

CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CONSORCIOS MICROBIANOS ACIDÓFILOS EN CULTIVO SUMERGIDO PARA BIOLIXIVIANTE

GROWTH KINETICS OF ACIDOPHILIC MICROBIAL CONSORTIA IN SUBMERGED CULTURE FOR BIOLEACHING AGENTS

Daladier Castillo-Cotrino^{1,2}, Virginia Chipana-Laura^{2,3}, Claudia Clavijo-Koc^{2,4} y Roberto Castellanos-Cabrera^{2,5}

Resumen

El estudio sobre la biolixiviación de metales a partir de minerales es una necesidad para mejorar el proceso de recuperar metales preciados y obtener mayores beneficios. El objetivo fue determinar en cuatro reactivaciones sucesivas, la velocidad específica de crecimiento y estabilidad de consorcios microbianos obtenidos de la planta de lixiviación de la empresa minera Southern Cooper Corporation (SCC) en Toquepala, Tacna - Perú. Los consorcios M-1, M-2, M-5, M-6 y BF-7 fueron obtenidos de la calcopirita de las pilas de lixiviación; y los PLS-3, PLS-4 e ILS-8 de las soluciones líquidas lixiviadas. El medio líquido de cultivo utilizado fue el 9K modificado. Los consorcios tuvieron cuatro reactivaciones sucesivas en el medio 9K, por triplicado, a temperatura ambiente durante 15 días y con aireación de 1vvm. Los recuentos microbianos, obtenidos cada ocho horas en la cámara de conteo Petroff-Hausser, fueron convertidos a la escala logarítmica decimal para obtener la cinética de crecimiento, utilizando el modelo Malthusiano, que determinó la constante de velocidad K en la fase logarítmica, y el modelo Gompertz para la curva de crecimiento microbiano. Los consorcios de muestras sólidas y de biofilm tuvieron una adaptación más rápida, comparados con los provenientes de las muestras líquidas de PLS e ILS, que mostraron una concentración microbiana inactiva en sus inicios. Todos los consorcios, después de la primera reactivación, evidenciaron velocidades de crecimiento más altas. Las muestras M-6 y BF-7 de biofilm tuvieron los microorganismos más activos y la muestra BF-7 fue la más estable durante las cuatro reactivaciones, por lo cual es la muestra indicada para continuar con estudios de aplicación, como inóculo y aislamiento de microorganismos, para la optimización de los procesos de biolixiviación.

Palabras clave: consorcio microbiano, biolixiviación, velocidad específica de crecimiento, medio 9K, inóculo microbiano.

Abstract

The study on the bioleaching of metals from minerals is a necessity to improve the process of recovering precious metals and obtaining greater benefits. The objective was to determine in four successive reactivations, the specific growth rate and stability of microbial consortia obtained from the leaching plant of the mining company Southern Cooper Corporation (SCC) in Toquepala, Tacna - Peru. The consortia M-1, M-2, M-5, M-6, and BF-7 were obtained from chalcopyrite from the leach heaps; and the PLS-3, PLS-4, and ILS-8 of the leached liquid solutions. The liquid culture medium used was modified to 9K. The consortia had four successive reactivations in 9K medium, in triplicate, at room temperature for 15 days and with 1 vvm aeration. The microbial counts obtained every eight hours in the Petroff-Hausser counting chamber were converted to the decimal logarithmic scale to obtain the growth kinetics using the Malthusian model that determined the rate constant K in the logarithmic phase and the Gompertz model to the microbial growth curve. The consortia from solid samples and biofilm had a faster adaptation, compared to those from the liquid samples of PLS and ILS, which showed an inactive microbial concentration at the beginning. All consortia after the first reactivation showed higher growth rates, the highest being in the PLS-4 consortium during the third reactivation, with a K of 0.025 h⁻¹. The most stable growth rates occurred in the fourth reactivation in the M-6 and BF-7 consortia, these were the most indicated to continue with application studies as inoculum after a third reactivation and achieve the optimization of the bioleaching process of the mineral chalcopyrite.

Key words: microbial consortium, bioleaching, specific growth rate, medium 9K, microbial inoculum.

Introducción

En el año 2021, el Perú se constituyó como el segundo mayor productor mundial de cobre con una producción de 2 299 277 toneladas métricas finas (TMF), después de Chile que mantuvo el liderazgo en

la producción de cobre con 5 600 000 TMF, esta producción fue obtenida por los procesos de Flotación (2 219 652 TMF), Lixiviación (76 201 TMF) y Gravimetría (3 424 TMF) (MINEM, 2021).

En la planta de lixiviación de la empresa minera Southern Cooper Corporation (SCC) ubicada en Toquepala, Tacna - Perú, a 3 200 msnm, el proceso de biolixiviación es a través de pilas del mineral calcopirita (CuFeS_2), donde el ácido sulfúrico diluido favorece el desarrollo de bacterias acidófilas encargadas de la recuperación del cobre en solución, denominada “pregnant leach solution” (PLS); luego de recuperado el cobre se obtiene una solución intermedia conocida como “intermediate leach solution” (ILS) rica en microorganismos, la cual se utiliza de nuevo como solución de ácido sulfúrico para regar por aspersión el mineral (Harrison *et al.*, 2007).

El proceso de biolixiviación involucra la disolución de minerales por acción directa e indirecta de microorganismos, que pueden formar consorcios para la recuperación de metales preciados, como el cobre, en estado de solución (You *et al.*, 2020; Benzal *et al.*, 2021; Bobadilla & Poblete, 2021; Castro *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2021). Los consorcios están compuestos de microorganismos autótrofos, heterótrofos obligados o mixotróficos que catalizan las oxidaciones de hierro y compuestos de azufre reducido (Johnson *et al.*, 2009; Benzal *et al.*, 2021), favoreciendo la acción biolixivante, porque se adaptan más fácilmente al proceso, en comparación a una sola especie microbiana (Joulian *et al.*, 2020; Benzal *et al.*, 2021). Los consorcios biolixivantes están formados por especies microbianas mesófilas o termófilas, y su población aumenta con la temperatura (Watling *et al.*, 2016; Hedrich *et al.*, 2018).

