



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE INGENIERÍA

**Evaluación del efecto de la
presencia de bacterias acidófilas
en la generación de drenaje
ácido de mina en Taxco,
Guerrero.**

TESIS

Que para obtener el título de
Ingeniera de minas y metalurgia

P R E S E N T A

Silvia Flor Fernández Reyes

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. Daniel Ramos Pérez



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Guadalupe Contreras Ordaz

VOCAL: Profesor: Daniel Ramos Pérez

SECRETARIO: Profesor: José Enrique Santos Jallath

1.er SUPLENTE: Profesor: Francisco Martín Romero

2.º SUPLENTE: Profesor: Fabiola Vega García

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio Nacional de Geoquímica Ambiental, Instituto de Geología,
Universidad Nacional Autónoma de México, México.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Daniel Ramos Pérez

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Alicia Santana Silva

SUSTENTANTE:

Silvia Flor Fernández Reyes

AGRADECIMIENTOS ACÁDEMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme mi formación profesional a través del colegio de ciencias y humanidades y de la Facultad de Ingeniería y ser mi casa por más de cinco años.

Al Laboratorio de Geoquímica Ambiental-A a cargo del Dr. Francisco Martín Romero, perteneciente al Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía (LANGEM), por permitirme llevar a cabo en sus instalaciones este proyecto y contribuir con su conocimiento en la elaboración de este trabajo.

A mi director de tesis M. en C. Daniel Ramos Pérez por trabajar conmigo y brindarme su apoyo a través de su conocimiento. También por alentarme durante todo el proceso de elaboración, tenerme confianza y paciencia hasta el final.

A mi supervisora técnica M. en C. Alicia Santana Silva por asesorarme en las pruebas analíticas y por todo su apoyo en la redacción y estructura de este trabajo.

A la Dr. Rocío J. Alcántara Hernández por su colaboración en la identificación de los microorganismos del DAM proveniente de Taxco, Guerrero.

A la Q. Astrid Vásquez Salgado por apoyarme durante mi estancia en el laboratorio con el equipo de análisis químico, además, de brindarme su conocimiento y amistad.

A la Dra. Elizabeth Solleiro Rebolledo y al M en C. Jaime Díaz Ortega, responsables del laboratorio de microscopia del Departamento de Ciencias Ambientales y del Suelo, por facilitarme el uso del microscopio, que fue fundamental para la fase experimental del trabajo.

A todos los profesores de la carrera que han contribuido con su conocimiento y experiencia a mi formación. En especial al M. I. José Enrique Santos Jallath, Quim. Guadalupe Contreras Ordaz, QFB. Fabiola Vega García, por sus observaciones para la mejora de este trabajo.

Dedicatorias

A mi mamá Flora Reyes García, sin ti esto no hubiera sido posible, gracias por siempre estar a mi lado y por alentarme a seguir preparándome en mi vida. Gracias por demostrarme que se puede superar cualquier obstáculo, por siempre tener las palabras correctas para ayudarme y sobre todo por el amor y ejemplo que le das a tus hijos. Para mí siempre serás el mejor ejemplo que seguir. Te amo.

A mi padre Enrique Fernández por ayudarme durante mi preparación escolar y por apoyarme durante mis estudios. Te quiero.

A mi hermano Fabián por asesorarme académicamente, por ayudarme en aquellos momentos difíciles, eres mi ejemplo para seguir. Gracias por acompañarme durante mi trayectoria escolar y por darme consejos para la vida. Siempre serás una de mis motivaciones para seguir adelante. Te quiero.

A mi hermano Gustavo por acompañarme en todo momento, por ayudarme con la tarea y jugar conmigo, por hacer los días más alegres y significativos para mí. Siempre recordare nuestras tardes de familia. Sé que siempre vas a estar para mi como yo siempre para ti. Te extraño cada día. Te quiero.

A mi hermana Pilar. Desde pequeñas hablamos de este momento, gracias por acompañarme y escucharme, por que todas esas veces que tuvimos que aprender y darnos de topes juntas, por que siempre supimos que llegaríamos hasta acá y aquí no acaba, estoy orgullosa de ti. Te quiero.

A mi familia por acompañarme en este largo camino, alentarme, confiar en mí y darme la fuerza para continuar. Por amenizar los días de estrés y hacerme reír cuando lo necesito, por demostrarme que no puedo contar con ellos. A mi tía Paula mi tío Fidel y a Griselda también formaron parte de esto.

