

Biolixiviación de cobre a partir de Tarjetas de Circuito Impreso utilizando un consorcio mixto de bacterias acidófilas.

Tesis de Pregrado

Presentado por:
Dariana Coral Flórez
Michelle Coral Flórez

Director: Fabio Roldan, Ph. D.
Codirector: Yaneth Vásquez, Ph. D.

Departamento de Microbiología Industrial
Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Bogotá D.C
2021

Tabla de contenido

Índice de figuras	4
Índice de Tablas	5
Resumen	6
Introducción	7
Marco Teórico y Antecedentes	8
1. Composición de los residuos electrónicos.....	8
2. Lixiviación de metales.....	8
2.1 Biolixiviación de metales	8
3. Microorganismos involucrados en la biolixiviación de metales.	10
3.1 Bacterias acidófilas quimiolitotrofos	10
4. Condiciones que afectan la biolixiviación.....	10
4.1 pH.....	17
4.2 Concentración de PCB's.....	17
4.3 Concentración de hierro (II) inicial.	17
5. Drenaje ácido de minas (DAM)	17
6. Estudios previos.....	17
Pregunta de investigación	19
Objetivos.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
Materiales y métodos	19
1. Mantenimiento de los cultivos de enriquecimiento.....	19
2. Selección del cultivo de enriquecimiento con mayor potencial de biolixiviación.	20
3. Preparación de PCB's y concentración inicial de cobre	20
4. Determinación de los parámetros para la biolixiviación.....	20
4.1 Biolixiviación de cobre.....	21
5. Ensayo bajo condiciones seleccionadas.....	22
6. Análisis de datos.....	22
Resultados y Discusión.....	22
1. Mantenimiento de los cultivos de enriquecimiento.....	22
2. Selección del cultivo de enriquecimiento con mayor potencial de biolixiviación.	24

3. Determinación de los parámetros para la biolixiviación.....	26
Conclusiones	30
Agradecimientos.....	31
Bibliografía.....	32
Anexos	35

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos de solubilización de metales. Desmaris (2020).....	10
Figura 2. Coloración de cultivos de enriquecimiento después de 6 días de incubación. El cultivo que se presenta a la derecha es el cultivo de enriquecimiento A, en medio se encuentra en cultivo B y a la izquierda el cultivo C.	23
Figura 3. Bacterias acidófilas vistas en microscopia de fase (100X). Los círculos amarillos encierran las células vistas en el microscopio.....	23
Figura 4. Comportamiento del pH durante 35 días de estudio. Las líneas con triángulos corresponden al cultivo mixto A, con círculos corresponden al cultivo mixto B y con cuadrado al cultivo mixto C. Las barras representan la desviación estándar del promedio de 3 réplicas (n=3).	25
Figura 6. En la derecha se encuentra el diagrama de límites de sistemas biológicos en términos de ORP y pH según Baas Beching (1960) interpolado con el comportamiento de ORP en función del pH de este estudio (izquierda), donde podrían encontrarse las bacterias del cultivo mixto B. . ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 7 . Microscopia de contraste de fase 100X de algas acidófilas..... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 8. Grafica del comportamiento del ORP en función del tiempo de los 9 ensayos. Las barras representan la desviación estándar del promedio de tres replicas.	27
Figura 9. Comportamiento del pH en función del tiempo de los 9 diferentes tratamientos después de 21 días de estudio.	29
Figura 10 . Coloración de los tratamientos ordenados de izquierda a derecha según el aumento de la concentración inicial de hierro (II). la izquierda los tratamientos con concentración de 9 g/L de hierro (II), en el medio los tratamientos con concentración de 12 g/L de hierro (II) y a la derecha los tratamientos con concentración de 15 g/L de hierro (II).	29
Figura 11 . Coloración de los cultivos a los 28 días. La imagen superior izquierda son los cultivos con alta concentración inicial de hierro (II) (15 g/L), la superior derecha son los cultivos con concentración inicial de hierro (II) media (12g/L) y la inferior son los cultivos con concentración inicial de hierro (II) baja (9g/L).....	30
Figura 12. Análisis ANOVA y Tukey se selección del tiempo con mayor ORP.	35
Figura 13 . Análisis ANOVA y Tukey de selección del cultivo mixto con mayor ORP en el tiempo 4 (28 días). Se observan diferencias significativas del cultivo B con respecto a los cultivos A y C.	35

Índice de Tablas

Tabla 1. Revisión bibliográfica utilizada para la selección de parámetros que afecten la biolixiviación...	12
Tablas 2. Parámetros y niveles utilizados en los ensayos de biolixiviación de cobre.....	21
Tabla 3. Organización y combinación de los parámetros y sus niveles utilizados en el ensayo de biolixiviación.....	21

Resumen

Los residuos de circuitos de tarjeta impresos (Printed Circuit Boards) PCB's han aumentado en los últimos años, estos contienen cobre metálico el cual puede ser extraído de forma eco amigable a través de la biolixiviación de cobre. La biolixiviación de cobre es el proceso por el cual se utilizan bacterias acidófilas para la solubilización de cobre proveniente de PCB's. Este trabajo de grado evaluó la biolixiviación de cobre de un cultivo de bacterias proveniente de drenaje ácido de minería (DAM) y los parámetros que podrían ser adecuados para este proceso, a través de la selección de un cultivo de enriquecimiento con mayor potencial de biolixiviación según su potencial de oxidación-reducción (por sus siglas en inglés ORP), y un diseño factorial (por sus siglas en inglés DOE) donde se evaluó el efecto de la combinación de 3 niveles (alto, medio y bajo) y de 2 parámetros (3^2), la concentración inicial de PCB's y la concentración inicial de hierro (II). Se utilizó el pH y el ORP como indicadores de la biolixiviación, donde el pH descendió y el ORP aumentó por la acción de los microorganismos. La concentración inicial de PCB's tuvo un efecto en el pH y el ORP, a mayor concentración inicial de PCB's mayor pH y menor ORP. La concentración inicial de hierro (II) no tuvo un efecto en estos parámetros, pero sí en la posible solubilización de cobre la cual se evaluó cualitativamente por el color verdoso que presentaban los tratamientos, los tratamientos con mayor concentración inicial de hierro (II) presentaron el color verdoso en menor tiempo. Pasados los 28 días de ensayo todos los tratamientos presentaron color verdoso posible indicativo de la solubilización.

Introducción

Los aparatos eléctricos y electrónicos se han vuelto indispensables en la vida cotidiana gracias a su amplia disponibilidad y uso generalizado que ha mejorado las condiciones de vida de la población mundial. Sin embargo, de la misma forma en la que se consumen se desechan, lo que produce los residuos de aparatos eléctricos y electrónicos, o comúnmente conocidos como residuos-e. Según el E-waste monitor (2019), monitor de residuos electrónicos a nivel global fundado por la Asociación Internacional de Residuos Sólidos (AIRS), en el 2019 se produjeron a nivel global 5,6 millones de toneladas (1)(2).

Estos aparatos eléctricos se componen principalmente de circuitos electrónicos impresos (PCBs por sus siglas en inglés, *Printed Circuit Board*), los cuales poseen un 30% de diversos metales en pequeñas cantidades. Según Yazici (2010) (REF) estos metales se pueden extraer por métodos tradicionales, físicos como pirometalurgia y químicos como hidrometalurgia, los cuales producen riesgos en el personal y en el medio ambiente, debido a las altas temperaturas y los reactivos tóxicos utilizados para la extracción de metales como ácidos fuertes (2).

En Colombia, se generaron 300.000 toneladas métricas de residuos-e sólo en el año 2017, de estos residuos solo 20.100 toneladas de los metales pudieron ser recuperados por los métodos tradicionales. Como alternativa a estos métodos tradicionales surgió la biolixiviación de metales, un método efectivo, amigable con el ambiente y de bajo costo. Permite a través del uso de microorganismos, promover la solubilización de metales y facilitar su extracción. Según Bas (2013) (REF), este proceso se basa en las características de oxidorreducción de los diferentes microorganismos, y se ve afectado por condiciones como la temperatura, el pH o la concentración inicial de hierro (II). Entre los microorganismos utilizados para la biolixiviación de metales, se destacan bacterias acidófilas mesófilas como *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* (3).

Al ser la biolixiviación de metales un tema de gran relevancia por su potencial en la reducción de metales PCB's y la biominería (4,5,6), el grupo de investigación de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) se ha enfocado en, establecer diferentes cultivos mixtos de bacterias acidófilas provenientes del drenaje ácido de minas (DAM) de la mina de carbón de Samacá y evaluar el potencial de biolixiviación de cobre presentes en PCBs de estos cultivos mixtos establecidos. (7)

Este trabajo busca evaluar el proceso de biolixiviación de cobre empleando cultivos mixtos de bacterias recolectadas de DAM de la mina de carbón en Samacá, Boyacá. Este proyecto, del grupo de investigación USBA de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), que es financiado por el Ministerio de ciencias y tecnología colombiano, permitirá aportar información sobre los cultivos de enriquecimiento y el proceso de biolixiviación. De esta forma al evaluar la biolixiviación y determinar los parámetros como la concentración de hierro (II) y la cantidad de PCB's inicial, se espera obtener la recuperación de cobre solubles y un proceso de extracción de metales amigable con el medio ambiente.

Marco Teórico y Antecedentes

1. Composición de los residuos electrónicos.

Según el monitor global de residuos electrónicos, los residuos electrónicos son aquellos productos que poseen componentes de circuitos o eléctricos con una fuente de energía asociada como una batería o electricidad. Por ejemplo, los electrodomésticos de cocina, celulares, e impresoras que se desechan son considerados residuos electrónicos. En estos se encuentran PCBs, los cuales están compuestos por una mezcla de plásticos y cerámicas que recubren diferentes metales. Es por esto que estos residuos son considerados una mina urbana, ya que contienen metales como hierro, cobre y oro, de importante valor comercial. Los porcentajes de metales en la composición de los PCBs esta alrededor del 30%, donde del 10-20% es cobre, del 1-3% níquel y otros metales preciosos como plata, platino u oro en un 0,3-0,4%. Por otra parte, también posee otros compuestos como acrílicos, un 19 % de plástico, 4% de bromuro y 49% cerámica. Estos compuestos le confieren a los PCBs una característica alcalina (2)(1)(8).

