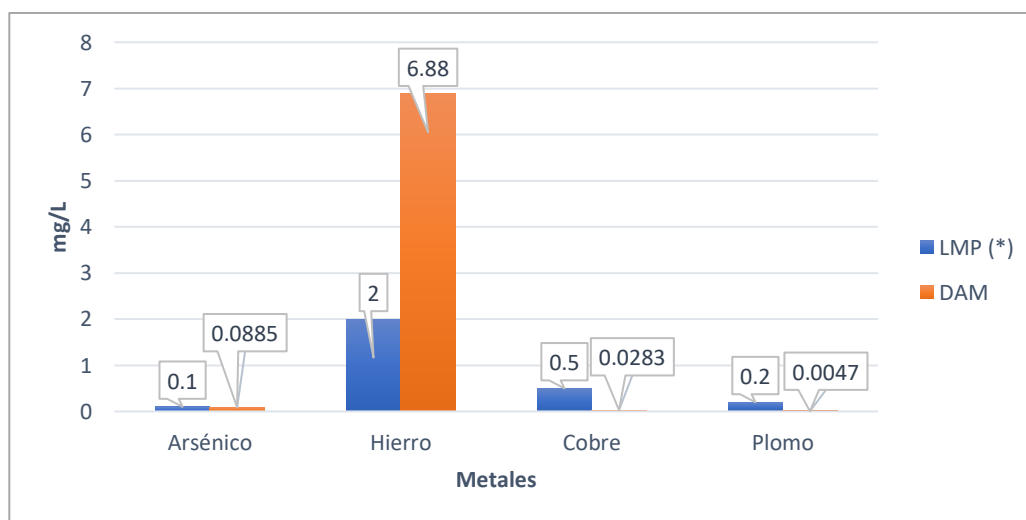


Figura 22. Metales pesados vs LMP de efluentes minero metalúrgicos.

Nota: * Límites máximos permisibles de efluentes minero metalúrgicos MINAM, 2010.

4.3.3. Porcentaje de remoción de hierro con hidróxido de calcio

En la tabla 38 se muestran los resultados de la concentración y Hierro mg/L. la medición se realizó en las 9 muestras de los 3 tratamientos (P01, P02 y TR).

Tabla 39

Resultados de la concentración de Hierro por tratamiento.

Cal 5%	P01	P02	TR
0.2	4.624	4.545	5.068
0.3	4.536	4.500	5.023
0.4	4.447	3.818	4.881
0.5	3.907	2.551	4.633
0.6	2.949	2.515	4.545
0.8	1.531	2.435	4.412
1	1.531	2.329	4.359
1.2	1.070	1.966	4.110
1.6	1.088	1.886	4.057
2	1.079	1.842	3.986

TR=Testigo relativo

- a. **Determinación de la remoción de Hierro:** En la Tabla 39 se tiene los resultados calculados de la remoción de Hierro.

Tabla 40

Porcentaje de remoción de Hierro en los tres tratamientos.

Cal 5% (mL)	P01	P02	TR
0.2	32.79	33.94	26.34
0.3	34.07	34.59	26.99
0.4	35.36	44.51	29.06
0.5	43.21	62.92	32.66
0.6	57.14	63.44	33.94
0.8	77.75	64.61	35.87
1	77.75	66.15	36.64
1.2	84.45	71.42	40.26
1.6	84.19	72.59	41.03
2	84.32	73.23	42.06

TR=Testigo relativo

A continuación, se muestra el desarrollo de las pruebas estadísticas, en la tabla 40 se muestra la prueba de normalidad de los resultados del Hierro, en cual se rechaza la

Ho: Existe evidencia estadística de que los datos no son normales. A un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 41

Prueba de normalidad.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
P01	0.810	10	0.019
P02	0.813	10	0.021
TR	0.932	10	0.472

En la tabla 41 se desarrolló el ANOVA de Friedman para muestras relacional, en la cual se concluye que se rechaza la Ho: Existe evidencia estadística de que la mediana del Hierro en los 3 tratamientos es igual, con un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 42

ANOVA de Friedman para muestras relacionadas.

N total	10
Estadístico de contraste	15,000
Grados de libertad	2
Sig. Asintótica (Prueba bilateral)	0.001

En la tabla 42 se desarrolló la prueba de ANOVA post-hoc de Bonferroni para comparar las medias entre factores. El testigo relativo vs P01 con una significancia ajustada de 0.002 siendo menor a un nivel de significancia de 0.05. Por lo que se rechaza la Ho: Existe evidencia estadística de que el testigo relativo vs P01 son iguales.

El testigo relativo vs P02 con una significancia ajustada de 0.002 son menor a un nivel de significancia de 0.05. Por consiguiente, se rechaza la Ho: Existe evidencia estadística de que el testigo relativo vs P02 son iguales.

Los tratamientos P01 vs P02 con una significancia ajustada de 1.000 es mayor a un nivel de significancia de 0.05. Por lo que se acepta la Ho: Existe evidencia estadística de que los tratamientos P01 vs P02 son iguales. Los niveles de significancia se han ajustado mediante las correcciones de Bonferroni para varias pruebas.

Tabla 43

ANOVA Post-hoc Bonferroni.

M1-M2	Estadístico de contraste	Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. Ajuste
TR-P01	1.500	0.447	3.354	0.001	0.002
TR-P02	1.500	0.447	3.354	0.001	0.002
P01-P02	0.000	0.447	0.000	1.000	1.000

En la figura 23 se muestra la remoción de Hierro en los tres tratamientos a diferentes concentraciones de lechada de cal al 5% (m/v), sin bien es cierto en los tres tratamientos existió una remoción de Hierro, en la prueba P01 se obtuvo una remoción de 84.44 % a 1.2 mL de lechada de Cal, en la P02 se obtuvo 62.92 % y 63.44 % a 0.5 mL y 0.6 mL de lechada de Cal respectivamente.

