



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y
CONSERVACION**

TESIS

**Evaluación de cepas de *Bacillus licheniformis* y
Acinetobacter radioresistens como un tratamiento previo
a la lixiviación de un concentrado de plomo.**

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biodiversidad y
Conservación

PRESENTA

Anette Dezha Bomaye

Directora

Dra. Sylvia Martínez Hernández

Codirector

Dr. Julio Cesar Juárez Tapia

Comité tutorial

Dr. Martín Reyes Pérez

Dr. Pablo Octavio Aguilar

Mineral de la Reforma, Hgo. 25 noviembre 2024.



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Área Académica de Biología

Department of Biology

Mineral de la Reforma, Hgo., a 25 de septiembre de 2024

Número de control: ICBI-AAB/625/2024

Asunto: Autorización de impresión.

MTRA.OJUKY DEL ROCIO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UA EH

El Comité Tutorial del nombre del producto que indique el documento curricular del programa educativo de posgrado titulado "**Evaluación de cepas de *Bacillus licheniformis* y *Acinetobacter radioresistens* como un tratamiento previo a la lixiviación de un concentrado de plomo.**", realizado por la sustentante **Anette Dezha Bomaye** con número de cuenta **363060** perteneciente al programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

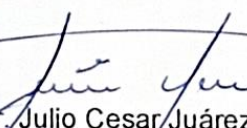
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

El Comité Tutorial


Dra. Sylvia Martínez Hemández
Vocal


Dr. Julio Cesar Juárez Tapia
Presidente


Dr. Martín Reyes Pérez
Secretario


Dr. Pablo Octavio Aguilar
Suplente



LFRP/CIAF

Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 40063, 40064 y 40065
aab_icbi@uaeh.edu.mx, maritzal@uaeh.edu.mx



El presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Genética del Área Académica de Biología en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) y en el Laboratorio de Metalurgia Extractiva del Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales (AACTyM) del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), bajo la dirección de la Dra. Sylvia Martínez Hernández, Dr. Julio Cesar Juárez Tapia, Dr. Martin Reyes Pérez y Dr. Pablo Octavio Aguilar. Así mismo, se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) con el número de beca 2022-000018-02NACF-01460 dentro del programa Maestría en Ciencias en Biodiversidad y Conservación.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Sylvia Martínez Hernández por haberme dado la oportunidad, el apoyo, su respaldo académico y personal para formarme como profesionista y por ser un gran ejemplo de compromiso y responsabilidad en este campo de la investigación científica.

A mis asesores, el Dr. Julio Cesar Juárez Tapia, Dr. Martín Reyes Pérez y al Dr. Pablo Octavio Aguilar, por el apoyo a lo largo de todo el proyecto, por su disposición cada que así lo requerí, por ayudarme a encontrar soluciones y sacar adelante en conjunto este proyecto.

A mis amados: mamá y papá por apoyarme e impulsarme a seguir formándome en esta profesión que tanto amo a pesar de todo. A mis hermanas y único hermano, que fueron mis soportes principales cada día. A mis sobrinos y sobrina que recargaban mis pilas. Gracias a Dios por todo.

A mi mejor amiga Bae por siempre estar e impulsarme a seguir con sus consejos y apoyo incondicional.

Al resto de amigos, compañeros y docentes que durante estos dos años de alguna u otra manera formaron parte de este proceso, muchas gracias.

INDICE

Lista de figuras.....	1
Lista de tablas.....	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. JUSTIFICACIÓN.....	7
3. HIPÓTESIS.....	7
4. OBJETIVOS.....	8
4.1 General.....	8
4.2 Específicos.....	8
5. ANTECEDENTES.....	9
5.1 Industria minera ¿Qué es el proceso de beneficio?.....	12
5.2 Definición de concentrado.....	13
5.3 Impacto ambiental.....	15
5.4 Importancia económica.....	15
5.5 Definiendo a la biolixiviación.....	15
5.5.1 La biolixiviación de manera natural.....	16
5.5.2 Proceso químico de la biolixiviación.....	16
5.6 Mecanismos de biolixiviación.....	17
5.6.1 Mecanismo directo.....	17
5.6.2 Mecanismo indirecto.....	17
5.6.3 Mecanismo de biolixiviación indirecta vía polisulfuro.....	18
5.7 Bacterias más estudiadas y utilizadas en los procesos de biolixiviación.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS: DIAGRAMA GENERAL.....	21
6.1 Obtención de la muestra.....	22
6.2 Análisis granulométrico.....	22
6.3 Principios y técnicas de caracterización química.....	23
6.3.1 Fluorescencia de Rayos X (FRX).....	23
6.3.2 Espectrofotometría De Emisión De Plasma Acoplada Por Inducción (ICP)....	24
6.4 Principios y técnicas de Caracterización Mineralógica.....	25
6.4.1 Difracción de rayos X (DRX).....	25
6.4.2 Microscopía Electrónica De Barrido (MEB-EDS).....	27
6.5 Parámetros importantes relacionados al crecimiento bacteriano.....	28
6.5.1 Importancia del metabolismo bacteriano.....	28
6.5.2 Medios de cultivo.....	29

6.5.3	Medio Luria Bertani (LB).....	30
6.5.4	Modificación de los medios de cultivo.....	31
6.5.5	Relación del pH en el crecimiento bacteriano.....	32
6.5.6	Implicación del potencial oxido reducción (redox).....	32
6.5.7	Escala McFarland.....	33
6.5.8	Espectrofotometría: método para cuantificación de crecimiento bacteriano. ..	34
6.6	Selección de cepas bacterianas para ensayos experimentales de pretratamiento..	35
6.6.1	Generalidades de <i>Bacillus licheniformis</i>	35
6.6.2	Generalidades de <i>Acinetobacter radioresistens</i>	36
7.	ENSAYOS EXPERIMENTALES.....	36
7.1	Preparación de medios de cultivo:	36
7.2	Montaje de ensayos experimentales:.....	37
7.3	Análisis mediante ICP y MEB de los ensayos experimentales.	39
7.4	Análisis estadístico: prueba de T pareada.....	39
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
8.1	Análisis granulométrico.....	41
8.2	Caracterización química.	42
8.2.1	Fluorescencia De Rayos X (FRX).....	42
8.2.2	Espectrofotometría de Emisión de Plasma Acoplada por Inducción (ICP).	43
8.3	Caracterización mineralógica.	44
8.3.1	Difracción de Rayos X (DRX).	44
8.3.2	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB-EDS).....	46
8.3.3	Montaje de experimentos: Bioensayos.	49
8.3.4	Primer ensayo: medio LB	52
8.3.5	Segundo experimento: $LB_{sinNaCl}$	54
8.3.6	Tercer experimento: replica de LB y LBS.	56
8.3.7	Cuarto experimento: ST_{FeSO4}	58
8.3.8	Quinto experimento: ST_{FeCl3}	59
8.3.9	Análisis ICP de los ensayos experimentales.	61
8.3.10	Análisis estadístico.	63
8.3.11	Análisis MEB a los polvos de los ensayos experimentales.....	66
9.	CONCLUSIONES.....	71
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	73
11.	Anexo 1: Galería de fotos.	82
12.	Anexo 2: Lista de reactivos.....	85

Lista de figuras.

Fig. 1 Diagrama general de la metodología planteada para el desarrollo de la experimentación.

Fig. 2 Ejemplo de difractograma que se obtiene en un análisis de DRX.

Fig. 3 Tubos estándar McFarland. Imagen obtenida de Bioanalytic GmbH.

Fig. 4 Fases minerales identificadas mediante DRX en la muestra de concentrado de plomo.

Fig. 5 Micrografías de la morfología característica de las partículas de concentrado de plomo, acompañados de un espectro y composición elemental resultado del análisis EDS. a) micrografía tomada a 150x de partículas simétricas bien definidas, b) micrografía de partículas de apariencia rugosa y amorfas tomada a un objetivo 100x, c) agregados irregulares en asociación con Cu.

Fig. 6 Asociación de AgCuSbS , revelada del análisis a la pastilla de resina preparada, con espectro y composición elemental dada por el análisis MEB-EDS.

Fig. 7 Asociación de AgSbPbS , revelada del análisis a la pastilla de resina preparada, con espectro y composición elemental dada por el análisis MEB-EDS

Fig. 8 Coloración inicial de medio LB y sus modificaciones al iniciar el experimento.

Fig. 9 Coloración de medio LB y sus modificaciones al quinto día en el que se finalizó el experimento.

Fig. 10 Coloración de $\text{ST}_{\text{FeSO}_4}$ al iniciar el experimento (izquierda) y al tercer día (derecha).

Fig. 11 Crecimiento de cepa JC36 a partir de resiembra del experimento (izquierda), crecimiento de JC36 (derecha).

Fig. 12 Coloración de $\text{ST}_{\text{FeCl}_3}$ iniciado el experimento (izquierda), coloración respecto al blanco (derecha).

Fig. 13 Resiembra de cepa JC36 (derecha) y JC15 (izquierda) en placa a partir de matraces con el experimento $\text{ST}_{\text{FeCl}_3}$, sin crecimiento aparente.

Fig. 14 Concentración celular en medio LB.

Fig. 15 Concentración celular en medio LB_s

Fig. 16 Control de pH medio $\text{LB}_{\text{sinNaCl}}$

Fig. 17 Concentración celular medio $\text{LB}_{\text{sinNaCl}}$

Fig. 18 Control de pH medio $\text{LB}_{0.9\text{NaCl}}$

Fig. 19 Concentración celular medio $\text{LB}_{0.9\text{NaCl}}$

Fig. 20 Control redox medio $\text{LB}_{0.9\text{NaCl}}$

Fig. 21 Control de pH medio LB.

Fig. 22 Control redox medio LB

Fig. 23 Control de pH medio LB_S.

Fig. 24 Control redox medio LB_S.

Fig. 25 Control de pH ST_{FeSO4}.

Fig. 26 Control redox ST_{FeSO4}

Fig. 27 Control de pH ST_{FeCl3}

Fig. 28 Control redox ST_{FeCl3}

Fig. 29 Comparación entre tratamientos y cepas para lixiviación de Pb, Sb y Ag, a) lixiviación de Pb, b) lixiviación de Ag y c) lixiviación de Sb.

Fig. 30 Composición elemental y comparación de la morfología aparente de una partícula de galena (señalado en rojo), respecto a otras con más rugosidad (señalados en amarillo), después de ser tratadas en medio LB.

Fig. 31 Partículas del experimento con medio LB, con aparentes marcas de adhesión de la cepa JC15 (señaladas con círculo rojo).

Fig. 32 Partícula del experimento con medio LB_{0.9NaCl}, con aparente adhesión de la cepa JC15 (señaladas con círculo rojo), comparado “filamentos” (señalado en amarillo) que no se consideran células bacterianas de acuerdo con la morfología.

Fig. 33 Micrografías obtenidas por MEB-EDS del experimento con medio LB_{0.9NaCl}, que muestra presencia de la cepa JC15 sobre las partículas minerales.

Fig. 34 Partícula del experimento con medio LB_{sinNaCl}, con aparente adhesión de la cepa JC36.

Fig. 35 Partícula del experimento con medio ST_{FeCl3}, con aparente adhesión de la cepa JC36.

Lista de tablas

Tabla 1. Técnicas y procedimiento de un proceso de beneficio. (modificado de Folchi (2005)).

Tabla 2. Ejemplos de elementos asociados a algunas menas minerales.

Tabla 3. Investigaciones realizadas empleando cepas bacterianas para lixiviación de minerales de interés.

Tabla 4. Nutrientes esenciales y su función en el desarrollo bacteriano

Tabla 5. Medios de cultivo propuestos para experimentación

Tabla 6. Escala McFarland obtenida de Bioanalytic GmbH.

Tabla 7. Composición para cada matraz de experimentación.

Tabla 8. Distribución de elementos contenidos en la muestra y de los pesos retenidos correspondientes a cada tamaño de partícula.

Tabla 9. Composición elemental del concentrado de plomo, resultado del análisis de FRX.

Tabla 10. Composición elemental del concentrado de plomo, resultado de análisis mediante ICP.

Tabla 11. Composición elemental del concentrado de plomo resultado de DRX.

Tabla 12. Concentración en mg/g de Ag, Pb y Sb en solución de cada experimento.

Tabla 13. Valores obtenidos de la prueba ANOVA de dos vías.

RESUMEN

La geodiversidad de México ha permitido que la industria minera se distinga por la extracción de minerales metálicos mediante la lixiviación con solventes químicos, repercutiendo en un elevado coste ambiental, por lo que la biolixiviación es una técnica alternativa que se ha empleado en años recientes, donde las bacterias permiten la disolución de metales valiosos. En este estudio evaluamos la lixiviación de un concentrado de plomo mediante un pretratamiento con dos cepas bacterianas: *Bacillus licheniformis* y *Acinetobacter radioresistens*. Se caracterizó química y mineralógicamente el concentrado de plomo mediante Fluorescencia de rayos X (FRX), Espectrofotometría de Emisión de Plasma Acoplada por Inducción (ICP), Difracción de rayos X (DRX) y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Para la parte experimental se evaluaron seis medios de cultivo con algunas modificaciones, las cuales fueron: Medio Luria Bertani (LB), LB_S, LB_{sinNaCl}, LB_{0.9NaCl}, Soya Trypticaseína+Sulfato ferroso y cloruro férrico (ST_{FeSO4} y ST_{FeCl3}). Mismos que fueron suplementados con 2.5 gr de concentrado de plomo. Se evaluaron las cinéticas de crecimiento, el potencial redox y pH. Se analizó mediante ICP la concentración de plata (Ag), plomo (Pb) y antimonio (Sb) y se analizó mediante MEB el polvo sometido a pretratamiento. Con base en los resultados y mediante un análisis estadístico de T pareada se logró determinar que existen diferencias significativas en la lixiviación de Pb, Ag y Sb con los medios LB, LB_S y ST_{FeSO4} por acción de bacterias respecto al control y mediante un ANOVA de dos vías se demostró que la lixiviación de plomo se favorece con medio LB_S utilizando ambas cepas, mientras que la lixiviación de plata se favorece en medio LB usando ambas cepas y para antimonio el medio ST_{FeSO4} actúa como agente lixivante (sin bacterias). Estos resultados suponen alcances importantes en el ámbito de la biolixiviación por lo que deben incrementarse los esfuerzos en investigación del papel que pueden desarrollar estas cepas.

Palabras clave: biolixiviación, bacterias, medios de cultivo, concentrado de plomo.

ABSTRACT

Mexico's geodiversity has enabled the mining industry to stand out for the extraction of metallic minerals through leaching with chemical solvents, resulting in a high environmental cost. Therefore, bioleaching is an alternative technique that has been employed in recent years, where bacteria facilitate the dissolution of valuable metals. In this study, we evaluated the leaching of a lead concentrate through pretreatment with two bacterial strains: *Bacillus licheniformis* and *Acinetobacter radioresistens*. The lead concentrate was chemically and mineralogically characterized through X-ray Fluorescence (XRF), Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry (ICP), X-ray Diffraction (XRD), and Scanning Electron Microscopy (SEM). For the experimental part, six culture media with some modifications were evaluated: Luria Bertani Medium (LB), LBS, LB without NaCl, LB 0.9NaCl, Tryptic Soy+Ferrous Sulfate and Ferric Chloride (STFeSO₄ and STFeCl₃). These media were supplemented with 2.5 g of lead concentrate. Growth kinetics, redox potential, and pH were evaluated. The concentrations of silver (Ag), lead (Pb), and antimony (Sb) were analyzed by ICP, and the pretreated powder was analyzed by SEM. Based on the results and through a paired t-test statistical analysis, it was determined that there are significant differences in the leaching of Pb, Ag, and Sb with the LB, LBS, and STFeSO₄ media due to bacterial action compared to the control. Additionally, a two-way ANOVA showed that lead leaching is favored with LBS medium using both strains, while silver leaching is favored in LB medium using both strains, and for antimony, the STFeSO₄ medium acts as a leaching agent (without bacteria). These results indicate significant advancements in the field of bioleaching, highlighting the need to increase research efforts on the role these strains can play.

Keywords: bioleaching, bacteria, culture media, lead concentrate.

1. INTRODUCCIÓN

La minería es una actividad que se distingue por la extracción de minerales metálicos y no metálicos, cada uno con naturaleza específica que determina los ritmos de explotación y métodos de extracción. En México la existencia de un subsuelo rico de diversos minerales y la vasta diversidad de yacimientos se puede atribuir a la evolución geológico-tectónica que ha atravesado el país (Bravo et al., 2021). En estados del norte del territorio mexicano, existen yacimientos de sulfuro de plomo, cobre y zinc, que, dada su composición o asociación a esfalerita, arsenopirita, etc., son consideradas menas de bajo tenor, siendo castigadas económicamente o con motivo de rechazo total en las plantas metalúrgicas, ya que para el proceso de recuperación de los metales de valor se requiere la aplicación de un pretratamiento (Makita, 2004). La asociación de minerales metálicos como el plomo (Pb), plata (Ag), etc., en matrices sulfuradas dificultan su recuperación, incluso con técnicas de fundición pirometalúrgica y la combinación de hidrometalurgia/pirometalurgia, lo cual repercute en un alto consumo hídrico y energético, generando graves problemas de contaminación ambiental (Vargas, 2010; Khodijah et al., 2020), por lo que la búsqueda de alternativas tecnológicas sostenibles se considera una necesidad actual (Eyzaguirre y Castillo, 2019).

En la industria minera, el objetivo de la lixiviación es la liberación de un compuesto o elemento a partir de una matriz sólida a una fase acuosa mediante un solvente químico (Makita, 2004).

La biolixiviación es considerada un proceso de oxidación bioquímica catalizada por microorganismos (bacterias y hongos) y actualmente se ha demostrado que es una tecnología rentable y respetuosa con el medio ambiente para la recuperación de metales valiosos de una variedad de minerales (incluidos minerales sulfídicos y oxidados) y desechos industriales (por ejemplo, lodo rojo, cenizas volantes y desechos electrónicos) (Misari, 2016; Hong et al., 2023). En la actualidad se presenta como una alternativa económica a las técnicas convencionales de tostación o de oxidación de minerales sulfuros de baja ley, se considera que cumple con el objetivo principal de recuperación de metales como el cobre, la plata e incluso el oro (Huarachi et al., 2017).

Para llevar a cabo la lixiviación de los metales de interés, los microorganismos dependen de la composición mineralógica y química del mineral, sin embargo, esta actividad es favorecida en medida que dichos microorganismos lixiviantes establezcan un mayor contacto con el área superficial de las partículas, al igual que el tamaño y densidad de pulpa (concentración) del mineral y la biomasa microbiana, factores que pueden determinar un aumento en la concentración de metales en solución (Castillo et al., 2021). En las últimas décadas se han realizado muchos esfuerzos para aclarar cómo actúan los microorganismos en los procesos de biolixiviación de minerales, entendiendo que su principal función es la oxidación de compuestos de azufre y del ion ferroso presentes en el mineral con el fin de producir ion férrico y protones que lo solubilizan y permitan mantener un medio ácido (Zepeda, 2018).

2. JUSTIFICACIÓN

México es reconocido como un país minero por excelencia, ocupando el primer lugar en producción de plata a nivel mundial hasta el año 2022. Sin embargo, esta distinción supone un elevado costo ambiental debido al proceso de extracción por medios mecánicos a gran escala, sistemas masivos de separación de las rocas mineralizadas, procesos de trituración y molienda del mineral, las grandes pilas de lixiviación o flotación conteniendo químicos de alto riesgo en concentraciones elevadas (ej. Cianuros y ácido sulfúrico) así como los gases que se desprenden en los procesos de trituración, lavado y corrosión impactan directamente a recursos naturales como el agua, suelo y aire, teniendo una degradación ambiental en la mayoría de los casos, sino es que en todos, irreparable.

El presente trabajo busca ser el primer estudio en el estado de Hidalgo que desarrolla una alternativa como pretratamiento al proceso de lixiviación convencional, que sea sostenible y económico. A nivel de laboratorio se busca comprender y aprovechar las capacidades metabólicas de ciertos grupos de bacterias en los procesos de separación de metales. Se plantea que sirva como precursor en futuras investigaciones orientadas a la biolixiviación, contando así con un marco referencial en la eficiencia y nivel de recuperación de los minerales. Con la finalidad de que a largo plazo se considere como un método eficaz en la industria minera no solo del estado, sino a lo largo del país o de futuras investigaciones que puedan enriquecer al tema.

La extracción de recursos no es una actividad que se pueda frenar completamente, sin embargo, se puede ofrecer una alternativa en donde diferentes métodos sean estudiados y aplicados permitiendo un mutuo beneficio en la industria minera y su relación con el ambiente, disminuyendo en alguna fracción el impacto que se tiene.

3. HIPÓTESIS

En el área de la hidrometalurgia la aplicación de diferentes procesos para la recuperación de metales de interés, como la plata, plomo, cobre, oro, etc., son bien conocidos. Por ejemplo, la cianuración o el uso de ácido sulfúrico, técnicas que, debido a su simplicidad, eficacia y bajo costo; son utilizadas a escalas industriales, sin embargo, muchas otras siguen siendo estudiadas. De igual manera, actualmente se utilizan cepas bacterianas con capacidades biolixiviantes que ayudan a la recuperación por medio de oxidación de minerales sulfurados.

Por lo anterior si se evalúan diferentes condiciones de requerimientos nutricionales a las que se puedan someter las cepas bacterianas entonces se esperaría establecer parámetros para el proceso de biolixiviación de un concentrado de plomo y así determinar los metales que pueden recuperarse por este mecanismo.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar el pretratamiento de un concentrado de plomo con dos cepas bacterianas en medios de cultivo convencionales, para determinar las condiciones óptimas de recuperación de metales de interés.

4.2 Específicos

- Realizar el análisis granulométrico y análisis químico mediante un deslame por vía húmeda para determinar la distribución de tamaños de partícula y la concentración de metales presentes en el concentrado de plomo.
- Caracterizar químicamente el sulfuro de plomo (PbS), mediante las técnicas de Fluorescencia de Rayos X (FRX) para el análisis químico elemental cuali-cuantitativo y Espectrofotometría De Emisión De Plasma Acoplada Por Inducción (ICP) para conocer la concentración de los metales presentes.
- Caracterizar mineralógicamente el sulfuro de plomo por Difracción de Rayos X (DRX) para el reconocimiento de las fases minerales y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB-EDS) para el reconocimiento de la distribución de los elementos.
- Proponer medios de cultivo con base en los requerimientos nutricionales de las cepas bacterianas con el fin de proveer un medio básico para su crecimiento y adaptabilidad tras la adición de concentrado de plomo.
- Analizar mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB-EDS) los polvos expuestos a la experimentación con el fin de obtener micrografías que evidencien la acción bacteriana ejercida en el pretratamiento.
- Realizar un análisis estadístico comparando la lixiviación de minerales metálicos para determinar si existen diferencias significativas entre ensayos experimentales.

5. ANTECEDENTES

Los presentes antecedentes describen los estudios que se han llevado a cabo del proceso de biolixiviación empleando cepas bacterianas.

Khodijah et al. (2020) investigaron la extracción biohidrometalúrgica de Pb de un concentrado de galena utilizando una bacteria mixotrófica oxidante de hierro y azufre (*Citrobacter* sp.), teniendo como resultado que la bacteria fue capaz de extraer plomo (Pb) del concentrado, la mayor extracción fue de 90 g/kg de plomo empleando el método de biolixiviación directa en condiciones de biolixiviación de 2 % p/v de densidad de pulpa, 5 g/L de FeCl₃ 50 g/L de NaCl, 20 g/L de melaza y una velocidad de rotación de 180 rpm a temperatura ambiente (25°C). Los análisis mediante FTIR, DRX y MEB mostraron que la adición de FeCl₃, NaCl y melaza aumentaron las eficiencias de lixiviación del plomo.

Chiamaka et al. (2022) estudiaron la recuperación de metaloides valiosos y peligrosos de dos muestras de desechos mineros sulfurados y relaves utilizando un consorcio acidófilo dominado por cepas bacterianas hierro- oxidantes, género *Leptospirillum* y *Acidiphilium*. Los resultados con biolixiviación mostraron que más del 70 % del contenido total de Zn, Co, In, As y Cd de residuos mineros y relaves se lixiviaron en 21 días y entre el 55 % y el 62 % de Mn, concluyendo en que la aplicación de este método tiene un potencial en el ámbito económico y la reducción del riesgo ambiental para muestras de desechos mineros sulfurados.

Quach et al. (2022) caracterizaron mineralógicamente y realizaron pruebas de biolixiviación con un mineral de sulfuro aurífero. La composición del mineral fue de arsenopirita, pirita, galena, esfalerita y calcopirita, de los cuales los principales metales fueron hierro (4,78 %), arsénico (1,73 %), plomo (0,43 %) y zinc (0,33 %). Aislaron 19 bacterias oxidantes de hierro y azufre, clasificándonos en seis géneros, tres de los cuales ya se conoce; *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Acidithiobacillus*, y con un primer reporte de los géneros *Glutamicibacter*, *Providencia* y *Stenotrophomonas* del origen del mineral de oro. Obtuvieron al emplear bacterias enriquecidas del mineral de oro, la eliminación de Ag (99,1 %), Zn (37,9 %), As (37,0 %) y Fe (32,2 %) del mineral después de 21 días de tratamiento, respectivamente, los hallazgos que presentaron destacan el potencial de las bacterias acidófilas originadas a partir de minerales de oro para ampliar las aplicaciones en la biolixiviación de metales en Vietnam.

Choi et al. (2018) evaluaron el efecto de la adaptación de *Acidithiobacillus ferrooxidans* como pretratamiento para biolixiviación de telurio (Te), oro (Au) y plata (Ag) a partir de un concentrado de oro y minerales de mena que contenían Te. Llevaron a cabo tres ensayos: un cultivo con cepas adaptadas a la concentración de los metales, no adaptadas y un control abiótico para monitorear la lixiviación química, en éstos monitorearon el pH, potencial oxido reducción, concentración de metales y viabilidad bacteriana. Los autores concluyen con que la adaptación microbiana mejoró la recuperación de Au-Ag-Te sugiriendo así, que la biolixiviación con microorganismos adaptados previamente puede utilizarse como pretratamiento en procesos principales de recuperación de metales valiosos.

Abraham et al. (2020) aislaron la cepa de *Bacillus licheniformis* JAJ3 realizando una serie de experimentos: inicialmente comprobaron la tolerancia de la cepa a metales pesados

en un medio enriquecido con Cu^{2+} , Ni^{2+} y Pb^{2+} , posteriormente evaluaron su capacidad de bioacumulación para estos mismos elementos y finalmente utilizaron desechos electrónicos para comprobar la eficiencia de esta cepa para biolixiviación de metales pesados, mediante análisis de MEB corroboraron que la pieza de desecho electrónico que utilizaron para el ensayo era lisa y después de una interacción de 7 días la cepa pudo adherirse a la superficie y la aparición de grietas.

McLean et al. (1992) examinaron la unión de ion férrico (Fe^{3+}) y ferroso (Fe^{2+}) al polímero aniónico de la cápsula gamma-glutamil de *Bacillus licheniformis* ATCC 9945, observaron que la adición de FeCl_3 a la cápsula de *B. licheniformis* en condiciones aeróbicas resultó en floculación por la formación inducida por la cápsula de ferrihidrita amorfa de color oxido. Para la adición de FeCl_2 en condiciones anaeróbicas se observó una unión significativamente menor de hierro, no se produjo cambio de coloración ni floculación. Los autores concluyen que el estado de oxidación del hierro influye significativamente en su tendencia a unirse a polímeros bacterianos aniónicos, como las cápsulas.