A mis amigos que he hecho a lo largo de mi trayectoria escolar, en especial a Ivonne y Perla. Gracias por hacer esta vida más divertida, por acompañarme durante la vida escolar y por todos esos momentos significativos que compartimos.

A JC por estar junto a mi en los momentos difíciles, por no soltarme, aconsejarme y por hacerme una mejor persona. Ojalá la vida nos deje compartir más momentos juntos.

A las personas del LGA, Astrid, Ali, Dani por sus consejos para la elaboración de este proyecto y su ayuda, además de las tardes que facilitaron la elaboración de este trabajo.

ÍNDICE

Índice de figuras	8
Índice de tablas.....	9
Abreviaturas y símbolos	10
Resumen	11
Objetivo general.....	12
Objetivos particulares	12
Justificación.....	13
I. Introducción.....	14
II. Generalidades.....	16
2.1. Ubicación geográfica	16
2.2. Fisiografía	17
2.3. Clima.....	17
2.4. Hidrogeología	17
2.4.1. Hidrogeología superficial.....	17
2.4.2. Hidrogeología subterránea	18
2.5. Geología	18
2.6. Yacimientos minerales.....	19
2.7. Mineralización.....	20
III. Marco teórico.....	21
3.1. Drenaje ácido minero	21
3.1.1. Factores físicos	24
3.1.2. Factores químicos	25
3.1.3. Factor biológico.....	25
3.1.3.1. Fases del crecimiento bacteriano.....	27
3.2. Biolixiviación	29
3.2.1. Biolixiviación del zinc	30
3.2.2. Mecanismos de biolixiviación.....	31
3.2.2.1. Mecanismo indirecto	31
3.2.2.2. Mecanismo directo.....	32
3.2.3. Biooxidación de minerales de Fe	34
IV. Metodología.....	35
4.1. Muestreo	35
4.1.1. Recolección de muestras líquidas	35
4.1.2. Recolección de muestras sólidas	35

4.2.	Caracterización fisicoquímica de las muestras líquidas	36
4.2.1.	Caracterización fisicoquímica	36
4.2.2.	Cromatografía iónica.....	36
4.2.3.	Especiación de hierro Fe (III) y Fe _{total}	37
8.1.	Caracterización de muestras sólidas	38
8.1.1.	Preparación de muestras	38
8.1.2.	Análisis composicional	38
8.1.3.	Análisis mineralógico.....	39
8.2.	Identificación de comunidades microbianas asociadas.....	39
8.3.	Aislamiento y enriquecimiento de inóculo en medios de cultivo T&K modificado.....	39
4.5.1	Recuperación y aislamiento de bacterias acidófilas del DAM.....	39
4.5.2	Enriquecimiento de bacterias acidófilas del DAM en medio T&K modificado	40
8.4.	Evaluación de crecimiento en medio T&K modificado con la adición de mineral de la zona para la simulación de la generación de Drenaje Ácido de Mina	41
V.	Resultados y análisis de resultados	43
5.1.2.	Caracterización fisicoquímica de muestra líquida de Drenaje Ácido de Mina	43
5.1.	Comunidades asociadas.....	46
5.2.	Recuperación y aislamiento de bacterias acidófilas presentes en el DAM .	47
5.3.	Enriquecimiento de bacterias acidófilas del DAM en medio T&K modificado	49
5.3.1.	Primera etapa.....	49
5.3.2.	Segunda etapa	53
5.4	Evaluación de crecimiento en medio T&K modificado con la adición de mineral de la zona para la simulación de la generación de DAM	56
5.3.3.	Efecto de la presencia de bacterias en experimentos con un medio T&K sobre los minerales de Fe durante la generación del DAM	58
5.4.	Modelación de generación del DAM vía minerales de Fe	63
5.4.1.	Efecto de la presencia de bacterias en experimentos en medio T&K sobre los minerales de zinc durante la generación del DAM	65
5.5.	Modelación de generación de DAM vía minerales de Zn	66
5.5.1.	Cinética de crecimiento de bacterias y cinética de disolución de minerales de Fe y Zn en experimentos de simulación de generación de DAM ..	67
5.5.2.	Cinética química para la disolución de la esfalerita.....	69