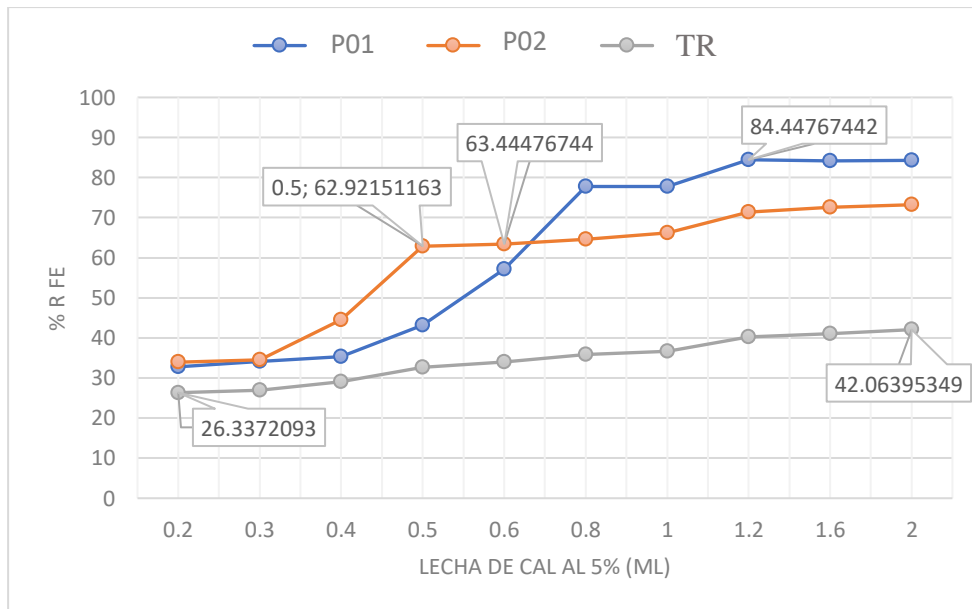


Figura 23. Porcentaje de remoción de Hierro por neutralización.

En la figura 24 se aprecia las concentraciones de los metales Arsénico, Hierro, Cobre y Plomo; las cuales fueron comparados con los límites máximos permisibles de efluentes minero metalúrgicos, de los cuales ningún en mención superan la normativa actual.

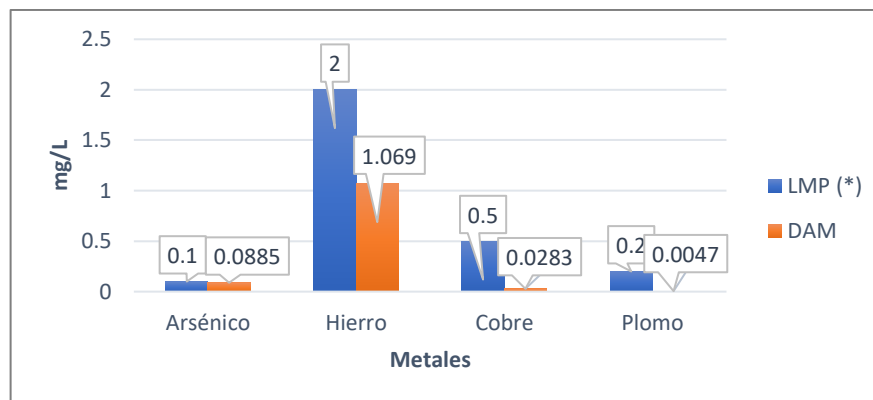


Figura 24. Concentración de metales pesados en el DAM neutralizado vs LMP
 Nota: * Límites máximos permisibles de efluentes minero metalúrgicos MINAM, 2010.

Para Wang et al., (2021) la neutralización directa con cal u otros agentes neutralizantes para precipitar los metales genera lodos tóxicos muy voluminosos, sin embargo, Martin et al, (2011) indica que la lixiviación previa de los metales pesados en el DAM antes de la neutralización es importante para mejorar la eficiencia de la neutralización y disminuir la formación de lodos neutralizados. Sin embargo, para los residuos se tiene dos alternativas, la 1er consiste en realizar estudios de recuperación de algún metal el cual sea económicamente viable (Misari, 2016), y la segunda opción es el confinamiento general del residuo.

El método de neutralización química es el más utilizado en la industria minera (Tabla 47) para la neutralización de drenajes ácidos. Sin embargo, estos son aplicados cuando el efluente previamente fue oxidado, la cal como neutralizante es muy efectiva y con bajos costos (Misari, 2016).

Tabla 47.
Neutralizadores para ácidos.

Reactivo	Reactividad	Solubilidad	Costo	Forma de uso
Soda caustica	NaOH	Alta	Medio	Solución
Carbonato de sodio	Na ₂ CO ₃			
Cal	CaO	Baja	Alta	Bajo
Hidróxido de calcio	Ca (OH) ₂			Suspensión I=5%
Caliza	CaCO ₃	Baja	Insoluble	Bajo
Dolomita	CaMg(CO ₃) ₂	Inapropiado si se quiere pH > 5		

Fuente: (Misari, 2016).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se logro el aislamiento de la bacteria *T. ferrooxidans* del drenaje ácido de minas de la Compañía Minera Ayapata S.A.C., del cual se tuvo un conteo 12000000 cel/L de *T. ferrooxidans* en el medio de cultivo liquido 9k-Fe, agitación 180 rpm, temperatura 25 °C y aireación de 3L/min.

Se determino la capacidad de oxidación de *T.Ferrooxidans* en la cual se observó que el tratamiento P01 presento mayores concentraciones del Fe^{+3} de 5.33 mg/L, mientras que el testigo relativo por su parte tuvo una concentración de 2.15 mg/L Fe^{+3} .

Se logro la neutralización del DAM con hidróxido de calcio al 5% por lo que se concluye que la neutralización es más eficiente, en medio oxidados, siendo el caso de la prueba 1 donde se obtuvo mayor remoción de Hierro 84.44% a un pH de 8.17.

5.2. Recomendaciones

Para la réplica del presente proyecto de investigación in situ, se recomienda tener en cuenta las condiciones ambientales de la zona en donde se pretendiera ejecutar, ya que la bacteria *T. ferrooxidans* requiere condiciones ambientales específicas para su eficaz oxidación.