Gholampoor et al. (2015) utilizaron polisacáridos extracelulares de *Microbacterium hominis* y *Bacillus licheniformis* con el fin de producir nanopartículas de plata, óxido de plata, óxido de hierro y nanopartículas metálicas de hierro a partir de nitrato de plata y cloruro de hierro (1Mm), las cepas se aislaron en medio Caso Agar enriquecido con sacarosa al 20%. Observaron que las bacterias sin polisacárido no pudieron producir estas nanopartículas mientras que células con exopolisacárido si favorecieron la formación de estas nanopartículas.

Muñoz et al. (2019) estudiaron el grado de tolerancia a metales pesados de hongos y bacterias aisladas de suelos con y sin rizosfera del pasivo minero de Santa Rosa de Jangas, con el fin de conocer su potencial en biorremediación. Los hongos y bacterias fueron identificados mediante análisis de la región ITS y 16S ADN_r, respectivamente. El índice de tolerancia a metales pesados se calculó usando medio salino suplementado con 1 mM a plomo (II), cobre (II), níquel (II) o zinc (II), y 0.1 mM a plata (I), cromo (VI) o cadmio (II). Encontraron que las cepas de hongos con mejores índices de tolerancia fueron: *Fusarium temperatum* CTLM05 (Pb^{+2}), *Fusarium temperatum* CTLM08 (Zn^{+2}), *Fusarium oxysporum* CTLM18 (Ni^{+2} y Cd^{+2}), *Fusarium oxysporum* CTLM12 (Ag^{+1}), *Fusarium inflexum* CTLM22 (Cu^{+2}) y *Penicillium vanluykii* CTLM11 (Cr^{+6}). Las cepas de bacterias con mayores índices de tolerancia fueron *Bacillus licheniformis* SSR18 (Cd^{+2} , Ni^{+2} y Zn^{+2}), *Bacillus subtilis* SSR3 (Pb^{+2}), *Serratia sp.* SSR15 (Cu^{+2}), *Serratia sp.* SSR13 (Ag^{+1}) y *Bacillus cereus* SSR01 (Cr^{+6}). También se encontró que los hongos mostraron mejores índices de tolerancia que las bacterias. Los autores concluyen que estos suelos contienen microorganismos interesantes con mecanismos para su adaptación, crecimiento y desarrollo sobre metales pesados y pueden ser de utilidad para el desarrollo de procesos biotecnológicos y biorremediación.

Raja et al. (2009) aislaron, identificaron y caracterizaron bacterias con base en su resistencia a metales, de aguas residuales recolectadas en el distrito de Madurai, India y sus alrededores. Analizaron 300 muestras e identificaron a *Proteus vulgaris* (BC1), *Pseudomonas aeruginosa* (BC2), *Acinetobacter radioresistens* (BC3) y *Pseudomonas aeruginosa* (BC5). Las cepas tuvieron un crecimiento óptimo a 30°C y pH 7., así mismo, mostraron resistencia a cadmio (Cd), níquel (Ni), plomo (Pb), arsénico (As), cromo (Cr) y mercurio (Hg).

Ram et al. (2019) aislaron una cepa bacteriana identificada como *Acinetobacter radioresistens* sp. NS-MIE de suelo agrícola en Malasia, mediante el gen 16S rRNA. La cepa fue cultivada en los medios Luria Bertani (LB), caldo nutritivo y medio mínimo de sales a 28°C durante 48 h a 170 rpm. Estudiaron el potencial de este microorganismo para la detoxificación del cromo VI (Cr) utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés) y las redes neuronales artificiales (ANN, por sus siglas en inglés) como herramientas de optimización para mejorar el proceso de biorremediación. Los autores concluyen que *A. radioresistens* NS-MIE muestra y ofrece un gran potencial para reducir el cromo hexavalente. La bacteria exhibe alta tolerancia y resistencia en caldo nutritivo suplementado con 160 ppm de K₂Cr₂O₇, pero solo reduce el cromo hexavalente hasta un 94,75 % en las condiciones óptimas. Se prevé que la bacteria ofrece un potencial prometedor para ser utilizada en la biorremediación de sitios contaminados con cromo y el tratamiento biológico de aguas residuales.

Das et al. (2021), realizaron una reseña sobre algunos géneros de bacterias resistentes a metales pesados como zinc (Zn), plata (Ag), paladio (Pd), níquel (Ni), mercurio (Hg), arsénico (As), cromo (Cr), plomo (Pb), cobre (Cu) y cadmio (Cd). Dentro de este reporte se incluyen el género *Bacillus* y *Acinetobacter*, y se reporta que la cepa *Acinetobacter baumannii* BL54 acumuló intracelularmente la plata, como un proceso dependiente de la energía y se produjo mediante la unión a una metaloproteína rica en cisteína, de igual manera se reporta la resistencia de *A. radioresistens* para níquel, cromo y cadmio, mientras que para el género *Bacillus*, entre ellos *B. licheniformis*, se reportó un amplio rango de resistencia a zinc y arsénico (As).

5.1 Industria minera ¿Qué es el proceso de beneficio?

Como en todos los sectores industriales, existen procesos que se siguen para la obtención del producto final, como ocurre en la minería, la cual busca la extracción de minerales metálicos y no metálicos con uso potencial para diversos sectores y productos, es por esto que se le conoce al proceso que se sigue para la obtención de elementos de interés, como proceso de beneficio. El beneficio de minerales o proceso de beneficio se refiere al conjunto de operaciones mecánicas, químicas o biológicas destinadas a obtener ciertos elementos metálicos contenidos en algunas rocas de la corteza terrestre, proceso en el que se moviliza, transforma y consumen grandes cantidades de materia. Las operaciones que comprenden este proceso son: la trituración del mineral, la decantación de partículas en tinajas, la aspersión de ácido sobre rocas amontonadas y la fundición. Sin embargo, este tipo de recuperación ha provocado a lo largo de la historia algún efecto sobre el entorno en el que tienen lugar. En términos muy generales, las labores de beneficio incluyen cinco operaciones sucesivas: molienda, selección, concentración, reducción y afino, para esto, se ha tenido un progreso a lo largo de los años en lo que respecta a cada proceso, por ejemplo, para operaciones de molienda, selección y concentración, los avances han consistido en el desarrollo de mejores dispositivos mecánicos, en cuanto a la reducción y afino, las mejoras han sido posibles gracias al desarrollo científico de la física y de la química que se ha aplicado al perfeccionamiento de las técnicas pirometalúrgicas y al desarrollo de técnicas nuevas como la hidrometalurgia, electrometalurgia y la biometalurgia (Folchi, 2005).

Las labores de beneficio tienen el objetivo de separar el material que no es considerado con un valor económico y así obtener con el mayor grado de pureza posible, el metal contenido en las rocas, para esto, se emplean agentes lixiviantes, tales como solventes orgánicos e inorgánicos. Sin embargo, el uso de estos no llega a tener una eficiencia del cien por ciento y es por ello que se aplican diversas técnicas y métodos (Tabla 1) (Folchi, 2005).

Tabla 1. Técnicas y procedimiento de un proceso de beneficio. (modificado de Folchi (2005).

PREPARACIÓN DE LAS MENAS			METALURGÍA EXTRACTIVA			
Molienda	Selección	Concentración	Pirometalurgia	Hidrometalurgia	Electrometalurgia	Biometalurgia
Martillos	Manual	Flotación	Fusión	Lixiviación	Electrolisis	Lixiviación
Molinos de piedra	En bateas con agua	Tostación	Tostación	Purificación	Electrotermia	cación bacteriana
		Calcinación	Calcinación	Precipitación		
Molinos mecánicos (de impacto, de rodillos, de bolas, etc.)	Gravimetría mecanizada	Conversión	Conversión			

5.2 Definición de concentrado.

Un concentrado mineral puede definirse como el producto de un proceso de concentración (flotación, lixiviación, gravimetría, etc.) en el cual se eleva la concentración en porcentaje de un mineral determinado, separando el mineral de la ganga, que en la industria minera se refiere a los materiales que carecen de valor económico significativo, pudiendo ser rocas, minerales o sedimentos que no contienen la concentración deseada del mineral objetivo, sin embargo siguiendo este proceso se llega a producir la segregación de dos o más especies mineralógicas contenidas en una sola matriz, razón por la cual se requiere de un proceso de refinamiento posterior (Bustamante et al., 2008).

Las sustancias minerales se requieren en un estado de pureza o concentración alta, es por ello que los concentrados llevan el nombre del mayor metal contenido (no necesariamente deben ser productos metálicos), por lo que pueden ser concentrados de zinc, cobre, plomo y otros. De igual forma se sabe que al contener el metal principal, cierto porcentaje de elementos que no haya podido ser separado estarán presentes, los cuales se convierten en elementos remunerables y/o penalizables dependiendo de las condiciones operativas del comprador (o refinería) que trata (procesa) el concentrado. Es importante recordar que el contenido de los concentrados siempre es distinto, esto se puede atribuir al lugar de procedencia (ya que cada yacimiento tiene sus características particulares) y a que el contenido del yacimiento no es homogéneo. Por tal motivo el concentrado tendrá contenidos similares, pero no iguales, a pesar de que se trate de mineral del mismo yacimiento (LATIZA, 2017; Conejeros, 2003).

En la Tabla 2 se enlistan ejemplos de elementos y su asociación a algunas menas minerales en las que se pueden encontrar.

Tabla 2. Ejemplos de elementos asociados a algunas menas minerales (Elaboración propia)

Elemento	Fórmula química	Minerales de mena
Cobre	Cu	Nativo (Cu) Calcopirita (CuFeS ₂) Calcosita (CuS ₂) Covelita (CuS) Cuprita (Cu ₂ O) Malaquita Cu ₂ CO ₃ (OH) ₂
Oro	Au	Nativo (Au) Silvanita (Au, Ag) Te ₂ Calaverita (AuTe ₂)
Hierro	Fe	Hematita (Fe ₂ O ₃) Magnetita (Fe ₃ O ₄) Pirrotita (FeS) Pirita (FeS ₂)
Plomo	Pb	Galena (PbS) Anglesita (PbSO ₄) Jamesonita (Pb ₄ FeSb ₆ S ₁₄)
Plata	Ag	Nativa (Ag) Argentita (Ag ₂ S) Cerargirita (Ag ₃ SbS ₃)
Aluminio	Al	Albita (NaAlSi ₃ O ₈) Gibbsita Al (OH) ₃
Antimonio	Sb	Boulangerita (Pb ₅ Sb ₄ S) Estibina (Sb ₂ S ₃)
Zinc	Zn	Esfalerita (ZnS)

5.3 Impacto ambiental

En Latinoamérica la minería se ha convertido en un modelo de desarrollo económico, sin embargo, esta actividad involucra el procesamiento de grandes cantidades de roca. Una manera de comprender lo que se realiza en un proceso de beneficio, es que al movilizar elementos de la naturaleza y exponerlos a la superficie en volúmenes considerables y concentraciones elevadas es cuando se consideran una fuente de contaminación ya que, si una planta beneficia menas con una ley del 6%, significa que tiene una tasa de producción de desechos del 94% (respecto del volumen de la materia prima que procesa) o lo que es lo mismo, que por cada unidad de metal obtenido, genera quince veces más unidades de residuos, repercutiendo así en la contaminación de aire, agua y suelo (López y Mayorga, 2020; Folchi, 2005).

Debido a la cantidad de contaminantes que se genera en esta industria, como en muchas otras, la minería se cuenta entre las actividades industriales que causan más impacto sobre el medio natural. Recursos como el agua, suelo y aire, son considerados como los más afectados durante un proceso de beneficio y transformación de minerales debido a los lixiviados y gases que se desprenden en los procesos de trituración, lavado, corrosión y mecanismos químicos de separación (SGM, 2017).

5.4 Importancia económica

La minería es una de las actividades de mayor tradición y evolución económica reconocida en México (Saavedra et al., 2008). De acuerdo con datos reportados por la Cámara Minera de México (CAMIMEX, 2022) esta actividad aportó el 2.3% del Producto Interno Bruto (PIB) nacional y el 8.1% del PIB industrial, y a escala mundial, México aportó el 23.9% de metales como el oro (Au), cobre (Cu), plata, (Ag), zinc (Zn) y plomo (Pb) (SEMARNAT, 2022).

Sin embargo, la producción / extracción de estos metales viene dada por el procesamiento de menas minerales o matrices sulfuradas, ya que las reservas de metales nativos son muy escasas, por lo que la recuperación de metales de interés, al estar ocultos en matrices complejas, dificulta su recuperación. Por lo que se buscan alternativas tecnológicas sostenibles para el pretratamiento de concentrados y la lixiviación de minerales metálicos a partir de estos (Eyzaguirre y Castillo, 2019).

5.5 Definiendo a la biolixiviación.

La biolixiviación puede definirse como el proceso mediante el cual se extraen metales a partir de minerales metálicos por acción de microorganismos (bacterias u hongos) (Nangali et al., 2023). De igual manera, se ha demostrado que la biolixiviación (bio hidrometalurgia) es una tecnología rentable y con un menor impacto en daños ambientales que se desencadenan tras la recuperación de metales de interés a partir de una variedad de minerales (matrices sulfuradas y óxidos) así como a partir de residuos industriales (Chen et al., 2023).

Se considera que la lixiviación bacteriana es un proceso de oxidación bioquímica propiciada por microorganismos. En estas reacciones bioquímicas intervienen enzimas que son moléculas de proteínas que catalizan los diversos procesos metabólicos con gran especificidad (Misari, 2016). La investigación sobre la ecología, genética y fisiología de las bacterias quimiolitótrofas ha mejorado la tecnología de la extracción de metales, aumentando la eficiencia del proceso para que sea aplicable a escala industrial.

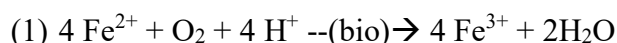
5.5.1 La biolixiviación de manera natural

La biolixiviación es una técnica actualmente estudiada y utilizada para tratar minerales sulfurados y la extracción de metales como el cobre, oro, plata etc. Esta tecnología puede mejorar significativamente el sector minero y se ha demostrado que en comparación con procedimientos convencionales puede ser más económica, eficiente y amigable con el ambiente (Makita, 2004).

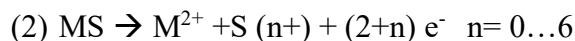
La solubilización de metales a partir de minerales por acción de microorganismos es un proceso que se lleva a cabo en la naturaleza, al contar con las condiciones necesarias de temperatura y humedad. El aumento del ion férrico (se observa con la aparición de coloración rojiza y descenso de pH) producto de la oxidación microbiana del hierro y azufre generando drenajes ácidos de manera natural que permiten la solubilización de metales y así los microorganismos aprovechan los minerales presentes como fuente de energía, sin embargo, en condiciones naturales este proceso se lleva a cabo de manera muy lenta y puede tardar años en desarrollarse (Saavedra y Cortón, 2014).

5.5.2 Proceso químico de la biolixiviación

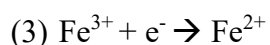
En el núcleo de la biolixiviación de sulfuros metálicos, los microorganismos oxidan el ion ferroso a ion férrico (reacción 1) (Petersen, 2023)



Que a su vez oxida las fases de sulfuro en los minerales objetivo (reacción 2)



Donde S(+n) representa al azufre en el estado de oxidación n, por ejemplo, S(II) como en $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ o S(VI) como en SO_4^{2-} . A medida que la reacción catódica férrica se reduce nuevamente a ferrosa (reacción 3)



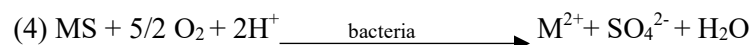
El proceso de oxidación a través de la membrana celular suele ser un proceso bioelectroquímico rápido y está significativamente influenciado por las condiciones en el entorno de la solución, como las concentraciones del reactivo que participan en la reacción 1; es decir férrico y ferroso, oxígeno disuelto y pH (Ojumu et al., 2006).

5.6 Mecanismos de biolixiviación.

En la biolixiviación de sulfuros minerales está involucrada la movilización de los constituyentes metálicos, esta acción es realizada a través de la oxidación promovida por los microorganismos, sin embargo, a lo largo de la historia se han postulado diferentes mecanismos o rutas que las bacterias pueden desarrollar, por lo que aún no existe una vía química de la oxidación biológica general que se aplique a todos los microorganismos (Rodríguez et al., 2001; Vera et al., 2022), por lo que a continuación se enuncian de manera general algunos de estos mecanismos que han sido considerados:

5.6.1 Mecanismo directo

La bacteria ataca al sulfuro metálico de forma directa mediante su adherencia a la superficie mineral y la posterior oxidación enzimática de éste por transporte de electrones desde la parte reducida del mineral, generalmente el sulfuro al oxígeno disuelto (reacción 4) (Rodríguez et al., 2001)



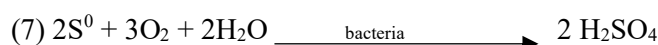
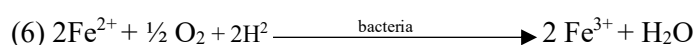
Esta vía significaría una transferencia directa de electrones desde el mineral sulfuro a los compuestos de la superficie celular (como citocromos) y posteriormente al oxígeno molecular, y de acuerdo con Vera (2022) se han realizado experimentos para respaldar dicha teoría, como los realizados por Ehrlich (2016) en donde utilizó un medio libre de hierro, un sulfuro metálico sintético como la Covelita (CuS) y *A. ferrooxidans*, sin embargo, estos experimentos deben interpretarse con cuidado, ya que el hierro es un nutriente esencial y siempre aparecen al menos trazas de este en las células o incluso ligadas a sustancias poliméricas extracelulares, y un estudio realizado por Reguera et al. (2005) que demuestra que *Geobacter sulfurreducens* desarrolla pili transportadores de electrones en la superficie celular, permitiendo la transferencia de electrones a óxidos de hierro, sin embargo, estos pili no se han encontrado en bacterias acidófilas, por lo que el autor sugiere que no puede aceptarse completamente una vía directa de biolixiviación, ya que son pocas las evidencias y no se muestra una generalidad con microorganismos acidófilos.

5.6.2 Mecanismo indirecto

El mecanismo indirecto tiene lugar por la interacción del mineral con productos intermedios o finales del metabolismo de las bacterias, no habiendo por tanto reacciones enzimáticas que actúen directamente sobre el sulfuro. El agente de lixiviación (Fe^{3+}) es consumido en la reacción 5 y regenerado por acción de microorganismos en la reacción 6 (Rodríguez et al., 2001).

A su vez, el azufre elemental que se forma en el proceso mediante la reacción (5), es oxidado a ácido sulfúrico (H_2SO_4) por la misma bacteria (reacción 7), esta producción de ácido disminuye el pH durante la lixiviación y acelera el proceso, mejorando, además, las condiciones ambientales de vida de las bacterias, su adherencia al mineral y evitando la precipitación de jarositas que constituyen una barrera de difusión entre el sulfuro y el Fe^{3+} .

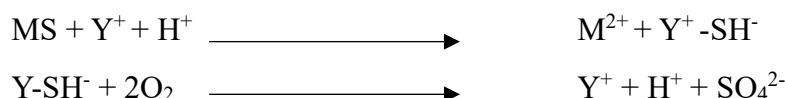
Este mecanismo propuesto, se considera como la base de los procesos extractivos de biolixiviación que se emplean a gran escala para obtención de cobre, uranio, etc., y ha sido ampliamente aceptado por la visión que proporciona sobre el proceso de biolixiviación (Rodríguez et al., 2001; Vera et al 2022).



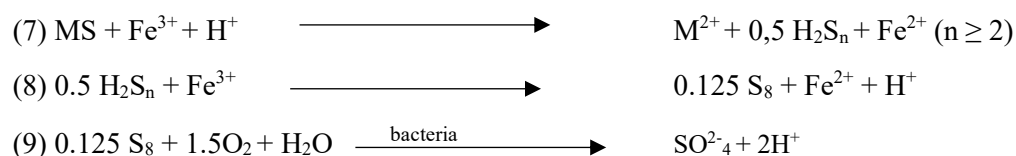
5.6.3 Mecanismo de biolixiviación indirecta vía polisulfuro.

De acuerdo con Vera et al. (2022) y Rodríguez et al. (2001) estudios de la mineralogía y de las propiedades semiconductoras de los sulfuros metálicos llevo a la conclusión de que en la pirita (FeS_2) y la molibdenita (MoS_2), las bandas de valencia provienen solamente de orbitales de átomos metálicos, que no contribuyen al enlace químico metal-azufre; razón por la cual estos sulfuros solamente pueden ser degradados por ataques oxidantes con el ion Fe^{3+} . Por el contrario, sulfuros metálicos como ZnS , FeS , MnS , CuFeS_2 y PbS , poseen bandas de valencias a las que contribuyen orbitales de átomos metálicos y de azufre, que no solo serían vulnerables al ataque mediante acción del Fe^{3+} , sino que también los protones H^+ podrían producir el mismo efecto.

Tributsch y Bennett (1981) proponen que el ion H^+ actúa como aceptor de electrones durante la oxidación del sulfuro mineral. Así, por reacción química con la superficie del sulfuro metálico, los protones (H^+) rompen sus enlaces químicos, produciendo un estado superficial que puede describirse químicamente como grupos $-\text{SH}$, mientras que una molécula transportadora Y^+ , generada por la bacteria, retira esos grupos de la superficie mineral por formación del complejo Y-SH , dicho compuesto es reabsorbido por el sistema metabólico de la bacteria, que lo oxida y libera de nuevo la molécula Y^+ . De una manera concisa podría enunciarse de la siguiente manera:



Rodríguez et al. (2001) mencionan que la disolución de sulfuros minerales (ZnS, CuFeS₂, y PbS) comienza por el ataque de los protones lo que permite la liberación del metal en forma iónica y la producción de ácido sulfúrico (reacción 7), este último es oxidado por ion férrico a azufre elemental con la formación de ion ferroso y protones (reacción 8) y finalmente el azufre elemental es transformado a sulfatos y protones por oxidación microbiana en presencia de oxígeno y agua (reacción 9). De acuerdo a este mecanismo, el papel de las bacterias durante la biolixiviación, consiste en generar el ácido por la oxidación del azufre elemental, abasteciendo al medio de protones para la hidrólisis del mineral.



5.7 Bacterias más estudiadas y utilizadas en los procesos de biolixiviación

Los microorganismos responsables de la biolixiviación de minerales sulfurados (Kinzler et al., 2003) se suelen clasificar de acuerdo con su temperatura óptima de crecimiento, dividiéndose en tres tipos: mesófilos, con temperatura optima inferior a 40°C, los termófilos moderados, con temperatura óptima de 40-55°C y los hipertermófilos con temperaturas de crecimiento superiores a 55°C (Schipper et al., 2013). Las bacterias responsables de la biolixiviación, como las mesófilas, pertenecen principalmente al phylum Proteobacteria, donde se encuentran los géneros *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Acidiferrobacter*, *Ferroplasma* (Zepeda, 2018).

Las primeras investigaciones en el campo de la biohidrometalurgia se basaron en el aislamiento e identificación de cultivos puros y su posterior caracterización fisiológica, siendo la especie *Acidithiobacillus ferrooxidans* la principal bacteria mesófila implicada en los procesos de biolixiviación. Estudios posteriores han demostrado que si bien *A. ferrooxidans* no es el único organismo implicado en procesos de este tipo (Tabla 3) es uno de los más importantes y significativos. Además de los microorganismos ferrooxidantes y tiooxidantes mesófilos, existen microorganismos termófilos con importantes ventajas en las aplicaciones biohidrometalúrgicas, por lo que cada día cobra más fuerza la idea de la utilización de microorganismos termófilos, ya que el aumento de la temperatura conlleva una aceleración de la cinética química del proceso (Rivera et al., 2011).

A pesar de que especies como *A. ferrooxidans* es de las más estudiadas, tras conocerse las rutas metabólicas que propician el mecanismo de biolixiviación, este grupo de bacterias catalogados como acidófilos extremos, debe comprender solo una pequeña selección de entre otros más que tienen capacidades de procesamiento de minerales (Watling, 2006).

Tabla 3. Investigaciones realizadas empleando cepas bacterianas para lixiviación de minerales de interés (Elaboración propia).

Especie	Elemento o mineral recuperado	Cita
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Calcopirita	Zhao et al., 2013.
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Arsenopirita	Ospina et al., 2012.
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Oro a partir de concentrados de pirita y arsenopirita	Orrantia, 1997.
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Arsenopirita	Makita, 2004.
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Concentrados de calcopirita (CuFeS ₂), esfalerita (ZnS) y galena (PbS)	Mejía et al., 2011.
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Galena (PbS)	Márquez et al., 2007.

6. MATERIALES Y MÉTODOS: DIAGRAMA GENERAL.

En este apartado del trabajo se describirán los principios y técnicas que se utilizaron para cada análisis que se realizó con el fin de dar cumplimiento a los objetivos planteados. Así mismo, se presenta la Fig. 1 para ilustrar la metodología que se llevó a cabo.

Para el desarrollo del presente estudio se realizó el análisis granulométrico de la muestra, sin embargo, para los ensayos experimentales se utilizó la muestra de la malla 200 con un tamaño de partícula de $74\ \mu\text{m}$, ya que, de acuerdo a la bibliografía, este tamaño de partícula es el que se ha empleado para pruebas de pretratamiento o biolixiviación (Márquez et al., 2007; Khodijah et al, 2020; Quach et al, 2022; Zhao et al., 2013).