2. Lixiviación de metales.

Los metales presentes en PCB's pueden ser extraídos a través de su lixiviación. Este es un proceso en el que se extraen componentes insolubles de un sólido utilizando un disolvente, dando como resultado la recuperación de los metales solubles. Estos procesos se pueden realizar por métodos hidrometalúrgicos y biometalúrgicos. La hidrometalurgia consiste en someter el material a una serie de soluciones químicas como agua regia, compuesta por ácido nítrico, ácido fluorhídrico y ácido clorhídrico, las cuales permiten separar y purificar los metales solubles de impurezas. Por otro lado, la biohidrometalurgia se basa en los procesos bioquímicos llevados a cabo por microorganismos capaces de interactuar con metales, esta interacción se da a través de la unión de los microorganismos a los iones metálicos. Este proceso se puede dar mediante dos métodos: la biosorción y la biolixiviación.

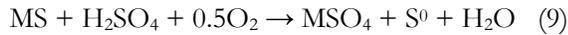
La biosorción, es un proceso de interacción fisicoquímico pasivo entre la superficie cargada de los microorganismos y los iones en solución. Este proceso se puede realizar con los microorganismos vivos y muertos. Por otra parte, la biolixiviación se basa en la acción de microorganismos como catalizadores de reacciones de oxidación. Estos procesos poseen ventajas como el bajo costo, minimiza volumen de químicos o líquidos biológicos que se manejan y posee una alta eficiencia (9).

2.1 Biolixiviación de metales

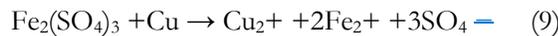
La biolixiviación se basa en la conversión de minerales ó compuestos metálicos insolubles, en compuestos solubles; con microorganismos catalizadores del proceso. Las reacciones químicas se pueden resumir en tres principalmente:

1. Las reacciones de oxidación y reducción de microorganismos.
2. La formación de ácido
3. La extracción de metales de los compuestos (10)(11).

Según Cui (2008) (9) existen dos mecanismos donde los microorganismos promuevan la biolixiviación de metales y minerales. Un mecanismo directo donde el microorganismo oxida directamente un mineral o metal, como se ve en la siguiente ecuación (9).



Otro mecanismo indirecto es la acción de los microorganismos como catalizadores de la oxidación del hierro (II) a hierro (III). El hierro (III) es el agente oxidante importante de los diferentes minerales o metales. Por lo que los microorganismos permiten el reciclaje de este (3)(9).



Cui (2008) (9) concluyo que, en el caso de ambos mecanismos, así como la biosorcpción, que los dos contribuían a la lixiviación de metales.

2.1.1 Solubilización de cobre

La solubilización de cobre se da por diferentes mecanismos como la acidólisis, redoxolisis y la complexolisis (Figura 1).

La acidólisis, es un proceso de solubilización donde los átomos de oxígeno protonados envuelven el compuesto metálico insoluble, dando como resultado la oxidación del compuesto y la solubilización del metal. Los átomos de oxígeno, al estar protonados, pueden interactuar con el agua, promoviendo la liberación del metal de la solución. La protonación del oxígeno solo ocurre en presencia de compuestos ácidos que son producidos por microorganismos. como: ácido acético, ácido cítrico, ácido fórmico, entre otros. También se puede protonar interactuando con ácidos inorgánicos como H_2SO_4 (12).

Por otro lado, la redoxolisis es un proceso de oxidorreducción, donde los compuestos metálicos insolubles son oxidados por un agente oxidante (Fe^{+3}) dando como respuesta su solubilización. En este proceso, el agente oxidante se reduce a su forma reducida (Fe^{+2}) y posteriormente es reciclado u oxidado por las bacterias a (Fe^{+3}). Este mecanismo de reciclaje del Fe^{+3} se realiza por reacciones bioquímicas y químicas con la acción de microorganismos que cambian el potencial de oxido-reducción en la solución (12).

Por último, el proceso de complexolisis es una solubilización inducida por ligando, este ligando producido por los microorganismos y junto a un agente quelante conducen a la liberación de iones metálicos en la solución. (12)

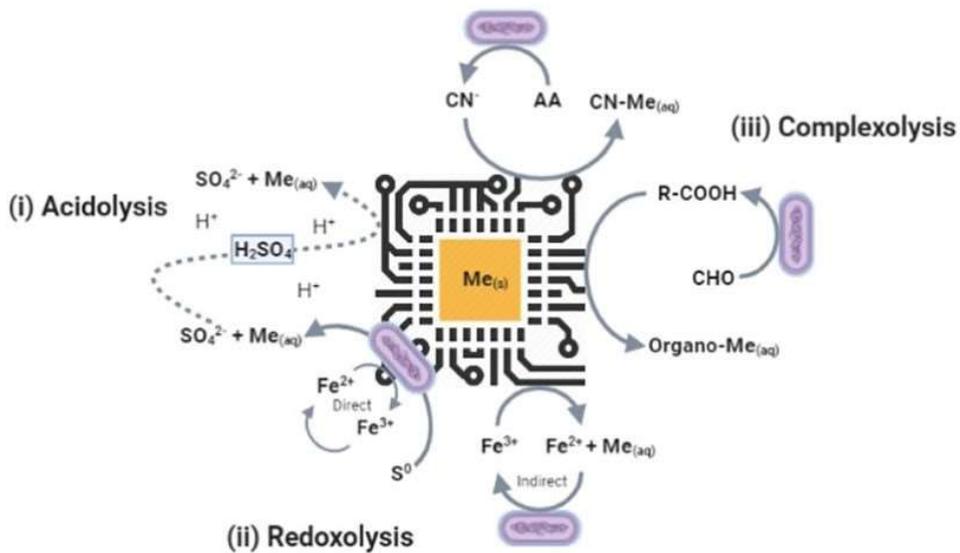


Figura 1. Mecanismos de solubilización de metales. Desmaris (2020)

3. Microorganismos involucrados en la biolixiviación de metales.

Los microorganismos involucrados en la biolixiviación de metales suelen ser bacterias (autotróficas, heterotróficas) y hongos. Las bacterias quimiolitotrofas acidófilas, actúan en mecanismos de acidólisis y redoxólisis; fijan el CO_2 mientras oxidan minerales sulfurados produciendo ácidos y iones férricos. Por otro lado, las bacterias heterótrofas acidófilas metabólicamente reducen el hierro (II), esto incrementa el potencial de oxidorreducción, importante para mecanismos de redoxólisis. Por último, los hongos que al secretar ácidos o ligandos como ácido cítrico, ácido tartárico o ácido oxálico son importantes en los mecanismos de acidólisis y complejólisis (12).

3.1 Bacterias acidófilas quimiolitotrofas.

Las bacterias acidófilas quimiolitotrofas son capaces de usar metales o minerales metálicos como donadores de electrones y el oxígeno como aceptor terminal para la producción energética. La fuente de carbono se obtiene a partir de carbono inorgánico como CO_2 o CO_3^{2-} . Esta oxidación aeróbica del mineral lleva a los metales a lixiviarse a través de los mecanismos mencionados anteriormente. Esto se da en ambientes cuyo pH no es mayor a 3 ya que la diferencia de pH entre el ambiente y el citoplasma de la bacteria genera una fuerza motriz de protones a través de la membrana citoplasmática y es utilizado para obtener energía (ATP) (12) (13).

4. Condiciones que afectan la biolixiviación

Según Jafari (2018) REF, el proceso de biolixiviación puede afectarse por varios parámetros que se catalogan como: fisicoquímicos, microbiológicos, según las propiedades de los minerales y el tipo de proceso. Dentro de los parámetros fisicoquímicos se encuentran el pH, temperatura, potencial de oxidorreducción, contenido de oxígeno y su disponibilidad. Se puede decir que el potencial de oxidorreducción es importante debido a que con él se monitorean las reacciones redox de los microorganismos. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, las bacterias acidófilas se encargan de la oxidación del hierro (II) a hierro (III), este compuesto junto con el oxígeno tiene una correlación alta entre el ORP (9)(10)(11)(12) (13).

Los parámetros microbiológicos que afectan la biolixiviación son la diversidad microbiana, densidad de la población, actividad microbiana, tolerancia a metales y habilidad oxidativa de los microorganismos. Jafari (2018) menciona que la habilidad oxidativa de los microorganismos es esencial para la biolixiviación, pero no aumenta la eficiencia (10) (9).

Las propiedades de los minerales importantes para la biolixiviación son el tipo de mineral, su composición y el tamaño, los cuales podrían contribuir a la inhibición de la actividad bacteriana o a un aumento del pH. Por otra parte, el tipo de proceso, operaciones con biorreactor, las columnas de biolixiviación y la agitación podrían afectar el proceso (10).

Con base a la comparación bibliográfica (Tabla 1) se eligió el pH, concentración de PCBs y concentración inicial de hierro (III) como los parámetros más importantes en la biolixiviación. Los parámetros más adecuados para la biolixiviación son aquellos que según el análisis bibliográfico, tienen el mayor impacto en la biolixiviación de cobre proveniente de PCBs.

Tabla 1. Revisión bibliográfica utilizada para la selección de parámetros que afecten la biolixiviación.

Nombre del artículo	Autores	Referencia	Objetivo	Parámetros y metodología	Resultados	Información relevante en el trabajo de grado
Factores que influncian la biolixiviación de cobre proveniente de residuos de tarjetas de circuito impreso por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Yang, Tao Xu, Zheng Wen, Jiankang Yang, Lim ei	(14)	Evaluar el potencial de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> de obtener metales en solución a partir de tarjetas de circuito	Se evaluó la influencia de la concentración inicial del inóculo, la concentración inicial de Fe (III) y el efecto del pH en el proceso biolixiviación.	1. Entre más concentración de Fe (III), más rápido se la movilización del cobre en la biolixiviación. El ion férrico es importante en el proceso. 2. El pH óptimo del microorganismo es de 1.8-2.5 . 3. Entre más concentración de inóculo, es mayor el porcentaje de la biolixiviación.	1.La biolixiviación de cobre se ve afectada por la concentración de Fe (III) 2.Un pH 2 es óptimo para realizar ensayos de biolixiviación 3.La biolixiviación de cobre se da en tiempos más cortos con mayores concentraciones de inóculo
Efectividad de bacterias reductoras de hierro provenientes de minerales bauxicos	Papassiopi , Nymphodora Vaxevanidou, Katerina Paspaliaris, Ioannis	(15)	Evaluar un tratamiento con bacterias con actividad metabólica de reducción de hierro con un agente quelante como EDTA. Para conocer si puede ser una herramienta efectiva para la remoción de hierro de los mineral bauxicos.	Todos los test fueron llevados en botellas de 125 mL. Se llevo a cabo un tratamiento biótico y uno abiótico de las muestras de minerales bauxicos y de los oxyhidroxidos de hierro sintéticos.	La remoción del hierro fue de un 7% a 29% y la mayor extracción y la más rápida se dio en la muestra que contenía chamosita, compuesto rico en Fe (II). Para los hierros sintéticos la habilidad dependió de la cristalinidad, la ferrohídrita amorfa si disolvió casi en 95% mientras que la gohetita y amatistas cristalinas no excedieron el 9% y 1.2%	1. Se uso un microorganismo reductor de hierro junto con un agente quelante EDTA
Respuesta de la comunidad microbiana a tres de pH	Yuguang Wanga , Kai Lib , Xinhua Chena , Hongbo Zhou,*	(16)	Evaluar la biolixiviación en columnas de cobre de baja calidad en diferentes pH utilizando bacterias mesófilas y termófilas	Se evaluaron 3 diferentes rangos de pH, 1.0-1.5; 1.5-2.0 ,2.0-2.5. Se tuvo en cuenta la densidad celular en función del tiempo de lixiviación. Además, se evaluó la densidad celular y la proporción de diferentes especies en la biolixiviación, así como la dinámica de las comunidades microbianas.	La eficiencia de la biolixiviación y la densidad celular aumentan con la disminución del pH. El pH bajo ayuda a la estabilidad y versatilidad del funcionamiento de las comunidades microbianas y promueve la extracción de cobre.	1. El pH es un factor importante en la biolixiviación de cobre