En la fase de aislamiento bacteriano se recomienda realizar una caracterización bioquímica para identificar exactamente a la bacteria. Para la fase de oxidación se recomienda realizar los tratamientos en un reactor en el cual se pueda medir parámetros fisicoquímicos en tiempo real.

En la fase de neutralización se recomienda tener en cuenta los residuos generados, y alternativas para su reutilización si fuera el caso o depositarlos de manera segura mediante un confinamiento.

Finalmente se recomienda seguir investigando sobre la oxidación bacteriana, seguida de una neutralización química, no solamente desde el punto de vista ambiental, si no también económico, ya que una alta concentración de metales, estos pueden ser recuperados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, F., Gentina, J. (2005). Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras. *Archivos de Ingeniería Bioquímica*, 3-24. www.euv.cl
- Arias V., Anaya F., Quiñones J., Salazar D., Gil J., J. G. (2015). Adaptación del *Thiobacillus Ferrooxidans* a sustratos conformados con especies de minerales piríticos. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalurgica y Geográfica*, 16(31), 1-12.
- Ayala, F., & Vadillo, L. (2004). Manual de restauración de terrenos y evaluación de impactos ambientales en minería (2nd ed.). Madrid: Instituto Geológico y Minero de España.
- Ballester, P. (2005). Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras. 69.
- Branlt, H. (2001). 8 Microbial Leaching of Metals.
- Caraballo, M. A., MacÍas, F., Nieto, J. M., Castillo, J., Quispe, D., & Ayora, C. (2011). Hydrochemical performance and mineralogical evolution of a dispersed alkaline substrate (DAS) remediating the highly polluted acid mine drainage in the full-scale passive treatment of Mina Esperanza (SW Spain). *American Mineralogist*, 96(8-9), 1270-1277. <https://doi.org/10.2138/am.2011.3752>
- Castillo, L., Satalaya, C., Paredes, U., Encalada, M., Zamora, J., & Cuadros, Arco. (2021). *Contraloría general de la república auditoría de desempeño sobre gobernanza para el manejo integral de los pasivos ambientales mineros*.
- Corrales, L. C., Sánchez, L. C., Sánchez- Cortes, P. S., Sánchez- León, A. S., & Sánchez-Quintero, V. (2006). Estudio piloto de aislamiento y fenotipificación de bacterias que participan en los procesos de biolixiviación , en las zonas mineras del Departamento de Boyaca. *NOVA - Publicación Científica*, 4(5), 57-63. <https://doi.org/10.22490/24629448.348>
- Delgado Cruz, S. V., & Castillo Cotrina, D. (2015). Biolixivante Effect of Temperature on Microbiai Growth and Bioleaching Chalcopyrite on Culture By Microbial Biollxivante. *Revista Ciencia &Desarrollo*, 20, 59-64.
- Drobner, E., Huber, H., & Stetter, K. O. (1990). *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative

- hydrogen oxidizer. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), 2922-2923.
<https://doi.org/10.1128/aem.56.9.2922-2923.1990>
- Espinosa, F. P. G., Gutiérrez, V. A. S., & Mogrovejo, F. H. C. (s. f.). *Estudio de microorganismos nativos en procesos de biooxidación de minerales auríferos refractarios. Artículo* Nbsp. 1-8.
- Ferguson, D. K., & Erickson, P. M. (1987). *An overview of methods to predict acid mine drainage*.
- Fernandez Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2014). *Metodología de la investigación*.
- Fidel Sergio Misari Chuquipoma. (2016). Tecnología De La Lixiviación Bacteriana De Minerales. En *Elsevier Science* (Vol. 2).
https://www.osinergmin.gob.pe/seccion/centro_documental/mineria/Documentos/Publicaciones/Biolixiviacion.pdf
- García & Rodríguez. (2006). Los residuos mineros en el medio ambiente. *Instituto Geológico y Minero de España, January 2006*, 1-5.
- Gilles, T., & Charlene, H. (2014). *The International Network for Acid Prevention: Global Acid Rock Drainage Guide*. 473.
- Guerrero, J. J., & Olivera, S. C. (1999). Environmental Biotechnology for Mining and Metallurgy. *Congreso Internacional de Minería y Medio Ambiente, November 1999*, 8.
https://www.researchgate.net/publication/258729015_environmental_biotechnology_for_mining_and_metallurgy
- Hirato, T., Kinoshita, M., Awakura, Y., & Majima, H. (1986). The leaching of chalcopyrite with ferric chloride. *Metallurgical Transactions B*, 17(1), 19-28.
<https://doi.org/10.1007/BF02670815>
- Ighalo, J. O., & Eletta, O. A. A. (2020). Response surface modelling of the biosorption of Zn(II) and Pb(II) onto *Micropogonias undulatus* scales: Box–Behnken experimental approach. *Applied Water Science*, 10(8). <https://doi.org/10.1007/s13201-020-01283-3>
- IGAFOM. (2017). Instrumento de gestión ambiental para la formalización de actividades de pequeña minería y minería artesanal – correctivo.