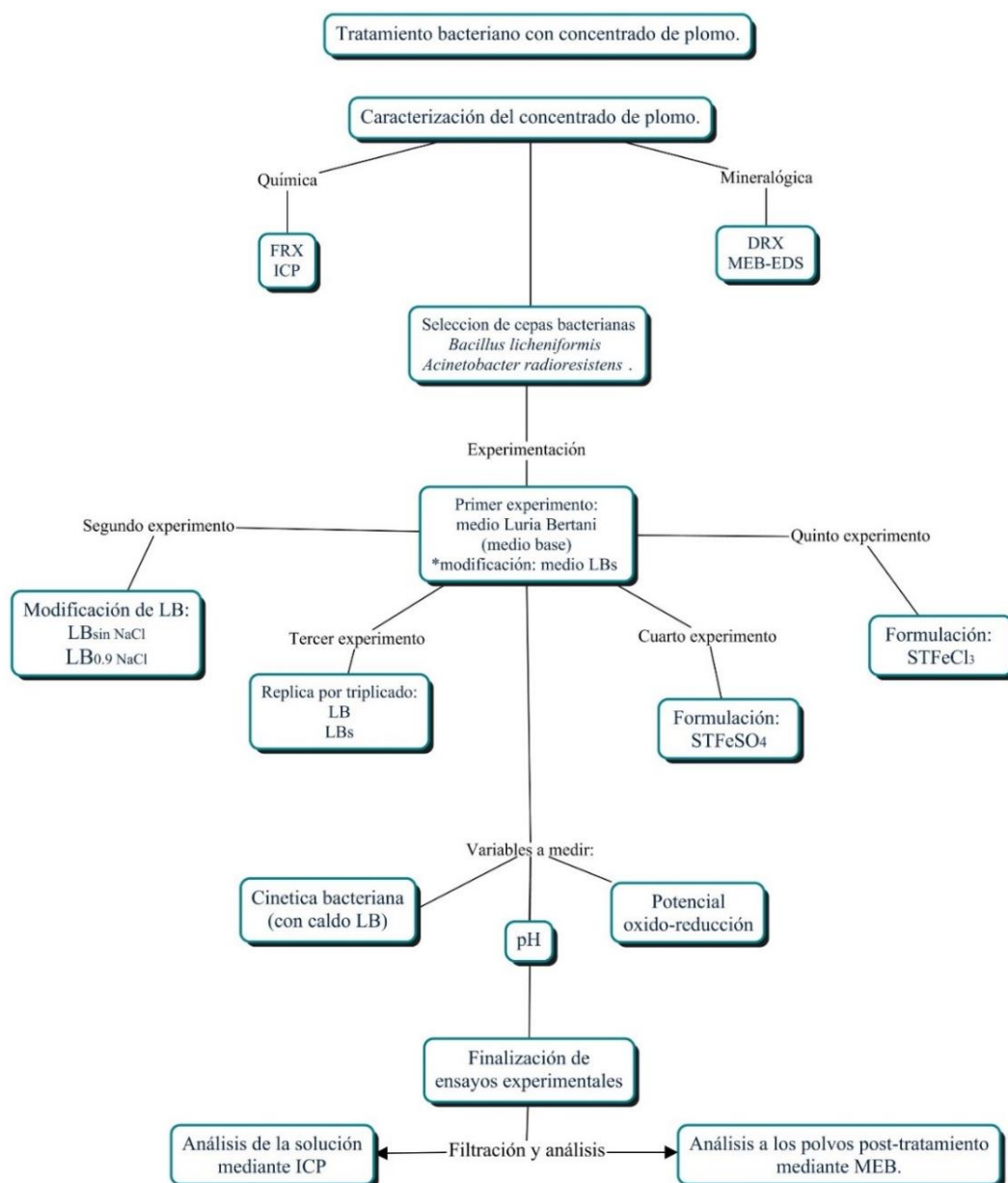


Fig. 1 Diagrama general de la metodología planteada para el desarrollo de la experimentación.

6.1 Obtención de la muestra.

La muestra de concentrado de plomo fue proporcionada por la compañía minera Carrizal Mining, ubicada en el municipio de Zimapán, Hgo., Mex., al Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), misma que es utilizada para los fines del presente estudio.

6.2 Análisis granulométrico.

Principio:

El análisis granulométrico se entenderá como la separación por un procedimiento manual o mecánico de las partículas constitutivas de un agregado según tamaños, de tal manera que se puedan conocer las cantidades en peso de cada tamaño de partícula que aporta al peso total. Para separar por tamaños se utilizan las mallas de diferentes aberturas, las cuales proporcionan el tamaño máximo de agregado en cada una de ellas. En la práctica, los pesos de cada tamaño se expresan como porcentajes retenidos en cada malla con respecto al total de la muestra. (Retsch, 2016).

Técnica:

Se llevó a cabo un deslame por vía húmeda de 1 kg de muestra. Se realizó en dos ciclos independientes colocando primero 500 gr y posteriormente otros 500 gr. El procedimiento consistió en disponer de un juego de mallas de la serie Tyler 100, 140, 200, 270, 325 y 400, se colocaron de mayor a menor, siendo la malla 100 la mayor, sobre una cubeta (anexo 1-a) y se adicionó un flujo de agua sobre la muestra durante 30 minutos para que de esta forma se diera el arrastre de las partículas por cada malla. Se dejó secar durante 2 días, después se pesó la cantidad retenida en cada malla, se colocó en bolsas para su almacenamiento y etiquetado con su respectivo número de tamiz.

6.3 Principios y técnicas de caracterización química.

Se menciona que la caracterización química y mineralógica se realizó únicamente de la muestra obtenida en la malla 200 de la serie Tyler.

Con la finalidad de obtener el análisis químico del concentrado de plomo, se llevaron a cabo las técnicas de Fluorescencia de Rayos X (FRX) y Espectrometría De Emisión De Plasma Acoplada Por Inducción (ICP), las cuales se explican a continuación con el fin de comprender el principio en el que se basa cada una.

6.3.1 Fluorescencia de Rayos X (FRX)

Principio:

La Fluorescencia de Rayos X tiene como finalidad el análisis químico elemental, cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo, de los elementos comprendidos entre el sodio (Na) y el uranio (U) de muestras sólidas y líquidas, es considerada una técnica analítica nuclear multi elemental espectroscópica que utiliza la emisión secundaria o fluorescente de radiación X generada al excitar una muestra con una fuente de radiación. Esta técnica permite la identificación de elementos en una muestra a partir de la lectura de la emisión de rayos X secundarios o fluorescentes que son emitidos desde la muestra luego de que ésta haya sido expuesta a la irradiación de rayos X primarios. Cuando los rayos X primarios provenientes de un tubo de rayos X o de una fuente radiactiva golpean una muestra, los rayos X pueden absorberse por el átomo o puede esparcirse a través del material. Si durante este proceso, los rayos X primarios tienen suficiente energía, los electrones son expulsados de los niveles internos, creando vacancias, estas vacancias se llenan con electrones de los niveles exteriores y en el proceso emite rayos X característicos cuya energía es la diferencia entre los niveles de energía transferidos. Dado que cada elemento tiene niveles de energía característicos, cada elemento produce rayos X específicos, permitiendo así medir la composición elemental de una muestra sin destruirla (De la Cruz, 2018).

Técnica:

Para este análisis se utilizaron 20 gr de muestra sólida contenida en una bolsa transparente y se colocó en el porta muestras del equipo. La muestra se analizó con un tiempo de prueba de 90 seg, rotándola cada 30, para lograr irradiar un mayor plano. Se utilizó un analizador portátil Nitón XL3t UltraThermo Scientific con un ánodo de Ag, 50 kV/200 (anexo 1-b) del laboratorio de Geoquímica Ambiental del Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). En una hoja de Excel se realizó el tratamiento de datos y se utilizó como material de referencia Montana 2710^a.

6.3.2 Espectrofotometría De Emisión De Plasma Acoplada Por Inducción (ICP)

Principio:

La espectrofotometría de emisión de plasma acoplado inductivamente (ICP), es una de las técnicas utilizadas para determinar elementos traza en una gran variedad de matrices que deben digerirse previamente para ser introducidas en forma líquida y ser transformadas mediante un nebulizador en aerosol y excitadas mediante un plasma de argón. La técnica se basa en un plasma altamente energético y eléctricamente neutro, que recibe la energía de un campo electromagnético de alta frecuencia o de una corriente continua que permite alcanzar una temperatura de hasta 8,000 K, las emisiones de los átomos excitados se recogen mediante un sistema óptico que separa la radiación según la longitud de onda, y finalmente un detector mide la intensidad de cada una de las radiaciones relacionando esta con la concentración de cada elemento en la muestra (Jiménez et al, 2020).

Técnica:

Para poder analizar mediante esta técnica se realizó una digestión ácida por triplicado a las muestras tamizadas con las mallas serie Tyler 100, 140, 200, 270, 325, 400 y -400. Se pesó en una balanza analítica 0.1 g de cada muestra y se colocó en vasos de precipitado de 100 mL. La digestión se realizó utilizando una parrilla de calentamiento a 200°C en donde se colocaron los vasos de precipitado y se inició agregando 10 mL de ácido clorhídrico (HCl) a cada vaso, se llevó hasta sequedad y posteriormente se adicionaron 10 mL de agua regia y 5 mL de ácido perclórico (HClO₄), se dejó evaporar hasta sequedad y se agregan 10 mL de HCl a cada vaso, se retiró de la parrilla y se dejó enfriar para su filtrado y se aforó a 100 mL. Se preparó un blanco con la misma composición de ácidos que se utilizó en la digestión (anexo 2-a), protocolo modificado de Martínez et al. (2018)

Para el análisis en ICP de las muestras se calibró el equipo usando el blanco y una curva de calibración de 3 puntos (1, 3 y 6 ppm) de un estándar multi elemental (antimonio (Sb), plata, (Ag), plomo (Pb), aluminio (Al), cobre (Cu), calcio (Ca) y potasio (K). Se realizó la lectura correspondiente de las muestras con un equipo Perkin Elmer 8300 (ver anexo 1-c), que se encuentra en el laboratorio ICP/ABSORCIÓN ATÓMICA del Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

6.4 Principios y técnicas de Caracterización Mineralógica.

El análisis mineralógico se realizó mediante las técnicas de Difracción de Rayos X y Microscopía Electrónica de Barrido-EDS (MEB-EDS), cuyo principio se explica en el siguiente apartado.

6.4.1 Difracción de rayos X (DRX).

Principio:

La difracción de rayos (DRX) es una técnica instrumental rápida, confiable y no destructiva, usada para la identificación de minerales y materiales cristalinos que se desconocen, dicha técnica es particularmente útil para la identificación de minerales de grano fino y mezclas de minerales que pueden no ser reconocidas por otras técnicas analíticas (Ochoa, 2017). La DRX tiene como fundamento el fenómeno de difracción de rayos X, descrito por la Ley de Bragg, dado que los rayos X poseen longitudes de onda del mismo orden de magnitud que los radios atómicos, al entrar en contacto esta radiación (rayos X) con un material cristalino, esta es difractada por los electrones que rodean los átomos de la muestra, produciéndose un patrón de difracción, que al ser estudiado y refinado permite el conocimiento de la posición, estructura y composición de las fases cristalinas que constituyen el material (Vera et al., 2018).

Los fundamentos de esta técnica provienen de la estructura tridimensional de los materiales, la cual se define como la repetición regular de planos de átomos que forman un cristal. Cuando un haz enfocado de rayos x interactúa con estos planos, parte de estos son transmitidos, absorbidos por la muestra, otra parte es refractada y dispersada, y otra parte más se difracta. Los rayos x son difractados de manera diferente para cada mineral, dependiendo de qué átomos componen la red cristalina y como están ordenados estos átomos. Los rayos x son generados dentro de un tubo sellado que se encuentra bajo vacío, aplicando una corriente de alto voltaje, se calienta un filamento (por lo general de cobre y cobalto) dentro del tubo, este voltaje acelera los electrones haciéndolos incidir sobre la muestra lo que resulta en la producción de rayos X con una longitud de onda (λ) específica de cada muestra, finalmente un detector capta la señal de los rayos x, procesándola y convirtiendo la señal en una frecuencia de conteo. El escaneo por rayos x resulta del cambio de ángulo entre el tubo emisor de rayos x, la muestra y el detector (Ochoa, 2017).

Cuando los rayos x inciden sobre la muestra y son difractados, los planos de átomos pueden ser medidos aplicando la Ley de Bragg, esta ley relaciona la longitud de onda de radiación electromagnética respecto al ángulo de difracción y a la distancia entre los planos de átomos en una muestra cristalina. La ley de Bragg descrita en (Bragg y Bragg, 1913) es:

Dónde:

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

n: número entero

λ : longitud de onda de los rayos x

d: distancia entre los planos de átomos

θ : ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión.

Como resultado de esta exposición se obtiene un Difractograma (Fig. 2) de las fases minerales presentes, que son comparados con software específicos con patrones establecidos para confirmar la composición mineralógica.

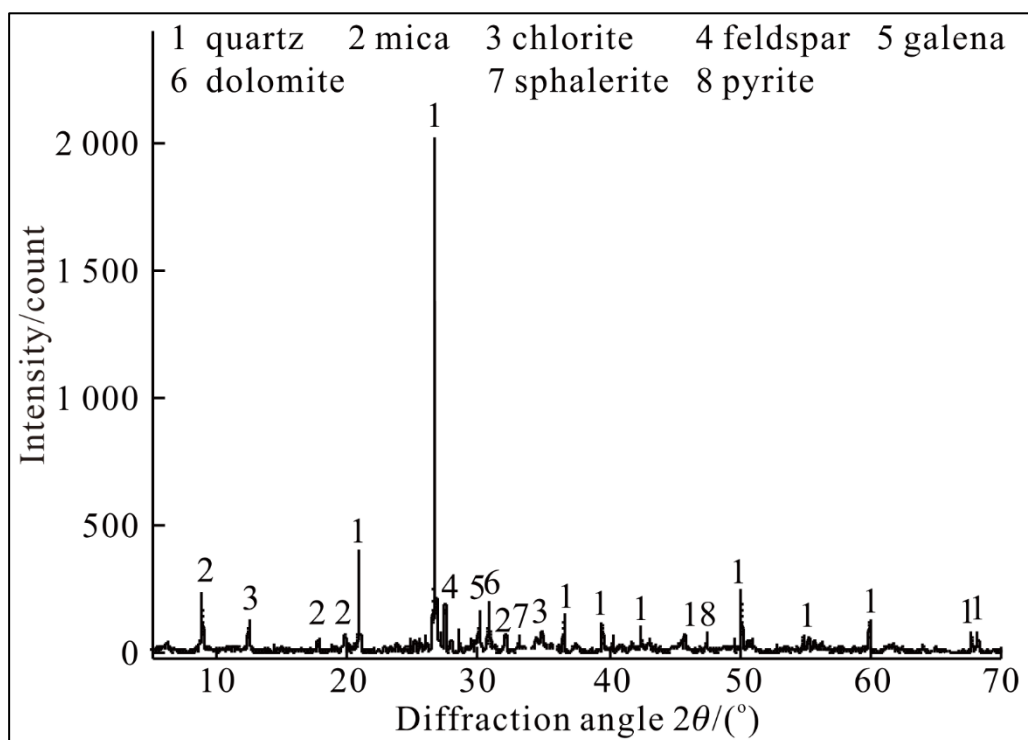


Fig. 2 Ejemplo de difractograma que se obtiene como resultado de un análisis de DRX. Obtenido de Chen y Xiao, 2017.

Técnica:

Para este análisis se envió al laboratorio de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí 20 g de muestra de la malla 200 sin ningún tratamiento previo y se utilizó un difractómetro de Rayos X D8-Advance a una velocidad de 8° por minuto.

Para realizar el grafico de las fases identificadas se utilizó el software OriginLab apoyándose de la base de datos de acceso libre Criystallography Open Database (COD, por sus siglas en inglés) graficando aquellos que revelaron una intensidad por arriba de 20 u.a.

6.4.2 Microscopía Electrónica De Barrido (MEB-EDS).

Principio:

La Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) es una técnica de análisis superficial, que consiste en enfocar sobre una muestra electrodensa (opaca a los electrones) un fino haz de electrones acelerado con energías de excitación desde 0.1kV hasta 50kV, resultando en un aporte de información sobre los distintos aspectos texturales y de la composición química que pueden aparecer en las muestras analizadas, en escala de micrómetros (μm) a nanómetros (nm). El analizador por dispersión de energía de rayos x (EDS) es una técnica de análisis no destructiva donde la radiación utilizada son los rayos x característicos que emite la muestra como resultado del bombardeo de electrones, y como resultado de este se obtiene información analítica sobre la composición y distribución elemental mediante mapeos del total o de zonas de la muestra de hasta unas cuantas micras de diámetro (Clavijo, 2013; Renau y Faura, 1994).

Técnica:

Para la caracterización del concentrado de plomo se realizaron dos análisis con esta técnica:

El primer análisis se realizó en polvo, que consistió en colocar en el portamuestras una pequeña porción representativa de la muestra para ser analizado con el microscopio Jeol IT-300 con un voltaje 30 kV a distintos aumentos con electrones secundarios y retrodispersados de la Escuela Superior de Apan, UAEH (anexo 1-d).

Para el segundo análisis se preparó una pastilla de resina, técnica modificada de Martínez (2019), encapsulando polvos de la muestra. Se dejó secando un día y se pulió por vía húmeda (anexo 1-e) con lijas de grano grueso a fino (320, 400, 600, 800 y 1200) hasta lograr un acabado en espejo (anexo 1-f) para la identificación de asociaciones minerales mediante la microscopía electrónica de barrido con electrones secundarios y retrodispersados.

6.5 Parámetros importantes relacionados al crecimiento bacteriano.

6.5.1 Importancia del metabolismo bacteriano.

Las bacterias necesitan un mínimo de nutrientes (agua, fuente de carbono y nitrógeno y algunas sales minerales) para crecer. De acuerdo a la forma en la que las bacterias puedan obtener esta energía para su crecimiento, se pueden clasificar en (Bado et al., 2008; Caycedo et al., 2021; Romero et al., 2012):

- Quimiótrofos o quimioorganotrofos: obtienen la energía de compuestos orgánicos.
- Fotótrofas: cuando la obtienen de la luz.
- Quimiolitótrofos o litótrofas (del griego lithos=piedra): cuando requieren sustancias inorgánicas como fuente de energía, por ejemplo, ácido sulfúrico (H_2SO_4), azufre elemental (S), amoníaco (NH_3), ion nitrito (NO^{2-}), hierro (Fe).

El termino metabolismo se refiere al conjunto de reacciones químicas que se producen en la célula con tres objetivos finales: 1) obtener energía química del entorno y almacenarla para usarla en diferentes funciones celulares, 2) convertir los nutrientes exógenos en unidades precursoras de los componentes macromoleculares de la célula bacteriana y 3) formar y degradar moléculas necesarias para cumplir funciones celulares específicas, como movilidad y captación de nutrientes.

El metabolismo se produce por secuencias de reacciones como resultado colectivo de dos reacciones que ocurren simultáneamente: catalizadas enzimáticamente, que actúan por presencia y aceleran las reacciones,

- Anabolismo, proceso en el cual la célula bacteriana sintetiza sus propios componentes resultando en la producción de nuevo material celular o también conocida como biosíntesis, un proceso que requiere energía, por lo que las bacterias deben ser capaces de obtenerla de su entorno, para crecer y eventualmente multiplicarse.
- Catabolismo se da un conjunto de reacciones degradativas de los nutrientes para convertirlos en energía o convertirlos en unidades precursoras de la biosíntesis.

Como resultado de los procesos metabólicos, existen bacterias que producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS), estos compuestos se componen de diversas sustancias orgánicas, incluidos polisacáridos, proteínas, ADN extracelular y lípidos y son utilizadas como una capa que protege a la célula contra condiciones extremas, al igual que se conoce que el uso de estas biopelículas sirve, para biomineralización, absorción de metales pesados y adsorción para los mismos y otros contaminantes orgánicos (Disi et al., 2023)

La utilización de la energía potencial contenida en los nutrientes se produce por reacciones de oxidación-reducción. Químicamente la oxidación está definida por la pérdida de electrones y la reducción por la ganancia de los mismos, en bioquímica, estas reacciones frecuentemente incluyen también la transferencia de átomos enteros de hidrógeno, por lo tanto, se conocen con el nombre de deshidrogenación. En el sistema con bacterias, los sistemas de oxidación-reducción transforman la energía química de los nutrientes en una

forma biológicamente útil mediante procesos que se conocen como respiración bacteriana, que de acuerdo con el aceptor final de electrones o de hidrógeno permite clasificar a los microorganismos por su tipo de respiración (Negroni, 2009):

- **Aerobios:** en donde los microorganismos requieren oxígeno para vivir, porque este es el aceptor final de hidrogeno, con el que se forman H_2O , mediante el ciclo de Krebs. Estos microorganismos se diferencian por producir la enzima catalasa.
- **Anaerobios:** estos microorganismos usan como aceptor final compuestos inorgánicos, como el hidrogeno que pueden reducirse, como los nitratos (NO_3) y sulfatos (SO_4).

6.5.2 Medios de cultivo.

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La diversidad metabólica de estos es tan grande que la variedad de medios de cultivo es enorme, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos, ni siquiera refiriéndonos a las bacterias con exclusividad. El crecimiento óptimo de bacterias depende de la composición del medio y de las condiciones físicas proporcionadas (Krishna et al., 2017).

Las bacterias reaccionan con una serie de elementos químicos y de acuerdo con las cantidades en que van a requerir de estos, se dividen en macro nutrientes (H, C, O, N, P, S, K, Mg) y micronutrientes (ej. Co, Cu, Zn y Mo), los cuales se pueden encontrar en la naturaleza formando parte de sustancias orgánicas y/o inorgánicas y son aquellos que las bacterias necesitan en pequeñas cantidades como nutrientes esenciales para el desarrollo bacteriano (Tabla 4) (Caycedo et al., 2021).

Tabla 4. Nutrientes esenciales y su función en el desarrollo bacteriano (modificado de Caycedo, 2021)

Nutriente	Función
Agua H₂O	Es el principal constituyente del protoplasto bacteriano, puede ser de fuente endógena, de procesos de oxido-reducción o exógena, que proceda del medio y se difunda a través de las membranas.
Dióxido de carbono CO₂	Requerido por todo tipo de bacterias, para autótrofas como fuente de carbono u oxidaciones de determinadas sustancias inorgánicas.
Nitrógeno y Azufre N₂ y S	Tanto el N y S se encuentran en la célula en estado reducido; el radical $-NH_2$ forma parte de los aminoácidos (a su vez constituye la base de las proteínas) y de las bases nitrogenadas (que participan en los ácidos nucleicos y en algunas coenzimas). El radical $-SH$ interviene en determinados aminoácidos y coenzimas como la Acetil CoA.

	Existen bacterias que pueden asimilar estos elementos en forma combinada inorgánica oxidada (NO_3 , SO_4) y algunas bacterias heterótrofas pueden asimilar alguna forma reducida, N y S inorgánico (NH_4^+ , S^{2-} , SH^-), S orgánico (cisteína) y N orgánico (aminoácidos, péptidos).
Sodio Na	Requerido por las bacterias como ion sodio (Na^{+1}) para crecer óptimamente, existen grupos que requieren concentraciones altas y aquellos que requieren bajas concentraciones.
Fósforo P	Es utilizado principalmente en la síntesis de macromoléculas como ácidos nucleicos, fosfolípidos, coenzimas y proteínas. Existen grupos de bacterias que pueden utilizar fosfatos orgánicos a través de enzimas (fosfatasas)
Catión proveniente del potasio (K) K^{+1}	Interviene en la activación de enzimas, participa en la síntesis de proteínas, en bacterias Gram positivas asociado con los ácidos teicoicos de la pared.
Catión procedente del magnesio (Mg) Mg^{+2}	Interviene en la funcionalidad de ribosomas, membranas y ácidos nucleicos, se desempeña como cofactor en muchas reacciones, especialmente las que implican transferencia de grupos fosfato (PO_4^{-3}), ej., en reacciones que requieren ATP.
Catión procedente del calcio (Ca) Ca^{+2}	Actúa en reacciones enzimáticas como cofactor de proteinasas, estabiliza la pared celular y ayuda a la termorresistencia de endosporas.
Cationes ferroso y férrico procedentes del hierro (Fe) Fe^{+2} y Fe^{+3}	El hierro forma parte de muchas moléculas implicadas en procesos de respiración, como citocromos y ferro proteínas no heminas (proteínas con Fe-S), interviene como cofactor en la función de ciertas enzimas (catalasas, peroxidasas, nitrogenasas y oxigenasas).

6.5.3 Medio Luria Bertani (LB)

El medio Luria Bertani (LB), es uno de los más usados para aislamiento de diferentes cepas de bacterias, debido a que es rico en nutrientes, de fácil elaboración y permite el crecimiento de una gran variedad de cepas. Está constituido por tres componentes, de los cuales uno es mineral, el NaCl y dos componentes orgánicos: la triptona (peptona) y el extracto de levadura. La triptona proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El extracto de levadura es fuente de vitaminas, particularmente del grupo B y el cloruro de sodio ayuda a mantener el equilibrio osmótico (Garboza et al., 2011).

6.5.4 Modificación de los medios de cultivo.

Se tomó medio Luria Bertani (LB) como medio base, del cual se realizó un primer experimento junto con una modificación con sacarosa (LB_S), tras los resultados de este primer experimento se propusieron dos modificaciones más al medio, que se enlistan en la Tabla 5 con el nombre con el que se identifican a lo largo de este trabajo.

Se propuso la formulación de Soya Trypticaseína con cloruro férrico (FeCl₃) y Caldo Soya Trypticaseína con sulfato ferroso (FeSO₄), al considerar que cumplen con los requerimientos básicos como fuente de energía que las cepas requieren.

Tabla 5. Medios de cultivo propuestos para experimentación

Descripción del medio de cultivo	Nombre con el que se identificará a lo largo del trabajo.
*Medio de cultivo base Caldo Luria Bertani (anexo 2-b)	LB
*Modificación Caldo Luria Bertani y sacarosa. (anexo 2-c)	LB _S
*Modificación de caldo Luria Bertani sin cloruro de sodio (NaCl) (anexo 2-d)	LB _{sin NaCl}
*Modificación caldo Luria Bertani con 0.9 g de NaCl (anexo 2-e)	LB _{0.9 NaCl}
Caldo soya tripticaseína con Sulfato ferroso. (anexo 2-f)	ST _{FeSO4}
Caldo soya tripticaseína con Cloruro Férrico (anexo 2-g)	ST _{FeCl3}

6.5.5 Relación del pH en el crecimiento bacteriano.

Principio:

El pH es considerado un factor químico importante en el proceso relacionado al crecimiento de microorganismos. Dentro del rango, los valores de pH menores de 7 son ácidos y los más altos de 7 son considerados alcalinos o básicos, es así que cada microorganismo tiene un intervalo de pH, normalmente de entre 2 y 3 unidades, dentro del cual es posible el crecimiento y pueden clasificarse, según el pH óptimo externo en el cual se desarrollan, como (Madigan et al., 2015):

- Neutrófilos: organismos que crecen de manera óptima a un valor de pH en el intervalo neutro de 5.5 a 7.9.
- Acidófilos: crecen mejor a pH por debajo de 5.5, solo hay un grupo muy restringido que crece de manera óptima a pH por debajo de 2 y los que crecen a rangos de 1 o inferiores son extremadamente raros, la mayoría de los acidófilos no puede crecer a pH 7 y muchos no pueden crecer a valores de más de dos unidades por encima de su pH óptimo.
- Alcalófilos: son microorganismos con crecimiento óptimo a pH 8 o más, se encuentran en hábitats muy alcalinos como lagos o suelos muy carbonatados.

Técnica:

Para el monitoreo de pH se utilizó un potenciómetro Thermo Scientific Orion Star A211 (anexo 1-g), con un electrodo de referencia asociado y para su calibración se utilizó buffer de referencia 4, 7 y 10. La medición se realizó de manera directa en el matraz del control, del blanco y las réplicas de cada experimento. Entre cada medición se enjuagó con agua destilada, y el registro se realizó en una hoja de Excel por tiempos para la construcción de la gráfica de cada cepa (*Bacillus licheniformis*-JC15 y *Acinetobacter radioresistens*-JC36).

6.5.6 Implicación del potencial oxido reducción (redox).

Principio:

Un proceso redox consiste en una reacción química entre especies que actúan como oxidantes (aceptoras de electrones) y reductoras (cede electrones). El mismo da lugar a productos constituidos por especies oxidadas o reducidas respectivamente (Fagundo et al., 2005).

El potencial redox es una medida de la actividad de los electrones, como el pH es la medida de la actividad de los protones, por lo que la identificación del potencial de óxido-reducción (ORP), es un factor crítico en la evolución de la oxidación de los compuestos inorgánicos, es considerada una forma de medir la energía química de oxidación-reducción mediante un electrodo, convirtiéndola en energía eléctrica, se determina con un electrodo de referencia de platino y un electrodo de hidrógeno conectado a un potenciómetro. Se cuantifica en voltios, que representa la energía liberada por todos los componentes en una

fracción de tiempo cuando un número de electrones viajan desde una fase a otra, es decir entre el sustrato y el electrodo de platino. El potencial redox es positivo cuando se produce una oxidación y negativo cuando se produce una reducción (Arias et al., 2021).