En el proceso de biolixiviación es importante evaluar la cinética del crecimiento microbiano, que se determina a través de la velocidad específica de crecimiento y la biomasa obtenida en un determinado sustrato (Madigan *et al.*, 2015). Esto se puede expresar a través de modelos matemáticos que dependen del sustrato, como los modelos Logístico y Maltusiano, que son utilizados en un crecimiento no acotado, y el modelo de Gompertz, cuando el sustrato es acotado (Melchor, 2015). El modelo poblacional de Malthus se ajusta a contextos de modelos biológicos (Malthus, 1926), el cual permite evaluar la etapa exponencial de los microorganismos, donde se asume que no existen restricciones de sustrato ni inhibición; esta se relaciona con la fase logarítmica de la cinética microbiana expresada en una constante (k) de velocidad de crecimiento (Parra *et al.*, 2019).

El proceso de lixiviación mejora con una mayor población microbiana (Joulian *et al.*, 2020; Benzal *et al.*, 2021) y mayor velocidad de crecimiento que depende de los factores medioambientales; su incremento se consigue mejorando estas condiciones (Braddock *et al.*, 1984; Coll *et al.*, 2001; Zárate, 2015).

En la biolixiviación de cobre, la flora microbiana nativa biolixivante está formada por consorcios microbianos cuyas capacidades varían en función de la curva de crecimiento. En cada proceso de reactivación

se hace posible determinar la velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración microbiana de cada consorcio; asimismo, en qué número de reactivación un consorcio presenta la mayor velocidad específica de crecimiento y de concentración microbiana que permita su selección para investigaciones posteriores.

Hay una limitada información sobre la velocidad de crecimiento y la concentración de biomasa de consorcios microbianos biolixivantes no cultivables en reactivaciones sucesivas. Por esta razón, se planteó determinar la velocidad específica de crecimiento de los consorcios microbianos en cuatro reactivaciones sucesivas para establecer cuáles de los consorcios provenientes de las muestras de mineral calcopirita, PLS e ILS son los que presentan la mayor velocidad de crecimiento y estabilidad para ser seleccionados en estudios posteriores de aplicación como inóculos en la optimización del proceso de biolixiviación de cobre.

Materiales y métodos

Muestreo

El muestreo se realizó de forma dirigida de diferentes tipos de muestras (Figura 1) de la Planta de Lixiviación, Extracción por Solventes y Electrodeposición (LESDE) de Toquepala de la empresa minera SCC en Tacna - Perú, ubicada a 3 200 msnm. Los puntos de muestreo fueron descritos considerando las características físicas y de elevación (Tabla 1).

Se eligieron ocho muestras de diferentes características, y se registró la temperatura con una cámara termográfica marca Flir Sistem AB (Sweden) y la altitud. Las muestras fueron de mineral lixiviable sólido (M), líquidas (ILS y PLS) y de biofilm (BF) (Tabla 1). Las sólidas se tomaron de zonas activas (coloración amarilla-anaranjada-rojiza) y zonas inactivas (coloración plomiza con betas azuladas) de las pilas de lixiviación; el mineral se recolectó con la ayuda de una pala de acero, picota y baldes de plástico. Las líquidas se obtuvieron introduciendo frascos colectores en la solución de PLS de la poza de colección proveniente de las pilas, y en la solución de ILS del estanque de refinado. El biofilm se tomó de la superficie del mineral sólido de la parte superior del botadero (Figura 1).

Las muestras fueron codificadas (Tabla 1), selladas y transportadas a temperatura ambiente al Laboratorio de Investigación en Biotecnología Microbiana (LIBIM) de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann en Tacna - Perú.

Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron inoculadas por triplicado en medio líquido 9K según Leathen *et al.* (1956) como base y modificado por Amaro *et al.* (1991), a pH 1.8, e incubadas a 26 °C (temperatura ambiente) durante 15 días y 1 vvm de aireación. Las muestras sólidas se

redujeron a un diámetro de 3 a 5 cm con un triturador mecánico.

El conteo directo de células se hizo cada ocho horas desde el tiempo cero hasta las 360 horas, en una cámara de Petroff-Hausser con ayuda de un microscopio de campo claro. La concentración celular se determinó en función del tiempo, y se obtuvo el crecimiento celular, la velocidad y la máxima concentración microbiana en cada consorcio (Delgado & Castillo, 2019; Castillo *et al.*, 2021).

Tabla 1. Descripción y localización de las muestras colectadas en la planta de lixiviación de Toquepala, Tacna -Perú.

Código de muestra	Características	T (°C)	Elevación msnm
M-1	Muestra sólida de mineral lixiviable de la zona de lixiviación LESDE, con zonas rojas en el mineral de la pila, que fue indicativo de un estado activo.	35	2 982
M-2	Muestra sólida de mineral de color amarillo y rojo pardo, procedente del depósito lixiviable de una pila inactiva.	21	2 984
PLS-3	Muestra líquida del vertedero de la poza de sedimentación <i>Run of Mine</i> (ROM) del depósito lixiviable Quebrada Honda (QH- PLS).	34	2 796
PLS-4	Muestra líquida de la poza de colección en la zona de lixiviación LESDE.	20	2 771
M-5	Muestra sólida de color amarillo y azul plomizo del depósito lixiviable de una zona en reposo ripeada.	39-43.6	3 106
M-6	Muestra sólida de mineral lixiviable de color rojizo y naranja con áreas pequeñas de color verde claro de la zona de lixiviación LESDE.	45	3 137
BF-7	Muestra viscosa, semilíquida de fango sobre el mineral sólido, con biofilm de color pardo rojizo del depósito lixiviable (botadero).	26	3 019
ILS-8	Muestra líquida de color pardo rojizo de la zona de bombeo de refinó (ILS RAF "solución pobre").	20	3 052

Estudio de consorcios microbianos

Los consorcios fueron reactivados, en el medio líquido 9K modificado, agregando un 10% de inóculo de este medio a otro, y así sucesivamente por cuatro veces, para obtener los consorcios microbianos con más actividad en el crecimiento y menor fase de adaptación en cada cultivo sucesivo (Miyamoto *et al.*, 2008;

Saavedra & Corton, 2014; Domínguez-Ordóñez, 2019; Delgado & Castillo, 2019).