- INEI. (2020). Instituto Nacional De Estadística E Informática.
- Instituto Nacional de Recursos Naturales – INRENA. (2005). *Mapa Hidrográfico e Inventario de Fuentes de Agua Superficiales en el Ámbito del ATDR Sicuani*. 122. http://www.ana.gob.pe/media/293600/fuentes_agua_superficial_sicuani.pdf
- Jimenez Huallpa, C. C. (2017). Eficiencia en la remoción del tratamiento de aguas ácidas de mina, mediante neutralización activo con lechada de cal de la Unidad Minera Arasi – Puno. *Universidad Peruana Unión*, 87. <http://repositorio.upeu.edu.pe/handle/UPEU/856>
- Jin, D., Wang, X., Liu, L., Liang, J., & Zhou, L. (2020). A novel approach for treating acid mine drainage through forming schwertmannite driven by a mixed culture of *Acidiphilium multivorum* and *Acidithiobacillus ferrooxidans* prior to lime neutralization. *Journal of Hazardous Materials*, 400(March), 123108. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123108>
- Leduc, L. G., & Ferroni, G. D. (1994). The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(2), 103-119. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00082.x>
- López Pamo, E., Aduvire, O., & Baretino, D. (2002). Tratamientos pasivos de drenajes ácidos de mina: Estado actual y perspectivas de futuro. *Boletín Geológico y Minero*, 113(1), 3-21.
- Macías, F., Caraballo, M. A., Rötting, T. S., Pérez-López, R., Nieto, J. M., & Ayora, C. (2012). From highly polluted Zn-rich acid mine drainage to non-metallic waters: Implementation of a multi-step alkaline passive treatment system to remediate metal pollution. *Science of the Total Environment*, 433(2012), 323-330. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.084>
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2003). *Biología de los microorganismos*. 10 ed. Madrid: Pearson Educación.
- Martins, M., Santos, E. S., Faleiro, M. L., Chaves, S., Tenreiro, R., Barros, R. J., Barreiros, A., & Costa, M. C. (2011). Performance and bacterial community shifts during bioremediation of acid mine drainage from two Portuguese mines. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(7), 972-981. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.07.006>

- MINAM. (2010). Decreto Supremo N°010-2010-MINAM. En *El Peruano* (p. 4). http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/09/ds_010-2010-minam.pdf
- Minas, D. E. (2018). *Caracterización y tratamiento de efluentes de aguas ácidas en la mina la rinconada - puno*.
- Ministerio de Energía y Minas Perú. (2018). *Anuario minero*. 286-287. <https://doi.org/10.30875/ee10314e-es>
- Montesinos, I. (2017). Caracterización de efluentes de mina para la elección de la alternativa óptima de tratamiento. tesis, Pontificia Universidad Católica del Perú, Facultad de ciencias e ingeniería, Lima. http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/7885/MONTESINOS_MAYRA_EFLUENTES_MINA_ELECCION_TRATAMIENTO.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Murillo Torrecilla, F. (2011). Hacer de la educación un ámbito basado en evidencias científicas. *REICE. Revista Iberoamericana sobre Calidad, Eficacia y Cambio en Educación*, 9(3), 3-12.
- Nemati, M., Harrison, S. T. L., Hansford, G. S., & Webb, C. (1998). Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: A review on the kinetic aspects. *Biochemical Engineering Journal*, 1(3), 171-190. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(98\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(98)00006-0)
- Nikolov, L. N., & Karamanev, D. G. (1992). Kinetics of the Ferrous Iron Oxidation by Resuspended Cells of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology Progress*, 8(3), 252-255. <https://doi.org/10.1021/bp00015a011>
- Price, W. A., & Errington, J. C. (1998). Guidelines for Metal Leaching and Acid Rock Drainage At Minesites in British Columbia. *Ministry of Energy and Mines, August*, 92.
- Rivera Uria, M.Y., Martín Romero, F., S., & S., S. R. (2007). Avances en el tratamiento de aguas ácidas de minas. *Scientia et Technica*, 4(36), 849-854. <https://doi.org/10.22517/23447214.5167>
- Rossi, R. (1990). *Biohydrometallurgy*. McGraw-Hill Book Company.
- Takeno, N. (2005). Atlas of Eh-pH diagrams Intercomparison of thermodynamic databases. *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Tokyo*,

419,285.

<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Atlas+of+Eh-pH+diagrams+Intercomparison+of+thermodynamic+databases#0>

Valente, T. M., & Leal Gomes, C. (2009). Occurrence, properties and pollution potential of environmental minerals in acid mine drainage. *Science of the Total Environment*, 407(3), 1135-1152. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.09.050>

Varela, G., & Grotiuz, G. (2008). TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA Fisiología y metabolismo bacteriano. *Cefa*, 43-57.

Vladimir Arias, C. R. (2012). Aislamiento de bacterias acidófilas a partir del drenaje ácido proveniente de las inmediaciones a las unidades mineras de Julcani y Recuperada, Huancavelica. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 15(30), 59-66.

Wang, X., Jiang, H., Zheng, G., Liang, J., & Zhou, L. (2021). Recovering iron and sulfate in the form of mineral from acid mine drainage by a bacteria-driven cyclic biomineralization system. *Chemosphere*, 262, 127567. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127567>

Xia, L., Liu, J., Xiao, L., Zeng, J., Li, B., Geng, M., Qiu, G. (2008). Single and cooperative bioleaching of sphalerite by two kinds of bacteria-Acidithiobacillus ferrooxidans and Acidithiobacillus thiooxidans. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*, 12: 190-195.

ANEXOS

Anexo 1. Panel fotográfico.



Figura 23. (1) aguas arriba de la minera, (2) aguas debajo de la unidad minera.



Figura 24. (2) y (3) relaveras de la unidad minera.

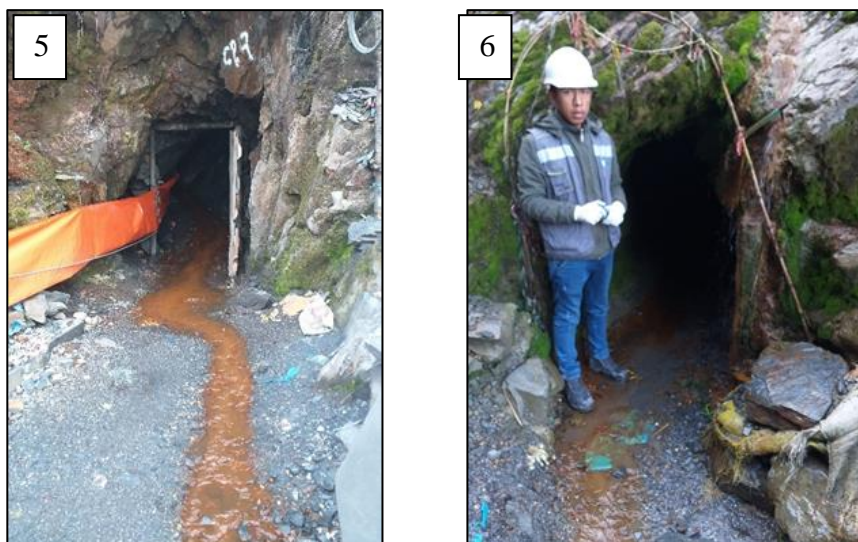


Figura 25. (5) y (6) punto de muestreo de muestreo biológico.