em
la
bioli
xivi
ació
n de
sulf
atos
de
cobr
e

<p>Biolixiviación en columna de metales a partir de residuos electrónicos</p>	<p>Ilyas, Sadia (17) Ruan, Chi Bhatti, HN Ghauri, MA Anwar, MA Ilyas, Sadia Ruan, Chi Bhatti, HN Ghauri, MA Anwar, M</p>	<p>Evaluar el potencial de cultivos mixtos adaptados a metales de quimiolitmixootrofos acidófilos moderadamente termófilos y heterótrofos acidófilos moderadamente termófilos para solubilizar metales de placas de circuito impreso en un reactor de columna.</p>	<p>Medio de cultivo utilizado FeTSB. Se utilizo un pH 2 <i>S. thermosulfidooxidan acidophilic</i> es un microorganismo heterótrofo, utiliza el mismo medio, pero suplementado con glucosa 1%. Realizaron una adaptación de cultivos análisis de la concentración de metales de las muestras</p>	<p>Porcentajes de recuperación: Zn (80%), Al (64%), <u>Cu (86%)</u> y Ni (74%). Se pueden recuperar de los PCBs mediante lixiviación microbiana utilizando un consorcio adaptado mixto de bacterias moderadamente termofílicas en la biolixiviación de columna. La adaptación mejora en gran medida las tasas de solubilización de los metales.</p>	<p>1. Es posible recuperar el 86% de cobre en biolixiviación en columna 2. Realizar una adaptación de los microorganismos podría mejorar la solubilización de cobre</p>
--	--	--	---	---	---

<p>Biolixiviación de metales provenientes de residuos electrónicos por bacterias acidófilas moderadamente termofílicas</p>	<p>Ilyas, Sadia Anwar, Munir A. Niazi, Shahida B. Afzal Ghauri, M.</p>	<p>(18)</p>	<p>Evaluar el potencial de cultivos puros y mixtos de bacterias moderadamente termófilas <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> y heterótrofos acidófilos A1TSB para solubilizar metales de placas de circuitos impresos, descubrir estrategias para mejorar la recuperación de metales y responder algunas preguntas básicas sobre el pH del medio y el crecimiento de bacterias durante la biolixiviación de metales a partir de desechos electrónicos.</p>	<p>Análisis de las muestras de muestra en 100 mL de cloruro de sodio para muestras lavadas <i>S. thermosulfidooxidans</i> y heterótrofo acidófilo medio FeTSB</p> <p>Adaptación a metales biolixiviación de muestras no lavadas y lavadas presentan concentración de chatarra del 10%, que presentó las mayores tasas de biolixiviación de metales.</p>	<p>No hubo cambios en la concentración de metales de los PCBs antes y después del lavado.</p> <p>Los estudios iniciales de biolixiviación de metales se realizaron con desechos electrónicos sin lavar y cultivos no adaptados. Se observaron fases de retardo de 5 a 7 días.</p> <p>Los metales que tenían concentraciones elevadas se lixivaban a velocidades más altas. Se observaron tasas de lixiviación de metales aún más altas cuando los estudios de biolixiviación se realizaron en presencia de azufre.</p> <p>El cobre exhibió la máxima biolixiviación (89% p/p) mientras que 81%, 79% y 83% de Ni, Al y Zn. La capacidad de biolixiviación de metales de las bacterias estaba asociada con su crecimiento.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. No es necesario un lavado de los PCB's 2. Adaptar los cultivos concentraciones de iones metálicos podría mejorar la biolixiviación 3. Altas concentraciones de cobre podrían lixivarse más rápido 4. La biolixiviación de cobre fue de 89%
---	--	-------------	--	---	--	--

Lixiviación bacteriana de cobre, zinc, níquel y aluminio a partir de residuos de tarjetas electrónicas usando bacterias acidófilas	Volkan Arslan (19)	<p>Estudiar la biolixiviación como una alternativa a la lixiviación química que es usada en la recuperación de metales preciosos como cobre, níquel zinc y aluminio proveniente de PCB's</p> <p>Estudiar el efecto de la biolixiviación usando cultivos y cultivos mixtos de <i>A. ferrooxidans</i> y <i>A. Thiooxidans</i> en la recuperación de metales preciosos provenientes de PCB's</p>	Evaluaron el efecto del pH inicial, concentración de inóculo, densidad de pulpa	<p>Condiciones óptimas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 10% de inóculo • 10% densidad de pulpa • 10 días • 1.8 pH inicial • 30°C • 180 rpm <p>Se obtuvo una biolixiviación de cobre del 94%</p> <p>A mayor densidad de pulpa menos ORP</p> <p>PCB's tienen una naturaleza alcalina</p> <p>A menor pH mayor ORP</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 10% de inóculo es óptimo para biolixiviar 96% de cobre 2. 180 rpm como condición óptima 3. Los cultivos mixtos son más eficientes 4. La biolixiviación es un método eco amigable y económico 5. PCB's tienen una naturaleza alcalina 6. Relación de pH y ORP
Recuperación simultánea de Ni y Cu provenientes de circuitos impresos de computadores usando biolixiviación. Evaluación y optimización estadística	M. Arshad i, S.M. Mousavi (20)	<p>Estudiar un cultivo puro de una bacteria acidófila, <i>A. ferrooxidans</i>, para extraer metales provenientes de circuitos impresos de computadores usando biolixiviación</p> <p>Optimizar valores de pH inicial, tamaño de partícula, densidad de pulpa y concentración de hierro (III) usando RSM para maximizar la recuperación simultánea de cobre y níquel.</p>	Evaluaron pH inicial, concentración de PCB's (densidad de pulpa) concentración de ion ferroso inicial Realizaron un ensayo factorial para evaluar el efecto de los parámetros.	<p>Condiciones óptimas</p> <ul style="list-style-type: none"> • pH 3 • 20 g/L PCB's • 8,4 g/L Fe (III) <p>100% de recuperación de Cobre</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Concentración de PCB's puede inhibir el crecimiento bacteriano y es un parámetro importante en el proceso de biolixiviación.

Biolixiviación de cobre proveniente de tarjetas de circuito impreso por sobrenadante de un cultivo bacterias hierro - sulfuro oxidadas libres	Weijin Wu (21), Xiaocui Liu, Xu Zhang*, Minglong Zhu and Wensong Tan	Estudiar la biolixiviación de cobre provenientes de PCB's utilizando bacterias libres	Evaluaron pH, Eh y concentración de ion ferroso con base a la concentración de PCB's	<ol style="list-style-type: none"> 1. El 100% de cobre fue recuperado en 2 h. 2. 5 g/L de PCB's obtuvo la recuperación de cobre. 3. El mecanismo indirecto de biolixiviación fue el predominante 4. El rol de la bacteria es mayormente reciclar el ion ferroso 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La concentración de PCB's es un parámetro importante en la biolixiviación 2. La biolixiviación puede ser fuertemente inhibida por la concentración de PCB's
Biolixiviación de cobre proveniente de tarjetas de circuitos impresos por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Mohan Anamalai, Kalaichelvan Gurumurthy (22)	Estudiar la biolixiviación de cobre proveniente de tarjetas de circuito impreso por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y determinar las condiciones óptimas para una eficiente biolixiviación	Evalúan efecto del pH inicial, la cantidad de los circuitos impresos, el volumen de inóculo en la biolixiviación de cobre	Pasados 7 días se recuperó la mayor cantidad de cobre. Las condiciones óptimas fueron pH 2.0, 10 g/L de PCB's y 40 % de inóculo <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> es un microorganismo eficiente en la biolixiviación Se biolixivió el 32,44% del cobre	<ol style="list-style-type: none"> 1. PH inicial de 2.25 2. Concentraciones altas de PCB's pueden inhibir la biolixiviación

4.1 pH

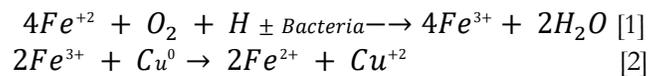
El pH es un factor decisivo en la biolixiviación, ya que define las reacciones químicas que ocurrirán. Según Jafari (2018) un pH ácido es adecuado para la oxidación del hierro y metales en disolución. La mayoría de los metales se recuperan a pH 2 o 2.5. La importancia del pH radica en que, por el mecanismo de acidólisis, donde los protones presentes acidifican el medio, los metales se solubilizan. Por otra parte, el pH menor a 1 disminuye la biolixiviación ya que se retrasa el crecimiento bacteriano y el metabolismo. Por otro lado, un pH mayor a 3 podría inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, resultando en menores porcentajes de metal recuperado (9)(10)(12).

4.2 Concentración de PCB's.

La alta concentración de metales, la naturaleza heterogénea ejerce un impacto negativo sobre el crecimiento bacteriano. Se ha descrito que entre mayor concentración de PCBs la tasa de biolixiviación disminuye y que la concentración optima podría encontrarse entre los 10 y 20 g/L (11) (14). Por otra parte, por composición de los PCBs, entre los cuales se encuentran los vinilos, bromuros y acrílicos (8) tienen por naturaleza un pH alcalino. Esta es otra razón por la cual la concentración de PCBs podría afectar el proceso de biolixiviación (19).

4.3 Concentración de hierro (II) inicial.

La biolixiviación de cobre se da principalmente por un mecanismo de redoxolisis indirecto que envuelve intermediarios como el ion férrico (Fe^{+3}) y el ion ferroso (Fe^{+2}), estos actúan como pares redox oxidando el cobre según las siguientes reacciones.