Figura 1. Mineral activo (M-1, M-6), Mineral inactivo (M-2, M-5), Muestras líquidas (PLS-3, PLS-4 e ILS-8) y biofilm (BF-7).

Análisis estadísticos

Se evaluó la biomasa producida, y la velocidad de crecimiento, de los consorcios en cada muestra por reactivación; el análisis se realizó con el programa Graphad Prisma 8.0 usando el modelo de crecimiento de poblaciones Malthusiano para determinar la velocidad en la fase logarítmica (K) y el modelo de Gompertz para obtener la curva de crecimiento.

Resultados y discusión

La cinética de la curva de crecimiento de cada consorcio microbiano, en sus cuatro reactivaciones, permitió conocer la máxima concentración microbiana y la velocidad de crecimiento en la fase logarítmica, donde se da el incremento exponencial de la biomasa celular (Braddock *et al.*, 1984; Zárate, 2015). Este estudio se realizó en diferentes tipos de muestras (Figura 1).

En la Figura 2 se muestra la máxima concentración microbiana en cuatro reactivaciones. Los consorcios microbianos provenientes de mineral sólido M-1, M-2, M-5, M-6 y de biofilm BF-7, lograron una concentración microbiana superior a 7 unidades logarítmicas de cel/ml desde la primera reactivación; este incremento se atribuye a la proliferación de microorganismos nativos heterótrofos que aún

disponen de nutrientes orgánicos provenientes del mineral, en donde se encontraron, además, microorganismos heterótrofos biolixiviantes (Tupikina *et al.*, 2014). Durante la primera reactivación, los diversos microorganismos, inicialmente adheridos al mineral, se desprenden para formar parte de un inóculo microbiano con concentraciones más elevadas.

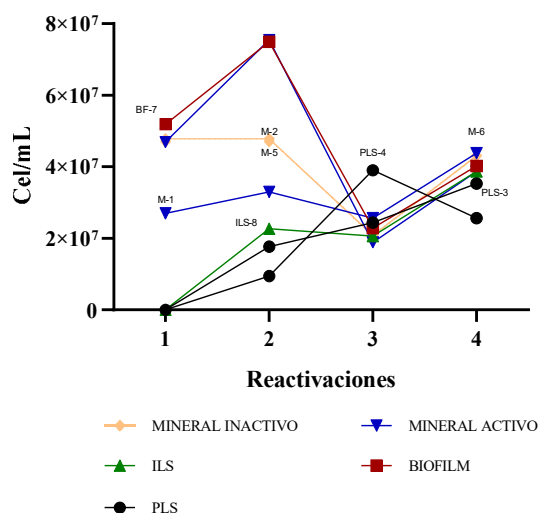


Figura 2. Evolución de la biomasa microbiana (cel/ml) de los consorcios por tipo de muestra.

En el grupo de microorganismos que se identificaron adheridos al mineral en forma de biopelícula están *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *A. thiooxidans*, siendo este último el que se adhirió más fácilmente al mineral (Okibe *et al.*, 2003).

Las muestras de PLS (Figura 3) e ILS-8 (Figura 4) llegaron a la fase logarítmica en la primera reactivación, con un recuento menor a 10^5 cel/ml, debido a la inhibición del cobre, como lo comprobaron Eyzaguirre & Castillo (2019). El desarrollo de los microorganismos depende de la composición del mineral, las condiciones fisicoquímicas y la distribución de los microbios acidófilos; es así que, en un biolixiviado, se reportó la presencia de *Acidithiobacillus caldus* (65%) y *Leptospirillum* sp. (29%), así como bacterias oxidantes del hierro y *Sulfobacillus* sp. (3%) (Govender *et al.*, 2015).

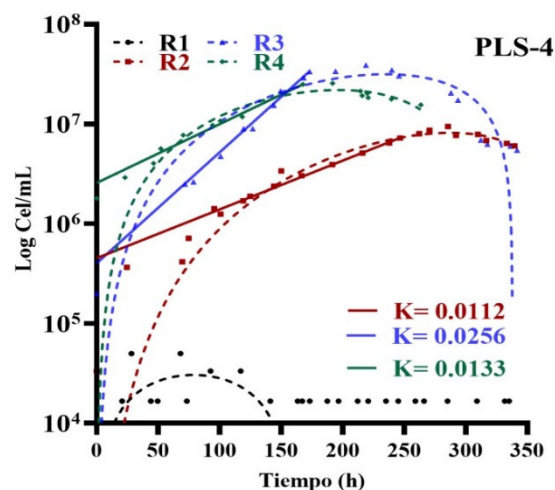
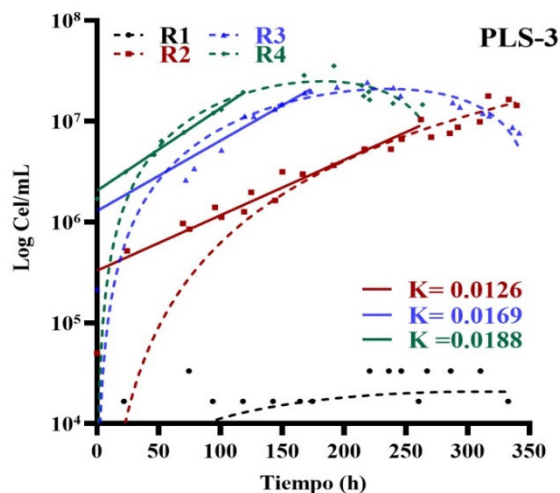


Figura 3. Cinética de crecimiento de los consorcios microbianos provenientes de PLS-3 y PLS-4 utilizando el modelo de Gompertz y el modelo de Malthus para determinar la velocidad de crecimiento (K).