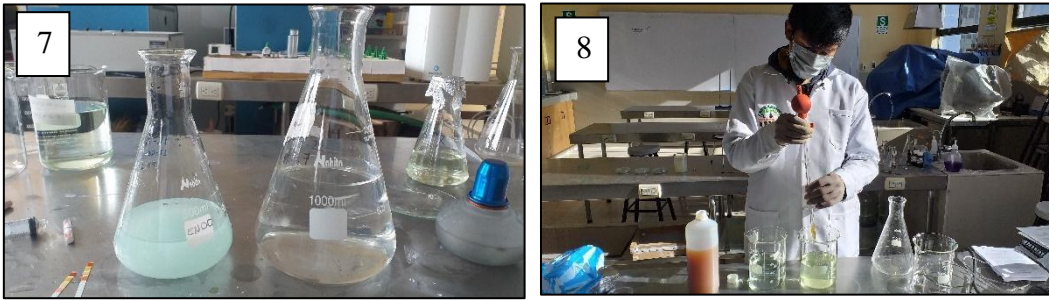


Figura 26. (7) medio de cultivo 9k-Fe, (8) aislamiento de muestra biológica.

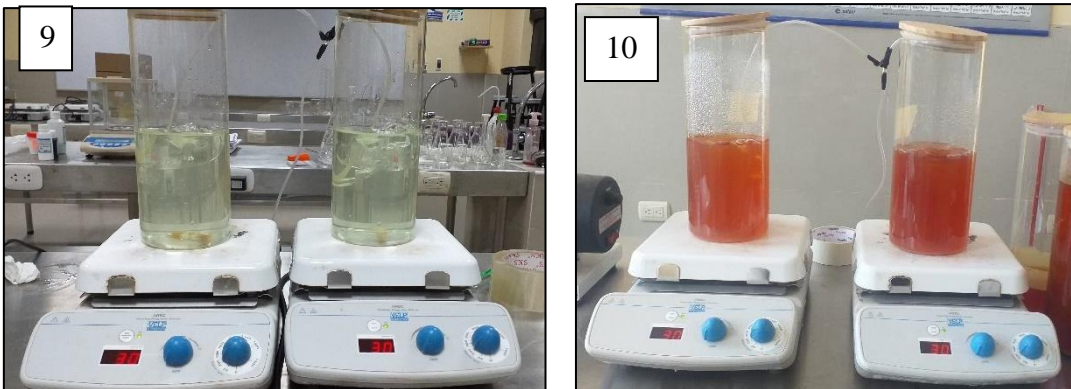


Figura 27. (9) Medio de cultivo 9k-Fe con inculo de muestra bilógica en el día uno, (10) Medio de cultivo 9k-Fe con inculo de muestra bilógica en el día 10.



Figura 28. (11) Biomasa bacteriana *T. Ferrooxidans* aislada a los 30 días.



Figura 29. (12) muestreo de efluente minero, (13) medición de parámetros fisicoquímicos.

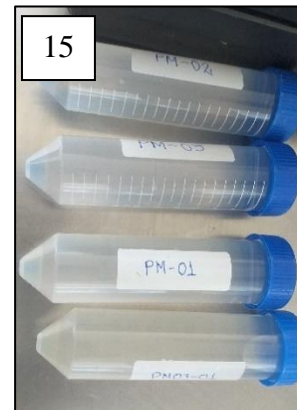


Figura 30. (14) muestras de efluentes mineros, (15) submuestras para envío de análisis químico de metales.



Figura 31. (16) tratamiento de oxidación bacteriano día 1, (17) tratamientos de oxidación día 9.



Figura 32. (18) monitoreo de oxígeno disuelto, (19) monitoreo de pH, potencial redox.

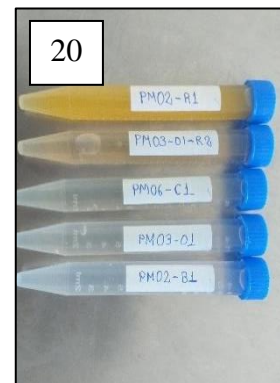


Figura 33. (19) precipitación de Fe^{+3} en el tratamiento 2, (20) muestra para determinación de Fe^{+2}



Figura 34. (21) determinación de Fe^{+2} , (22) espectrofotómetro UV/VIS para la determinación de Fe^{+2} y Hierro total.



Figura 35. (23) lechada de cal al 5% en suspensión constante, (24) fase de neutralización química con lechada de cal al 5%(m/v).



Figura 36. (25) suministro de lechada de cal al 5% a cada tratamiento de oxidación bacteriana.

Anexo 2. Resultados de monitoreo fase de oxidación bacteriana.