Técnica:

Para el monitoreo de la variación del potencial óxido reducción se utilizó un potenciómetro Thermo Scientific Orion Star A211 (anexo 1-g), con un electrodo de referencia asociado. La medición se realizó de manera directa en el matraz del control, del blanco y las réplicas de experimento, en tiempos específicos para cada uno. Entre cada medición se enjuaga con agua destilada, y el registro se realizó en una hoja de Excel por tiempos para la construcción de la gráfica de cada cepa.

6.5.7 Escala McFarland

Principio:

La escala McFarland se basa en una serie de tubos estandarizados que contiene una suspensión de un precipitado fino que se asemeja a suspensiones bacterianas en opacidad (Fig. 3). Los estándares que se utilizan son precipitados de sulfato de bario que resulta de la mezcla de cloruro de bario con ácido sulfúrico. Las suspensiones bacterianas se comparan visualmente con los estándares hasta encontrar al más similar en turbiedad y se le relaciona con el número de células de acuerdo con cada estándar (Tabla 6) (Fiallos, 2017).

Tabla 6. Escala McFarland obtenida de Bioanalytic GmbH.

Estándar McFarland	1% BaCl ₂ (mL)	1% H ₂ SO ₄ (mL)	Densidad aproximada de recuento de células (x10 ⁸ células)
0.5	0.05	9.95	1.5 x 10 ⁸
1.0	0.1	9.9	3.0 x 10 ⁸
2.0	0.2	9.8	6.0 x 10 ⁸
3.0	0.3	9.7	9.0 x 10 ⁸
4.0	0.4	9.6	12.0 x 10 ⁸



Fig. 3 Tubos estándar McFarland. Imagen obtenida de Bioanalytic GmbH.

Técnica:

Para realizar el estándar, se sembraron las dos cepas (JC15 y JC36) en caldo nutritivo (anexo 2-h) en tubos Eppendorf y se dejaron en incubadora (anexo 1-h) 30°C durante 12 horas para tener un buen crecimiento. Transcurridas las 12 horas se observó el crecimiento de cada cepa para su estandarización. Se utilizaron cuatro tubos de ensaye y se preparó Solución Salina Isotónica (SSI) al 0.6 % (ver anexo 2-i), se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 120°C, así como puntas de 1000 µL que se utilizaron en el proceso.

Para la preparación del estándar el procedimiento se llevó a cabo en campana de flujo laminar en todo momento. Para estandarizar cada cepa se centrifugaron los tubos Eppendorf a 12,000 rpm durante 10 minutos, para luego desechar el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 700 µL de SSI. Posteriormente se pasó por vórtex para homogeneizar. Se agregó a los cuatro tubos de ensaye 2800 µL de SSI y 700 µL de cada cepa y se etiquetó para su identificación. Se continuó agregando SSI a cada tubo comparando la turbidez de la suspensión bacteriana con el estándar McFarland no. 1 hasta lograr la semejanza con este, protocolo modificado de Ulloa (2015).

6.5.8 Espectrofotometría: método para cuantificación de crecimiento bacteriano.

Principio:

El crecimiento de la población bacteriana se mide a partir de los cambios en el número de células o en la concentración de algún componente celular (proteínas, ácidos nucleicos o peso seco de las células), como estimación del número de células y para su medición existen métodos como el recuento de células y la turbidez, método que está en función de la masa celular. La base de este método consiste en la medición de cantidad de luz dispersada o transmitida a través de un cultivo bacteriano. El fundamento de estos métodos radica en la interacción de la luz con un cultivo bacteriano. Las suspensiones bacterianas dispersan la luz, al igual que cualquier partícula relativamente pequeña suspendida en agua, por lo tanto, dicha dispersión es proporcional a la masa del cultivo (Madigan et al., 2015; Iañez, 1998).

Para llevar a cabo estas determinaciones se utiliza un espectrofotómetro, el cual mide la densidad óptica (D.O.), que es considerada la unidad de turbidez. Las longitudes de onda utilizadas normalmente para las mediciones turbidimétricas bacterianas incluyen 480 nm (azul), 540 nm (verde) y 600 nm (rojo). En este equipo la luz atraviesa un tubo conteniendo el cultivo bacteriano, el cambio entre la intensidad de luz que incide en el cultivo y la transmitida se registra en el equipo de espectrofotometría como densidad óptica (D.O). A medida que la concentración celular aumenta, el cultivo se hace más turbio y se reduce la cantidad de luz transmitida que alcanza la célula fotoeléctrica (dicha intensidad se detecta como corriente en un galvanómetro) (Madigan et al., 2015).

Técnica:

Esta técnica se utilizó para determinar el crecimiento de las cepas en los medios (caldo LB, LB_S, LB_{sin NaCl}, LB_{0.9 NaCl}), para el procedimiento se utilizaron cubetas de cuarzo (anexo 1-i) en las que se agregaron aproximadamente 10 mL de cada suspensión bacteriana para ser analizadas en el espectrofotómetro MAPADA Nanogenius del laboratorio de Genética del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH (ver anexo 1-j), se evaluó a una longitud de onda de 600 nm. Para construir la gráfica de cinética se registró por tiempos la D.O. de cada cepa (JC15 y JC36) en una hoja de Excel.

6.6 Selección de cepas bacterianas para ensayos experimentales de pretratamiento.

La selección de las cepas como pretratamiento de biolixiviación se realizó tras la valoración de las concentraciones de los elementos que constituyen el concentrado de plomo, con la finalidad de elegir aquellas cepas tolerantes a estas concentraciones para así evitar la muerte celular. Dadas las altas concentraciones de plomo, se eligió trabajar con cepas pertenecientes a las especies bacterianas *Bacillus licheniformis* (JC15) y *Acinetobacter radioresistens* (JC36), las cuales en el estudio realizado por Baltazar (2021), mostraron crecimiento a concentraciones de 6000 ppm de Pb, superando lo reportado en otras investigaciones.

6.6.1 Generalidades de *Bacillus licheniformis*

Las bacterias del género *Bacillus*, hasta la fecha, no han sido bien descritas filogenéticamente, sin embargo, el grupo se caracteriza por ser bacterias aeróbicas y anaeróbicas, capaces de formar endosporas características que las hace resistentes a temperaturas extremas, químicos, factores ambientales e incluso algunos tipos de radiación y por tanto se pueden utilizar en procesos industriales (Jiménez et al., 2018; Dobrzyński et al. 2023).

Bacillus licheniformis es una especie bacteriana Gram positiva formadora de endosporas. Tiene un alto interés biotecnológico con numerosos usos potenciales, incluida la producción de compuestos bioactivos que pueden aplicarse en una amplia gama de campos como la acuicultura, agricultura, biomedicina e industrias (Muras et al., 2021). Estudios han demostrado que la inoculación de *B. licheniformis* podría acelerar la degradación de componentes orgánicos, proceso que está estrechamente relacionada con la actividad enzimática (Su et al., 2024).

Abraham y colaboradores (2020) reportaron el aislamiento de una cepa de *B. licheniformis* con la capacidad de tolerar concentraciones de metales pesados y, observaron el crecimiento de las cepas en concentraciones de 120 mg/L de Cu y Ni y en el caso de Pb el mayor crecimiento se registró a 140 mg/L.

6.6.2 Generalidades de *Acinetobacter radioresistens*.

El género *Acinetobacter* abarca bacterias Gram negativas, con forma de coccobacilos, que se encuentran distribuidos en la naturaleza pudiendo aislarse del agua y suelo (Jamil y Rasheed, 2023). Algunas especies de este género forman biopelículas que facilitan su adhesión a superficies abióticas y bióticas. El alto poder del metabolismo de *Acinetobacter* expresa actividades enzimáticas en la asimilación o dispersión de metabolitos en el ambiente, sin embargo, aún no se ha estudiado lo suficiente sobre el metabolismo de las especies pertenecientes a este género, ya que una gran parte se enfoca en cepas patógenas para el humano. Se sabe que exhiben actividades proteolíticas, hidrolizando (gelatina, caseína y proteínas solubles en agua del musculo de la carne de res) (Carvalho, 2024).

Acinetobacter radioresistens es una especie que se caracteriza por ser resistente a la radiación, desecación y otros agentes microbianos, con cepas capaces de crecer en fenol o benzoato como única fuente de carbono y energía, por lo que se puede considerar como una bacteria con fines beneficiosos y prometedora, con aplicaciones en varias áreas, como la eliminación de fosfatos, desechos aromáticos, derrames y degradación de ocratoxina (Mohamed et al., 2021).

Como se plantea en los antecedentes, estas especies, cuentan con algunos estudios respecto a la tolerancia de metales pesados, punto importante que se ha tomado en cuenta para su selección en la evaluación del presente estudio, para su posible uso en el proceso de biolixiviación.

7. ENSAYOS EXPERIMENTALES.

La experimentación se dividió en 3 fases; montaje de experimentos, filtración y análisis: mediante ICP y MEB, que se explicará de manera detallada.

7.1 Preparación de medios de cultivo:

Técnica:

Para la preparación de cada medio se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL en los cuales se distribuyó 150 ml de cada medio (modificado de Khodijah et al., 2020) y para cada ensayo experimental se realizó el cálculo correspondiente a utilizar en función del número de réplicas que se realizarían (lo cual fue variando entre experimentos), se pesó con balanza analítica y se diluyó en agua destilada utilizando frascos para medio de cultivo (anexo 1-k), se colocó en parrilla de calentamiento con agitación hasta homogeneizar durante 20 min a 150°C y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 120°C utilizando papel aluminio como tapón de cada matraz durante todo el proceso para evitar lo menos posible su contaminación y se dejó enfriar en campana de flujo laminar (anexo 1-l) para su inoculación. Se pesaron 2.5 gramos de concentrado de plomo con balanza analítica y se colocaron en tubos Eppendorf para ser esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 120°C, para asegurar su inocuidad al agregarse en la experimentación.

7.2 Montaje de ensayos experimentales:

Técnica:

Para cada experimento se preparó el estándar McFarland y los medios de cultivo como previamente ya se describió. La Tabla 7 muestra la composición que tuvo cada experimento, se realizó la siembra de 1500 μL de estándar de cada cepa para su acoplamiento con cada medio a experimentar, el procedimiento se realizó en campana de flujo laminar utilizando puntas estériles de 1000 μL y se dejó cada matraz 12 horas en agitación constante a 120 rpm a temperatura ambiente utilizando aluminio como tapón para evitar la contaminación del medio. Posterior al acoplamiento se agregó el concentrado de plomo, considerando este paso como tiempo cero del experimento y se inició el registro de las primeras horas de las técnicas de espectrofotometría o siembra en placa, pH y redox (en los casos en que aplico cada una). Cada experimento se dejó cinco días en agitación constante a 130 rpm en un agitador orbital (anexo 1-m) y a temperatura ambiente.

Tabla 7. Composición para cada matraz de experimentación.

Matraz con:	Composición:
Blanco	150 mL medio de cultivo
Control	150 mL medio de cultivo 2.5 g concentrado de plomo
LB	1500 μL de estándar McFarland de cada cepa
LB_S	2.5 g concentrado de plomo
LB_{sinNaCl}	
LB_{0.9NaCl}	
ST_{FeCl3}	
ST_{FeSO4}	

*Para caldo LB_S la sacarosa se agregó al mismo momento que se adicionó el concentrado de plomo.

*Para la siembra en placa se prepararon 8 cajas de agar nutritivo (anexo 2-j), utilizando una parrilla de calentamiento con agitación para su preparación, se esterilizó el

medio durante 20 minutos a 150°C, y en campana de flujo laminar se realizó su vacío en cajas Petri de plástico, se dejó 10 minutos para solidificar y se almacenó en refrigeración para su uso.

El montaje de experimentos se dividió en 5, con especificaciones de cada uno que se explican de manera individual a continuación:

Primer ensayo: medio LB y LB_s, se evaluó la cinética de las cepas JC15 y JC36 mediante espectrofotometría para determinar la viabilidad de este medio para el crecimiento de las cepas.

Segundo ensayo: se evaluaron dos medios, medio LB_{sinNaCl}, se evaluó con las cepas JC15 y JC36 y el medio LB_{0.9NaCl} solo con la cepa JC15.

Para ambos medios se colocó un blanco y un control y se registró la cinética bacteriana mediante espectrofotometría, la medición de pH y redox.

Tercer ensayo: se replicó el medio LB y LB_s por triplicado de cada cepa para fiabilidad de los datos, así como un blanco y control para cada medio. Solo se registró el pH y redox teniendo el antecedente de la cinética realizada del primer experimento.

Cuarto ensayo: para ST_{FeSO4} se evaluó el crecimiento de las cepas mediante resiembra en placa, ya que por la turbidez del medio no se pudo evaluar mediante espectrofotometría, se registró el pH y redox.

Quinto ensayo: ST_{FeCL3}, se evaluó el crecimiento de las cepas mediante resiembra en placa, ya que por la turbidez del medio no se pudo evaluar mediante espectrofotometría, se registró el pH y redox.

Filtración

Esta fase se llevó a cabo con la finalidad de separar los polvos de concentrado de plomo expuestos en los medios y procurar una solución libre de partículas para sus respectivos análisis mediante ICP.

Técnica:

El filtrado se realizó en dos ciclos; el primero utilizando papel filtro Wattman no. 4 (anexo 1-n) y embudos de vidrio de tamaño mediano, se pasó por el filtro la solución en un promedio de 4-5 veces, para el segundo ciclo se realizó un filtrado utilizando un sistema de vacío (anexo 1-o) con una bomba Rocker 300 para asegurar la retención de partículas. El líquido resultante se colocó en viales de ámbar para su refrigeración y análisis. Los polvos del concentrado contenidos en el papel filtro, se dejaron secando por dos días y se analizaron mediante MEB-EDS.

7.3 Análisis mediante ICP y MEB de los ensayos experimentales.

Para el análisis de la solución resultante del filtrado se realizó la lectura correspondiente de las muestras con un equipo Perkin Elmer 8300 (anexo 1 c), el equipo se calibró con el blanco de cada experimento y una curva de 3 puntos (0.5, 1.5 y 3 ppm) de un estándar multi elemental de Pb, Ag y Sb para determinar la concentración de estos elementos en los ensayos.

- **Análisis MEB a los polvos con tratamiento bacteriano.**

Para este análisis se obtuvieron micrografías utilizando dos técnicas: un análisis se realizó con el microscopio Jeol IT-300 de la Escuela Superior de Apan, UAEH (anexo 1 d) utilizando cinta doble cara para el montaje de las muestras, la cinta impregnada con una pequeña porción representativa de la muestra de los polvos y aplicando un recubrimiento de oro. Para el segundo análisis se utilizó un microscopio de mesa Thermo Scientific Phenom XL (anexo 1-p) de la Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, no se aplicó recubrimiento de oro. El estudio consistió en realizar un barrido general de las muestras a distintos objetivos para evaluar la morfología de las partículas. Este análisis se realizó tomando en cuenta criterios mencionados por Martínez (2010).

7.4 Análisis estadístico: prueba de T pareada.

La prueba de T pareada, también conocida como prueba de t de muestras relacionadas, permite contrastar las medias de dos grupos relacionados y permite determinar si hay una diferencia significativa entre éstas. Esta prueba puede utilizarse para evaluar diseños en los que las muestras son emparejadas de acuerdo a una serie de variables para controlar su efecto (ejemplo, en los diseños de casos y controles), de igual manera es útil cuando el tamaño de las muestras es pequeño o cuando no se cumplen los requisitos que exige una prueba paramétrica (Rubio y Berlanga, 2010; Gómez et al. 2003). La fórmula que se aplica es la siguiente:

$$t = \frac{\mu_d}{\frac{s_d}{\sqrt{n}}}$$

Donde:

μ_d es la media de las diferencias entre los pares de observaciones.

s_d es la desviación estándar de las diferencias entre los pares de observaciones.

n es el número de observaciones.

- **Análisis de varianza (ANOVA, de dos vías).**

El análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) es un conjunto de técnicas estadísticas de gran utilidad y plasticidad, cuando se presentan más de dos grupos que necesitan ser comparados, cuando hay mediciones repetidas en más de dos ocasiones, cuando los sujetos pueden variar en una o más características que afectan el resultado y se necesita ajustar su efecto o cuando se desea analizar simultáneamente el efecto de dos o más tratamientos. La ANOVA (de 2 o más factores o de medidas repetidas) son extensiones que se basan de la misma lógica. La varianza total en este caso, también se divide en varianza entre los grupos y la varianza dentro o residual. Esta herramienta estadística permite analizar la influencia simultánea de dos variables independientes en una variable dependiente continua, examinando tanto los efectos principales de cada variable como las posibles interacciones entre ellas (Dagnino, 2014).

Técnica:

Se elaboró una matriz de datos en Excel con la recuperación de Pb, Sb y Ag que se obtuvo de los ensayos experimentales (LB, LB_S, ST_{FeSO4} y ST_{FeCl3}) y se llevó a cabo una prueba de T pareada para determinar si la disolución de éstos elementos en presencia de bacterias es mayor respecto al control, posteriormente, se seleccionaron las muestras que tuvieron una diferencia significativa de recuperación respecto al control y se utilizó el software Past (por sus siglas en inglés) para llevar a cabo un ANOVA de dos vías y establecer la diferencia entre tratamientos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1 Análisis granulométrico.

La Tabla 8 muestra la granulometría del concentrado mineral de plomo expresada en porcentaje y el correspondiente análisis químico cuantitativo para cada tamaño de partícula retenido en la serie de tamices Tyler 100 (147 μm), 140 (105 μm), 200 (75 μm), 270 (53 μm), 325 (44 μm) y 400 (37 μm).

Se reporta que en la malla 100 y 140 se tiene un peso retenido aparentemente similar y que en conjunto suman el 81.94% de la muestra. En la misma tabla se enlista la concentración química de los elementos que se evaluaron expresado, a excepción de la plata, en porcentaje (%), siendo que la mayor concentración se le atribuye al plomo (Pb) con variación en cada malla, sin embargo, puede asumirse que la distribución de los elementos es homogénea. Martínez et al. (2020) reporta una alta concentración de plata de un concentrado de plomo con un promedio de 3.6 g/ton, lo que supera los resultados de este trabajo, sin embargo, la presencia de elementos como cobre (Cu) y plomo (Pb) concuerdan en un concentrado de esta naturaleza.

Tabla 8. Distribución de elementos contenidos en la muestra y de los pesos retenidos correspondientes a cada tamaño de partícula.

Concentrado de Plomo											
Malla	Apertura (μm)	Retenido en malla (g)	% retenido	% que pasa	Porcentaje de concentración						
					mg/g	(%)					
					Ag	Sb	Pb	Al	Cu	Ca	K
100	147	419.95	42.00	58.01	2694.3	0.22	38.7	0.07	6.28	2.66	0.15
140	105	399.42	39.94	18.06	2870.3	4.24	43.3	0.06	5.63	2.35	0.06
200	75	29.49	2.95	15.11	2760.3	2.72	39.8	0.06	4.85	1.74	0.11
270	53	51.09	5.11	10.01	2999.3	1.42	42.4	0.07	5.86	2.14	0.19
325	44	7.58	0.76	9.25	2248	2.93	46.3	0.05	5.5	2.38	0.14
400	37	3.66	0.37	8.88	2014.3	7.57	37.2	0.03	3.43	1.30	0.04
-400		88.81	8.88	0.0	2344.3	7.47	35.3	0.04	3.84	1.86	0.03
Total		1000	100.0								

8.2 Caracterización química.

8.2.1 Fluorescencia De Rayos X (FRX).

Mediante la técnica de FRX se determinó la composición química del concentrado mineral, la cual se presenta en la tabla 9. Con estos resultados se puede observar que el elemento de mayor concentración es el plomo con una estimación del 22.36%, y la composición por elementos como plata (Ag), cobre (Cu), antimonio (Sb), hierro (Fe), arsénico (As), azufre (S), entre otros, tienen una representatividad menor en la muestra.

Estos resultados son consistentes con el estudio realizado por Martínez et al. (2018), con la presencia de elementos como; plomo (Pb), plata (Ag), antimonio (Sb), azufre (S), zinc (Zn), cobre (Cu), etc., con una estimación de contenido aún más bajo de Pb (14.81%), Ag (0.12%) y Sb (3.15 %). Sin embargo, Khodijah et al. (2020) reportan una constitución similar al analizar un tamaño de partícula de 75 μm con valores para el Pb (38.26%), Fe (8.73%), S (8 %), entre otros que superan lo reportado en estos resultados , no obstante, Hassan et al. (2011) reportan una muestra constituida por 16.34% de plomo, seguido de un 34.23% de S y un 28.67 % de Fe, lo que hace evidente la variación en cuanto a estimación de cada elemento presente, sin embargo, puede decirse que la composición química se asemeja con lo revisado en otros trabajos.

Tabla 9. Composición elemental del concentrado de plomo, resultado del análisis de FRX.

Elemento	Contenido %
Ag	0.2130
Pb	22.36
S	5.37
Fe	4.92
Zn	1.65
Cu	1.8
As	2.21
Sb	6.85
Ca	3.44
K	0.37

8.2.2 Espectrofotometría de Emisión de Plasma Acoplada por Inducción (ICP).

En la Tabla 10 se presentan los resultados cuantitativos de la concentración de los metales en solución, cabe recordar que este análisis estuvo determinado por la constitución del estándar multi elemental que se preparó, por lo que no se reportan elementos como el S o el Fe. En la tabla se puede observar que el plomo (Pb) es el elemento más predominante con un 39.81% respecto a los elementos que se determinaron: Cu, Sb, Ca, K y Al siendo su concentración por valores debajo del 5%. El contenido elemental de este análisis concuerda con lo reportado por Arellano (2020), respecto a la presencia de Ag, Cu, y Pb, sin embargo, el contenido de Pb fue mayor en dos de los análisis obtenidos por este autor, mientras que solo una muestra se asemeja en concentración de Pb (30.39%) con lo aquí reportado.

De igual manera Larrabure et al. (2023) reporta que en un sulfuro polimetálico que contiene plata, los elementos más abundantes son el S, Pb, Fe y, Mn, sin embargo, los valores reportados por estos autores en Pb (21.7%) y Sb (0.7%) son más bajos respecto a la concentración que se encontró en la muestra analizada en este trabajo, sin embargo, para Ag fue mayor (0.8%).

Tabla 10. Composición elemental del concentrado de plomo, resultado de análisis mediante ICP.

Elemento	Contenido %
Ag	0.27
Pb	39.81
Al	0.06
Cu	4.85
Sb	2.72
Ca	1.74
K	0.11

8.3 Caracterización mineralógica.

8.3.1 Difracción de Rayos X (DRX).

Como resultado del análisis mediante DRX se logró determinar que la composición está dada por minerales metálicos y minerales de ganga que se enlistan en la Tabla 11, con el respectivo porcentaje representativo en la muestra, siendo la boulangerita y la galena los minerales predominantes con un 37.6 % y 35.6% respectivamente. En la Fig. 4 se muestran las fases minerales que revelaron una intensidad alta (por arriba de 20 u.a) debido a la naturaleza cristalina de la mayor parte del material (Chen y Xiao, 2017).

La asociación de estos minerales ya ha sido reportada de diferentes maneras; como puede ser que predomine la galena con una baja cantidad de calcopirita y esfalerita o pirita (Khodijah et al., 2020; Márquez et al., 2007) o lo contrario, que los minerales que se consideran valiosos representen una cantidad más pequeña (Peng et al., 2023; Chen y Xiao, 2017; Runqing et al., 2015).

Tabla 11. Composición elemental del concentrado de plomo, resultado de DRX.

		Fórmula química	Contenido (%)
Mineral metálico.	Boulangerita	(Pb ₅ Sb ₄ S ₁₁)	37.6%
	Galena	(PbS)	35.6%
	Jamesonita	(Pb ₄ FeSb ₆ S ₁₄)	8.4%
	Anglesita	(PbSO ₄)	5.5%
	Esfalerita	(Zn _{0.721} Fe _{0.279}) S	0.9%
Mineral de ganga	Albita	(NaAlSi ₃ O ₈)	8.9%
	Yeso	(CaSO ₄)2H ₂ O	3.1%

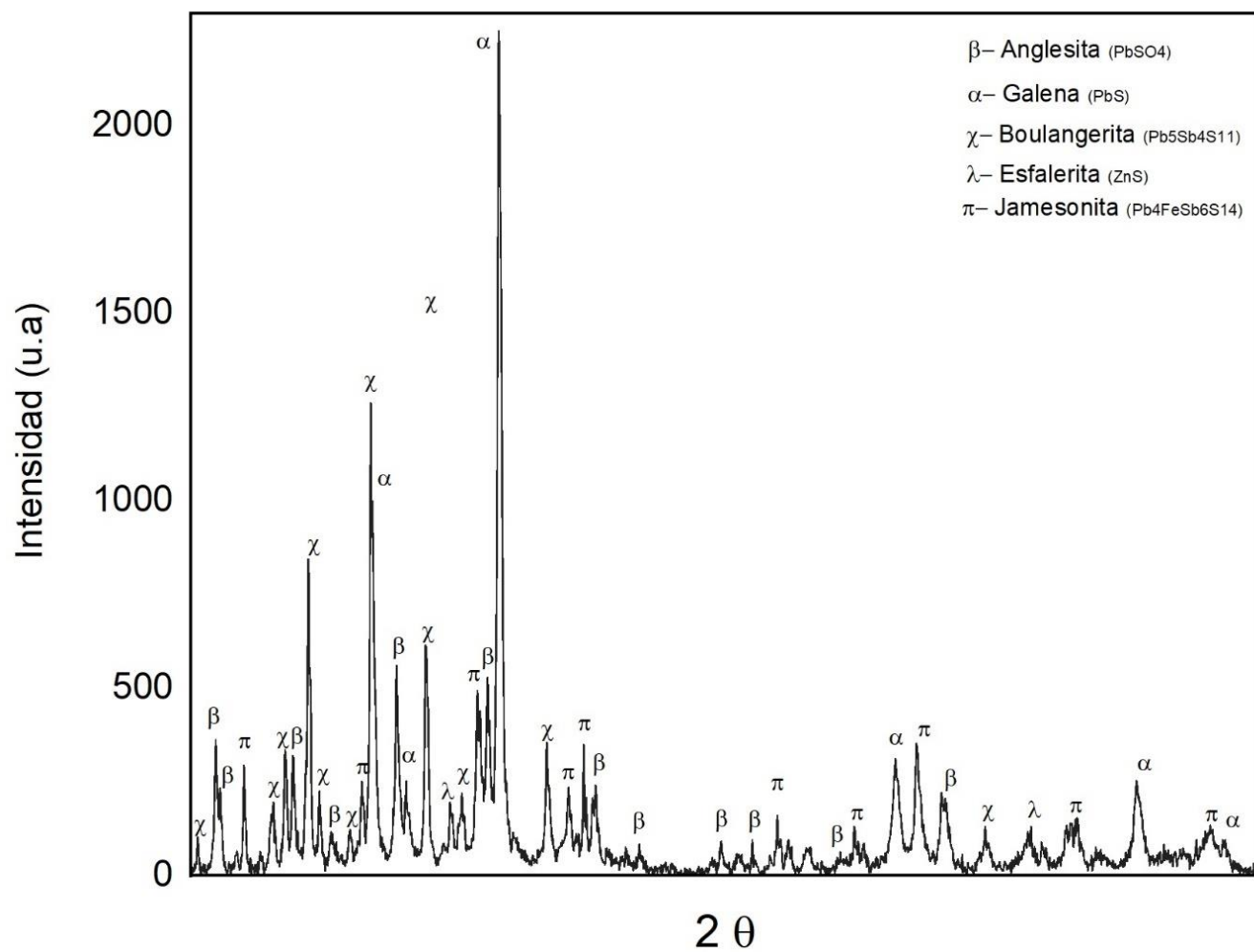


Fig. 4 Fases minerales identificadas mediante DRX en la muestra de concentrado de plomo.