Conclusiones	72
Perspectivas	74
Referencias	76

Índice de figuras

Figura 1 Localización de Taxco, Guerrero (GEOINFOMEX-SGM, 2019), (CAMIMEX, 2016).	16
Figura 2 Curva de crecimiento bacteriano, muestra las cuatro fases que describen el crecimiento (Carroll, et al., s.f.)	28
Figura 3 Potencial del ciclo del hierro, azufre y carbono basado en las capacidades metabólicas asociadas con los microorganismos generadores de DAM (Baker & Banfield, 2003).	30
Figura 4 Reacciones químicas involucradas en la biooxidación de la pirita (FeS ₂). (Ghassaa, et al., 2017)	34
Figura 5 DAM proveniente del socavón 1412. Foto tomada de: (Romero, 2016)	35
Figura 6 Cromatógrafo (883 Basic IC Plus) con automuestreador.	36
Figura 7 Muestra de mineral proveniente de la metalera	38
Figura 8 Reactores con medio de cultivo T&K modificado, inoculados con 200 [μl] de bacterias. La alteración por las bacterias aún no es visible.....	41
Figura 9 Difractograma comparativo de muestra MT-RG1 antes (rojo) y después del tratamiento con bacterias acidófilas	45
Figura 10 Distribución de las bacterias identificadas en la muestra Pileta.....	46
Figura 11 Características microscópicas de muestra Pileta. Tinción de Gram 100x	47
Figura 12 Aislamiento de bacterias acidófilas presentes en el DAM en medio sólido T&K modificado	47
Figura 13 Curva de crecimiento y oxidación de hierro en control de oxidación química en medio T&K sin ocular de la primera etapa.	51
Figura 14 Curva de crecimiento y oxidación del hierro en medio T&K inoculado con A. ferroxidans aislado de la muestra de DAM Pileta en primera etapa.	51
Figura 15 Curva de crecimiento de las bacterias y concentración de hierro en control de oxidación química en medio T&K modificado sin bacterias.....	55
Figura 16 Curva de crecimiento de las bacterias y concentración de hierro en medio T&K inoculado con muestra Pileta	55
Figura 17 Curva de crecimiento de las bacterias y concentración de hierro en control de oxidación química en medio T&K con mineral.....	58
Figura 18 Curva de crecimiento de las bacterias y concentración de hierro en medio T&K con mineral inoculado con muestra pileta.	58
Figura 19 Diagrama de Pourbaix del hierro para el medio T&K modificado	63
Figura 20 Diagrama de Pourbaix para el hierro en medio con mineral.....	64
Figura 21 Gráfica del crecimiento bacteriano asociado a la libración del zinc en medio con mineral.....	65
Figura 22 Diagrama de Purbaix para el zinc en medio con mineral.....	66
Figura 23 Gráfica de curva de crecimiento de las bacterias presentes en el medio T&K y con mineral.	68
Figura 24 Gráfico de las concentraciones de zinc (II) para la oxidación química con orden de reacción cero	70
Figura 25 Gráfico de las concentraciones de zinc (II) en In para la oxidación biológica con orden de reacción uno	70

Índice de tablas

Tabla 1 Formaciones geológicas del distrito minero Taxco	18
Tabla 2 Unidades mineras relacionados con los principales minerales encontrados en sus obras.	20
Tabla 3 Minerales secundarios formados.....	22
Tabla 4 Investigaciones con los macroorganismos asociados al DAM.....	26
Tabla 5 Composición de los medios de cultivos utilizados para las bacterias contenidas en el DAM.....	40
Tabla 6 Composición de la muestra de DAM recolectada.....	43
Tabla 7 Parámetros fisicoquímicos de la muestra del DAM obtenidos en campo.....	43
Tabla 8 Caracterización de muestra de mineral colectado dentro de la mina.....	44
Tabla 9 Caracterización de elementos traza en la muestra sólida	44
Tabla 10 Bacterias identificadas en las muestras líquidas	46
Tabla 11 Características morfológicas y microscópicas de bacterias acidófilas aisladas en muestra Pileta.....	47
Tabla 12 Parámetros fisicoquímicos y concentración de hierro en control de oxidación química en medio T&K modificado sin bacterias.....	49
Tabla 13 . Parámetros fisicoquímicos y concentración de hierro en experimento de oxidación biológica en medio T&K modificado, inoculado con bacterias de muestra de Pileta	49
Tabla 14 Parámetros fisicoquímicos y concentración de hierro en control de oxidación química en medio T&K modificado sin bacterias.....	53
Tabla 15 Parámetros fisicoquímicos y concentración de hierro en medio T&K modificado con bacterias de la muestra Pileta	54
Tabla 16 Parámetros fisicoquímicos y concentración de hierro en control de simulación de DAM por oxidación química en medio T&K con mineral añadido sin bacterias	56
Tabla 17 Parámetros fisicoquímicos y concentración de hierro en experimento de simulación de generación de DAM por oxidación biológica mediante el uso de A. ferroxidans aislada de pileta	57
Tabla 18 Concentración de elementos mayoritarios liberados durante la simulación en medio T&K con mineral sin bacterias.....	61
Tabla 19 Concentración de elementos mayoritarios en medio T&K con mineral inoculados con muestra Pileta	61
Tabla 20 Ecuación lineal que representa el crecimiento de las bacterias, así como su constante de crecimiento k.....	68
Tabla 21 Modelo de ecuaciones para obtener el orden de la reacción según el tipo de oxidación: química y biológica	69
Tabla 22 Constante de cinética de reacción para la oxidación química y biológica.....	71