Durante la oxidación del Fe^{+2} en presencia de protones con las bacterias acidófilas como catalizadoras, se produce Fe^{3+} y agua [ecuación 1]. Posterior sucede la oxidación del cobre, junto con la reducción del Fe^{3+} a Fe^{+2} [ecuación 2], este será utilizado como fuente de energía y reciclado por las bacterias autótrofas acidófilas para su crecimiento mediante su oxidación a Fe^{3+} . Varios autores describen que a mayor concentración inicial de ion ferroso mayor solubilización de cobre, sin igual a concentraciones mayores a 12 g/L la tasa de solubilización de cobre tiende a disminuir (12)(11) (14).

5. Drenaje ácido de minas (DAM)

La minería produce como principal contaminante el drenaje minas, debido a que. Este drenaje puede ser ácido (DAM) en el proceso de perforación y extracción, los minerales sulfurados presentes en el subsuelo tienen contacto con el oxígeno y el agua, generando así un drenaje que se caracteriza por tener un bajo pH (menor a 3) y presencia de metales y sulfatos. El bajo pH genera la solubilización de los metales presentes en el subsuelo, por lo que estos se encuentran en altas cantidades en este drenaje (21). Una característica importante de éste es su color naranja-rojizo, resultado de procesos de oxidación de minerales sulfurados y solubilización del hierro ferroso (Fe^{2+}). Estos procesos, son mediados por bacterias acidófilas presentes en DAM, las cuales se encargan de la oxidación de la pirita (FeS_2) a hierro férrico (Fe^{3+}) soluble. Por lo anterior, las bacterias acidófilas presentes en el drenaje han sido utilizadas en la extracción de metales de interés comercial en procesos de biolixiviación (21).

6. Estudios previos

En 1999 Krebs describió la biolixiviación como un proceso mediado por microorganismos. Mencionó además que se podría utilizar industrialmente en desechos sólidos industriales, o para recuperar metales a partir de materiales sólidos como minerales (23). Un año después, Johnson en un estudio sobre la biodiversidad y ecología de los microorganismos acidófilos, exaltó la importancia de estos en la recuperación de metales (24).

Yang y colaboradores (2008) estudiaron los factores que influenciarían la biolixiviación de cobre a partir de PCBs por *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Evaluaron el efecto del pH, la concentración de iones férricos y la concentración del inóculo. Observaron que el porcentaje de biolixiviación son directamente proporcionales a la concentración de hierro (III) en el medio de cultivo, hasta concentraciones menores a 20 g/L. El pH con el cual se obtuvo una mayor recuperación de cobre fue 1.5 y que a mayor concentración de inóculo mayor cobre recuperado. De esto concluyeron que la concentración de iones férricos y el pH son factores importantes en la biolixiviación y que la presencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* logro la recuperación del 70% de cobre a los 120 h (14).

Adicionalmente Zhu y colaboradores (2011) estudiaron la biolixiviación de metales provenientes de tarjetas de circuito impreso por consorcios de bacterias acidófilas. Se evaluaron los efectos del pH inicial, la concentración inicial de Fe^{2+} , la concentración de PCBs, el tamaño de partícula y la cantidad de inoculación. Obtuvieron que el pH inicial y la concentración de Fe^{2+} jugaron un papel importante en la extracción de cobre y la formación de precipitados. Contrario a los resultados de Yang en 2008, el pH inicial óptimo de los investigadores en 2011 fue de 2 obteniendo una eficiencia de recuperación del 97% de cobre a las 45 h. Adicionalmente mostraron la importancia de otros factores como la concentración de PCBs obteniendo que la mejor concentración fue de 12g/L (25).

La relevante de la concentración de PCBs continuó estudiándose juntos a los otros factores como el pH y concentración de hierro (II), que podrían mejorar la biolixiviación de metales. De esta forma, Arshadi y Mousavi (2014), estudiaron la recuperación simultanea de níquel y cobre de PCBs mediante biolixiviación utilizando *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Identificaron que las condiciones óptimas como pH inicial (3,0) concentración de ion férrico de (8,6 g/L), una densidad de pulpa o contaminante de 20 (g/L) se obtendría el 100% de cobre y níquel (26).

Wang y colaboradores (2017) estudiaron la diversidad microbiana y la biolixiviación a diferentes profundidades de una columna de biolixiviación de cobre a diferentes pH, concluyeron que a menor pH mejoraba la extracción de cobre. Sus resultados coincidieron con los obtenidos por Yang (2008), ya que obtuvieron que a pH entre 1.0-1.5 se obtenía la mayor concentración de cobre disuelto (86%). De igual forma, en este estudio verificaron que son las comunidades microbianas las que bajan el pH durante la biolixiviación y que este factor tiene efectos significativos en los microorganismos tanto del mineral como del lixiviado sin importar la profundidad de la columna. (16)

Finalmente, García (2020), inicio este en la mina de carbón de la empresa Comercializadora Internacional Milpa S.A. ubicada en Samacá. En primer lugar, García recolectó 3 muestras de diferentes sitios con presencia histórica de DAM. Los puntos de muestreo fueron: la piscina de almacenamiento de DAM, el tanque de acumulación de DAM y los lodos de canal de salida del DAM, con el fin de comparar las comunidades microbianas presentes en estos puntos. Posteriormente, estableció a partir de estas muestras, cultivos de enriquecimiento de bacterias acidófilas, las cuales presentaron potencial de biolixiviación, debido a que, además de provenir del drenaje ácido de minas, también, presentaban bajo pH y coloración naranja-rojiza, indicativo del hierro soluble. (7)

Adicionalmente, García seleccionó el medio de cultivo 9k (Silverman y Lundgren, 1959) como el ideal para el rápido crecimiento de estas bacterias. Por último, realizó una revisión bibliográfica, con el fin de identificar los factores que podrían afectar la biolixiviación, determinó que el pH, y

la concentración de PCBs a biolixiviar, eran factores importantes en el proceso de biolixiviación. Lo anterior con el fin de estudiar el proceso de biolixiviación del cobre presente en PCBs utilizando cultivos de enriquecimiento de bacterias acidófilas establecidas de la mina de carbón de Samacá. Este estudio se realizó por aproximadamente 5 meses. (7)

Pregunta de investigación

¿Cuáles son los parámetros más adecuados para maximizar el proceso de biolixiviación de cobre presentes en PCBs, empleando un consorcio de bacterias acidófilas?

Objetivos

Objetivo general

Estudiar los parámetros más adecuados para maximizar en el proceso de biolixiviación de cobre, empleando un consorcio de bacterias acidófilas aisladas del drenaje ácido de minería (DAM) de carbón

Objetivos específicos

- Seleccionar el cultivo de enriquecimiento de bacterias acidófilas que tenga el mayor potencial de biolixiviación.
- Definir las condiciones/parámetros que favorezcan la biolixiviación de Cu
- Evaluar la capacidad de biolixiviación de Cu en PCB por un cultivo mixto de bacterias acidófilas.

Materiales y métodos

1. Mantenimiento de los cultivos de enriquecimiento.

Los 3 cultivos de enriquecimiento de bacterias acidófilas establecidos con muestras de la mina de carbón en Samacá, Boyacá por García (2020) se mantuvieron por transferencias mensuales de 10 mL de inóculo en 100 mL de medio 9K en Erlenmeyer de 250 mL por 2 años. Este medio 9K tenía la siguiente composición: 0.83 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.03 g/L de K_2HPO_4 , 0.083 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y se adicionaron 150 g/L $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada.

Estos cultivos fueron sembrados por García (2020) por triplicado para cada sitio muestreado denominados A, de la piscina de almacenamiento de DAM, B del tanque de acumulación de DAM y C de los lodos de canal de salida del DAM. Se incubaron a 28 °C con 150 rpm y cada 30 días se realizaba transferencia a medio nuevo.

La transferencia mensual se realizó observando que los cultivos cumplieran con la coloración naranja, indicativo de la precipitación de hierro (III), un pH menor a 2 y observando a través de un microscopio de contraste de fases (100X) la viabilidad de las células mediante su movilidad.

2. Selección del cultivo de enriquecimiento con mayor potencial de biolixiviación.

Se evaluó el cambio del potencial de oxido reducción (ORP) de los tres cultivos de enriquecimiento en presencia de pirita como indicativo de la cantidad de reacciones de oxido reducción por la oxidación de la pirita. Para la preparación del inóculo para el ensayo, se tomaron 50 mL de cada una de las réplicas de cada cultivo de enriquecimiento (A, B y C) y se mezclaron obteniendo un volumen final de 150 mL de inóculo de cada cultivo. A partir de cada inóculo se tomaron 10 ml y se llevaron a Erlenmeyer (250ml) con 150 mL de medio 0k (0.025 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01 g K_2HPO_4 , 0.025 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 700 ml Agua destilada). El medio 0K no posee hierro ya que este será aportado adicionando 4.8 g de pirita (FeS_2) (16). Se montaron tres unidades experimentales ($n=3$) por cada cultivo de enriquecimiento (A, B y C). Se ajustó el pH inicial a 1,7 utilizando H_2SO_4 . Estos cultivos se denominaron PA, PB y PC (Pirita y Cultivo de enriquecimiento) y se incubaron durante 30 días a 28°C y 150 rpm.

Se realizaron 4 eventos de muestreo (0, 7, 14, 21, 28), midiendo ORP (mV) y pH con una sonda multiparamétrica (HI 9828: HANNA) la cual fue calibrada con estándares de ORP y pH. En cada muestreo se realizó la observación de microscopia de los cultivos con pirita por microscopia de contraste de fases (100X). (16)

3. Preparación de PCB's y concentración inicial de cobre

Los PCB's fueron triturados por un esmeril en la facultad de Ingeniería y el polvo resultante de la trituración fue recolectado y tamizado (tamiz No. 30 según el Standard testing sieve de 0,6mm) para garantizar un tamaño homogéneo en toda la muestra. Se realizó una digestión ácida de 3 g de los PCB's triturados con 30 mL agua regia compuesta de HNO_3 (67%): HCL (69%) (1: 3) en un vaso de precipitado de 100 mL a 200°C por 2 h en una plancha de calentamiento. Se adicionaron 5 mL del agua regia cada vez que se evaporaba, el volumen resultante fue filtrado con filtros de nylon (WHATMAN) de $2.0 \mu\text{m}$ y 1 mL del filtrado fue diluido en 9 mL de agua desionizada realizando una dilución 1/10. Este procedimiento se realizó por duplicado, con el fin de cuantificar la concentración de cobre inicial en los PCB's, Este cobre soluble fue determinado por un servicio externo de absorción atómica prestado por la Universidad Central siguiendo el método 7000B de la USEPA (por sus siglas en inglés: United States Environmental Protection Agency) que mide la concentración de cobre soluble de 2 a 10 ppm. (18)

4. Determinación de los parámetros para la biolixiviación.

Con base a la búsqueda de literatura (Tabla 1) se identificaron la concentración de PCB's inicial y la concentración de hierro (II) como los parámetros que tenían efecto en la biolixiviación y los cuales se estudiaron. Se realizó un ensayo factorial porque permite evaluar el efecto de varios parámetros utilizando diversas combinaciones de estos. Se realizó un ensayo 3^2 donde se evaluaron 3 niveles (-, 0, +) y 2 parámetros (concentración inicial de PCB's y concentración inicial de hierro (II)). La concentración de cada parámetro para cada nivel se presenta en la tabla 2.