P	Día	Fecha	ORP(mV)			T° (°C)			Ph			OD (mg/l)		
P R U E B A 1	1	25/10/2021	224	223	228	18.1	16.4	24.32	3.36	2.96	2.56	3.18	2.37	2.15
	2	26/10/2021	239	238	243	18.3	16.6	24.3	3.07	2.67	2.27	2.88	2.08	1.86
	3	27/10/2021	242	241	246	18.2	16.5	24.3	2.8	2.4	2.00	2.61	1.81	1.59
	4	28/10/2021	244	243	248	18.8	17.1	24.3	2.79	2.39	1.99	2.6	1.8	1.58
	5	29/10/2021	245	244	249	18.4	16.7	24.3	2.74	2.34	1.94	2.55	1.75	1.53
	6	2/11/2021	260	259	264	22.3	20.6	24.3	2.6	2.2	1.8	2.41	1.61	1.39
	7	3/11/2021	250	249	254	16.3	14.6	24.3	2.64	2.24	1.84	2.45	1.65	1.43
	8	4/11/2021	254	253	258	16.6	14.9	24.3	2.55	2.15	1.75	2.36	1.56	1.34
	9	5/11/2021	250	249	254	16.3	14.6	24.3	2.62	2.22	1.82	2.43	1.63	1.41
P R U E B A 2	1	25/10/2021	220	219	224	18.4	16.7	24.3	3.38	2.98	2.58	3.19	2.39	2.17
	2	26/10/2021	235	234	239	18.9	17.2	24.3	3.14	2.74	2.34	2.95	2.15	1.93
	3	27/10/2021	239	238	243	19.9	18.2	24.3	2.88	2.48	2.08	2.69	1.89	1.67
	4	28/10/2021	242	241	246	18.4	16.7	24.3	2.85	2.45	2.05	2.66	1.86	1.64
	5	29/10/2021	242	241	246	18.5	16.8	24.3	2.82	2.42	2.02	2.63	1.83	1.61
	6	2/11/2021	251	250	255	23	21.3	24.3	2.7	2.3	1.9	2.51	1.71	1.49
	7	3/11/2021	249	248	253	21	19.3	24.3	2.74	2.34	1.94	2.55	1.75	1.53
	8	4/11/2021	247	246	251	19.6	17.9	24.3	2.75	2.35	1.95	2.56	1.76	1.54
	9	5/11/2021	241	240	245	16.3	14.6	24.3	2.79	2.39	1.99	2.6	1.8	1.58
P R U E B A 3	1	25/10/2021	159	158	163	19.5	17.8	24.3	4.31	3.91	3.51	4.12	3.32	3.1
	2	26/10/2021	192	191	196	22.9	21.2	24.3	3.94	3.54	3.14	3.75	2.95	2.73
	3	27/10/2021	221	220	225	24.3	22.6	24.3	3.26	2.86	2.46	3.07	2.27	2.05
	4	28/10/2021	228	227	232	23.3	21.6	24.3	3.12	2.72	2.32	2.93	2.13	1.91
	5	29/10/2021	229	228	233	22.7	21	24.3	3.09	2.69	2.29	2.9	2.1	1.88
	6	2/11/2021	227	226	231	17.2	15.5	24.3	3.05	2.65	2.25	2.86	2.06	1.84
	7	3/11/2021	228	227	232	16.8	15.1	24.3	3.02	2.62	2.22	2.83	2.03	1.81
	8	4/11/2021	228	227	232	17.8	16.1	24.3	3.03	2.63	2.23	2.84	2.04	1.82
	9	5/11/2021	223	222	227	16.3	14.6	24.3	3.09	2.69	2.29	2.9	2.1	1.88

Anexo 3. Resultado de pH en la fase de neutralización

	Cal 5%	1	2	3	Promedio (P01)
P01	0.2	2.44	2.31	2.60	2.45
	0.3	2.53	2.40	2.69	2.54
	0.4	2.55	2.42	2.71	2.56
	0.5	2.58	2.45	2.74	2.59
	0.6	2.65	2.52	2.81	2.66
	0.8	2.84	2.71	3.00	2.85
	1	8.16	8.03	8.32	8.17
	1.2	9.85	9.72	10.01	9.86
	1.4	10.24	10.11	10.40	10.25
	1.6	10.27	10.14	10.43	10.28
	2	10.81	10.68	10.97	10.82
P02	0.2	2.77	2.51	2.67	2.65
	0.3	2.84	2.58	2.74	2.72
	0.4	3.26	3	3.16	3.14
	0.5	6.24	5.98	6.14	6.12
	0.6	8.60	8.34	8.5	8.48
	0.8	11.61	11.35	11.51	11.49
TR	0.2	10.3	10.65	10.57	10.6
	0.3	11.17	11.52	11.44	11.47
	0.4	11.44	11.79	11.71	11.74
	0.5	11.7	12.05	11.97	12
	0.6	11.78	12.13	12.05	12.08
	0.8	11.94	12.29	12.21	12.24

Anexo 4. Resultados de Hierro Luego de la neutralización con hidróxido de Calcio.

Código	Cal 5%	1	2	3	Promedio (P01)
P01	0.2	4.383	4.765	4.724	4.624
	0.3	4.295	4.677	4.636	4.536
	0.4	4.206	4.588	4.547	4.447
	0.5	3.666	4.048	4.007	3.907
	0.6	2.708	3.09	3.049	2.949
	0.8	1.29	1.672	1.631	1.531
	1	1.29	1.672	1.631	1.531
	1.2	0.829	1.211	1.17	1.07
	1.6	0.847	1.229	1.188	1.088
	2	0.838	1.22	1.179	1.079
P02	0.2	4.66	4.53	4.445	4.545
	0.3	4.615	4.485	4.4	4.5
	0.4	3.933	3.803	3.718	3.818
	0.5	2.666	2.536	2.451	2.551
	0.6	2.63	2.5	2.415	2.515
	0.8	2.55	2.42	2.335	2.435
	1	2.444	2.314	2.229	2.329
	1.2	2.081	1.951	1.866	1.966
	1.6	2.001	1.871	1.786	1.886
	2	1.957	1.827	1.742	1.842
TR	0.2	4.947	5.089	5.168	5.068
	0.3	4.902	5.044	5.123	5.023
	0.4	4.76	4.902	4.981	4.881
	0.5	4.512	4.654	4.733	4.633
	0.6	4.424	4.566	4.645	4.545
	0.8	4.291	4.433	4.512	4.412
	1	4.238	4.38	4.459	4.359
	1.2	3.989	4.131	4.21	4.11
	1.6	3.936	4.078	4.157	4.057
	2	3.865	4.007	4.086	3.986

Anexo 5. Determinación de ion ferroso

Se determinó las concentraciones de iones ferroso mediante el método de la fenontraleina por colorimetría con un espectrofotómetro de UV/VIS.

Tabla 44

Curva de calibración para Fe^{+2} .

código	Hierro estándar	Absorbancia	Fe mg/l
I	0	0	0
II	0.5	0.044	0.4
III	1	0.075	0.8
IV	1.5	0.147	1.2
V	2	0.181	1.6
VI	2.5	0.23	2

En el grafico se muestra la concentración de Fe^{+2} vs Absorbancia a 510 nm.