8.3.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB-EDS).

Como resultado del barrido en distintos puntos, se diferenció una generalidad de partículas con morfología regular y bordes lisos característicos de minerales como la galena, identificada también en el estudio por Martínez (2019), en la Fig. 5 a) tomada a un aumento de 150x, se puede observar que el elemento mayoritario es el Pb, seguido del S y una pequeña proporción de Fe.

Se encontraron partículas más irregulares y rugosas como se muestra en la Fig. 5 b) en las que se denota la distribución de elementos como el C, O, S, Fe, Sb y Pb, lo cual es consistente con la composición química de la caracterización de las fases minerales de la muestra, sin embargo, estas partículas irregulares y rugosas probablemente esté dada por la asociación de la anglesita, que se ha demostrado que puede cubrir grandes áreas del sustrato al que esté asociado. La jamesonita y la boulangerita, se han encontrado asociadas estando la jamesonita presente como agregados fibrosos, mientras que la boulangerita se presenta como pequeños granos que pueden asociarse a otros minerales, la esfalerita se ha encontrado asociada en sus bordes y cementada por galena y jamesonita, siendo sus márgenes de grano los que se caracterizan por intensos reflejos internos. La esfalerita se ha reportado con texturas coliformes esponjosas, con inter-crecimientos complejos con galena y sulfosales de Sb-Pb. En la Fig. 5 c), de acuerdo al espectro arrojado por el análisis, la presencia de Cu también se considera importante ya que se ha reportado su asociación a sulfosales de Cu-Pb-Fe-Sb, formando agregados irregulares de hasta 50 μm , compuestos de diminutos cristales aciculares en estrecha asociación con boulangerita y galena, su identificación concuerda con la caracterización realizada por ICP y FRX (Dolníček et al., 2023; Radosavljević et al., 2016; Liu et al., 2022; Morales et al., 2013; Keutsch y Brodtkorb, 2008).

Como resultado del análisis a la pastilla de resina se identificaron dos asociaciones de plata, conocidas como sulfosales (Ag): el primero que se muestra en la Fig. 6 como (AgCuSbS) y la segunda AgSbPbS que se muestra en la Fig. 7 cada imagen se acompaña de un espectro asociado a la composición por los elementos que están presentes, por lo que se puede observar que el contenido de Ag, en el caso de la Fig. 6, es menor respecto a los otros elementos, siendo que estas asociaciones con contenidos bajos de Ag y altos de Pb, forman a menudo laminillas que pueden estar encerradas por boulangerita, mientras que la asociación de AgSbPbS, en donde predomina el plomo, se ha reportado como sulfosales que forman inclusiones isométricas o prismáticas relativamente raras y aisladas encerrados en boulangerita con inclusiones de galena (Pažout et al., 2019; Dolníček et al., 2023; Li et al., 2010; Ding et al., 2019). Estos resultados son contrastantes con los resultados de ICP y FRX, corroborando la asociación que no se logró identificar mediante DRX, ya que la complejidad de la mineralogía y la textura de la plata hacen que su caracterización mineralógica sea un desafío, porque llega a encontrarse solo en pequeñas cantidades en minerales sulfurados, como piritita y galena (Tiu et al., 2021).

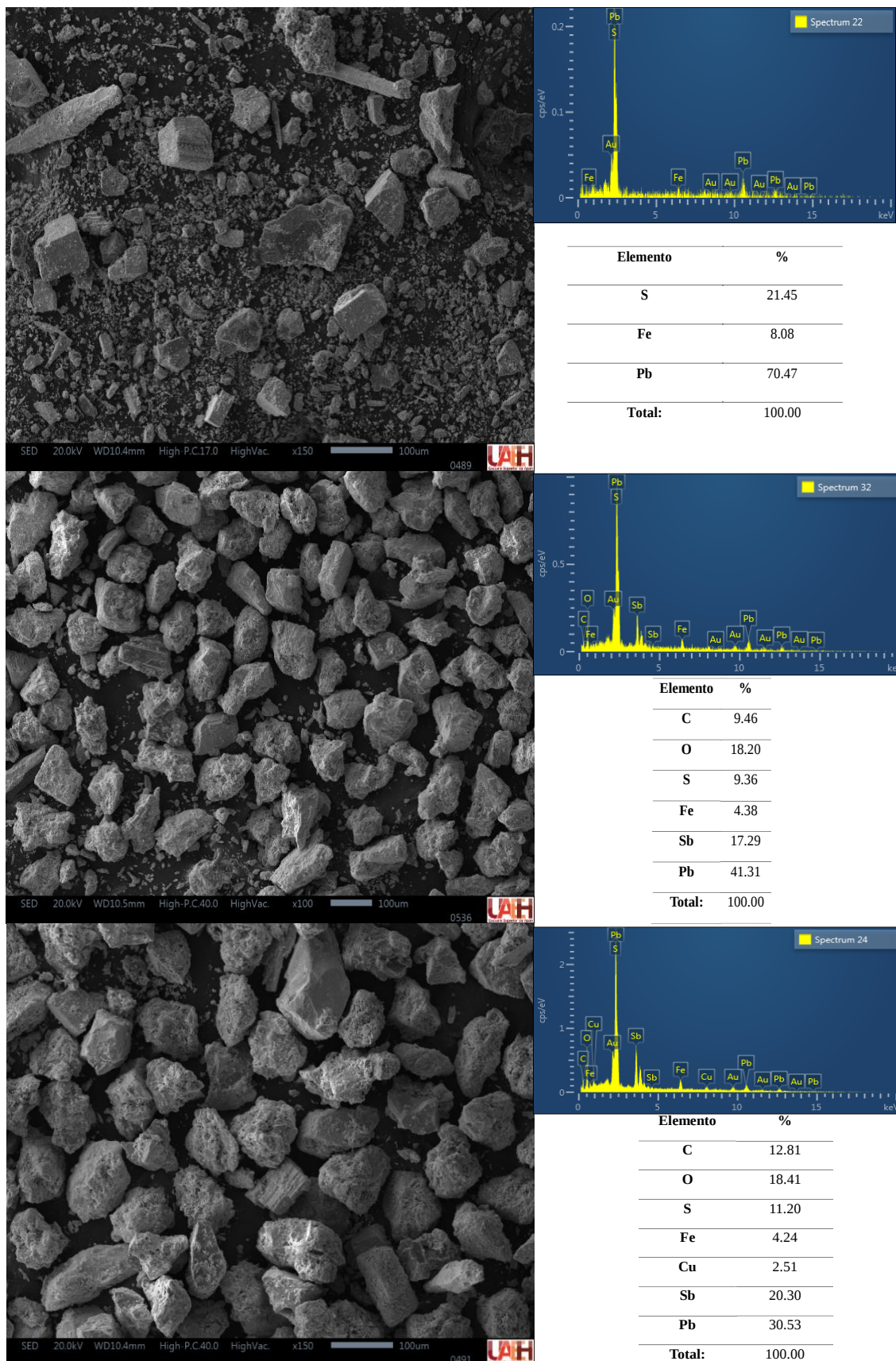


Fig. 5 Micrografías de la morfología característica de las partículas de concentrado de plomo, acompañados de un espectro y composición elemental semicuantitativa resultado del análisis EDS. a) micrografía tomada a 150x de partículas simétricas bien definidas, b) micrografía de partículas de apariencia rugosa y amorfas tomada a 100x, c) agregados irregulares en asociación con Cu.

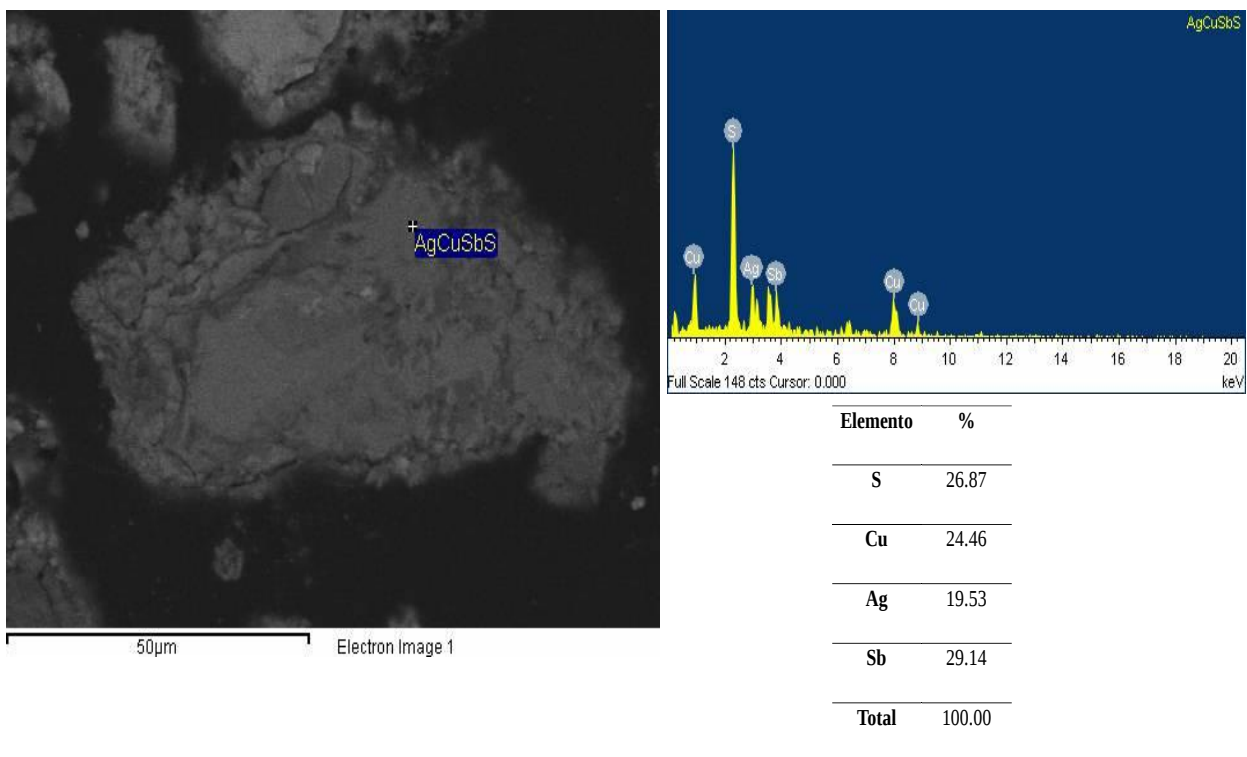


Fig. 6 Asociación de AgCuSbS, revelada del análisis a la pastilla de resina preparada, con espectro y composición elemental dada por el análisis MEB-EDS.

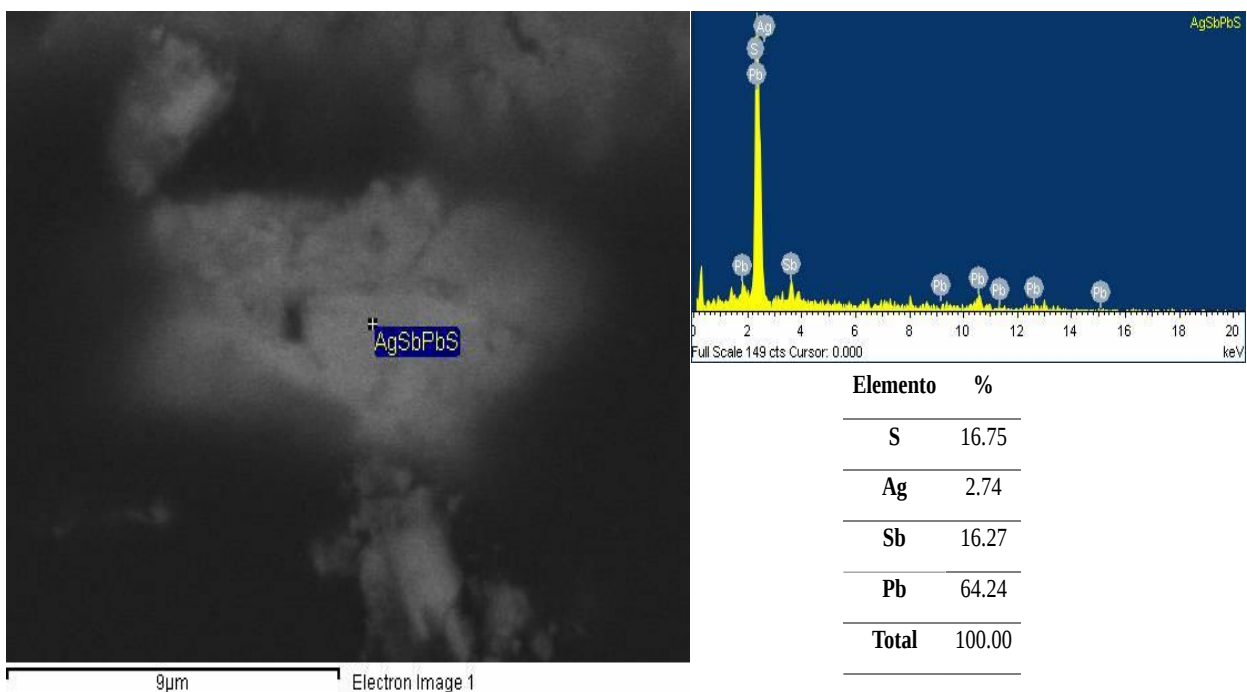


Fig. 7 Asociación de AgSbPbS, revelada del análisis a la pastilla de resina preparada, con espectro y composición elemental dada por el análisis MEB-EDS.

8.3.3 Montaje de experimentos: Bioensayos.

En los experimentos llevados a cabo con medio LB y modificaciones (LB_S, LB_{sinNaCl} y LB_{0.9NaCl}), se pudo observar una coloración característica al iniciar cada experimento. En la Fig. 8 se observa el control (matraz izq.) sin turbidez, mientras que los ensayos con cepas bacterianas (matraz de en medio y derecha) presentan la turbidez característica de crecimiento celular. Al quinto día, en el que se da por concluido el experimento, la coloración era de un café oscuro como se aprecia en la Fig. 9. En los matraces control no se observó este cambio tan drástico a color oscuro como en los matraces que contenían a las cepas JC15 y JC36.



Fig. 8 Coloración inicial de medio LB y sus modificaciones al iniciar el experimento.

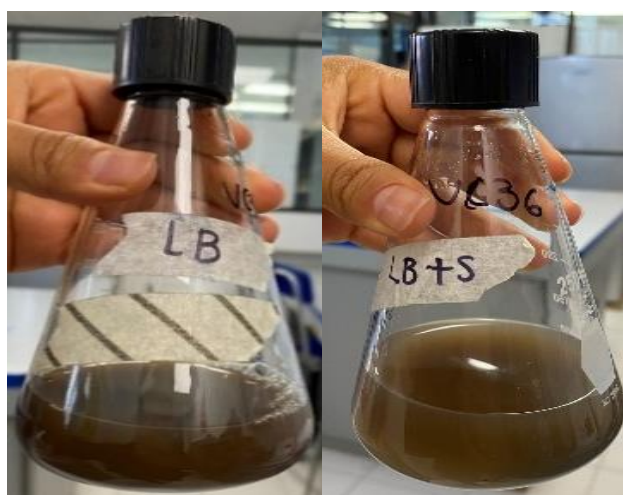


Fig. 9 Coloración de medio LB y sus modificaciones al quinto día, en el que se finalizó el experimento.

ST_{FeSO4}

Para el experimento con la formula ST_{FeSO4}, desde su preparación se pudo observar una coloración oscura como se observa en la Fig. 10, dada por la composición del mismo, por esta razón no se pudo llevar a cabo la técnica de espectrofotometría y se optó por realizar una resiembra en placa de cada cepa a partir de los matraces durante el experimento para corroborar la presencia de bacterias en el medio. (Fig. 11)



Fig. 10 Coloración de ST_{FeSO4} al iniciar el experimento (izquierda) y al tercer día (derecha).

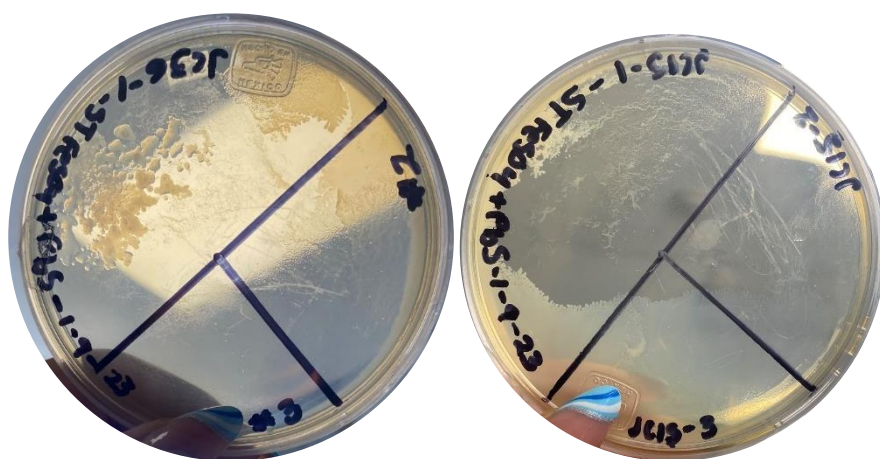


Fig. 11 Crecimiento de cepa JC36 a partir de resiembra del experimento (izquierda), crecimiento de JC36 (derecha).

ST_{FeCl3}

El medio ST_{FeCl3} mostró una coloración entre marrón oscuro o naranja oscuro, como se muestra en la Fig. 12 desde el primer día de incubación, por lo que tampoco fue posible medir mediante espectrofotometría la cinética bacteriana, se realizaron siembras en placa al segundo día del experimento para determinar el crecimiento de las cepas en el medio como se muestra en la Fig. 13 no hubo un crecimiento aparente.



Fig. 12 Coloración de ST_{FeCl3} iniciado el experimento (izquierda), coloración respecto al blanco (derecha).



Fig. 13 Resiembra de cepa JC36 (derecha) y JC15 (izquierda) en placa a partir de matraces con el experimento ST_{FeCl3}, sin crecimiento aparente.

8.3.4 Primer ensayo: medio LB

Como resultado de la medición por espectrofotometría a cada ensayo experimental se elaboraron graficas de las cinéticas bacterianas, resultados contrastantes con el principio de la técnica que indica que un aumento de la densidad óptica (D.O) unidad de medida de la turbidez, es igual a un aumento de la concentración celular, por lo tanto, en los gráficos se presenta la D.O de cada cepa (eje y), en función del tiempo (eje x).

Para interpretación de estas y las próximas gráficas de crecimiento bacteriano, pH y redox, se recuerda que el tiempo indica la medición de cada hora al experimento, considerado el tiempo cero el momento en que se adiciona el concentrado de plomo a cada medio con la cepa correspondiente.

La Fig. 14 muestra la variación entre cepas de la D.O en función del tiempo, siendo que con la cepa JC36 se tiene un aumento en su D.O de 1.1 al tiempo 8 a más de 1.5 en una hora lo que indica un aumento en la concentración celular, mientras que JC15 comienza con una D.O. por debajo de 0.7 alcanzando al tiempo 9 su máximo con 0.9, esta cepa se mantiene por debajo de valores de 1 lo que indica una concentración de células constante. JC36 es la cepa con mayor aumento de células en el medio en presencia del concentrado de plomo.

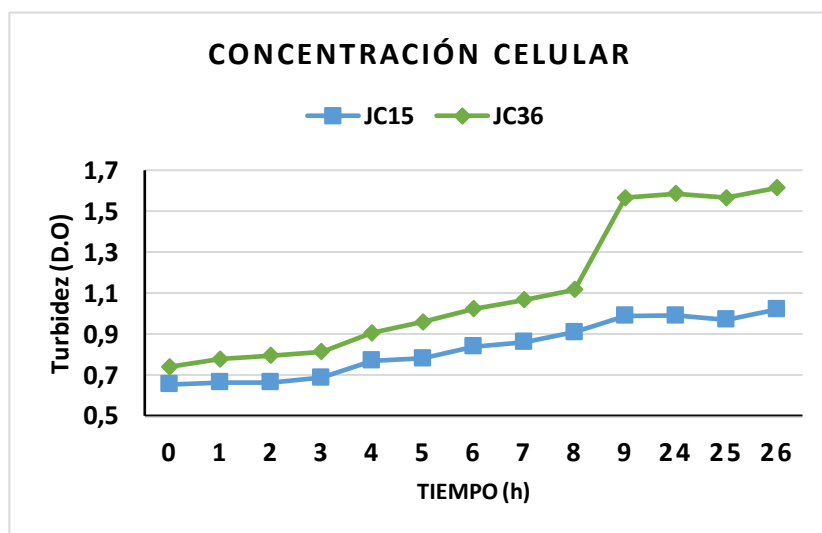


Fig. 14 Concentración celular en medio LB.

LB_s

En este medio se observó que JC36 al iniciar el experimento registró una D.O. de 0.8 (Fig. 15) manteniendo una tendencia que a partir del tiempo 8 alcanza un valor por encima de 0.9, mientras que JC15 se mantiene por debajo de valores de 0.8 de D.O, estos resultados indican que JC36 en el medio LB_s de acuerdo a la D.O., presenta un aumento en su masa celular mientras que la concentración celular de JC15 se mantuvo sin aumento representativo en el tiempo que se monitoreo.

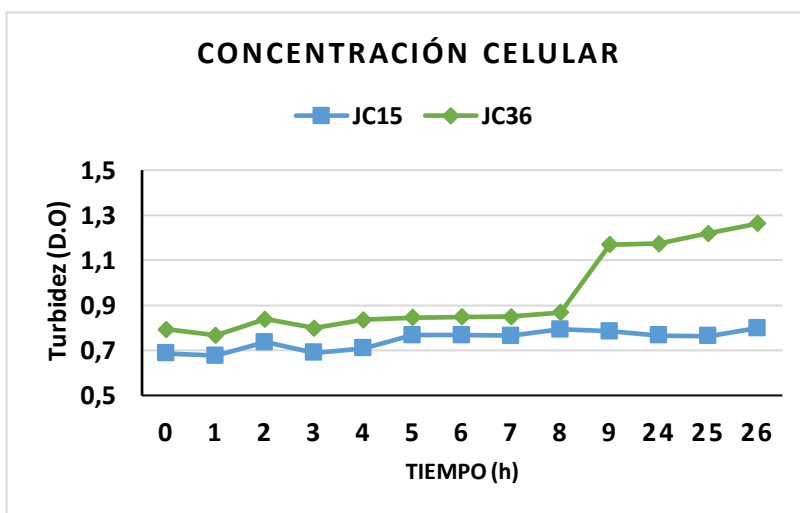


Fig. 15 Concentración celular en medio LB_s

8.3.5 Segundo experimento: $LB_{sinNaCl}$

En este ensayo El monitoreo de pH del blanco inicia neutro el cual se mantuvo durante el tiempo de medición (Fig. 16, línea azul), mientras que la cepa JC15 (Fig. 16, línea naranja) al iniciar el experimento muestra una ligera variación, manteniéndose en un pH de 6, mientras que la D.O. de esta cepa (Fig.17) indica que no hubo un aumento en la concentración de la masa celular. Para JC36 el pH inicial del medio (Fig. 16, línea gris) se observa que se mantuvo neutro sin un aparente incremento de la masa celular (Fig.17, línea naranja).

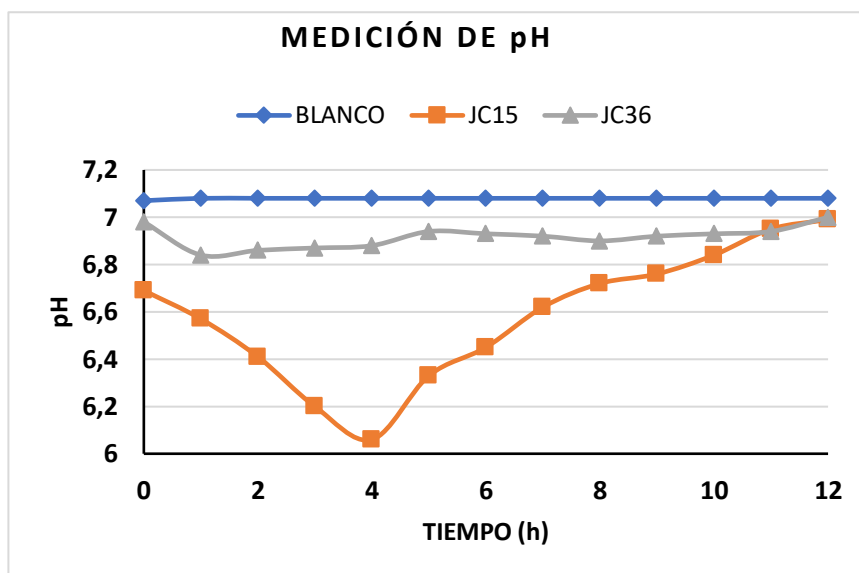


Fig. 16 Control de pH medio $LB_{sinNaCl}$

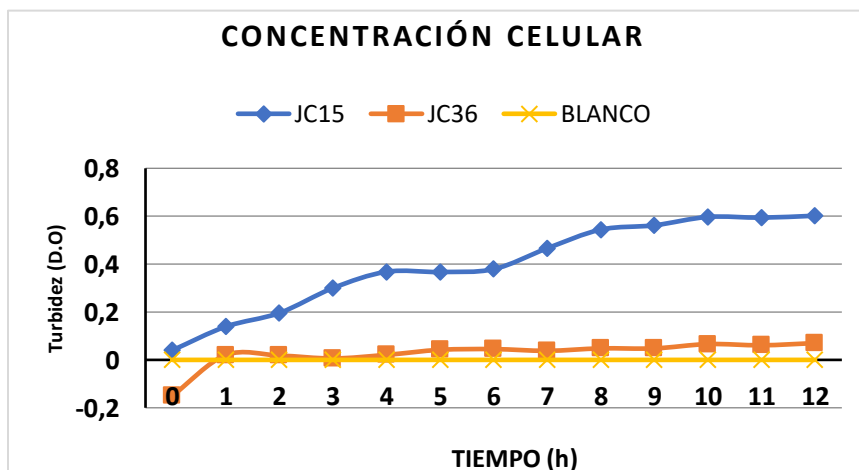


Fig. 17 Concentración celular medio $LB_{sinNaCl}$

LB_{0.9}NaCl

En este experimento se evaluó por triplicado solamente el comportamiento de la cepa JC15, debido al tiempo que se lleva en las mediciones de cada matraz.