En las muestras de mineral activo M-1, M-6, al igual que la BF-7 y las líquidas PLS-3, PLS-4 e ILS-8, se observó un incremento de la concentración celular en la segunda reactivación, a diferencia de las muestras del mineral inactivo M-2 y M-5, las cuales mantuvieron la biomasa estable. En la tercera reactivación, la única muestra que incrementó la concentración celular provino del PLS-4, a diferencia de las otras muestras que disminuyeron ligeramente; sin embargo, todas las muestras se mantuvieron en concentraciones cercanas a 2×10^7 cel/ml y en la cuarta reactivación todas las muestras volvieron a incrementar su biomasa obteniendo recuentos muy similares, cercanos a 4×10^7 cel/ml, a diferencia de PLS-4 que disminuyó su biomasa (Figura 2). El incremento de biomasa que se observó en la segunda, tercera y cuarta reactivación indica que la población microbiana se adaptó al medio

9K modificado. Estos microorganismos fueron capaces de utilizar las fuentes de hierro y azufre para su metabolismo y aprovechar los nutrientes químicos del medio similar al de un mineral sulfurado, en el cual los microorganismos lograron desarrollarse utilizando los recursos derivados de la disolución de hierro y azufre presentes en el mineral (Haghshenas *et al.*, 2009; Zárate, 2015). Esto sugiere que la diversidad microbiana disminuye en la tercera reactivación, sobre todo la población de microorganismos heterótrofos, que para ser aislados fue necesario utilizar medios de cultivo con sales de amoníaco y cloruros. Estos microorganismos también fueron importantes en la biolixiviación y los procesos de biorremediación (Wang *et al.*, 2014).

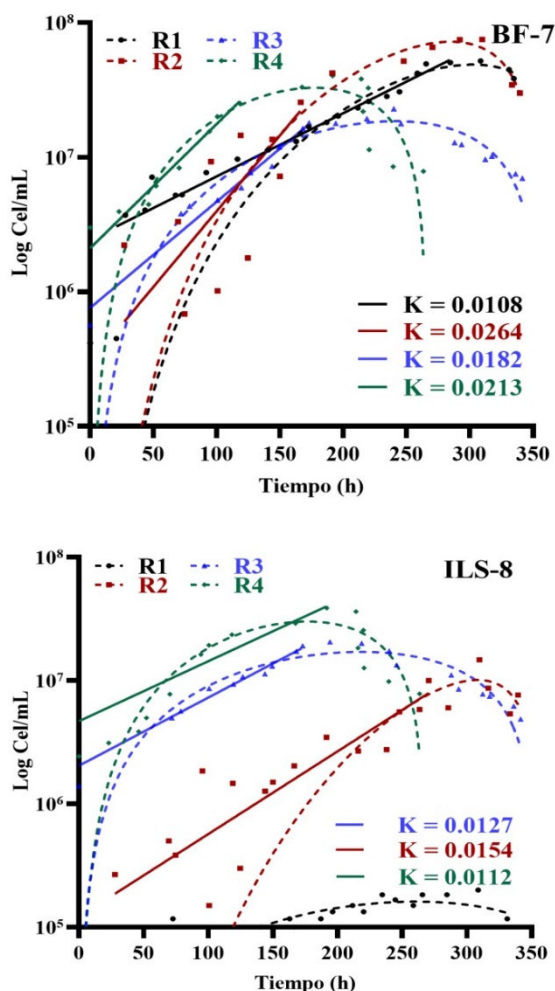


Figura 4. Cinética de crecimiento de los consorcios microbianos provenientes de biofilm (BF-7) e ILS-8 utilizando el medio de Gompertz y el modelo de Malthus para determinar la velocidad de crecimiento (K).

La primera reactivación tuvo una velocidad de crecimiento significativamente menor a las

subsiguientes reactivaciones (Figura 5) porque constituyó una fase de adaptación para el crecimiento (Coll *et al.*, 2001), y las muestras líquidas PLS-3, PLS-4 e ILS-8 no presentaron un crecimiento exponencial durante esta reactivación (Figura 5). Esto indica que las células no soportaron elevadas concentraciones de cobre y de otros metales tóxicos presentes en estas soluciones que pueden afectar la velocidad del crecimiento microbiano (Harrison *et al.*, 2007; Saavedra, 2019).

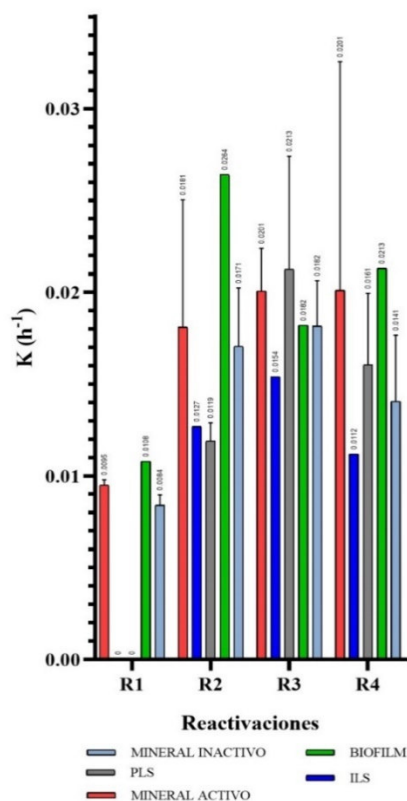


Figura 5. Promedio de la velocidad de crecimiento de los consorcios por tipo de muestra.

La máxima concentración celular de 7.49×10^7 cel/ml y 7.7×10^7 cel/ml para los consorcios M-6 (Figura 6) y BF-7 (Figura 4), respectivamente, durante la segunda reactivación, evidencian una biomasa mayor, en comparación con los 10^7 cel/ml observada para *Acidithiobacillus ferrooxidans* en un concentrado de calcopirita (Xia *et al.*, 2008); sin embargo, estos valores son similares a los encontrados para biolixivantes de la arsenopirita (8×10^7 cel/ml), de acuerdo a los hallazgos de Ospina *et al.* (2012). Esto sugiere una diversidad microbiana capaz de prosperar en el medio de cultivo 9K modificado, enriquecido con trazas de minerales, que demostró ser eficaz para el crecimiento de microorganismos biolixivantes (Kim *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2003; Arias *et al.*, 2013).