Tablas 2. Parámetros y niveles utilizados en los ensayos de biolixiviación de cobre

Parámetros	Unidades	Nivel (-)	Nivel (0)	Nivel (+)
------------	----------	-----------	-----------	-----------

Concentración de PCB's	g/L	5	10	15
Concentración de hierro (II)	g/L	9	12	15

Se eligieron estos parámetros ya que el hierro (II) es oxidado por los microorganismos acidófilos a hierro(III) el cual es un importante intermediario en la oxidación de cobre y también es fuente de energía para las bacterias que actúan como catalizadores de la biolixiviación de cobre (21), la concentración de PCB's inicial podría llegar a inhibir la actividad microbiana por encima de los 15 g/L (20) (22). Aunque inicialmente se consideró el pH como un parámetro relevante no fue posible establecer medios de cultivos con diferencias de pH de 0,5.

4.1 Biolixiviación de cobre

El ensayo se llevó a cabo en Erlenmeyer (250 mL) con 105 mL de medio OK y 10 mL de inóculo por triplicado (n=3) para cada tratamiento. Se adicionaron 45 mL de una solución de sulfato ferroso el cual aportó el hierro (II) con la concentración indicada en la combinación de parámetros del ensayo factorial (Tabla 3.). Para la concentración inicial de PCB's, de igual forma, se pesó la concentración indicada en la tabla 3 y se adicionó a cada tratamiento según la combinación de los niveles.

Tabla 3. Organización y combinación de los parámetros y sus niveles utilizados en el ensayo de biolixiviación.

Numero de tratamiento	Tratamiento	Nivel de la concentración inicial de PCB's	Nivel de la concentración inicial de hierro (II)
1	AA	+	+
2	AM	+	0
3	AB	+	-
4	MA	0	+
5	MM	0	0
6	MB	0	-
7	BA	-	+
8	BM	-	0
9	BB	-	-

Se incubaron a 28°C por 30 días a 180 rpm y se realizaron 5 eventos de muestreo (0, 7, 14, 21, 28 días). Estos consorcios fueron llamados según la letra que indicaba el nivel de PCB's (A= alto, M= medio y B=bajo) seguido de la letra que indicaba el nivel de la concentración de hierro (III) (A= alto, M= medio y B=bajo) (Tabla 3).

La determinación del cobre soluble se realizó al inicio (t=0), en la mitad del ensayo (t=14) y al final (t=28) tomando 5 mL. Los 5 mL se centrifugaron con 10000 rpm por 5 min, el sobrenadante fue filtrado con filtros de nylon (WHATMAN) de 0,22 µm y a 1 mL de cada volumen filtrado se le adicionó 1 mL de ácido nítrico y 8 mL de agua desionizada. Se realizó la determinación de cobre soluble por absorción atómica empleando el método 7000B de la USEPA (por sus siglas en inglés: United States Environmental Protection Agency) en un laboratorio externo de la Universidad Central.

De igual forma, cada 7 días se midió el ORP (mV) y el pH y se ajustó con ácido sulfúrico (H₂SO₄ a pH 1,8. Adicionalmente, se hizo un seguimiento de los cultivos por microscopia con el fin de verificar la viabilidad de las células al observar movilidad en el microscopio de contraste de fases (100X).

5. Ensayo bajo condiciones seleccionadas

El tratamiento con mayor cobre soluble fue evaluado bajo las mismas condiciones en contraste con un control abiótico. El control abiótico se realizó en Erlenmeyer (250 mL) con un volumen de 112 mL de medio 0K y 48 mL la solución de sulfato ferroso con la concentración de ion ferroso elegido en el ensayo anterior, sin inóculo y con la concentración de PCB's del tratamiento seleccionado en el ensayo anterior.

6. Análisis de datos

Para la selección del cultivo de enriquecimiento con mayor potencial de biolixiviación se compararon los valores de ORP utilizando una prueba de análisis de varianza (ANOVA) y comparadas sus medias con la prueba TUCKEY (p<0,005).

El efecto de los 9 tratamientos planteados se comparó utilizando la prueba de análisis de varianza ANOVA factorial de dos factores (p<0,005). Los datos tuvieron un comportamiento de varianza homogéneo y para establecer la diferencia significativa entre los datos se usó un intervalo de confianza del 95% en todas las pruebas.

Resultados y Discusión

1. Mantenimiento de los cultivos de enriquecimiento.

Después de 3-4 días de incubación de los cultivos de enriquecimiento, se observó el cambio de color a marrón-naranja (Figura 1), indicativo de la oxidación del hierro (II) a hierro (III) presente en el sulfuro de hierro (FeSO₄) por el metabolismo bacteriano [Ecuación 3] (14)(21)(27). Estos resultados coinciden con los presentados por García (2020) donde después de una semana de incubación de los cultivos de enriquecimiento, se observó una coloración naranja (7).



Misari (2016) menciona que la oxidación del Fe (II) también puede darse en presencia de oxígeno; sin embargo, los tiempos cortos de oxidación (3-4 días) son indicativo de la acción bacteriana como catalizadores de esta oxidación. (28)(14). Por otra parte, después del tiempo de incubación hubo diferencias entre los cultivos. Los cultivos de enriquecimientos A (Figura 1) tomaron una coloración amarilla por el precipitado con bastante turbidez, mientras que los cultivos B tuvieron menor turbidez y además presentaban una coloración de precipitado más rojiza y por ultimo los cultivos C tuvieron una coloración de precipitado más anaranjada con poca turbidez, esto probablemente se debe a los 3 diferentes puntos de los cultivos en la mina de carbón. Estos cultivos de enriquecimiento llevan en mantenimiento alrededor de dos años y su pH se ha mantenido por debajo de 2.



Figura 2. cultivo de enriquecimiento A, en medio se encuentra en cultivo B y a la izquierda el cultivo C.

Por otra parte, en la microscopía de contraste de fase se observaron bacilos individuales móviles (Figura 2). Estos resultados concuerdan con los resultados de García (2020) quien también realizó una microscopía de contraste de fase (100x) y observó el crecimiento de bacterias bacilares y cocos (7). Por otra parte, los resultados de Gonzales (2020) quien utilizó un cultivo de enriquecimiento aislado del mismo DAM de este estudio, realizó una ampliación y un análisis secuencial del gen ribosomal 16S donde estudio los microorganismos acidófilos del DAM de la mina de carbón de Samacá, y observó células individuales alargadas con un tamaño de célula de $0.392 \mu\text{m}$, e identificó la presencia de bacterias quimiolitotrofas oxidadoras de hierro *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus ferrophilus* (29). De igual forma, Misari (2016) describe la morfología de *Acidithiobacillus ferrooxidans* como células en forma bacilar con flagelo polar, gram negativas, no formadoras de esporas (28). En este estudio no se realizó tinción de gram a los consorcios debido a que los precipitados de hierro no permitieron observar la coloración de las bacterias.

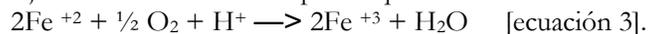


Figura 3. Bacterias acidófilas vistas en microscopía de fase (100X). Los círculos amarillos encierran las células vistas en el microscopio.

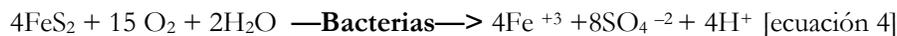
2. Selección del cultivo de enriquecimiento con mayor potencial de biolixiviación.

Durante el ensayo se realizó monitoreo del ORP y pH. El comportamiento del pH descendió en los primeros 21 días a 2.5 después de esto, se mantuvo en este pH hasta el día 28 y posteriormente descendió nuevamente a un pH 2. El pH se ajustó cada semana a 1.8 para favorecer las reacciones de oxidorreducción (3). Según Bas (2013) la adición de H₂SO₄ es necesaria debido a que en la biolixiviación consume o requiere acidez [ecuación 3], por lo que si el pH no se controla durante el proceso, este aumentaría continuamente (3). Es por esto, aunque se ajustó el pH a 1.8 con

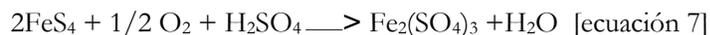
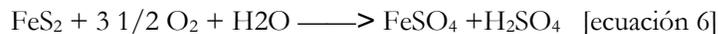
en cada tiempo de muestreo, 7 días después este aumentaba hasta que hubo un pH de 2.5 en el día 21. Además, la estabilización del pH a 1.8 es necesario para asegurar una alta eficiencia en la biolixiviación (14). Todos los tratamientos al día 21 terminaron en un pH de 2.5 esto pudo deberse a que la calibración del pH metro no estaba ajustada a medios ácidos por lo que este no leía datos menores a pH 2.



Adicionalmente Bas (2013) estudió el efecto del uso de la pirita, y observo que esta es usada como fuente de hierro y además como una fuente de ácido, ya que la oxidación de la pirita produce protones, lo que genera acidez en el medio. [ecuación 4 y 5]. Esto no concuerda con los resultados debido a que, en el ensayo, aunque se utilizó la pirita como fuente de hierro y se ajustó el pH semanalmente a 1.8, este seguía incrementando 7 días después del ajuste. Por otro lado, en el tiempo 21 el pH solo aumentaba hasta 2,5, lo que puede ser un indicativo de la reacción de oxidación de la pirita. (3) Este aumento del pH se puede deber a que en el proceso de trituración con el esmeril se dificulto la especificidad de polvo triturado al momento de la recolección. Por lo que es posible que en este proceso se hayan recolectado otros compuestos que pudieran contener carbonatos lo que habría aumentado el pH.