Abreviaturas y símbolos

A. ferroxidans	<i>Acidithiobacillus ferroxidans</i>
CE	Conductividad Eléctrica
DAM	Drenaje Ácido de Mina
Eh	Potencial redox con respecto al electrodo normal de hidrógeno
FRX	Espectrometría de Fluorescencia de rayos X
IC	Cromatografía iónica
OD	Oxígeno disuelto
pH	Indica la concentración de iones de hidrogeno presentes en determinadas disoluciones. $= -\log_{10} [H^+]$
T&K	Medio de cultivo diseñado para el aislamiento de A. ferroxidans (Touvinen & Kelly, 1973)

Resumen

El Drenaje Ácido de Mina (DAM) es un problema ambiental crítico en todo el mundo debido a su bajo pH y concentración de elementos potencialmente tóxicos. Se sabe de la generación DAM altamente contaminado en una mina inactiva en Taxco, Guerrero, México. En donde se libera al medio ambiente a través de la Galería 1412. La generación de DAM en este sitio podría estar asociada con la oxidación y disolución de minerales de sulfuro de zonas mineralizadas naturalmente y desechos mineros en el área, esta generación podría verse afectada por factores químicos, físicos y biológicos. Según investigaciones, el factor biológico por presencia de bacterias acidófilas en la mina podría ser el más importante, ya que podría aumentar la disolución de sulfuros y contribuir en la liberación de zinc, que podrían utilizarse en biolixiviación.

Abstract

Acid Mine Drainage (AMD) is a critical environmental problem worldwide due to its high acidity and concentration of potentially toxic elements. A highly polluted AMD from an inactive mine in Taxco, Guerrero, Mexico, which is released to the environment through the 1412 Gallery has been reported. The AMD generation in this site could be associated with the oxidation and dissolution of sulfide minerals from naturally mineralized zones and mining wastes in the area, this generation could be affected by chemical, physical and biological factors. According to many investigations, the biological factor by the presence of acidophilic bacteria in the mine could be the most important, because it could increase the sulfide dissolution and contribute to the release of zinc, that could be used for bioleaching.

Objetivo general

- Evaluar el efecto de la presencia de bacterias acidófilas en la generación del Drenaje Ácido de Mina (DAM) en Taxco, Guerrero.

Objetivos particulares

- Identificar la presencia de bacterias acidófilas en el DAM generado en Taxco, Guerrero.
- Estudiar el efecto de las bacterias acidófilas presentes en el DAM de Taxco, Guerrero en medios sintéticos.
- Estudiar el efecto de las bacterias acidófilas en la generación del DAM en Taxco, Guerrero a partir de los minerales presentes en una mina abandonada.

Justificación

En el distrito minero de Taxco, se ha reportado un serio problema de generación de DAM como resultado de la oxidación de minerales sulfurados de presas de jales inactivas y minas subterráneas abandonadas debido a la infiltración del agua subterránea (Romero, 2016), este proceso podría estar fuertemente vinculado a la presencia de microorganismos acidófilos como *Acidithiobacillus ferroxidans*, capaz de catalizar la oxidación de los sulfuros presentes en la zona, por lo cual es de vital importancia establecer si existe su presencia en este sitio y estudiar el efecto de estas bacterias acidófilas en el proceso de generación del DAM, a partir de los minerales presentes en una mina abandonada en Taxco, Guerrero, mediante experimentos a nivel laboratorio y proponer su uso como biolixiviante en la recuperación de Zn.