En el monitoreo del matraz control se observa que el pH inicial es neutro (6.8) (Fig. 18, línea verde) y su valor redox (Fig. 20, línea verde) se mantiene durante el monitoreo, mientras que no se observa aparente incremento de la turbidez (Fig. 19 línea verde). Para las réplicas de la cepa JC15 el pH incrementa (Fig. 18) al igual que la turbidez (Fig. 19) lo que indica el aumento de la masa celular, por el contrario, el redox disminuye alcanzando valores negativos (Fig. 20) indicando que el sistema se encuentra en condiciones reductoras al tener una alta disponibilidad de electrones libres. De acuerdo a Rodríguez et al. (2001) sulfuros metálicos como el concentrado de plomo, al poseer bandas de valencia a las que contribuyen orbitales de átomos metálicos y de azufre pueden ser oxidados mediante protones de H^+ , lo que explica el ambiente reducido que se forma en los ensayos con valores redox negativos. Y en el caso del control, el ligero valor de redox que se presenta constante está dada por el consumo u oxidación de iones H^+ .

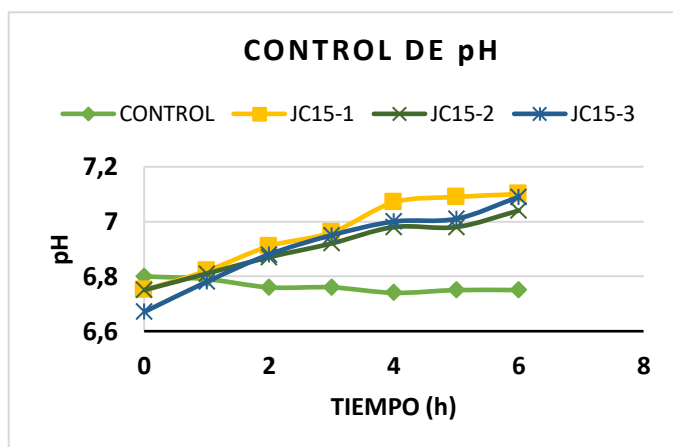


Fig. 18 Control de pH medio LB_{0.9}NaCl

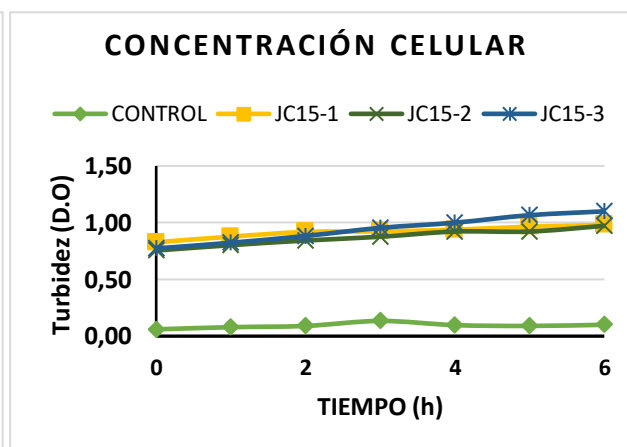


Fig. 19 Concentración celular medio LB_{sin}NaCl

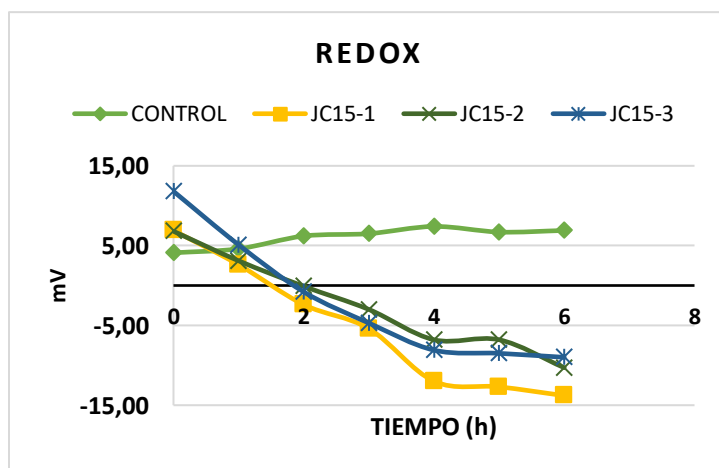


Fig. 20 Control redox medio LB_{sin}NaCl

8.3.6 Tercer experimento: replica de LB y LBS.

En este experimento solo se llevó a cabo la medición del pH y redox ya que se realizó un monitoreo de estas cepas en el primero. Los resultados arrojan que el pH del medio en la muestra control (Fig. 21, línea naranja), es neutro con valores ligeramente debajo de pH 7 y tras la adición del concentrado éste se mantiene neutro mientras que el redox (Fig. 22 línea naranja) al registrar valores negativos se indica la formación de un ambiente reducido, condición que se mantuvo a lo largo del ensayo, sin mostrar aparentes reacciones de oxidación, mientras que en el ensayo con JC15 el pH (Fig. 21, línea gris) inicia con un pH neutro (6) tras la adición del concentrado se observa una tendencia a hacia valores de pH 5 hasta finalizar su monitoreo, por lo que se infiere que alcanzo un ambiente ligeramente ácido mientras que el redox (Fig. 22, línea naranja) indica que el medio comenzó a oxidarse alcanzando valores de entre 50 y 100 mV lo que concuerda con lo mencionado por Choi et al. (2018) que al generarse un proceso de lixiviación por oxidación el valor de pH tiende a disminuir, mientras que los valores redox aumentan, lo cual concuerda con las reacciones químicas que se enuncian en el mecanismo de biolixiviación vía polisulfuro, debido a la tendencia de aceptar electrones con la consiguiente formación de sulfatos en el medio (Arias, 2021).

Para la muestra con JC36 el pH (Fig. 21 línea amarilla) tiende a subir, después de mantenerse a pH 6, alcanzando un valor casi de 8, mientras que el medio se reduce como lo indica el redox (Fig. 22, línea amarilla).

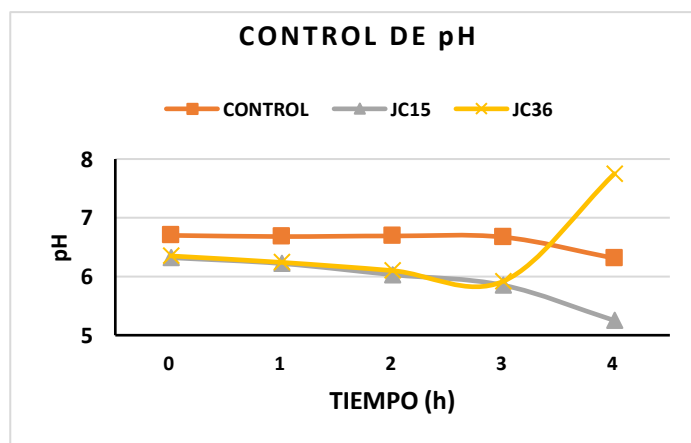


Fig. 21 Control de pH medio LB.

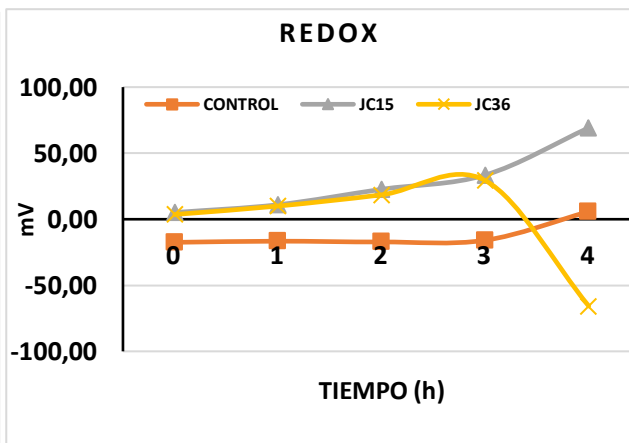


Fig. 22 Control redox medio LB.

Medio: LBs

En LBs el pH del medio en la muestra control (Fig. 23, línea naranja) al iniciar el experimento indica un medio neutro (pH 6) y tras la adición del concentrado a partir del tiempo tres tiende a bajar a 4, encontrándose en un estado reducido como lo muestra el redox (Fig. 24, línea naranja) hasta el tiempo tres que comienza a producirse una reacción de oxidación, mientras que el pH de los ensayos con las cepas JC15 (Fig. 23 línea gris) y JC36 (Fig. 23 línea amarilla) tras la adición de concentrado se acidifica, siendo más rápida este proceso en presencia de bacterias que en ausencia, siendo proporcional con el estado redox ya que en presencia de bacterias esta reacción de oxidación inicia desde el tiempo uno, tanto para JC15 (Fig. 24 línea gris) y JC36 (Fig. 24 línea amarilla).

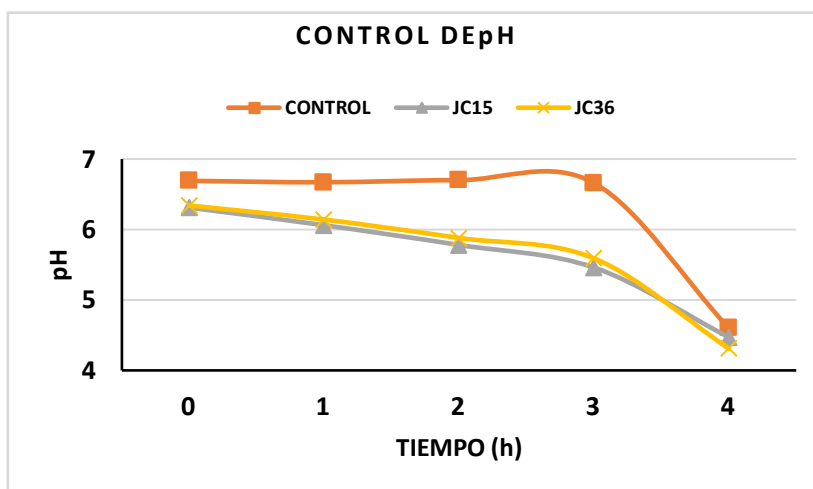


Fig. 23 Control de pH medio LBs.

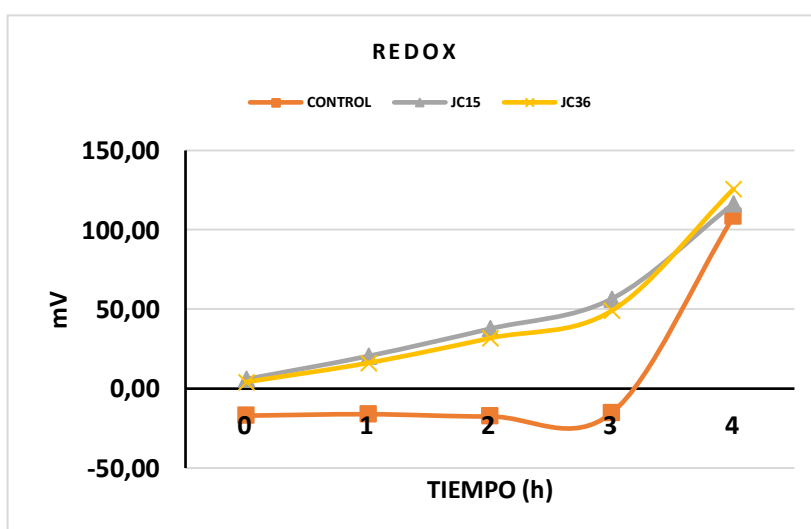


Fig. 24 Control redox medio LBs.

8.3.7 Cuarto experimento: ST_{FeSO_4}

La presencia de bacterias con esta formulación se corroboró mediante la resiembra de las cepas en placa. En el monitoreo de este ensayo, el pH del medio de la muestra control (Fig. 25, línea azul) se encontró como ácido (pH de 4.2) mismo rango en el que se encontró JC15 (línea gris) y JC36 (línea amarilla), al tiempo cinco se muestra una tendencia a descender y al finalizar el monitoreo en las tres muestras se alcanza un pH de 3.7, mientras que el redox (Fig. 26) indica que el control (línea azul) se encontraba en un ambiente de oxidación y tras la adición del concentrado el medio sigue oxidándose tanto en presencia como en ausencia de bacterias, ya que JC15 (línea gris) y JC36 (línea amarilla) alcanzan valores cercanos a 170 mV, por lo que en presencia de bacterias la oxidación no se acelera en este experimento sino que se mantiene una tendencia respecto al control, sin embargo, se logra el cultivo de las cepas en un medio ácido oxidante.

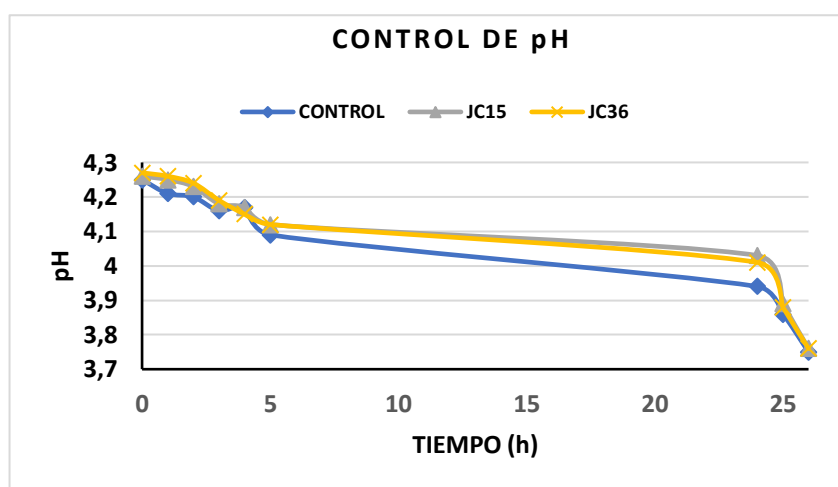


Fig. 25 Control de pH ST_{FeSO_4}

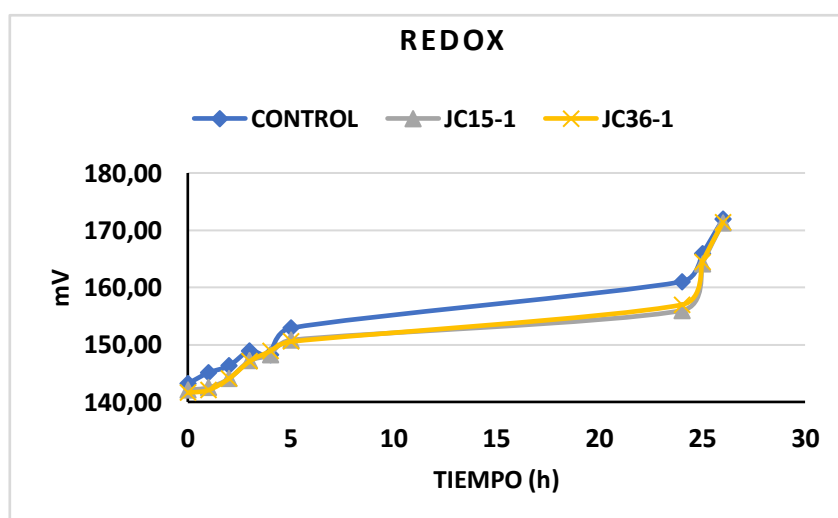


Fig. 26 Control redox ST_{FeSO_4}

8.3.8 Quinto experimento: ST_{FeCl_3}

Con esta formulación se puede observar que el pH del medio (Fig. 27) en la muestra control (línea verde), al iniciar el experimento es ácido, con un pH inicial de 1.5, mismo rango que se observa para JC15 (línea azul) y JC36 (línea amarilla), presentando ligeras variaciones en los matraces con las cepas durante el tiempo de monitoreo, sin embargo manteniéndose en el rango de pH 1.6-1.9, mientras que el redox (Fig.28) indica que en el medio con la muestra control (línea verde) se encontraba en estado oxidativo (290 mV) al igual que con las cepas JC15 y JC36, sin embargo, se muestra un ligero descenso durante el tiempo que se monitoreo pero manteniéndose en este estado de oxidación, tras registrar valores positivos en la gráfica.

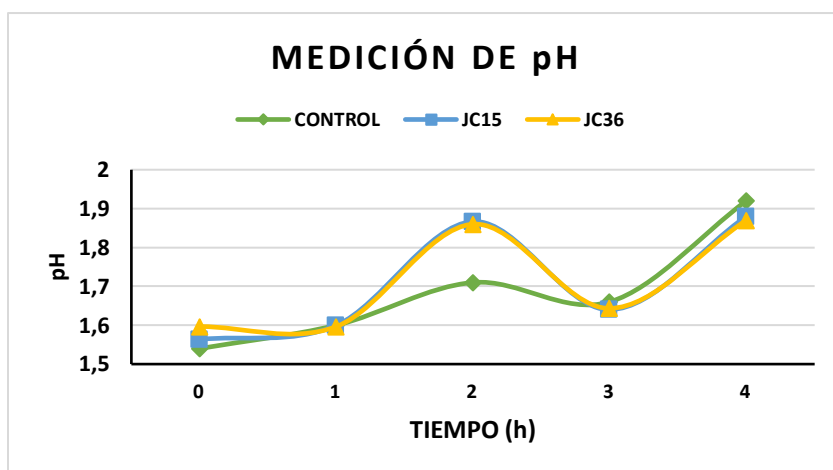


Fig. 27 Control de pH ST_{FeCl_3}

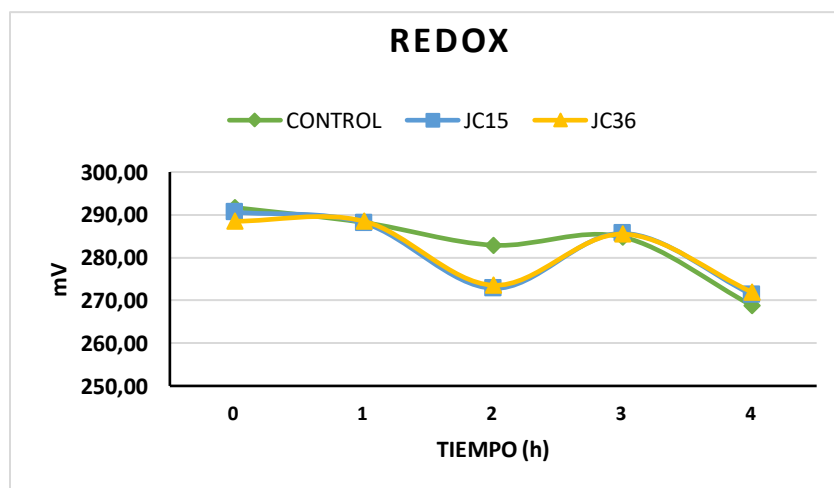


Fig. 28 Control redox ST_{FeCl_3}

De acuerdo con Watling (2006), una práctica común en los ensayos de pruebas, la aclimatación de las cepas a un sistema mineral es importante, partiendo de su tolerancia a iones de metales básicos. Sin embargo, la mayoría de los estudios en los que se evalúa el pH y redox de un sistema se realiza con especies de bacterias bien identificadas por su capacidad de oxidación de hierro y azufre, como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidiphilum* sp, *Acidithiobacillus thiooxidans* ya que permiten la acidificación y oxidación del medio por su capacidad de tolerar y propiciar ambientes ácidos variables (pH 1.5-3) con minerales como calcopirita, pirita o galena pura, sin embargo, en algunos casos se debe controlar la acidificación del medio al inicio del experimento para lograr mantener valores redox alrededor de 550 mV para que resulte eficiente la oxidación de los sulfuros (Márquez et al., 2007). En este estudio en LB se alcanzó un estado de oxidación con valores de 60 mV y LBs 120 Mv sin necesidad de ajustar el pH, valores inferiores por lo ya conocido con *A. ferrooxidans*.

Como se muestra en los resultados de este apartado, la acidificación del medio no se controló, por lo que el ligero incremento del redox que se observa en los ensayos experimentales con las cepas fue resultado del metabolismo de las mismas, que son capaces de descomponer sustratos orgánicos para producir energía, generando como productos de la fermentación, ácidos orgánicos que podrían mejorar la corrosión superficial de los sulfuros permitiendo la liberación de iones metálicos (Su et al., 2024; Zhao et al., 2013). El monitoreo del potencial redox al indicar la actividad metabólica, puede ser utilizado para especificar el ambiente en que los microorganismos son capaces de generar energía y así sintetizar enzimas recurriendo a distintas rutas metabólicas que las bacterias pueden seguir, es por ello que se considera importante la identificación de éstas ya que así se optimizarían las condiciones de sulfooxidación y mejorar la actividad catalítica bacteriana (Arias et al., 2021).

8.3.9 Análisis ICP de los ensayos experimentales.

Mediante el análisis por ICP se determinó la disolución de plomo (Pb), plata (Ag) y antimonio (Sb) en los diferentes experimentos, como lo muestra la Tabla 12, excepto en el medio de ST_{FeCl_3} en el que Ag se encontró por debajo del límite de detección de la curva de calibración. A partir del experimento 3 los resultados de los análisis son dados por el promedio del triplicado de las muestras analizadas, por lo que se indica la desviación estándar de estos análisis.

En este apartado se reporta el análisis de los experimentos en los que se contrasta la disolución de plata (Ag), plomo (Pb) y antimonio (Sb) respecto al control.

En el experimento 2 de acuerdo a los resultados, JC15 lixivia Pb y Sb, superando los valores encontrados en el control, sin embargo, para Ag se observó una variación entre las réplicas.

Los resultados del experimento 3, medio LB permiten determinar que la solubilidad de Sb (30.54 mg/g), Pb (176.7 mg/g) y Ag (6.6 mg/g) está dada por la interacción del medio con el concentrado en ausencia de bacterias, sin embargo, JC15 supera la lixiviación de Sb (116.18 mg/g) y Ag (17.1 mg/g) respecto al control, lo mismo que JC36 para Sb (61.7 mg/g) y Ag (17.86 mg/g). Mientras que en medio LB_S la lixiviación de Pb se ve favorecida por JC15 (2275.06 mg/g) y JC36 (2413.06 mg/g) respecto al control (Pb 186.33 mg/g).

En el experimento con ST_{FeSO_4} solo Ag resultó con una aparente recuperación mayor respecto al control, dada por JC15 (3.8 mg/g) y JC36 (4.32 mg/g) mientras que el control fue de 2.16 mg/g. Y en el experimento con ST_{FeCl_3} la disolución de Pb y Sb fue mayor en el control respecto a las muestras con las cepas, por lo que se adjudica a la interacción con el medio dicha disolución.

Tabla 12. Concentración en mg/g de Ag, Pb y Sb en solución de cada experimento.

Experimento	Medio	Muestra	Elemento	mg/g
2	$LB_{0.9NaCl}$	Control	Pb	0.6
			Ag	3.66
			Sb	0.42
		JC15-1	Pb	27.9
			Ag	16.26
			Sb	459.64
		JC15-2	Pb	12.06
			Ag	3.36
			Sb	534.34
		JC15-3	Pb	26.52
			Ag	0.6
			Sb	210.31
3	LB	Control	Sb	30.54
			Pb	176.7

		JC15	Ag	6.6
			Sb	116.18
			Pb	5.78
		JC36	Ag	17.1
			Sb	61.7
			Pb	22.88
		Control	Ag	17.86
			Sb	74.58
			Pb	186.06
	LB _s	JC15	Ag	3.21
			Sb	75.82
			Pb	2275.06
		JC36	Ag	4.02
			Sb	68.62
			Pb	2413.06
		Control	Ag	4.42
			Ag	2.16
			Pb	371.82
4	ST _{FeSO4}	JC15	Sb	13572
			Ag	3.8
			Pb	322.2
		JC36	Sb	11758
			Ag	432
			Pb	321.68
		Control	Sb	12528
			Pb	2256.6
			Sb	29.1
5	ST _{FeCl3}	JC15	Pb	1980.3
			Sb	25.4
		JC36	Pb	2003.3
			Sb	25

La lixiviación o solubilización de metales en estos resultados por acción bacteriana en medio LB y LB_s a partir de un concentrado mineral con un grado de complejidad como el que se utilizó para este pretratamiento, no ha sido reportada y se apoya en el mecanismo de biolixiviación vía polisulfuro de acuerdo a Rodríguez et al. (2001), sin embargo, los medios evaluados, Luria Bertani (LB) y Caldo Soya Tripitcaseina (ST), son medios con componentes orgánicos complejos que al contener aminoácidos y péptidos, de acuerdo con Liu et al. (2014), pueden formar complejos permitiendo la lixiviación de ciertos elementos, dado por los complejos que se generan de las reacciones en el medio, en ausencia de bacterias, lo que explica la disolución de metales en las muestras control y en los medios ST_{FeCl3} y ST_{FeSO4}, por ende, en éstos medios no se atribuye la disolución de metales por acción bacteriana.

8.3.10 Análisis estadístico.

La prueba de T pareada respalda las diferencias significativas en la lixiviación de Pb, Ag y Sb en los ensayos con los medios LB, LB_S y ST_{FeSO4} por acción de bacterias respecto al control, esto permitió descartar a ST_{FeCL3} para la prueba de ANOVA de dos vías.

Como se muestra en la Fig. 29 a) para lixiviación de Pb, existen diferencias significativas respecto al medio utilizado ($p = 4.27E-10$) (LB, LB_S y ST_{FeSO4}) y entre las cepas ($p = 0.00012$) (JC15 y JC36), siendo que al emplear ambas cepas en medio LB_S la lixiviación de Pb es significativamente mayor respecto a la evaluación de medio LB y ST_{FeSO4}.

El análisis de varianza, permitió determinar que existen diferencias significativas de acuerdo al medio de cultivo a emplear para lixiviación de Ag ($p=0.002$), siendo LB, como se muestra en la Fig. 29 b) el más viable para ambas cepas, respecto a ST_{FeSO4} y LB_S, sin embargo, al comparar estos dos últimos medios de cultivo no hay diferencias significativas para lixiviar Ag, pero si respecto al control, lo que resulta favorable ya que se pueden emplear ambos para pretratamiento. Hay diferencias en utilizar medios de cultivo, no hay diferencias en cual cepa utilizar.

Para lixiviación de Sb (Fig. 29 c) existen diferencias significativas de acuerdo al medio de cultivo utilizado ($p=5.94E-10$), siendo ST_{FeSO4} el medio que mostró más eficiencia en el control respecto a LB y LB_S. Para LB y LB_S no existe aparentemente diferencias significativas, lo que sugiere que pueden ser utilizados ambos medios para lixiviación de Sb y ambas cepas, sin embargo, ST_{FeSO4} actúa como mejor agente lixivante.

Tabla 13. Valores obtenidos de la prueba ANOVA de dos vías.

Plomo (Pb)	Sum of sqrs	d.f.	Mean square	F	p
Medio cultivo:	1,40E+07	2	7,00E+06	143,5	4,72E-10
Cepa:	1,79E+06	2	894710	18,34	0,0001229
Interaction:	4,84E+06	4	1,21E+06	24,82	3,14E-06
Within:	683146	14	48796,2		
Total:	2,17E+07	22			
Plata (Ag)	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p
Medio cultivo:	617,271	2	308,636	9,903	0,002089
Cepa:	71,449	2	35,7245	1,146	0,3459
Interaction:	87,6368	4	21,9092	0,703	0,6028
Within:	436,3	14	31,1643		
Total:	1237,27	22			
Antimonio (Sb)	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p
Medio cultivo:	7,34E+08	2	3,67E+08	535,6	5,94E-14
Cepa:	7,33E+06	2	3,66E+06	5,352	0,01878
Interaction:	1,25E+07	4	3,14E+06	4,58	0,01421
Within:	9,59E+06	14	684735		
Total:	7,46E+08	22			

Sum of sqrs (por sus siglas en inglés): suma de cuadrados, d.f.: grados de libertad, mean square (por sus siglas en inglés): cuadrado medio, F: relación entre la variabilidad entre grupos y variabilidad dentro de los grupos y p: probabilidad.