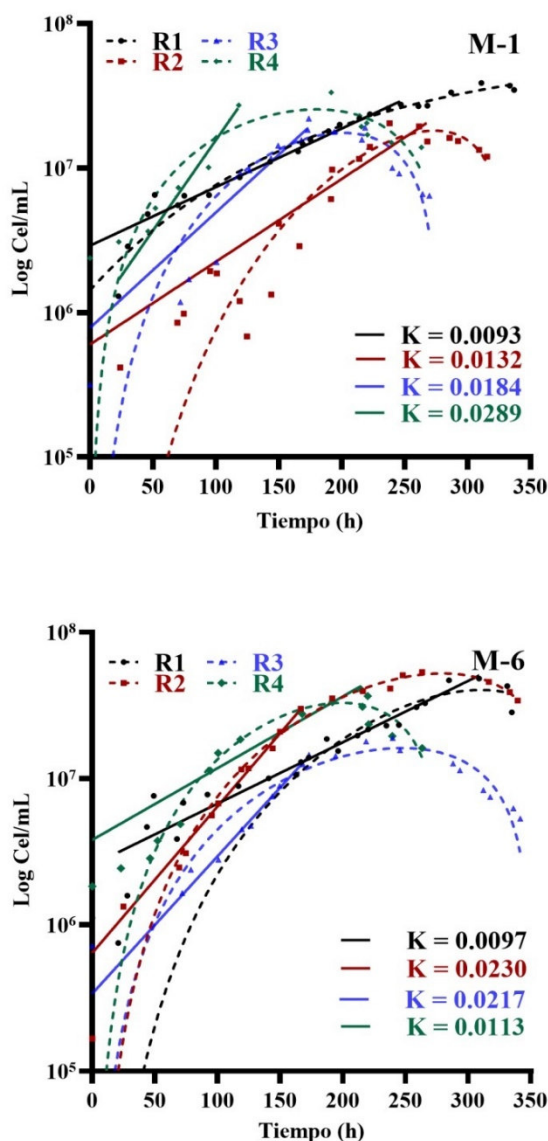


Figura 6. Cinética de crecimiento de los consorcios microbianos provenientes de mineral sólido activo utilizando el modelo de Gompertz y el modelo de Malthus para determinar la velocidad de crecimiento (K).

La máxima velocidad de crecimiento, entre todos los consorcios y reactivaciones, se observó en la muestra M-1 durante la cuarta reactivación, con un valor K de 0.0289/h (Figura 6); sin embargo, la muestra M-6 fue más estable durante todas las reactivaciones, logrando una mayor biomasa en la segunda reactivación. Este valor indica que los microorganismos se encuentran activos durante las primeras 100 horas, en comparación con los valores relativamente más bajos de otros consorcios microbianos biolixiviantes como los reportados por Govender *et al.* (2015) con valores de 0.035, 0.039, 0.040, 0.044, 0.065 y 0.74/h, o los descritos por Braddock *et al.* (1984) y Zárate (2015) con cepas

aisladas de *Thiobacillus ferrooxidans* con velocidades de 0.070 y 0.092/h y de *Thiobacillus thiooxidans* con 0.067/h. El valor de K obtenido puede ser optimizado variando los factores de temperatura y composición química del medio debido a que la velocidad de crecimiento es única a cada especie microbiana, según las condiciones medioambientales en las que se encuentre (Coroller *et al.*, 2005; Magaña & Villareal, 2006; Jin *et al.*, 2018; Koukou *et al.*, 2021); al incrementar la tasa de crecimiento microbiano en un menor tiempo se optimizó el proceso de biolixiviación (Delgado & Castillo, 2019; Eyzaguirre & Castillo, 2019).

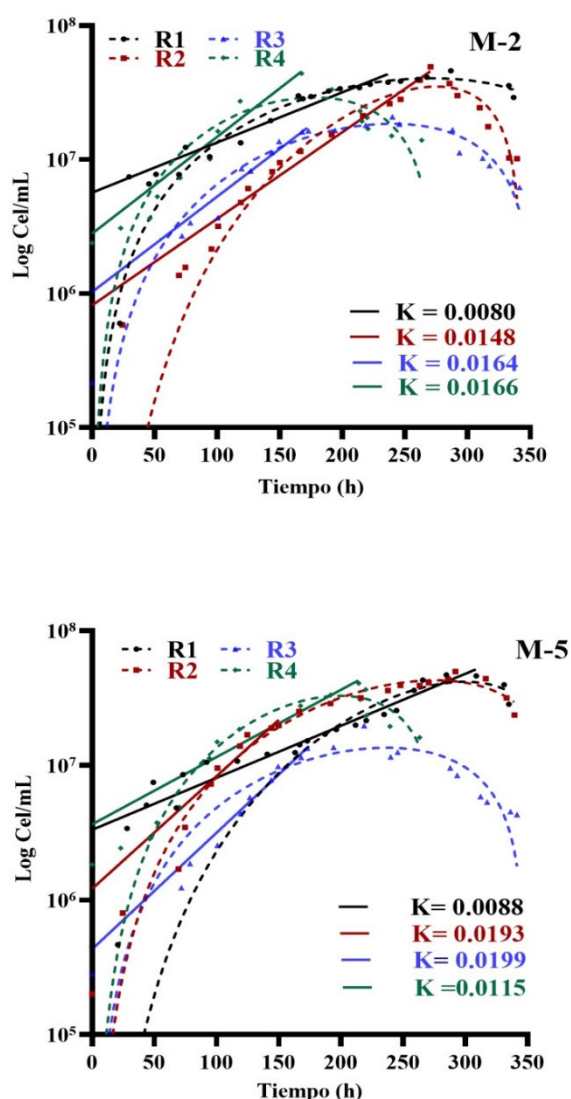


Figura 7. Cinética de crecimiento de los consorcios microbianos provenientes de mineral inactivo M-2 y M-5 utilizando el modelo de Gompertz y el modelo de Malthus para determinar la velocidad de crecimiento (K).