I. Introducción

En el año 2007, después de que la actividad minera quedara suspendida en el distrito minero de Taxco, a causa de una huelga, se produjo un serio problema de drenaje ácido de mina (DAM), el cual comenzó a salir del Socavón 1412, al pie de la presa de jales Guerrero (Figura 4).

Este fenómeno fue originado debido a la acumulación de agua subterránea infiltrada entre las rocas fracturadas de la montaña, la cual dejó de reciclarse en el proceso minero debido al paro de actividades (Romero, 2016).

Después de uno o dos años de inactividad, el DAM generado comenzó a salir de la bocamina con un volumen estimado de 820 galones/min o bien 3104 L/min (Industrial Minera Mexico, 2017).

Según investigaciones previas en el sitio, el DAM producido presenta un bajo valor de pH (pH 2.2-2.9), el DAM está enriquecido con sulfatos (1470-5454 mg/L), metales pesados como Zn, Fe, Cu, Cd y Pb (Zn=3.0-859 mg/L, Fe= 5.5-504 mg/L, Cu=0.7-16.3 mg/L, Cd= 0.3-6.7 mg/L y Pb= 0.05-1.8 mg/L) y metaloides como As (As=0.002-0.6 mg/L) (Romero et al, 2010).

Según algunas investigaciones realizadas en sitios semejantes, la generación del DAM en este sitio puede llevarse en varias etapas, según lo que se muestra a continuación (Romero, 2004):

- A) Etapa inicial: En la que predominan las reacciones de oxidación química donde los protones liberados son neutralizados por los minerales carbonatados, hidróxidos y aluminosilicatos que mantiene condiciones desde neutras a alcalinas ($\text{pH} \geq 7$), propiciando la precipitación de minerales secundarios que controlan la movilidad de los Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT) liberados durante la oxidación (Romero, 2004).
- B) Etapa intermedia: En donde coexisten las reacciones de oxidación química y biológica, generando una mayor acidez, que agota los minerales con potencial de neutralización, el pH del drenaje disminuye entre 4.5-3.5 dando lugar al desarrollo de microorganismos acidófilos como *Gallionella ferruginea* y *Metallogenium symbioticum*, capaces de catalizar la oxidación del Fe^{2+} presente en la piritita (Walsh & Mitchell, 1972).

- C) Etapa final: Predominan las reacciones de oxidación catalizadas biológicamente. Existe una elevada producción de protones, donde se alcanzan $\text{pH} < 3.5$, dando lugar al desarrollo de microorganismos acidófilos como: *Acidithiobacillus spp.*, *Thiobacillus spp.* (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus caldus*), *Leptospirillum sp.* (*L. ferriphilum*, *L. ferrooxidans*), entre otros que son capaces de aportar el 75% del DAM producido (Edwards, et al., 2000).

Entre estas etapas, la última es determinante, ya que se sabe que los microorganismos son capaces de catalizar la oxidación de los minerales presentes en las minas abandonadas y residuos mineros, por lo que es importante reconocer si estos representan un factor importante en la generación del DAM de Taxco, Guerrero, para que de esta manera puedan proponerse alternativas de uso, como el uso de este como biolixiviante y medir la recuperación de Zn en minas polimetálicas.

II. Generalidades

2.1. Ubicación geográfica

El estado de Guerrero se caracteriza por realizar actividades mineras desde tiempos de la colonia, posiblemente su más importante distrito minero es Taxco de Alarcón, el cual se ubica entre los paralelos 18° 21' y 18° 41' de latitud norte; los meridianos 99° 25' y 99° 47' de longitud oeste; altitud entre 700 y 2 600 msnm (INEGI, 2009). Ocupa el 1.02% de la superficie del estado de Guerrero.

Perteneciente a la región minera Buenavista de Cuellar, Taxco se localiza en la parte norte del estado de Guerrero, mientras el distrito minero Taxco se localiza en la parte suroccidental y comprende una superficie de 100 km².



Figura 1 Localización de Taxco, Guerrero (GEOINFOMEX-SGM, 2019), (CAMIMEX, 2016).

La región minera Buenavista de Cuellar se caracteriza por tener una mineralización consistente en: Au, Ag, Pb, Zn, Cu, Cd, Fe, Hg, Sb; en esta región se encuentran yacimientos minerales con las características de vetas, zonas de skarn, relleno de cavidades, mantos y brechas (Miranda Huerta, et al., 2003).