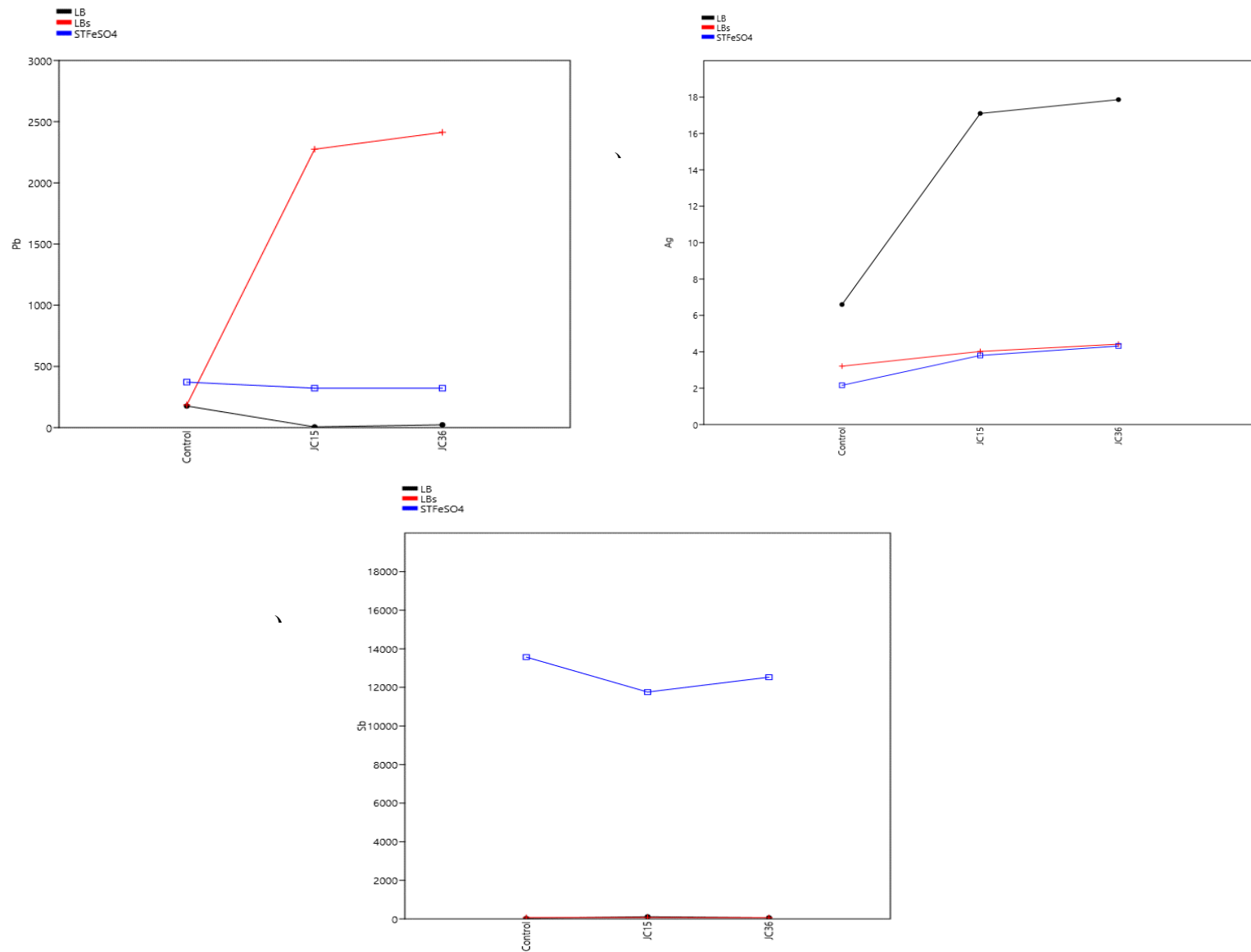


Fig. 29 Comparación entre tratamientos y cepas para lixiviación de Pb, Sb y Ag, a) lixiviación de Pb, b) lixiviación de Ag y c) lixiviación de Sb.

8.3.11 Análisis MEB a los polvos de los ensayos experimentales.

Se llevó a cabo un análisis mediante MEB a distintos aumentos con la finalidad de observar los cambios en la morfología de las partículas del mineral posterior a su tratamiento con los experimentos realizados, como se observa en la Fig. 30 en la muestra correspondiente a las partículas sometidas a LB las indicadas con círculo rojo, que se asume son partículas de galena por la simetría característica de estas, no sufren mayor cambio, mientras que el resto de partículas que componen el concentrado se muestran con mayor rugosidad, respecto a lo observado en la caracterización, así mismo, el espectro reveló una composición elemental de Pb, Sb, Fe, Cu, S, Zn concordante con la caracterización.

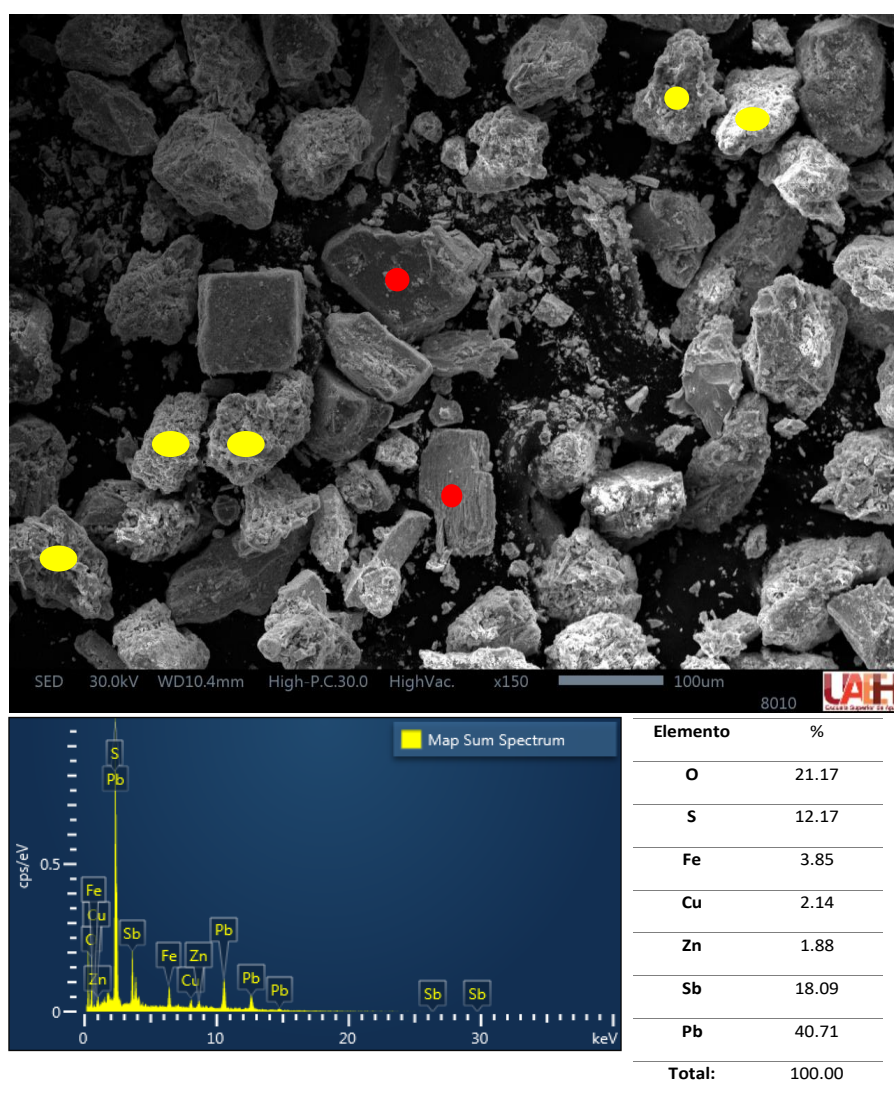


Fig. 30 Composición elemental y comparación de la morfología aparente de una partícula de galena (señalado en rojo), respecto a otras con más rugosidad (señalados en amarillo), después de ser tratadas en medio LB.

Se identificaron partículas con aparentes marcas de adhesión de las cepas, como se muestra en la Fig. 31 del concentrado expuesto al medio LB correspondiente a la cepa JC15 (*Bacillus licheniformis*), mientras que la Fig. 32 corresponde a las partículas expuestas a una de las modificaciones de medio LB (LB_{0.9NaCl}) señaladas en rojo.

La aparente adhesión que se muestra en las micrografías obtenidas mediante MEB son resultado de una interacción de las partículas en cada medio durante cinco días, mientras que Zhao et al., (2013) reportó la adhesión de células de *A. ferrooxidans* directamente a partículas de un mineral de calcopirita, después de 16 días de experimentación, atribuyendo el cambio en la morfología de estas partículas por la adhesión de la cepa y la producción de ácidos orgánicos. La morfología de *B. licheniformis* observada mediante este estudio MEB se compara con la morfología de una cepa analizada por Farhat et al. (2023) que coincide por ser bacilos alargados formando colonias.

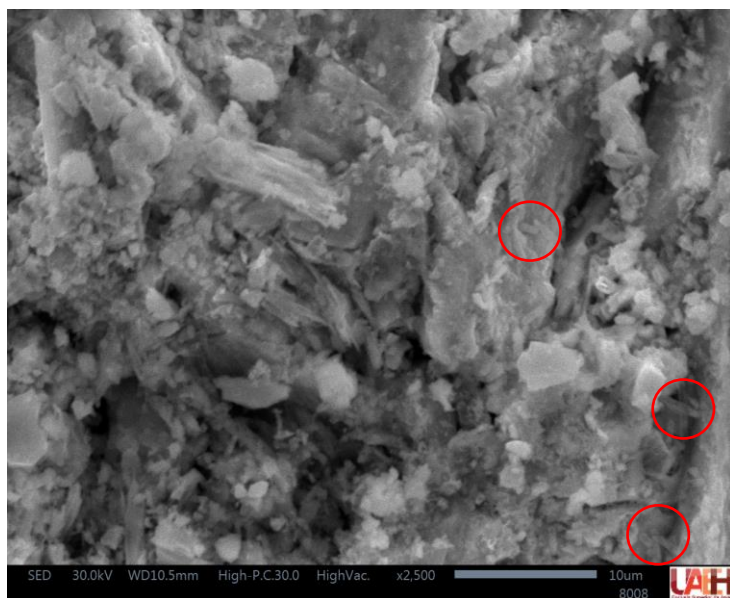


Fig. 31 Partículas del experimento con medio LB, con aparentes marcas de adhesión de la cepa JC15 (señaladas con círculo rojo).

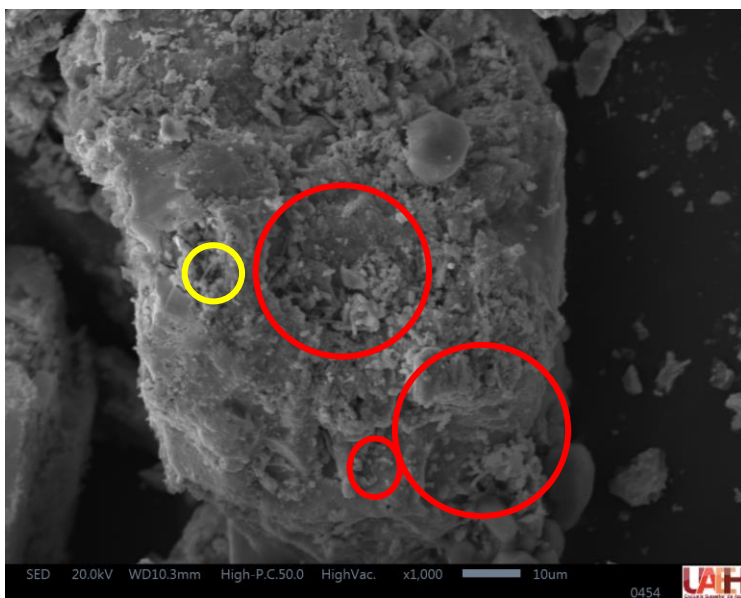


Fig. 32 Partícula del experimento con medio LB_{0.9NaCl}, con aparente adhesión de la cepa JC15 (señaladas con círculo rojo), comparado “filamentos” (señalado en amarillo) que no se consideran células bacterianas de acuerdo con la morfología.

Se obtuvieron micrografías (Fig. 33) a mayor escala (22000x), de *Bacillus licheniformis*, en donde se puede apreciar de manera precisa la morfología de esta bacteria sobre las partículas de concentrado de plomo.

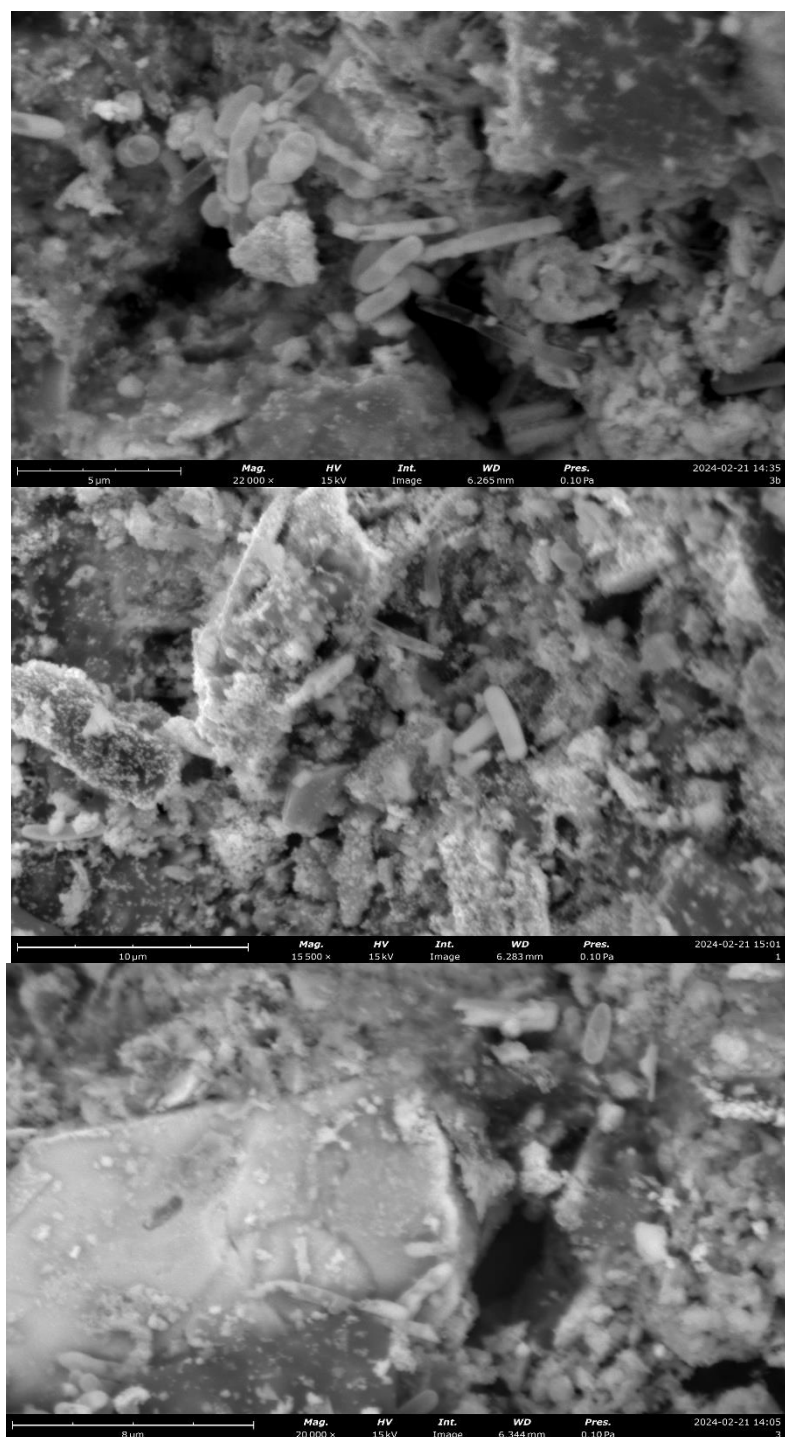


Fig. 33 Micrografías obtenidas por MEB-EDS del experimento con medio LB_{0.9}NaCl, que muestra presencia de la cepa JC15 sobre las partículas minerales.

Como resultado del barrido del análisis MEB, se identificaron partículas con ciertas características en los experimentos con la cepa JC36 (*Acinetobacter radioresistens*), la Fig. 34 corresponde a partículas en exposición de la modificación de $LB_{sinNaCl}$ y la Fig. 35 a una partícula en medio ST_{FeCl_3} , ambas micrografías concuerdan con la aparente adhesión de esta cepa recubriendo la partícula, por la forma de cocobacilo que presenta, característica de este género.

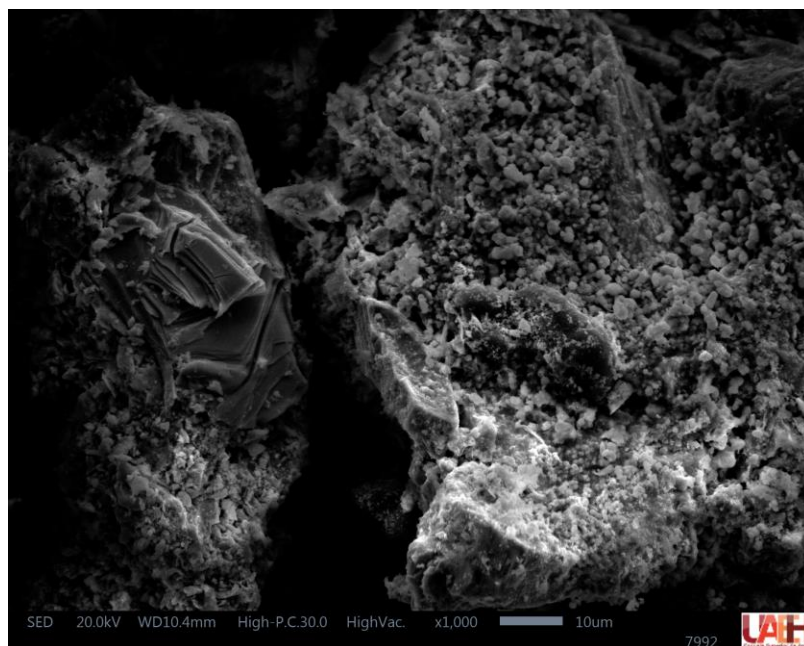


Fig. 34 Partícula del experimento con medio $LB_{sinNaCl}$, con aparente adhesión de la cepa JC36.

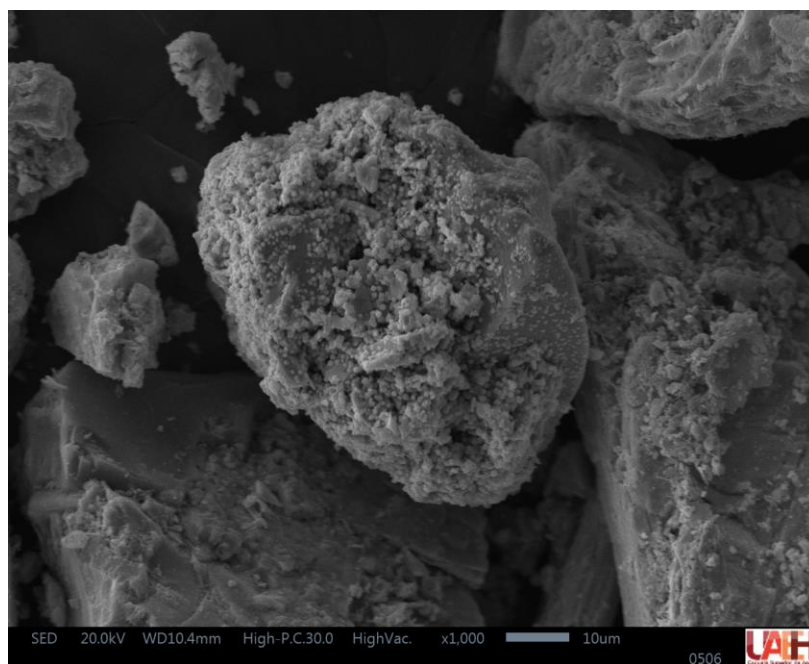


Fig. 35 Partícula del experimento con medio ST_{FeCl_3} , con aparente adhesión de la cepa JC36.

Existen algunas cepas de *B. licheniformis* como la DSM-13 y *B. licheniformis* JAJ3 que han sido utilizadas para evaluar su efecto de biolixiviación (Chiang et al., 2013; Abraham et al., 2020), concluyendo que este efecto puede atribuirse a que los microorganismos podrían producir ácidos orgánicos, y exopolisacaridos (EPS), sustancias que han sido reportadas para distintas cepas de *B. licheniformis*, con distintas aplicaciones (Gholampoor et al., 2015; McLean et al 1992).

De acuerdo con Rosenberg y Ron (1998) y Carvalho et al., (2024) dentro del género *Acinetobacter* existen cepas capaces de producir polímeros extracelulares que facilitan su adhesión a superficies lo que propicia el cambio de las propiedades superficiales de compuestos orgánicos e inorgánicos insolubles en agua.

La formación de estas EPS puede ayudar a las bacterias a adherirse a superficies sólidas y que, al agruparse en comunidades, formen un biofilm en las superficies que sirve como reservorio de nutrientes y facilita el intercambio de metabolitos dentro del biofilm (Watling, 2006), sin embargo, de acuerdo Farhat et al., (2023) las bacterias poseen diversos mecanismos para influir activamente e inducir la formación de minerales, uno de estos mecanismos implica la producción de EPS, que actúan como matriz para la nucleación y el crecimiento de minerales, dentro de la EPS, la presencia de la enzima anhidrasa carbónica facilita la conversión localizada de dióxido de carbono en iones de bicarbonato, esta actividad enzimática aumenta la disponibilidad de iones bicarbonato, que promueve la precipitación del mineral y contribuye a la formación controlada de minerales carbonatados. Este autor recalca las implicaciones para biomineralización dada por la variabilidad en las vías metabólicas o enzimas involucradas, por lo que no se podría descartar que un mecanismo similar esté actuando con *A. radioresistens* y *B. licheniformis*.

9. CONCLUSIONES

- Los resultados de caracterización química mediante FRX e ICP son concordantes con la composición mostrando una homogeneidad en la distribución del contenido elemental.
- El análisis de DRX y MEB-EDS, revelan la complejidad del concentrado dada la asociación de cinco fases minerales de tipo sulfuro, así como la inclusión de sulfosales de plata, y al ser de interés económico se considera importante la búsqueda de alternativas de pretratamiento o tratamiento microbiano a sulfuros de esta naturaleza que permitan su disolución.
- La selección de cepas bacterianas nativas del distrito minero de Zimapán, de acuerdo con su tolerancia en la concentración de metales pesados resultó favorable en la adaptación de las formulaciones propuestas, sin embargo, al ser medios de cultivo complejos podrían evaluarse otros más sencillos.
- De acuerdo con el monitoreo de pH y redox se propone que las cepas llevan a cabo un mecanismo de biolixiviación por la vía polisulfuro, dado que los valores redox (positivos o negativos) indican que los iones H^+ pueden estar siendo oxidados o reducidos, según sea el medio.
- Se recomienda analizar los polvos de los ensayos experimentales mediante técnicas que permitan determinar el estado de oxidación del azufre, para corroborar la acción de las bacterias en los casos que se obtuvo mayor disolución de metales respecto al control.
- El pretratamiento con medio LB, LB_S y LB_{0.9NaCl} mostró ser eficiente para un concentrado de plomo, por lo que el uso de medios orgánicos resulta beneficioso para el metabolismo de *B. licheniformis* (JC15) y *A. radioresistens* (JC36) resultando en la lixiviación de Ag, Pb y Sb,
- El análisis estadístico permitió determinar que para lixiviación de Pb el medio con mejores resultados es LB_S independientemente de la cepa que se utilice, para lixiviación de Ag, LB es más eficiente utilizando cualquiera de las dos cepas y para lixiviación de Sb ST_{FeSO4} actúa como mejor agente lixivante, sin embargo, LB y LB_S también pueden ser utilizados con ambas cepas para pretratamiento, por lo que se recomienda investigar más el desarrollo de éstas en un ambiente enriquecido con FeSO₄.
- El uso de cloruro férrico (FeCl₃) y sulfato ferroso (FeSO₄) en conjunto con las cepas utilizadas corrobora que estas no son bacterias oxidativas del hierro, ya que no se le puede atribuir a éstas la lixiviación de Ag, Pb y Sb con estas formulaciones, por lo que se respalda el mecanismo de biolixiviación vía polisulfuro.
- Se considera importante el análisis de las vías metabólicas que desarrollan las cepas *B. licheniformis* (JC15) y *A. radioresistens* (JC36) para determinar las reacciones

químicas que se generan e incluso plantear la estequiometría para mejorar las condiciones de experimentación.