Por otro lado, la disminución del pH concuerda con Misari (2016) ya que, el pH disminuye a través del tiempo como indicativo del crecimiento y la actividad microbiana. Como se muestra en las siguientes reacciones:



La primera reacción es catalizada por microorganismos acidófilos, donde a partir de la pirita se produce sulfato ferroso (FeSO₄) y ácido sulfúrico (H₂SO₄) este compuesto acidifica el medio, y es producido como indicativo del crecimiento de microorganismos acidófilos, posteriormente en la ecuación 7 el compuesto azufrado (2FeS₄) se oxida por la acción de los microorganismos para producir sulfato férrico (Fe₂(SO₄)₃) que luego será oxidado nuevamente a S⁰ en una reacción química que no requiere microorganismos (ecuación 8). El S⁰ es utilizado como fuente de energía por los microorganismos acidófilos en una reacción de oxidación formando ácido sulfúrico (H₂SO₄) acidificando aún más el medio (28).

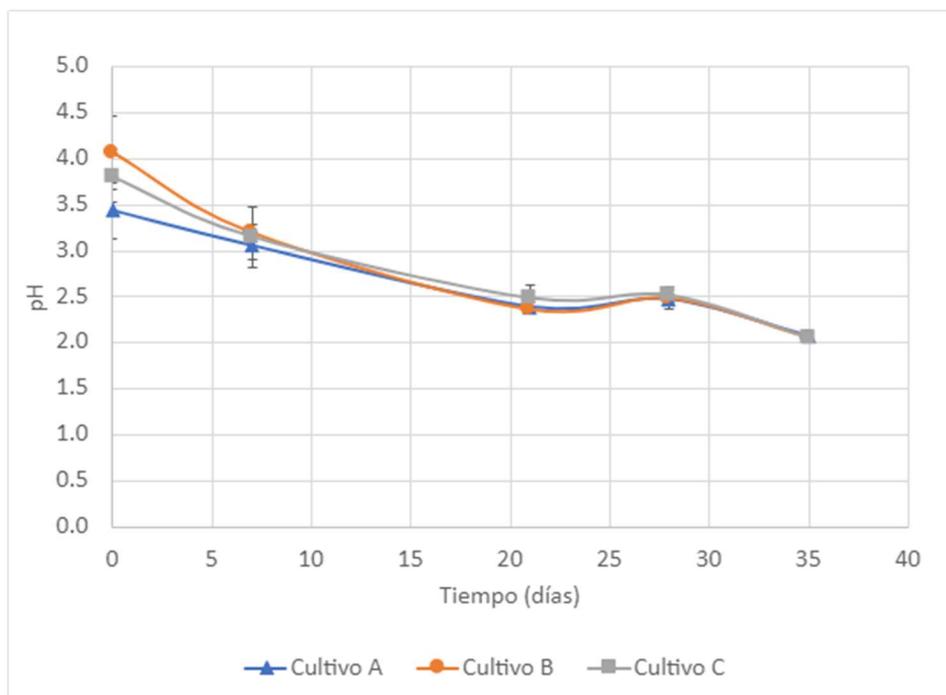


Figura 4 Comportamiento del pH durante 35 días de estudio. Las líneas con triángulos corresponden al cultivo mixto A, con círculos corresponden al cultivo mixto B y con cuadrado al cultivo mixto C. Las barras representan la desviación estándar del promedio de 3 réplicas ($n=3$).

De forma contraria, el ORP inicial de los cultivos estuvo cerca de 120-150 mV e incremento a más de 600 mV a los 28 días y posteriormente se puede observar un ligero descenso en los 35 días (Figura 4). Se observó un incremento significativo del ORP durante el estudio ($p \leq 0,05$). Por esta razón, se seleccionó el cultivo mixto B, ya que este presentó diferencias significativas frente a los otros dos consorcios en el día 28 (ANOVA, $p \leq 0,05$ y Tukey). El día de muestreo 21 se seleccionó para el análisis de varianzas debido a que en él se presenta los mayores datos de ORP, indicativo de la oxidación de la pirita por parte de los microorganismos. (Anexos 1 y 2).

El aumento del ORP según Desmaris (2020) y Sajjad (2018) se debe a que las bacterias autotróficas acidófilas oxidan el hierro (II) a hierro (III), donde a mayor cantidad de hierro (II) en el medio mayor cantidad de hierro (III) se producirá, es decir, que a partir de la oxidación de la pirita (Fe_2S) habrá mayor cantidad de hierro (III) que puede ser reducido. Esta reacción es la que aumentan el ORP ya que hay más hierro (III) que será reducido, y gracias a eso habrá una mayor cantidad de reacciones de oxido reducción (14) (29).

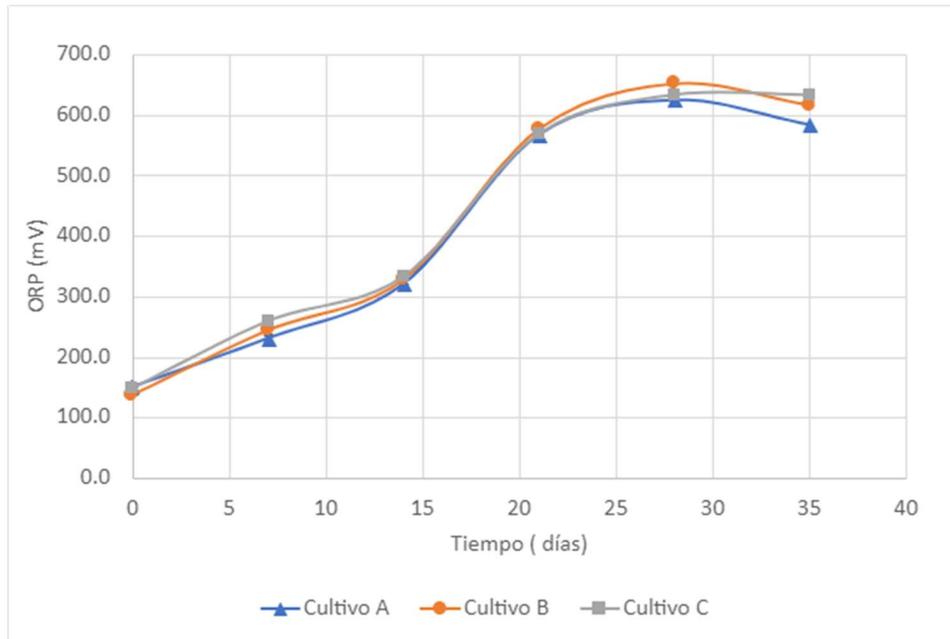


Figura 5. Comportamiento del ORP durante 35 días de estudio. La línea con triángulo representa el cultivo de enriquecimiento A, la línea con círculos representa el cultivo B y la línea con cuadrados representa el cultivo C. Las barras representan la desviación estándar del promedio de 3 réplicas ($n=3$).

3. Determinación de los parámetros para la biolixiviación.

Los resultados del ORP a través del tiempo se presentan en la figura 7. Todos los tratamientos comenzaron con un ORP de 350 a 400 mV. Pasados 7 días de incubación los tratamientos con baja concentración de PCB's inicial, el tratamiento 7, 8 y 9 (BA, BM, BB), tuvieron un ORP mayor a 500 mV. Mientras que los que tenían alta o media concentración de PCB's a los 7 días presentaron un ORP menor a 300 mV, exceptuando el tratamiento 5 (MM) que tiene concentración inicial media de PCB's y tuvo un comportamiento similar a los de concentración inicial baja de PCB's. A los 14 días de ensayo todos los tratamientos aumentaron el ORP, el tratamiento que tuvo un mayor aumento fue el número 6 (MB) que aumento más de 300 mV, los demás tratamientos aumentaron entre 50 y 100 mV. A los 21 días en los tratamientos con baja concentración de PCB's, 7, 8, 9 (BA, BM, BB) y el 6 (MM) se estabilizo el ORP, mientras que los tratamientos 2 y 3 (AM y AB) los cuales tenían alta concentración de PCB's aumentaron

más de 300 mV, al igual que el tratamiento 4 (MA). Por otro lado, del tiempo 21 al 28 el ORP del tratamiento número 1 (AA) se mantuvo estable en un ORP no mayor a 350 mV.

Tabla 4. Comportamiento de los tratamientos con baja concentración de de PCB's

# de tratamiento	Tratamiento	[] de PCB's	[] de Fe (II)	7 días	14 días	21 días
7	BA	-	+	502,9	569,2	611,0
8	BM	-	0	555,8	599,1	622,3
9	BB	-	-	547,9	617,3	633,1

Estos resultados son similares a realizados por Arslan (2021) donde evaluó el efecto en el ORP de un cultivo de *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* a diferentes concentraciones de PCBs, observo el incremento del ORP con concentraciones de PCBs menor a 10 g/L, esto es debido a la oxidación del hierro (II) a hierro (III) indicativo de la actividad de bacterias acidófilas que utilizan el hierro (II) como fuente de electrones para su crecimiento y metabolismo (19). Por otro lado, Los resultados de los cuatro tratamientos que disminuyeron el ORP en el día 7, los cuales tienen concentraciones de PCB's entre 10 a 15 g/L, concuerdan con el estudio de Arslan (2021), donde determino que las concentraciones menores a 10 g/L eran eficientes para la oxidación de Fe^{+2} y contribuían a valores altos de ORP así como a la disolución de metales, mientras que concentraciones mayores a 10 g/L podrían inhibir la actividad de las bacterias acidófilas debido al incremento del pH que eran causadas por las concentraciones altas de PCBs en el medio (19). Por otra parte, los resultados permiten observar que no hay una diferencia entre el ORP a diferentes concentraciones de ion ferroso. Adicionalmente, Desmaris (2020) explica que el incremento del ORP se da por la acción de los microorganismos acidófilos los cuales reciclan el hierro (II) y el hierro (III) por lo que al ser un indicativo de la actividad microbiana puede ser usado como monitor del progreso de la biolixiviación (14)

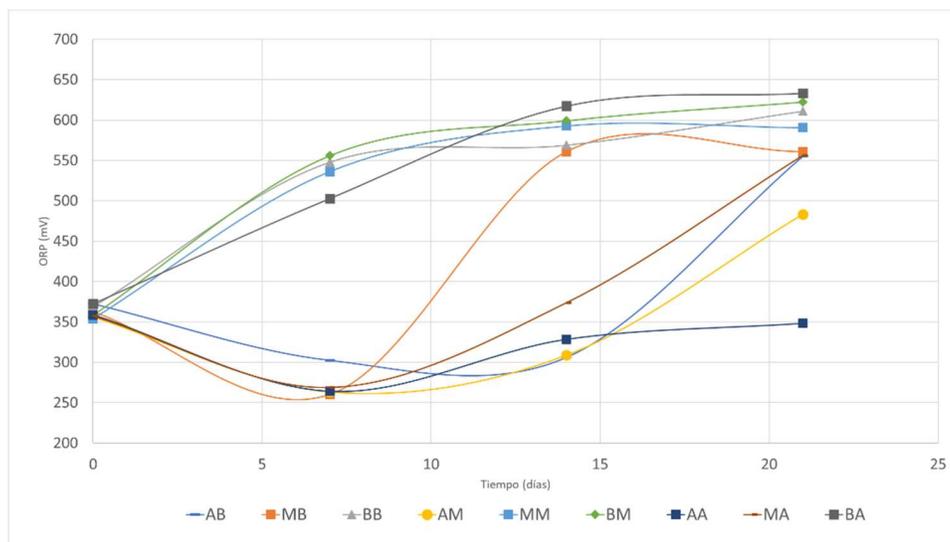
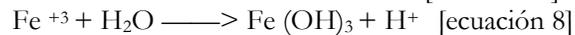
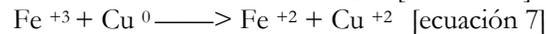
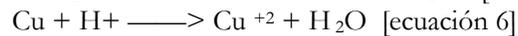
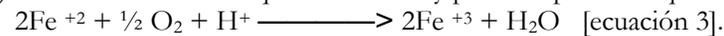


Figura 6. Grafica del comportamiento del ORP en función del tiempo de los 9 ensayos. Las barras representan la desviación estándar del promedio de tres replicas.