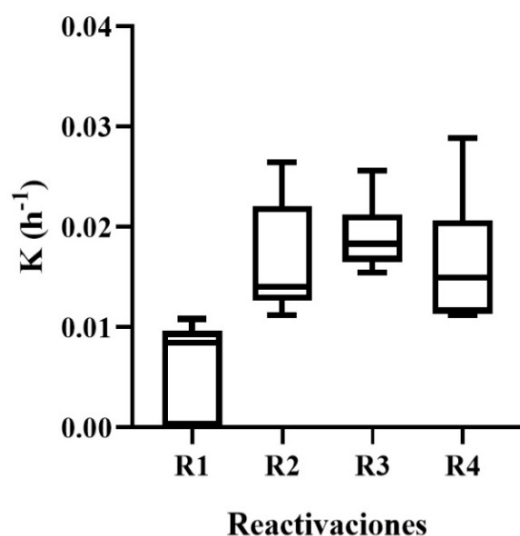


Figura 8. Gráfico de cajas y bigotes de la velocidad de los consorcios microbianos en cuatro reactivaciones.

Los consorcios microbianos de las muestras de mineral inactivo M-2 y M-5 (Figura 7) lograron biomazas altas en la primera reactivación, pero estas descendieron en las sucesivas reactivaciones y la velocidad de crecimiento fue más baja, comparada con los consorcios del mineral activo. Esto se relaciona con la coloración del mineral que se describe en la Tabla 1 y se visualiza en la Figura 1.

La cinética de las muestras de PLS alcanzó velocidades de crecimiento diferentes (Figura 3) debido a que PLS-3, que provino de una muestra de escorrentía -a diferencia de la muestra PLS-4, que se obtuvo de un depósito de líquido biolixiviado (Figura 1)- hizo que los microorganismos tuvieran una demanda de oxígeno disponible diferente, comparado con la microbiota que se desarrolló en sistemas lénticos y lóticos, donde la diferencia radicó en las adaptaciones de los microorganismos a las condiciones de flujo, movimiento del agua y a la disponibilidad de oxígeno (Madigan *et al.* 2015). Las velocidades de crecimiento (K) de los microorganismos, que procedieron de muestras líquidas, presentaron incrementos significativos en la segunda y tercera reactivación, como se observa en PLS-3 y PLS-4 (Figura 3) e ILS-8 (Figura 4). La muestra PLS-4 (Figura 3) logró la máxima velocidad de crecimiento, con una K de 0.0256/h en la tercera reactivación, siendo la más activa de las muestras líquidas; esta muestra se extrajo de la zona de biolixiviación de refino LESDE, a diferencia de la muestra PLS-3 que se obtuvo del vertedero de la poza de sedimentación Run of Mine, e ILS-8 RAF “solución pobre” (Tabla 1 y Figura 1).

El consorcio microbiano de la muestra biofilm BF-7 mantuvo una cinética más estable durante las cuatro reactivaciones (Figura 4), esto indica que los microorganismos de este consorcio se encuentran

activos desde la primera reactivación y posteriormente se adaptan a las condiciones de laboratorio y a la composición del medio 9K modificado.

Al comparar la velocidad por tipo de muestra (Figura 5) se comprueba que el mineral activo y el biofilm son las muestras con mayor potencial para obtener consorcios activos y microorganismos aislados para el proceso de biolixiviación, a diferencia de las muestras del mineral inactivo; sin embargo, las muestras de PLS e ILS podrían tener microorganismos altamente resistentes a concentraciones de metales pesados y adaptados a condiciones extremas.

La mayor velocidad de crecimiento y estabilidad se observa en la tercera reactivación para el conjunto de consorcios (Figura 8), esto indica que después de la segunda y tercera reactivación es más probable aislar microorganismos con potencial de biolixiviación. En este trabajo serían los consorcios M-6 y BF-7 los indicados para continuar con estudios de aplicación como inóculos para el mejoramiento de la biolixiviación. Según Amar *et al.* (2021), un biofilm está formado por células microbianas dentro de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) constituido en su mayoría por proteínas, ADN y polisacáridos. Estas células adheridas contribuyeron a una mayor eficiencia en la biolixiviación del mineral (Feng *et al.*, 2015). Asimismo, Liu *et al.* (2019) demostraron que un consorcio de *Leptospirillum ferriphilum*, *Acidithiobacillus caldus* y *Ferroplasma thermophilum*, pudo formar una biopelícula y favorecer la biolixiviación por contacto de calcopirita.

Conclusiones

Las diferentes velocidades de crecimiento observadas entre los consorcios microbianos y el número de reactivaciones sugieren que la composición de las especies varía según las condiciones del medio y el tiempo.

Los consorcios de muestras de mineral activo M-1, M-6 y del biofilm BF-7 demuestran una adaptación más rápida a las condiciones de laboratorio en comparación con las muestras de mineral inactivo y de los líquidos PLS e ILS. Las muestras con mayor potencial para aislar una mayor diversidad de microorganismos fueron M-6 y BF-7 durante la segunda reactivación, siendo el consorcio de procedencia del biofilm el más estable durante las cuatro reactivaciones.

Los consorcios microbianos obtenidos de muestras líquidas no alcanzaron la fase logarítmica durante la primera reactivación debido a la alta concentración de metales del medio de procedencia. La muestra PLS-4 de la poza de biolixiviación LESDE tuvo el consorcio microbiano más activo en la tercera reactivación, comparada con las muestras PLS-3 e ILS-8 que se encontraron en escorrentía. De la muestra PLS-4 fue posible aislar microorganismos resistentes a metales debido a la concentración de cobre que contuvo este biolixiviado.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna-Perú en el marco del Proyecto de Investigación N° 10605-2013-UN/JBG: “Aislamiento y Aplicación de Microorganismos Biolixiviantes para la Recuperación de Minerales Provenientes de la Actividad Minera de la Región Tacna”, y a la Empresa Minera Southern Cooper Corporation por su apoyo en la toma de muestras.