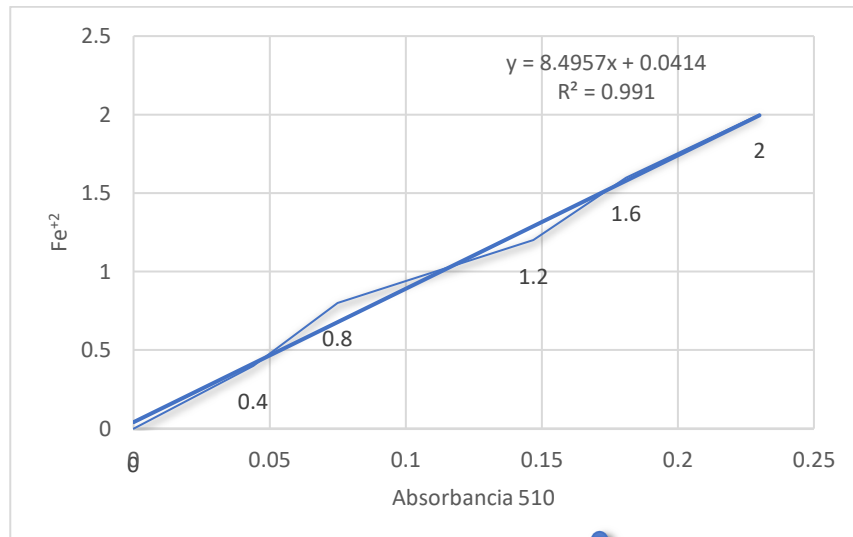


Figura 25. Tabulación de curva de calibración.

Una vez obtenido la curva de calibración con un coeficiente de determinación R^2 de 0.0991, Se determino de concentración de Fe^{+2} mediante la siguiente ecuación:

$$Fe \frac{mg}{L} = 8.4957(abs\ 510) + 0.991$$

En la tabla se muestran los resultados de Fe^{+2} (mg/L), el análisis se realizó cada 24 horas durante 9 días en los tres tratamientos (P01, P02 y TR).

Tabla 45

Monitoreo de Fe⁺² en fase oxidación bacteriana.

Día	Dilución	Abs 510	Abs 510	P01	P02	TR
	(a)	diluido (b)	(a*b)	mg/L	mg/L	mg/L
1	1:5	0.087	0.43539673	5.68	5.610	5.65
2	1:5	0.082	0.41067834	5.47	5.570	5.64
3	1:5	0.077	0.38595996	5.26	5.150	5.61
4	1:5	0.068	0.33770025	4.85	4.160	5.13
5	1:5	0.063	0.31298186	4.64	3.780	5.10
6	1:100	0.288	0.28826347	4.43	3.110	4.95
7	1:100	0.235	0.2352955	3.98	2.790	4.82
8	1:100	0.152	0.15172381	3.27	2.150	4.80
9	1:100	0.066	0.06579799	1.55	2.050	4.73

Anexo 6. Determinación de hierro

El hierro total se determinó por el método de la fenontraleina, por colorimetría con un espectrofotómetro de UV/VIS. Para lo cual se procedió a tabular la curva de calibración un obteniendo un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9907$

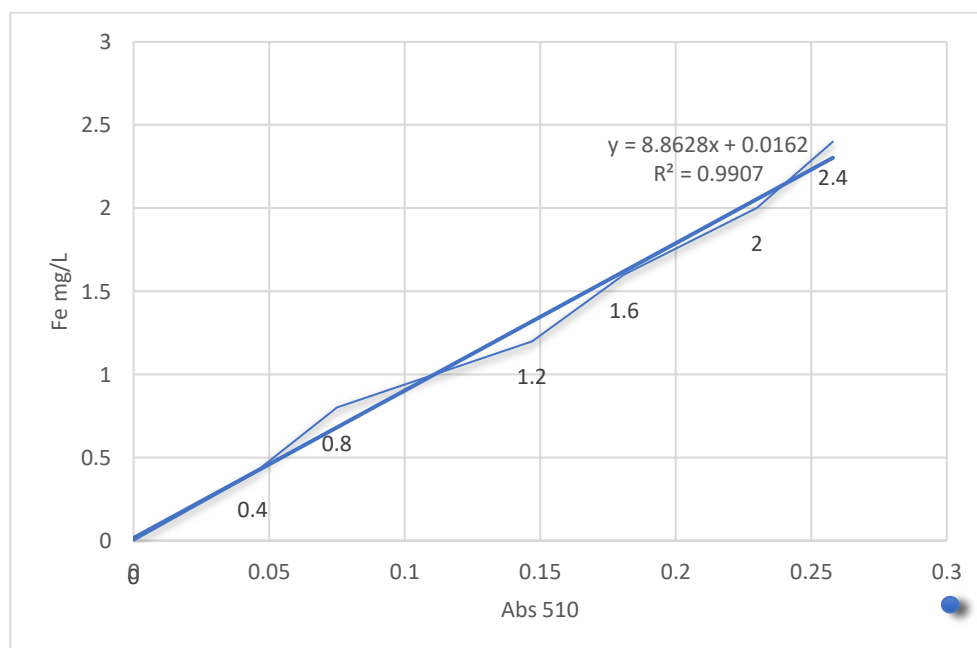


Figura 26. Curva de calibración para la determinación de hierro.

Una vez obtenido la curva de calibración con un coeficiente de determinación R² de 0.9907, Se determino la concentración de Fe mediante la siguiente ecuación:

$$Fe \frac{mg}{L} = 8.8628(abs\ 510) + 0.9907$$

En la tabla se muestran los resultados de Fe (mg/L), el análisis se realizó después de finalizar la neutralización con lechada de cal al 5% (m/v).

Tabla 46

Resultados de la concentración de hierro por tratamiento.