Por otro lado, se monitoreo el pH a lo largo del ensayo ajustándolo en cada evento de muestreo a pH 2. Se observo un comportamiento similar en todos los tratamientos ya que hubo un aumento del pH en todos los tratamientos a los primeros 7 días de incubación y posteriormente hubo un ligero descenso a menos del 1.8. Los tratamientos que tuvieron un mayor incremento del pH (>2,5) fueron los tratamientos 1, 2, 3, 4, 5, 6, son aquellos que tuvieron una concentración de PCB's alta o media. Contrario a lo anterior, los tratamientos 7, 8, 9, los cuales tenían concentraciones bajas de PCBs tuvieron un pH menor a 2 durante todo el ensayo.

Xiang (2010) explica el comportamiento del aumento inicial y posterior descenso del pH en todos los tratamientos. Se debe a la reacción de oxidación del hierro (II) a hierro (III) por las bacterias, ya que esta reacción consume acido [ecuación 3]. Simultáneamente, los protones son parcialmente consumidos por el cobre en una oxidación natural, sin un agente oxidante como el hierro (III) [ecuación 6]. Posteriormente, el hierro (III) producido de la oxidación del hierro (II) oxida el cobre de forma espontanea [ecuación 7] o se acumula, esta acumulación hace que el hierro (III) en presencia de agua se hidrolice, dando como resultado e hidróxido de hierro (Fe (OH)₃) junto con protones [ecuación 8] (30). Estas reacciones explican el comportamiento del pH durante los primeros 7 días y los días posteriores, donde el hierro (III) se hidroliza debido a que se acumula y produce protones que disminuyen el pH.



El comportamiento de los 7 primeros tratamientos es debido a que según Arslan (2012) los PCB's tienden a tener una naturaleza alcalina lo que explica el aumento de pH en los tratamientos con concentraciones mayores de 5 g/L de PCB's (19). Adicionalmente, Bas (2013) estudio el consumo de ácido de las reacciones dependiendo de la concentración de hierro (II) y observo que entre mayor concentración de hierro (II) hubo un mayor consumo de ácido, por lo que incrementa el pH. Estos resultados concuerdan con los de este estudio ya que los tratamientos con niveles altos y medios de hierro (II) como 1, 2, 4, 5 aumentaron su pH en los primeros 7 días (3).

La concentración de PCB's, tiene un efecto en el pH ya que en los tratamientos 7, 8, y 9, con concentraciones bajas de PCB's (5 g/L), tuvieron un pH menor a 1,8. Adicionalmente estos tres tratamientos concuerdan con las afirmaciones de Arslan (2012) donde el ORP incrementa con la formación de ácido sulfúrico ya que un medio ácido aumenta las reacciones de oxido reducción del hierro (II). Al igual que en el tratamiento MB donde simultáneamente entre el muestreo de la semana 1 y 2 el pH disminuye drásticamente y el ORP aumenta significativamente. (19)

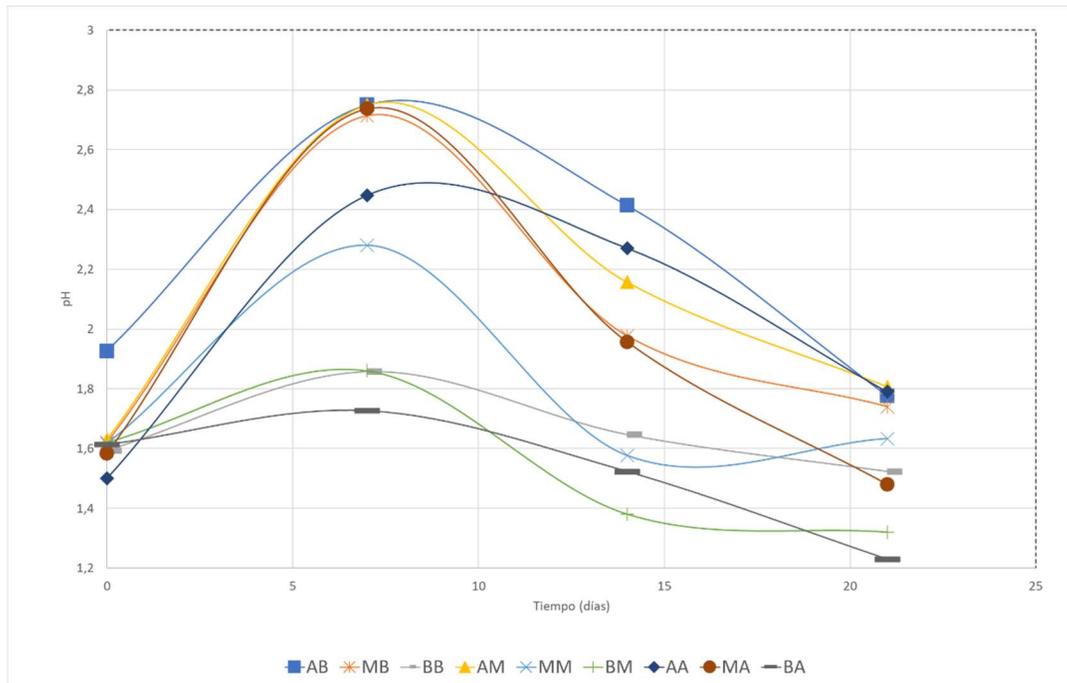


Figura 95. Comportamiento del pH en función del tiempo de los 9 diferentes tratamientos después de 21 días de estudio.

Con base a la relación del pH y el ORP, se observó un aumento de ORP en pH menor a 2 y al aumentar el pH el ORP disminuía. Esto se debe a la acumulación de hierro (III) que se explica en la ecuación 8 donde entre el hierro (III) se produce en exceso aumentando el ORP ya que es un compuesto potencialmente reducible. De igual manera el hierro (III) se hidroliza en presencia de agua produciendo protones (H^+) los cuales disminuyen el pH. (30)

En la biolixiviación de cobre los resultados fueron cualitativos con base a la coloración del medio debido al tiempo límite del ensayo. Los cultivos con alta concentración de hierro (II) a los 14 días presentaron coloraciones azuladas verdosas mientras que los demás tratamientos presentaban coloraciones naranjas. Según Lei (1995) el color del cobre soluble es verde por lo que es probable que en los tratamientos donde la concentración inicial de hierro (II) era de 15 g/L se haya dado biolixiviación de cobre a los 14 días del ensayo. (31)



Figura 10 6. Coloración de los tratamientos ordenados de izquierda a derecha según el aumento de la concentración inicial de hierro (II). la izquierda los tratamientos con concentración de 9 g/L de hierro (II), en el medio los tratamientos con concentración de 12 g/L de hierro (II) y a la derecha los tratamientos con concentración de 15 g/L de hierro (II).

Por otro lado, a los 28 días todos los tratamientos presentaron coloración verdosa (Figura 11), lo que podría indicar que las bacterias recolectadas de DAM podrían biolixiviar cobre a los 28 días bajo cualquier

tratamiento y que altas concentraciones iniciales de hierro (II) hacen más eficiente el proceso de biolixiviación. Sin igual, para poder afirmar esto son necesarios los datos cuantitativos de sobre soluble. (31)



Figura 11.7. Coloración de los cultivos a los 28 días. La imagen superior izquierda son los cultivos con alta concentración inicial de hierro (II) (15 g/L), la superior derecha son los cultivos con concentración inicial de hierro (II) media (12g/L) y la inferior son los cultivos con concentración inicial de hierro (II) baja (9g/L).

En cuanto a la relación de la coloración de los tratamientos con el ORP y el pH, los cultivos con menor ORP el número 1 y 4 (AA y MA) a los 14 días ya tenían coloración verdosa por lo que es posible que hubiera biolixiviación. Esto indica que el ORP podría no ser un indicativo de la solubilización de cobre. Estos resultados concuerdan con Arslan (2021) nuevamente en el estudio donde evaluó el efecto en el ORP de un cultivo de *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* a diferentes concentraciones de PCBs, en los tratamientos número 2 y 3 (AM y AB) obtuvo que a mayor ORP mayor extracción de cobre, Estos cultivos presentaron coloración verdosa al día 28, sin embargo, no al día 14 y en este intervalo de tiempo el aumento de su ORP en casi 300mV (19). Por otro lado, concuerdan con los resultados de Bakhtiari (2011) en un estudio sobre la cinética de la biolixiviación de cobre donde concluye que los microorganismos pueden solubilizar cobre sin incrementar el ORP como podría pasar en el tratamiento número 1 (AA) o los tratamientos con baja concentración inicial de hierro (II) donde no presentaron coloración verdosa al día 14 pero si al día 28, y durante estos días no aumentaron su ORP. (32)

Conclusiones

El cultivo de enriquecimiento B tuvo mayor potencial de biolixiviación donde se encontraron bacterias bacilares probablemente del género *Acidithiobacillus sp.*

Adicionalmente la disminución del pH y el aumento del ORP son indicativos del crecimiento y metabolismo bacteriano, un menor pH está relacionado con la producción de ácido sulfúrico y un mayor ORP está relacionado con un aumento en las reacciones de oxidorreducción en el medio.

En cuanto al comportamiento del ORP y el pH en la determinación de los parámetros para la biolixiviación, las concentraciones iniciales de PCB's mayores a 10 g/L aumentan el pH, el cual luego disminuye por la acción de los microorganismos. La concentración inicial de hierro (II) no tiene efecto en el ORP y pH, pero probablemente en la biolixiviación de cobre sí ya que tiene relación con el color verdoso el cual podría ser indicativo de la solubilización en el medio.