Literatura citada

- Amar A., Castro C., Bernardelli C., Costa C.S. & Donati E. 2021. Influence of UVA radiation on growth, biofilm formation and bioleaching capacity of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 201: 105574. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2021.105574>.
- Amaro A.M., Chamorro D., Seeger M., Arredondo R., Peirano I. & Jerez C.A. 1991. Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 910–915. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.910-915.1991>.
- Arias A.V., Anaya M.F., Quiñones L.J., Salazar I.D., Gil R.J. & Jamanca L.G. 2013. Adaptación del *Thiobacillus ferrooxidans* a sustratos conformados con especies de minerales piríticos. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas*, 16(31): [numeración no se continua con los artículos adyacentes]. <https://doi.org/10.15381/iigeo.v16i31.8339>. <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/view/8339>.
- Benzal E., Solé M., Lao C., Morral E., Gamisans X. & Dorado A.D. 2021. Influence of ore grade and mineral medium on chalcopyrite bioleaching with mixed microbial consortia. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 40(3): e13588. <https://doi.org/10.1002/ep.13588>.
- Bobadilla-Fazzini R.A. & Poblete-Castro I. 2021. Biofilm formation is crucial for efficient Copper Bioleaching from Bornite under mesophilic conditions: Unveiling the lifestyle and catalytic role of Sulfur-Oxidizing Bacteria. *Frontier in Microbiology*, 12: 761997. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.761997>.
- Braddock J.F., Luong H.V. & Brown E.J. 1984. Growth kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* isolated from arsenic mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(1): 48–55. <https://doi.org/10.1128/aem.48.1.48-55.1984>.
- Castillo D., Castellanos R. & Tirado E. 2021. Acción biooxidativa de cultivos microbianos biolixiviantes sobre la arsenopirita. *Ciencia & Desarrollo*, 20(1): 57-69. <https://doi.org/10.33326/26176033.2021.1.1108>.
- Castro L., Blázquez M.L. & Muñoz J.A. 2021. Leaching/Bioleaching and Recovery of Metals. *Metals*, 11(11): 1732. <https://doi.org/10.3390/met11111732>.
- Coll F., Giannuzzi L., Noia, M. & Zaritzky N. 2001. Un modelado matemático: una herramienta útil para la industria alimenticia. *Ciencia Veterinaria*, 3(1): 22-28. <https://repo.unlpam.edu.ar/handle/unlpam/4271>. <https://repo.unlpam.edu.ar/handle/unlpam/4233>.
- Coroller L., Guerrot V., Huchet V., Le Marc Y., Mafart P., Sohier D. & Thuault D. 2005. Modelling the influence of single acid and mixture on bacterial growth. *International Journal Food Microbiology*, 100(1–3): 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.014>.
- Delgado S. & Castillo D. 2019. Influencia de la temperatura en el crecimiento de un consorcio microbiano y su capacidad biooxidativa sobre el hierro de la calcopirita. *Ecología Aplicada*, 18(1): 85-90. <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v18i1.1310>.
- Domínguez-Ordóñez M., Miranda-Romero L., Martínez-Hernández P.A., Huerta-Bravo M. & Castillo-López E. 2019. Evaluación de métodos nutricionales para reactivar inóculo ruminal preservado analizado a través de cinética de fermentación y digestibilidad de forrajes *in vitro*. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.*, 10(2): 315-334. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4483>.
- Eyzaguirre P. & Castillo D. 2019. Biolixiviación indicativa del sulfato de cobre por crecimiento microbiano ante el drenaje minero. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 21(1): 49-56. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2019.444>.
- Feng S., Yang H. & Wang W. 2015. Microbial community succession mechanism coupling with adaptive evolution of adsorption performance in chalcopyrite bioleaching. *Bioresource Technology*, 191: 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.122>.
- Govender E., Bryan C.G. & Harrison S.T.L. 2015. Effect of physico-chemical and operating conditions on the growth and activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in a simulated heap bioleaching environment. *Minerals Engineering*, 75:14–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mineng.2015.02.006>.
- Haghshenas D.F., Alamdari E.K., Torkmahalleh M.A., Bonakdarpour B. & Nasernejad B. 2009. Adaptation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to high grade sphalerite concentrate. *Minerals Engineering*, 22(15): 1299–1306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mineng.2009.07.011>.
- Harrison J.J., Ceri H. & Turner R.J. 2007. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 5(12): 928–938. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1774>.
- Hedrich S., Joulain C., Graupner T., Schippers A. & Guézennec A.G. 2018. Enhanced chalcopyrite dissolution in stirred tank reactors by temperature increase during bioleaching. *Hydrometallurgy*, 179: 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.05.018>.
- Jin S., Liu Y., Sun C., Wei X., Li H. & Han Z. 2018. A Study of the environmental factors influencing the growth phases of *Ulva prolifera* in the southern Yellow Sea, China. *Marine Pollution Bulletin*, 135: 1016–1025. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.08.035>.
- Johnson D.B., Bacelar-Nicolau P., Okibe N., Thomas A. & Hallberg K.B. 2009. *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. nov. and *Ferrithrix termotolerans* gen. nov., sp. nov.: Heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 59(5): 1082–1089. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65409-0>.
- Joulain C., Fonti V., Chapron S., Bryan C.G. & Guezenec A.G. 2020. Bioleaching of pyritic coal wastes: bioprospecting and efficiency of selected consortia. *Research in Microbiology*, 171(7): 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.08.002>.