- Para próximos estudios se recomienda realizar el análisis de azufre (S) en solución, así como la determinación de ácidos orgánicos del experimento.
- Los análisis mediante MEB muestran la evidencia de la adhesión de estas cepas al sustrato, sentando un antecedente para el análisis de EPS que pueden producir *B. licheniformis* (JC15) y *A. radioresistens* (JC36) y del papel que juegan en los mecanismos de biolixiviación.
- Se recomienda, de acuerdo con los resultados de la lixiviación de iones metálicos (Ag, Pb y Sb) evaluar los efectos a partir de minerales con cierto grado de pureza, ya sea sintéticos o minerales de mena, ya que, por la naturaleza de la muestra, no se puede determinar que fase mineral es en la que las bacterias podrían desarrollar un proceso de biolixiviación más eficiente.
- Los polvos resultantes de este experimento podrían ser evaluados a una fase de lixiviación química para corroborar la eficiencia del pretratamiento.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abraham, J., Chatterjee, A., y Sharma, J. (2020) Isolation and Characterization of *Bacillus licheniformis* Strain for Bioleaching of Heavy Metals. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 7(3), 139-144. doi: 10.30491/jabr.2020.110332
2. Arellano, P. (2020) Caracterización mineralógica de concentrados de plomo provenientes de tres unidades mineras de la región Zacatecas-Durango. (Tesis de pregrado). Instituto Politécnico Nacional, México. Consultado en <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/28693>
3. Arias, V., Lovera, D., Flores, A. y Sánchez, T. (2021) Correlación del potencial óxido reducción y la población bacteriana durante el estudio de biolixiviación de sulfuros de cobre. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas*, vol. 4 (47), pp. 19-28. <https://dx.doi.org/10.15381/iigeo.v24i47.20639>
4. Bado, I., García, V., Grotiuz, G. y Varela, G. (2008) Temas de bacteriología y virología médica. 2da edición. Montevideo. Oficina del Libro FEFMUR, p. 47-61.
5. Baltazar, J. (2021) Resistencia a Pb y Zn de bacterias aisladas de Zimapán Hidalgo: un enfoque para la biorremediación de suelos. (Tesis de grado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
6. Bragg, W. H., Bragg, W. L., (1913) The reflection of x-rays by crystals. *Cambridge philosophical society*, 17(1), 43 pp. DOI: 10.1098/rspa.1913.0040.
7. Bustamante, M., Gaviria, A. y Restrepo, O. (2008) Notas de clase de la asignatura: concentración de minerales. Instituto de Minerales CIMEX. Universidad Nacional de Colombia, pp. 1. Recuperado de <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/doc13.pdf>
8. CAMIMEX (2022) Informe anual CAMIMEX 2022. Cámara Minera de México, México. Recuperado de <https://www.camimex.org.mx/index.php/publicaciones/informe-anual>
9. Carvalho, M., Bento, T., Bastos, J., Teixeiraa, P. y Bergogne, E. (2024) *Acinetobacter*. *Encyclopedia of Food Safety (Second Edition)*, Academic Press, p. 58-67 ISBN 9780128225202, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822521-9.00212-4>.
10. Castillo, D., Castellanos, R. y Tirado, E. (2021) Acción biooxidativa de cultivos microbianos biolixiviantes sobre la arsenopirita. *Ciencia & Desarrollo*, Vol. 20, Núm.1, pp. 57-69 doi: <https://doi.org/10.33326/26176033.2021.1.1108>
11. Caycedo, L., Corrales, L. y Trujillo, D. (2021) Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. [info:eu-repo/semantics/article, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca]. Repositorio Institucional UNAD. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/43049>

12. Chen, D., Xiao, J. (2017) Mineralogical characterization of a polymetallic sulfide ore to improve silver recovery. *Journal of Wuhan University of Technology. Mater. Sci.*, vol. 32, 501–507 <https://doi.org/10.1007/s11595-017-1625-7>
13. Chen, H., Zhang, D., Zhao, X., Li, Q., Liang, Y., Pakostova, E., Zhang, Y. y Yang, Y. (2023) Effects of Fe and cost-effective media composition on arsenopyrite bioleaching by *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *Chemical Engineering Journal*, vol. 474 DOI 10.1016/j.cej.2023.145845"
14. Chiamaka Belsonia Opara, Rosie Blannin, Doreen Ebert, Max Frenzel, Katrin Pollmann, Sabine Kutschke (2022) Bioleaching of metal(loid)s from sulfidic mine tailings and waste rock from the Neves Corvo mine, Portugal, by an acidophilic consortium, *Minerals Engineering*, Volume 188, 2022,107831, ISSN 0892-6875, <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2022.107831>.
15. Chiang, Y., Santos, R., Monballiu, A., Ghyselbrecht, K., Martens, J., Mattos, M., Gerven, T. y Meesschaert, B. (2013) Effects of bioleaching on the chemical, mineralogical and morphological properties of natural and waste-derived alkaline materials. *Minerals Engineering*, vol. 48, p. 116-125. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2012.09.004>
16. Choi, N., Cho, K, Kim, B. (2018) Enhancement of Au–Ag–Te contents in tellurium-bearing ore minerals via bioleaching. *International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials* 25, 262–270. <https://doi.org/10.1007/s12613-018-1569-8>
17. Clavijo, J. (2013) Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Revista Elementos*, vol. 3.
18. Conejeros, V. (2003) Procesamiento de minerales. Universidad Católica del Norte. Chile, pp. 12-13. Recuperado de https://www.academia.edu/36845538/Procesamiento_de_minerales_V_Conejeros
19. Dagnino, J. (2014) Análisis de varianza. *Revista Chilena de Anestesia*, 43 (4), 306-10. recuperado de <https://revistachilenadeanestesia.cl/PII/revchilanestv43n04.07.pdf>
20. Das, A., Mondal, N. y Pal, R. (2021) A brief account on heavy metal resistant bacteria. *Archive of life Science and Environment*. 5 (2): 233-243. ISSN 2456-7876
21. De la Cruz, E. (2018) Fluorescencia de rayos X y su aplicación en la determinación de elementos químicos en determinadas muestras. (Tesis de grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
22. Ding, K., Guo, J., Liu, B., Han, X. y Yang, S. (2019) The important significance of mineralization concerning sulfosalt minerals in Xiasai deposit [夏塞银矿床中硫盐矿物成矿作用的重要意义]. *Dizhi Xuebao/Acta Geologica Sinica*, 93 (1), pp. 215-226. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85138067174&doi=10.19762%2fj.cnki.dizhixuebao.2019012&partnerID=4> DOI: 10.19762/j.cnki.dizhixuebao.2019012

23. Disi, A., Mohamed, D., Al-Gouthi, M. y Zouari, N. (2023) Insights into the interaction between mineral formation and heavy metals immobilization, mediated by *Virgibacillus* exopolymeric substances. *Environmental Technology & Innovation*, vol. 33 103477, ISSN 2352-1864, <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103477>.
24. Dobrzyński, J., Wróbel, B. y Ewa, G. (2023) Taxonomy, Ecology, and Cellulolytic Properties of the Genus *Bacillus* and Related Genera. *Agriculture*. 13. 1979. 10.3390/agriculture13101979.
25. Dolníček, Z., Ulmanová, J., Sejkora, J., Knížek, F. y Škácha, P. (2023) Mineralogy and genesis of the Pb-Zn-Sb-Ag vein H32A in the Příbram uranium and base-metal district, Bohemian Massif, Czech Republic. *Ore Geology Reviews*, vol. 162 105695, ISSN 0169-1368, <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2023.105695>.
26. Ehrlich, H. (2016) Biogenesis and biodegradation of sulfide minerals in the earth's surface. In: Ehrlich HL, Newman DK, Kappler A (eds) *Ehrlich's Geomicrobiology*, 6th edn. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton Florida, USA, pp 517–549
27. Eyzaguirre, P. y Castillo, D. (2019) Biolixiviación indicativa del sulfato de cobre por crecimiento microbiano ante el drenaje minero. *Rev. Investig. Altoandin*, 21 (1), 49-56.
28. Fagundo, J., González, P., Suarez, M., Melian, C. (2005) Relaciones entre potenciales redox y concentraciones de sulfuros en aguas termales de Cuba. *Contribución a la Educación y la Protección Ambiental*, vol. 6, p 31-44. ISBN: 959-7136-35-X
29. Farhat, T., Al Disi, Z., Ashfaq, M. y Zouari, N. (2023) Study of diversity of mineral-forming bacteria in sabkha mats and sediments of mangrove forest in Qatar. *Biotechnology Reports*, vol. 39. e00811, ISSN 2215-017X, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2023.e00811>.
30. Fiallos, J. (2017) Determinación de la correlación entre Métodos Visuales, Ópticos y Difusión en placa en el Crecimiento de *Escherichia coli*. (tesis de grado). Universidad Técnica de Ambato. Ecuador.
31. Folchi, M. (2005) Los efectos ambientales del beneficio de minerales metálicos: un marco de análisis para la historia ambiental. *Varia Historia* [online], v21, n. 33 [Accedido 14 enero 2024], pp. 32-57. Disponible en: <<https://doi.org/10.1590/S0104-87752005000100003>>. Epub 09 Nov 2010. ISSN 1982-4343. <https://doi.org/10.1590/S0104-87752005000100003>.
32. Garboza, F., Frontado, R., Noguera, N., Ávila, H., Ojeda, L., Ramírez, N., Triana, J., y Triana, F. (2011) Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(2), 138-143. Recuperado en 15 de mayo de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000200010&lng=es&tlng=es.

33. Gholampoor, N., Emtiazi, G. y Emami, Z. (2015) The Influence of *Microbacterium hominis* and *Bacillus licheniformis* Extracellular polymers on Silver and Iron Oxide Nanoparticles Production; Green Biosynthesis and Mechanism of Bacterial Nano Production. J Nanomater Mol Nanotechnol 4:2.
34. Gómez, M., Danglot, C. y Vega, L. (2003) Sinopsis de pruebas estadísticas no paramétricas. Cuándo usarlas. Revista Mexicana de Pediatría, vol. 70, num. 2 pp 91-99
35. Hassan, S., Daryoush, A. y Mohammad, S. (2011) Galena biooxidation by moderate sulphur bacteria. African Journal of Microbiology Research Vol. 5(23), pp. 3919-3923. ISSN 1996-0808
36. Huarachi, O., Dueñas, A., Yapó, U., Almanza, M., Manuel, D., Lazarte, A., Mogrovejo, G. Taco, H., Esparza, M. (2017) Biolixiviación de mineral cuarzo por *Acidithiobacillus ferrooxidans* en reactor de columna por gravedad. Rev. Metal. 53(2) e096. <http://dx.doi.org/10.3989/revmetalm.096>
37. Iañez, E. (1998) Determinación del crecimiento de poblaciones bacterianas. Obtenido de http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/14_micro.htm
38. Jamil, I. y Rasheed, F. (2023) *Acinetobacter* as Model Organism: Environmental and Biotechnological Applications. Journal of science and technology, vol 1:1, p. 39-47.
39. Jiménez, M., Grijalva, A. y Ponce, X. (2020) Plasma acoplado inductivamente en espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES). Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento, Vol. 4, Núm. 4, pp. 4-12 doi 10.26820/recimundo/4
40. Jiménez, R., Valdés, S., Olalde, V., Abraham, R., y García, J. (2018) Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. Revista mexicana de fitopatología, 36(2), 256-275. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-3>
41. Keutsch, F. y Brodtkorb, M. (2008) Metalliferous paragenesis of the San Jose' mine, Oruro, Bolivia. Journal of South American Earth Sciences, vol 25, pp.485-491. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2007.12.003>
42. Khodijah, C., Amadea, E. y Zaki, M. (2020) Bioleaching of Indonesian Galena Concentrate With an Iron- and Sulfur-Oxidizing Mixotrophic Bacterium at Room Temperature. Frontiers in Microbiology, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.557548
43. Kinzler, K., Gehrke, T., Telegdi, J., y Sand, W. (2003) Bioleaching a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS). Hydrometallurgy, 71(1-2), 83–88. doi:10.1016/s0304-386x(03)00176-2
44. Krishna, G., Anshul, N., Sharmili, J. y Ramadas, K. (2017) Scale-up and inhibitory studies on productivity of lipase from *Acinetobacter radioresistens* PR8. Journal of Bioscience and Bioengineering, vol 124:2, p. 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.03.005>

45. LATIZA (2017) Guía para la comercialización de minerales y metales. Asociación Latinoamericana de Zinc. Recuperado de <https://latiza.zinc.org/descargas/publicaciones/>
46. Larrabure, G., Silva, D., Teplyakov, A. y Rodriguez, J. (2023) Alkaline pretreatment of a polymetallic sulfide (Fe-Pb-Mn) ore containing silver increases the efficiency of cyanidation by decreasing elemental sulfur content and by exposing sulfide surfaces. *Minerals Engineering*, vol 203 108325, ISSN 0892-6875, <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2023.108325>.
47. Li, Z., Li, J., Chen, L., Zhang, S y Zheng, S. (2010) Occurrence of silver in the Shagou Ag-Pb-Zn deposit, Luoning County, Henan Province: Implications for mechanism of silver enrichment. *Diqiu Kexue - Zhongguo Dizhi Daxue Xuebao/Earth Science. Journal of China University of Geosciences*, 35 (4), pp. 621-636. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77955255418&doi=10.3799%2fdqkx.2010.077&partnerID=40&md5=64b3> DOI: 10.3799/dqkx.2010.077
48. Liu, S., Killen, E., Lim, M., Gunawan, C. y Amal, R. (2014) The effect of common bacterial growth media on zinc oxide thin films: identification of reaction products and implications for the toxicology of ZnO. *The Royal Society of Chemistry*, vol. 4, p. 4363-4370. DOI: 10.1039/c3ra46177g
49. Liu, Y., Wei, Z. y Xue, C. (2022) Selective depression of Pb²⁺-activated sphalerite by potassium ferricyanide in Pb-Zn sulfides flotation separation. *Minerals Engineering*, vol 182, 107558, ISSN 0892-6875, <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2022.107558>.
50. López, A. y Mayorga, M. (2020) Análisis de los costos ambientales en una empresa minera en el Ecuador. *Cofin Habana*, 14(1), e12. Epub 14 de mayo de 2020. Recuperado en 15 de enero de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2073-60612020000100012&lng=es&tlng=es.
51. Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Stahl, D. (2015) Crecimiento y control bacteriano. En Brock. *Biología de los microorganismos* (pp. 172-173). Madrid, España. Pearson.
52. Makita, M. (2004) Biolixiviación de metales en minerales con arsenopirita mediante cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en cultivo continuo. (Tesis doctoral). CIMAV.
53. Márquez, M., Ospina, J. Mejía, E. (2007) Mineralogía del proceso de oxidación bacteriana de la galena (PbS) por *Acidithiobacillus ferrooxidans*, mediante análisis de microscopía electrónica de barrido, FTIR y DRX. *Scientia Et Technica*, XIII (36), 549-554.
54. Martínez, A. (2010) Microanálisis por dispersión de energías de rayos-X (XEDS). Servicio de Microscopía Electrónica. Universidad de Málaga. España. Recuperado de <https://www.uma.es/sme/nueva/Documentos/EDXS.pdf>

55. Martínez, E. (2019) Caracterización y estudios preliminares de lixiviación alcalina de plata y de metales base, contenidos en un concentrado de plomo. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
56. Martínez, E., Juárez, J.C., Teja, A.M., Reyes, M., Moreno, R., Barrientos, F.R., Pérez, M. y Reyes, V.E. (2018) Caracterización y estudio preliminar de lixiviación de plata contenida en un concentrado de plomo. *Tópicos de Investigación en Ciencias de la Tierra y Materiales*, vol. 5, pp. 175-181 ISSN 2395-8405.
57. Martínez, E., Teja, A., Teja, A.M., Reyes, M., Pérez, M., Reyes, G., Barrientos, F.R. Y Juárez, J.C (2020) Identificación de sulfuros complejos de plata (Sulfosales) contenidos en un concentrado de Pb, del distrito minero de Zimapán Hidalgo. *Tópicos de Investigación en Ciencias de la Tierra y Materiales*, vol. 7, pp 19-23.
58. McLean, R., Beauchemin, D. y Beveridge, T. (1992) Influence of oxidation state on iron binding by *Bacillus licheniformis* capsule. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 58, No. 1 p. 405-408.
59. Mejía, E., Ospina, J., Osorno, L., Márquez, M. & Morales, A (2011) Adaptación de una cepa compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre concentrados de calcopirita (CuFeS₂), esfalerita (ZnS) y galena (PbS). *Rev. Colomb. Biotecnol*, 13(1), 132-143
60. Misari, F. (2016) Biolixiviación: tecnología de la lixiviación bacteriana de minerales. (pp. 46) Perú. OSINERGMIN
61. Mohamed, M., Ali, M., Alfadil, N., Idriss, M., Eltayib, E., Elsaman, T. y Mohamed, M. (2021) Contamination of Sudanese BankNotes with *Acinetobacter radioresistens*. *Tropical Journal of Natural Product Research*; 5(5):1427-1433. doi.org/10.26538/tjnpr/v5i8.1
62. Morales, J., Astilleros, J., Fernandez, L. Alvarez, P. y Jimenez, A. (2013) Anglesite (PbSO₄) epitactic overgrowths and substrate-induced twinning on anhydrite (CaSO₄) cleavage surfaces. *Journal of Crystal Growth*, vol. 380, pp. 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2013.06.010>
63. Muñoz, L., Olivera, P., Santillán, M. y Tamariz, C. (2019) Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa Jangas (Perú). *Revista peruana de Biología* 26(1): 109 - 118 (febrero 2019). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v26i1.15914>
64. Muras, A., Romero, M., Mayer, C. y Otero, A. (2021) Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*, *Critical Reviews in Biotechnology*, 41:4, 609-627, DOI: 10.1080/07388551.2021.1873239
65. Nangali, D., Siame, J., Mzula, A., Musungu, L., Mugala, A., Mukosha, L., Ngulube, R. y Dusengemungu, D. (2023) Bioleaching of chalcopyrite using native *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolated in a mining area in Kitwe Zambia. *Scientific African* vol 22, p. 1-9. ISSN 2468-2276, <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01882>.

66. Negroni, M. (2009) Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 2da edición. Buenos Aires. Medica Panamericana. ISBN 978-950-06-1584-6
67. Ochoa, R. (2017) Caracterización mineralógica de material particulado en Hermosillo, Sonora, México, utilizando la técnica de difracción de rayos X. (Tesis de maestría). Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.
68. Ojumu, T., Petersen, J., Searby, G. y Hansford, G. (2006) A review of rate equations proposed for microbial ferrous-iron oxidation with a view to application to heap bioleaching. Hydrometallurgy, vol 83, p. 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.03.033>
69. Orrantia, E. (1997) Aislamiento y caracterización de cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* con alta resistencia a arsénico y su utilización en la recuperación de oro a partir de concentrados de pirita y arsenopirita. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León.
70. Ospina, J., Mejía, E., Osorno, L., Márquez, M. y Morales, A. (2012) Biooxidación de concentrados de arsenopirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* en Erlenmeyer agitados. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XIV No. 1, 135-14.
71. Pažout R, Sejkora J, Šrein V. (2019) Ag-Pb-Sb Sulfosalts and Se-rich Mineralization of Anthony of Padua Mine near Poličany—Model Example of the Mineralization of Silver Lodes in the Historic Kutná Hora Ag-Pb Ore District, Czech Republic. Minerals, vol. 9(7):430. <https://doi.org/10.3390/min9070430>
72. Peng, Z., Haiyun, X., Yanling, J., Pei, Z., Jialing, C. y Dianwen, L. (2023) Effect of preoxidation on copper flotation from copper-lead mixed concentrate. Physicochemical Problems of Mineral Processing, vol 59 (2) 163253 ISSN 1643-1049 DOI: 10.37190/ppmp/163253
73. Petersen, J. (2023) From understanding the rate limitations of bioleaching mechanisms to improved bioleach process design. Hydrometallurgy, vol 221, p. 1-6. ISSN 0304-386X, <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2023.106148>.
74. Quach, N. T., Pham-Ngoc, C., Bui, T. L., Tran, T. H., Ngo, T. P., Nguyen, V. y Phi, Q. (2022) Bioleaching Potential of Indigenous Bacterial Consortia from Gold-Bearing Sulfide Ore of Ta Nang Mine in Vietnam. Polish Journal of Environmental Studies, 31(1), 803-813. <https://doi.org/10.15244/pjoes/141341>
75. Radosavljević, S., Stojanović, J., Radosavljević, A. y Vuković, N. (2016) (Pb–Sb)-bearing sphalerite from the Čumavići polymetallic ore deposit, Podrinje Metallogenic District, East Bosnia and Herzegovina. Ore Geology Reviews, vol. 72, Part 1, pp 253-268. ISSN 0169-1368, <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2015.07.008>.
76. Raja, E., Selvam, S. y Ominie, K. (2009) Isolation, identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from sewage. International Joint Symposium on Geodisaster Prevention & Geoenvironment in Asia, Fukuoka, 205-211.

77. Reguera, G, McCarthy, K., Mehta, T., Nicoll, J., Tuominen, T. y Lovley, D. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 435:1098–1101. <https://doi.org/10.1038/nature03661>
78. Renau, J. y Faura, M. (1994) Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido. Centro de Investigación Hospital La Fe. Universidad de Coruña. ISBN: 84-88301-88-X
79. Retsch (2016) Análisis por tamizado calidad hasta el último grano. Retsch GmbH Haan. Recuperado de <https://www.retsch.es/files/79401/expert-guide-analisis-por-tamizado.pdf>
80. Rivera, R., Camejo, P., Moya F., López, J., Munguía, M. (2011) Estudio de biolixiviación de un mineral de sulfuros de cobre de baja ley con bacterias tio- y ferro-oxidantes en condiciones termófilas. *Revista de la facultad de Ingeniería*, 26: 65-73.
81. Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M., González, F. y Muñoz, J. (2001) Mechanisms of metal sulfide bioleaching. *Revista De Metalurgia*, 37(6), 665–672. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.2001.v37.i6.534>
82. Romero, A., Vásquez, J. y Lugo, A. (2012) Bacterias, fuente de energía para el futuro. *Tecnura*, vol. 16, no. 32, pp 118-143. Retrieved January 31, 2024, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-921X2012000200011&lng=en&tlng=es.
83. Rosenberg, E. y Ron, E. (1998) Surface Active Polymers from the Genus *Acinetobacter*. In: Kaplan, D.L. (eds) *Biopolymers from Renewable Resources. Macromolecular Systems — Materials Approach*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03680-8_11
84. Rubio, M. y Berlanga, V. (2012) Cómo aplicar las pruebas paramétricas bivariadas t de Student y ANOVA en SPSS. Caso práctico. [En línea] REIRE, Revista d’Innovació i Recerca en Educació, Vol. 5, núm. 2, 83-100. Accesible en: <http://www.ub.edu/ice/reire.htm>
85. Runqing, L., Yanze, G., Li, W., Wei, S., Hongbiao, T. y Yuehua, H. (2015) Effect of calcium hypochlorite on the flotation separation of galena and jamesonite in high-alkali systems. *Minerals Engineering*, vol 84, p. 8-14. ISSN 0892-6875, <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2015.09.009>.
86. Saavedra, A. y Cortón, E. (2014) Biotecnología microbiana aplicada a la minería. *Revista Química Viva - Número 3*, año 13, p 148-163.
87. Saavedra, S., Elvira, E., & Sánchez, M. (2008) Minería y espacio en el distrito minero Pachuca-Real del Monte en el siglo XIX. *Investigaciones geográficas*, (65), 82-101. Recuperado en 16 de abril de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-46112008000100007&lng=es&tlng=es.
88. Schipper, A., Hedrich, S., Vasters, J., Drobe, M., Sand, W., & Willscher, S. (2013) Biomining: Metal Recovery from Ores with Microorganisms. *Geobiotechnology I*,

89. SEMARNAT (2022) Minería en México: panorama social, ambiental y económico. SEMARNAT.
90. Servicio Geológico Mexicano (2017) Museo virtual: aplicaciones de la geología: impacto ambiental. Recuperado de https://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones_geologicas/Impacto-ambiental.html#
91. Su, J., Zhou, K., Chen, W., Xu, S., Feng, Z., Chang, Y., Ding, X., Zheng, Y., Tao, X., Zhang, A., Wang, Y., Li, J., Ding, G. y Wei, Y. (2024) Enhanced organic degradation and microbial community cooperation by inoculating *Bacillus licheniformis* in low temperature composting. Journal of Environmental Sciences, vol. 143, p. 189-200. ISSN 1001-0742, <https://doi.org/10.1016/j.jes.2023.08.037>.
92. Tiu, G., Ghorbani, Y., Jansson, N. y Wanhainen, C. (2021) Tracking silver in the Lappberget Zn-Pb-Ag-(Cu-Au) deposit, Garpenberg mine, Sweden: Towards a geometallurgical approach. Minerals Engineering, vol. 167. 106889, ISSN 0892-6875, <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2021.106889>.
93. Tributsch, H. y Bennett, J. (1981) Semiconductor-electrochemical aspects of bacterial leaching. I. Oxidation of metal sulphides with large energy gaps. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 31 (1). p. 565-577. <https://doi.org/10.1002/jctb.503310176>
94. Ulloa, F. (2015) Análisis de los métodos para medir la turbidez de los inóculos y su influencia en el antibiograma de la bacteria *E. coli* en urocultivos. (Tesis de grado) Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
95. Vargas, Y. (2010) Formulación de un modelo experimental para la recuperación de plata a partir de efluentes fotográficos y radiológicos mediante el proceso electrolítico de ánodo insoluble.
96. Vera, E., López, A., Pineda, Y., Useda, O., Peña, G., Daza, O., Lozano, L., y Ardila, M. (2018) Caracterización, beneficio y usos potenciales de minerales estratégicos del departamento de Boyacá. Tunja: Editorial UPTC.
97. Vera, M., Schippers, A., Hedrich, S. y Sand, W. (2022) Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of microbial metal sulfide oxidation – part A. Applied Microbiology and Biotechnology. 106:6933–6952. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12168-7>
98. Watling, H. (2006) The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides - A review. Hydrometallurgy, vol. 84, issues 1 y 2, p. 81-108. ISSN 0304-386X, <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.05.001>.
99. Zepeda, V. (2018) Biolixiviación de minerales sulfurados de cobre de baja ley. (Tesis doctoral), Universidad Complutense de Madrid.
100. Zhao, X., Wang, R., Lu, X., Lu, J., Li, C. y Li, J. (2013) Bioleaching of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Minerals Engineering, vol. 53, p. 184-192. ISSN 0892-6875, <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.08.008>.

11. Anexo 1: Galería de fotos.

a) Serie de mallas Tyler para tamizado. 	b) Analizador portátil FRX Nitón XL3t UltraThermo Scientific 
c) Equipo de Espectrometría De Emisión De Plasma Acoplada Por Inducción (ICP) 	d) Microscopio Jeol IT-300, Escuela Superior de Apan, UAEH. 
e) Pulido de pastilla por vía húmeda. 	f) Pastilla de resina para análisis MEB-EDS. 
g) Potenciómetro Thermo Scientific Orion Star A211 con electrodo de referencia asociado. 	h) Incubadora. 

i)
de cuarzo

Cubetas



j) Espectrofotómetro MAPADA
Nanogenius. Laboratorio Genética. CIB
UAEH



k) Frascos para medio de cultivo



l) Campana de flujo laminar



m) Agitador orbital



n) Papel filtro Wattman no. 4



o) Sistema de vacío



p) Microscopio de mesa Thermo Scientific Phenom XL, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada



12. Anexo 2: Lista de reactivos.

a) Reactivos ocupados para la digestión. HCl.....20 ml Agua regia.....10 ml HClO₄.....5 ml	b) Medio LB Luria Bertani NaCl.....5g Extracto de levadura....5 g Peptona de caseína.....10 g *preparación en 1000 ml de agua destilada.
c) Modificación LB_S NaCl..... 5g Extracto de levadura....5 g Peptona de caseína.....10 g Sacarosa..... 0.9 g *preparación en 1000 ml de agua destilada.	d) Modificación Luria Bertani sin cloruro de sodio (NaCl) Extracto de levadura....5 g Peptona de caseína.....10 g *preparación en 1000 ml de agua destilada.
e) Modificación caldo Luria Bertani con 0.9 g de NaCl NaCl..... 0.9 g Extracto de levadura....5 g Peptona de caseína.....10 g *preparación en 1000 ml de agua destilada.	f) Formulación ST_{FeSO₄} Caldo soya tripticaseína (CST)...30 g FeSO₄ 7H₂O.....24.83 g Sacarosa.....4 g *preparación en 1000 ml de agua destilada.
g) Formulación ST_{FeCl₃} Caldo soya tripticaseína (CST)...30 g FeCl₃.....24.83 g Sacarosa.....4 g *preparación en 1000 ml de agua destilada.	h) Caldo nutritivo Peptona de gelatina.....5.0 g Extracto de carne.....3.0 g *preparación en 1000 ml de agua destilada.
i) SSI al 0.6 % NaCl 0.6 g Agua destilada 100 ml *preparación en 1000 ml de agua destilada.	j) Agar nutritivo Peptona de gelatina 4.0 g Extracto de carne 3.0 g Extracto de levadura 5.0 g Agar bacteriológico 15.0 g *preparación en 1000 ml de agua destilada.