Lechada de Cal 5%	P01	P02	TR
0.2	4.624	4.545	5.068
0.3	4.536	4.500	5.023
0.4	4.447	3.818	4.881
0.5	3.907	2.551	4.633
0.6	2.949	2.515	4.545
0.8	1.531	2.435	4.412
1	1.531	2.329	4.359
1.2	1.070	1.966	4.110
1.6	1.088	1.886	4.057
2	1.079	1.842	3.986

TR=Testigo relativo

Anexo 7. Remoción de hierro: para la remoción de hierro se aplicó la siguiente formula

$$\% R Fe = \frac{Ci - Cf}{Ci} x 100$$

Donde:

Ci: Concentración inicial de Fe.

Cf: Concentración final de Fe.

Tabla 43.

Porcentaje de remoción de hierro en los tres tratamientos.

Lechada de cal 5% (mL)	P01	P02	TR
0.2	32.79	33.94	26.34
0.3	34.07	34.59	26.99
0.4	35.36	44.51	29.06
0.5	43.21	62.92	32.66
0.6	57.14	63.44	33.94
0.8	77.75	64.61	35.87
1	77.75	66.15	36.64
1.2	84.45	71.42	40.26
1.6	84.19	72.59	41.03
2	84.32	73.23	42.06

TR=Testigo relativo

Anexo 8. Informe de análisis químico de metales.



Laboratorios Analíticos del Sur

Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado – Arequipa – Perú
www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

+51 (054) 443294
+51 (054) 444582
+51 958 961 254
+51 958 961 253

INFORME DE ENSAYO LAS01-AG-21-00096

Fecha de emisión: 29/10/2021


Página 2 de 3

Clave generada : 376B51A8

RESULTADOS DE ENSAYO FISICO QUÍMICO

Código Interno L.A.S.	Nombre de Muestra	*782														
		*3015 As	Ag	Al	B	Ba	Be	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K	Li	Mg
		mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
AG21000868	DAM-02	0,0885	^b <0,0024	4,06	0,0309	0,01274	0,000128	3,60	0,00018	0,020897	0,00588	0,0283	6,88	2,04	0,01337	0,9678

Código Interno L.A.S.	Nombre de Muestra	*782														
		Mn	Mo	Na	Ni	P	Pb	Sb	Se	SiO2	Sn	Sr	Ti	Tl	V	Zn
		mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
AG21000868	DAM-02	0,19765	^b <0,00038	3,65	0,04035	0,1261	0,0047	0,00182	^b <0,002	1,385	0,00829	0,0552	0,00228	^b <0,0013	0,00024	0,1393


 Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Omar A. Juárez Soto
 Gerente de Operaciones
 M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114426

Anexo 9. Límites Máximos Permisibles de efluentes minero metalúrgicos.

ANEXO 01

**LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES
PARA LA DESCARGA DE EFLUENTES LÍQUIDOS DE
ACTIVIDADES MINERO - METALÚRGICAS**

Parámetro	Unidad	Límite en cualquier momento	Límite para el Promedio anual
pH		6 - 9	6 - 9
Sólidos Totales en Suspensión	mg/L	50	25
Aceites y Grasas	mg/L	20	16
Cianuro Total	mg/L	1	0,8
Arsénico Total	mg/L	0,1	0,08
Cadmio Total	mg/L	0,05	0,04
Cromo Hexavalente(*)	mg/L	0,1	0,08
Cobre Total	mg/L	0,5	0,4
Hierro (Disuelto)	mg/L	2	1,6
Plomo Total	mg/L	0,2	0,16
Mercurio Total	mg/L	0,002	0,0016
Zinc Total	mg/L	1,5	1,2

Anexo 10. Matriz de consistencia.

PROBLEMATICA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	INDICADORES	METODOLOGÍA
Problema Principal	Objetivo General		Variable Dependiente		
¿Cuál es el efecto de la oxidación bacteriana seguida de una neutralización química en el tratamiento de los drenajes ácidos de minas en la Compañía Minera Ayapata S.A.C.?	Tratar los drenajes ácidos de minas mediante oxidación bacteriana seguida de una neutralización química en la Compañía Minera Ayapata S.A.C.	Es factible tratar los drenajes ácidos de minas mediante oxidación bacteriana seguida de una neutralización química en la Compañía Minera Ayapata S.A.C.	- Drenaje ácido de minas.	Parámetros fisicoquímicos: - pH y potencial redox - Fe, Cu, Pb y Ar	i. Muestreo en la Compañía Minera Ayapata S.A.C. ii. Análisis fisicoquímico (antes del tratamiento) del drenaje ácido de minas. iii. Aislamiento de bacterias del género <i>Thiobacillus Ferrooxidans</i> . iv. Oxidación bacteriana v. Neutralización química. vi. Análisis de resultados
Problemas Específicos	Objetivo Especifico		Variables independientes		
¿Existen consorcios bacterianos <i>T. Ferrooxidans</i> en los drenajes ácido de mina de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.?	Aislar bacterias del género <i>T. ferrooxidans</i> presentes en los drenajes ácido de minas de la compañía minera Ayapata S.A.C.	Es posible aislar bacterias del género <i>T. Ferrooxidans</i> en los drenajes ácidos de mina de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.	- Oxidación bacteriana (<i>Thiobasillus Ferrooxidans</i>) - Neutralización química	- pH y potencial redox - Oxígeno disuelto - Temperatura - pH - Análisis de Fe, Cu, Pb, Ar	
¿Cuáles la capacidad de oxidación bacteriana del género <i>T. Ferrooxidans</i> en muestras de drenajes ácidos de minas de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.?	Determinar la capacidad de oxidación bacteriana del género <i>T. ferrooxidans</i> en muestras de drenajes ácidos de minas de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.	Las bacterias tendrán niveles altos de oxidación en los drenajes ácido de minas.			
¿Cuál es el efecto de la neutralización química en el drenaje oxidado por las bacterias <i>T. Ferrooxidans</i> ?	Evaluar la neutralización química con hidróxido de calcio en el DAM de la Compañía Minera Ayapata S.A.C.	El hidróxido de calcio tendrá un efecto neutralizante de los drenajes ácidos de minas oxidados por las bacterias.	-		



UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA

"Universidad Pública de Calidad"