- Kim T.W., Kim C.J., Chang Y.K., Ryu H.W. & Cho K.S. 2002. Development of an optimal medium for continuous ferrous iron oxidation by immobilized *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells. *Biotechnology Progress*, 18(4): 752-759. <https://doi.org/10.1021/bp020289j>.
- Koukou I., Mejilholm O. & Dalgaard P. 2021. Cardinal parameter growth and growth boundary model for non-ferrolytic *Clostridium botulinum* – Effect of eight environmental factors. *International Journal of Food Microbiology*, 346: 109162. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109162>.
- Leathen W.W., Kinsel N.A. & Braley S. 1956. *Ferrobacillus ferrooxidans*: A chemosynthetic autotrophic bacterium. *Journal of Bacteriology*, 72(5): 700-704. <https://doi.org/10.1128/jb.72.5.700-704.1956>.
- Liu R., Chen J., Zhou W., Cheng H., & Zhou H. 2019. Insight to the early-stage adsorption mechanism of moderately thermophilic consortia and intensified bioleaching of chalcopyrite. *Biochemical Engineering Journal*, 144, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.01.009>.
- Ma L., Huang S., Wu P., Xiong J., Wang H., Liao H. & Liu X. 2021. The interaction of acidophiles driving community functional responses to the re-inoculated chalcopyrite bioleaching process. *Science of the Total Environment*, 798: 149186. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149186>.
- Madigan M., Martinko J., Bender K., Buckley D. & Stahl D. 2015. *Brock Biología de los microorganismos 14.ª Edición*. Pearson. España.
- Magaña H.A. & Villareal T.A. 2006. The effect of environmental factors on the growth rate of *Karenia brevis* (Davis) G. Hansen and Moestrup. *Harmful Algae*, 5(2): 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2005.07.003>.
- Malthus T.R. 1926. *First essay on population (1798)*. Macmillan, London. <https://archive.org/details/b31355250/page/n3/mode/2up>. urn:oclc:record:1155448083.
- Melchor M. 2015. *Modelización mediante difusiones no homogéneas tipo Gompertz*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España. <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/40667/24955334.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- MINEM. 2021. *Anuario minero 2021*. MINEM (Ministerio de Energía y Minas). Lima, Perú. <https://www.minem.gob.pe/minem/archivos/file/Mineria/PUBLICACIONES/ANUARIOS/2021/AM2021.pdf>.
- Miyamoto-Shinohara Y., Sukenobe J., Imaizumi T. & Nakahara T. 2008. Survival of freeze-dried bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54(1): 9–24. <https://doi.org/10.2323/jgam.54.9>.
- Muñoz A., Márquez M.A., Montoya O.I., Ruíz O. & Lemehsko V. 2003. Evaluación de oxidación bacteriana de sulfuros con *Acidithiobacillus ferrooxidans* mediante pruebas de FTIR y difracción de rayos X. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(1): 73–81. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/artic le/view/594>.
- Okibe N., Gericke M., Hallberg K.B. & Johnson D.B. 2003. Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4): 1936-1943. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1936-1943.2003>.
- Ospina J.D., Mejía E., Osorno L., Márquez M.A. & Morales A.L. 2012. Biooxidación de concentrados de arsenopirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* en erlenmeyer agitados. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1):135–145. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/issu e/view/2963>.
- Parra E., Gordillo W. & Pinzón W. J. 2019. Modelos de Crecimiento Poblacional: Enseñanza-Aprendizaje desde las Ecuaciones Recursivas. *Formación universitaria*, 12(1): 25–34. <https://doi.org/10.4067/S0718-50062019000100025>.
- Saavedra A. & Corton E. 2014. Biotecnología microbiana aplicada a la minería. *Revista Química Viva*, 13(3): 18-32. URI: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v13n3/saavedra.pdf>.
- Saavedra A. 2019. Efecto de la producción de EPS inducida por galactosa sobre la oxidación de ion ferroso por *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Tesis para optar el grado de Magister en Ciencias de la Ingeniería mención en Ingeniería Bioquímica. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Chile. ResearchGate. DOI: 10.13140/RG.2.2.22075.36641.
- Tupikina O.V., Minnaar S.H., Rautenbach G.F., Dew D.W. & Harrison S.T.L. 2014. Effect of inoculum size on the rates of whole ore colonisation of mesophilic, moderate thermophilic and thermophilic acidophiles. *Hydrometallurgy*, 149: 244-251. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2013.10.010>.
- Wang Y., Zeng W., Qiu G., Chen X. & Zhou H. 2014. A Moderately Thermophilic Mixed Microbial Culture for Bioleaching of Chalcopyrite Concentrate at High Pulp Density. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(2): 741–750. <https://doi.org/10.1128/AEM.02907-13>.
- Watling H.R., Johnson J.J., Shiers D.W., Gibson J.A.E., Nichols P.D., Franzmann P.D. & Plumb J.J. 2016. Effect of temperature and inoculation strategy on Cu recovery and microbial activity in column bioleaching. *Hydrometallurgy*, 164: 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2016.05.017>.
- Xia L., Liu X., Zeng J., Yin C., Gao J., Liu J. & Qiu G. 2008. Mechanism of enhanced bioleaching efficiency of *Acidithiobacillus ferrooxidans* after adaptation with chalcopyrite. *Hydrometallurgy*, 92(3–4): 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.01.002>.
- You J., Solongo S.K., Gomez-Flores A., Choi S., Zhao H., Urík M., Ilyas S. & Kim H. 2020. Intensified bioleaching of chalcopyrite concentrate using adapted mesophilic culture in continuous stirred tank reactors. *Bioresource Technology*, 307: 123181. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123181>.
- Zárate E. 2015. Determinación de los parámetros cinéticos del crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* en sustrato hidrófobo de azufre. Informe Final de Investigación. Repositorio Institucional. Universidad Nacional del Callao. <http://hdl.handle.net/20.500.12952/1107>. <https://repositorio.unac.edu.pe/handle/20.500.12952/1107>.

¹ Autor para correspondencia: dcastilloc@unjbg.edu.pe. ORCID 0000-0003-0133-5921

² Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Av. Miraflores s/n, Tacna, Perú.

³ vchipanal.espg@unjbg.edu.pe. ORCID: 0000-0002-7984-6097.

⁴ cclavijok.espg@unjbg.edu.pe. ORCID: 0000-0003-2582-5618.

⁵ rcastellanos@unjbg.edu.pe. ORCID: 0000-0002-9021-412X.