Es necesario comparar los resultados obtenidos con resultados cuantitativos de la solubilización de cobre para poder confirmar que las bacterias de DAM son capaces de biolixiviar cobre proveniente de PCB's.

Agradecimientos

Agradecemos a nuestro director de tesis Fabio Roldan por su apoyo y paciencia durante todo este proceso, así como a nuestra codirectora Yaneth Vásquez por su compromiso y aportes de conocimiento a este trabajo. Así mismo, agradecemos a nuestra evaluadora Gina López por tomarse el tiempo de leer este trabajo y asesorarnos con el mismo. Por otra parte, agradecemos a la estudiante de pregrado Anne Tarazona por su ayuda en este trabajo.

Por último, agradecemos a nuestros padres de familia por apoyarnos durante todo este proceso.

Bibliografía

1. Forti, V. (2020). Observatorio mundial de los residuos electrónicos. Cantidades, flujos y potencial de la economía circular.
2. Yazici, E. (2010). Characterisation of Computer Printed Circuit Boards for Hazardous Properties and Beneficiation Studies
3. Bas, A. D., Deveci, H., & Yazici, E. Y. (2013). Bioleaching of copper from low grade scrap TV circuit boards using mesophilic bacteria. *Hydrometallurgy*, 138, 65–70.
4. Duarte, P. G., Caicedo, G. A., & Márquez Godoy, M. A. (2020). Early reprecipitation of sulfate salts in coal biodesulfurization processes using acidophilic chemolithotrophic bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(6). doi:10.1007/s11274-020-02855-w.

5. Caicedo, G. A., & Marquez, M. A. (2010). Selection procedures of consortia bacterial with *A. ferrooxidans* like bacteria and *A. thiooxidans* like bacteria in coal biodesulfurization process. *Rev.fac.ing.univ. Antioquia* [online]. n.52, pp.88-94. ISSN 0120-6230.
6. Caicedo, G. A., & Marquez, M. A. (2016). Differences between the use of ferric sulphate and ferric chloride on biodesulfurization of a large coal particle. *DYNA*, 83(197), 74-80.
7. Garcia, L. (2020). Uso de bacterias acidófilas presentes en el drenaje ácido de minas (DAM) para la biolixiviación de cobre presente en placas de circuito impreso.
8. Forti, V., Baldé, C. P., Kuehr, R., & Bel, G. (2020). The Global E-waste Monitor 2020 (Issue July). <http://ewastemonitor.info/>
9. Cui, J., Zhang L. (2008). Metallurgical recovery of metals from electronic waste: A review. Vol. 158, *Journal of Hazardous Materials*. p. 228–56.
10. Jafari, M., Abdollahi, H., Shafaei, S. Z., Gharabaghi, M., Jafari, H., Akcil, A., & Panda, S. (2019). Acidophilic bioleaching: A Review on the Process and Effect of Organic–inorganic Reagents and Materials on its Efficiency. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*, 40(2), 87–107.
11. Priya, A., & Hait, S. (2017). Comparative assessment of metallurgical recovery of metals from electronic waste with special emphasis on bioleaching. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(8), 6989–7008.
12. Desmarais, M., Pirade, F., Zhang, J., & Rene, E. R. (2020). Biohydrometallurgical processes for the recovery of precious and base metals from waste electrical and electronic equipments: Current trends and perspectives. *Bioresource Technology Reports*, 11(May), 100526.
13. Jerez, C. A. (2019). Bioleaching and biomining for the industrial recovery of metals. In *Comprehensive Biotechnology* (pp. 758–771). Elsevier.
14. Yang, T., Xu, Z., Wen, J., & Yang, L. (2009). Factors influencing bioleaching copper from waste printed circuit boards by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 97(1–2), 29–32.
15. Papassiopi, N., Vaxevanidou, K., & Paspaliaris, I. (2010). Effectiveness of iron reducing bacteria for the removal of iron from bauxite ores. *Minerals Engineering*, 23(1), 25–31.
16. Wang, Y., Li, K., Chen, X., & Zhou, H. (2018). Responses of microbial community to pH stress in bioleaching of low grade copper sulfide. *Bioresource Technology*, 249(July 2017), 146–153.
17. Ilyas, S., Ruan, C., Bhatti, H. N., Ghauri, M. A., & Anwar, M. A. (2010). Hydrometallurgy Column bioleaching of metals from electronic scrap. *Hydrometallurgy*, 101(3–4), 135–140.

18. Ilyas, S., Anwar, M. A., Niazi, S. B., & Afzal Ghauri, M. (2007). Bioleaching of metals from electronic scrap by moderately thermophilic acidophilic bacteria. *Hydrometallurgy*, 88(1–4), 180–188.
19. Arslan, V. (2021). Bacterial leaching of copper, zinc, nickel and aluminum from discarded printed circuit boards using acidophilic bacteria. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 23(5), 2005–2015.
20. Arshadi, M., & Mousavi, S. M. (2014). Simultaneous recovery of Ni and Cu from computer-printed circuit boards using bioleaching: Statistical evaluation and optimization. *Bioresource Technology*, 174, 233–242.
21. Wu, W., Liu, X., Zhang, X., Zhu, M., & Tan, W. (2018). Bioleaching of copper from waste printed circuit boards by bacteria-free cultural supernatant of iron–sulfur-oxidizing bacteria. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1).
22. Annamalai, M., & Gurumurthy, K. (2019). Enhanced bioleaching of copper from circuit boards of computer waste by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Environmental Chemistry Letters*, 17(4), 1873–1879.
23. Krebs, W., Brombacher, C., Bosshard, P. P., Bachofen, R., & Brandl, H. (1997). Microbial recovery of metals from solids. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3–4), 605–617.
24. Johnson, D. B. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, 27(4), 307–317.
25. Zhu, N., Xiang, Y., Zhang, T., Wu, P., Dang, Z., Li, P., & Wu, J. (2011). Bioleaching of metal concentrates of waste printed circuit boards by mixed culture of acidophilic bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 192(2), 614–619.
26. Arshadi, M., & Mousavi, S. M. (2014). Simultaneous recovery of Ni and Cu from computer-printed circuit boards using bioleaching: Statistical evaluation and optimization. *Bioresource Technology*, 174, 233–242.
27. Sajjad, W., Zheng, G., Zhang, G., Ma, X., Xu, W., & Khan, S. (2018). Bioleaching of copper- and zinc-bearing ore using consortia of indigenous iron-oxidizing bacteria. *Extremophiles*, 22(6), 851–863.
28. Misari, S. (2016) *Tecnología de la Lixiviación Bacteriana de Minerales*. Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería.
29. Gonzales, V. (2020) *Recovery of schwertmannite from mine acid drains using acidophilic microorganisms*. Universidad Central.
30. Xiang, Y., Wu, P., Zhu, N., Zhang, T., Liu, W., Wu, J., & Li, P. (2010). Bioleaching of copper from waste printed circuit boards by bacterial consortium enriched from acid mine drainage. *Journal of Hazardous Materials*, 184(1–3), 812–818.
31. Lei, G. D., Adelman, B. J., Sárkány, J., & Sachtler, W. M. H. (1995). Identification of copper(II) and copper(I) and their interconversion in Cu/ZSM-5 De-NO_x catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 5(3), 245–256.

32. Bakhtiari, F., Atashi, H., Zivdar, M., Seyedbagheri, S., & Fazaelipoor, M. H. (2011). Bioleaching kinetics of copper from copper smelters dust. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 17(1), 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2010.10.005>

Anexos

Anexo 1. Análisis estadístico de selección del tiempo de cultivo con mayor potencial de ORP

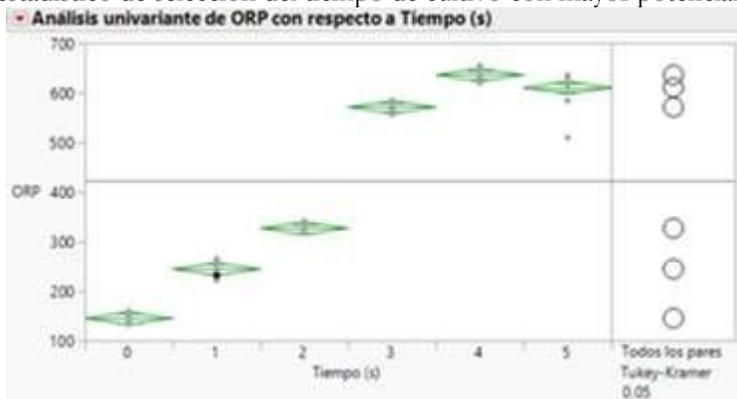


Figura 128. Análisis ANOVA y Tukey se selección del tiempo con mayor ORP.

Se seleccionó el tiempo 4 (día 28) para la comparación entre cultivos de enriquecimiento ya que en este tiempo hubo los valores de ORP. Se puede observar junto al análisis ANOVA, el análisis Tukey - Kramer que permite comparar las medias en el día 28.

Anexo 2. Análisis estadístico de selección del cultivo mixto con mayor potencial de ORP.

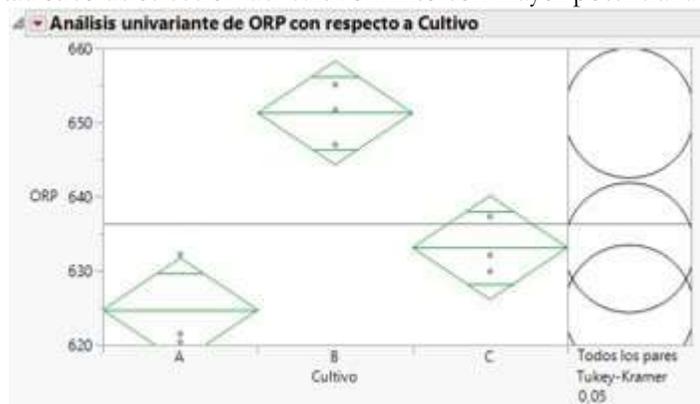


Figura 13 9. Análisis ANOVA y Tukey de selección del cultivo mixto con mayor ORP en el tiempo 4 (28 días). Se observan diferencias significativas del cultivo B con respecto a los cultivos A y C.

Posteriormente, se realizó un análisis ANOVA y Tukey - Kramer para comparar las medias entre los valores de ORP de cada cultivo de enriquecimiento en el día 28 (tiempo 4). Se puede observar que el cultivo de enriquecimiento B posee diferencias significativas ($p \leq 0,05$) junto a los otros dos consorcios.