2.2. Fisiografía

La zona de estudio se ubica al sur de la provincia sierra madre del sur la cual se caracteriza por tener relieve variado como sierras, valles guerrerenses y depresión de balsas, siendo estas tres las subprovincias pertenecientes a la zona (INEGI, 2009). El sistema de topoformas incluye también sierras con cañadas y mesetas con lomeríos (Miranda Huerta, et al., 2003).

2.3. Clima

El rango de temperatura oscila entre 12 – 26 °C y la temperatura promedio anual son 18 °C en zonas montañosas y 20 °C en zonas planas, los meses más calurosos van de abril a septiembre, predomina un clima templado subhúmedo con lluvias en verano principalmente. El rango de precipitación fluvial va de 800 – 1500 mm anuales, siendo los meses más lluviosos de junio a septiembre (INEGI, 2009).

2.4. Hidrogeología

Taxco corresponde a la región hidrogeológica R18: Balsas, localizada al suroeste de México, las regiones hidrogeológicas son límites naturales de las grandes cuencas existentes en el país. R18 cuenta con una superficie hidrológica de 117,405 km², equivalente al 6% del territorio nacional. La región hidrológica, está limitada por las Sierras Madre del Sur y la de Juárez, así como por el eje Neovolcánico. Cuenta con un potencial importante de escurrimientos consistentes en más de 900 milímetros al año (CONAGUA, 2010). Cubre el 53.31% de la superficie del estado, abarcando el centro y norte de la entidad.

2.4.1. Hidrogeología superficial

Se divide en las subregiones hidrogeológicas alto, medio y bajo Balsas. Las corrientes fluyen al río Balsas, que a la vez vierte sus aguas en el océano Pacífico. Las cuencas de esta región hidrológica y la porción del territorio estatal que cobijan son: Rio Balsas-Mezcala

22.07%, Rio Balsas-Zirándaro 14.72%, Rio Balsas-Infiernillo 5.46%, Rio Tlapaneco (5,61%), Rio Grande de Amacuzac 3.24% y Rio Cutzamala 2.21% (CONAGUA, 2013).

2.4.2. Hidrogeología subterránea

Se han ubicado 41 acuíferos dentro de R18, que captan como recarga media renovable un volumen de 4,543 millones de metros cúbicos por año, frente a una extracción de 2,292 millones de metros cúbicos por año que se realiza por los usos agrícola, público urbano, doméstico e industrial mediante obras de alumbramiento, lo que representa que se extrae aproximadamente el 50% del volumen que se recarga (CONAGUA, 2010).

2.5. Geología

El estado de Guerrero está constituido por una serie de secuencias volcánico-sedimentarias generadas en un ambiente de arco de islas de edad Jurásico tardío-Cretácico temprano y sin basamento reconocido (Miranda Huerta, et al., 2003). Las rocas que afloran en la zona minera Taxco conforman una secuencia litológica que está representada por rocas metamórficas, sedimentarias e ígneas, las rocas más antiguas son esquistos con intercalaciones de pizarras que pertenecen al esquistos de Taxco (Paleozoico superior), sobre este descansan rocas sedimentarias como: caliza, dolomitas, limolitas, areniscas y conglomerados pertenecientes a las formaciones Morelos y Mexcala del cretácico inferior y superior. Rocas clásticas de origen continental de la formación Balsas del terciario se encuentra descansando sobre rocas sedimentarias del cretácico, la columna litológica se encuentran las rocas ígneas de la riolita Tilzapotla que junto a intrusiones ígneas son las rocas más jóvenes de la región (Romero, 2018). Las principales formaciones de la zona se encuentran en la Tabla 1 junto con las principales rocas que las caracteriza.

Tabla 1 Formaciones geológicas del distrito minero Taxco

Formación	Principales rocas
Morelos	Caliza y dolomía
Mexcala	Lutita, arenisca y caliza
Balsas	Conglomerado calcáreo y volcánico, arenisca, tobácea y andesita.
Tilzapotla	Riolita y tobas riolíticas

2.6. Yacimientos minerales

En el distrito de Taxco existen unas 50 vetas de importancia, más del 50% de ellas tienen un rumbo que varía de N 20° 30° W, un 25% tiene un rumbo entre N-S y N 10° W, y las restantes entre N 40° y 60° W. Un sistema de fallas no mineralizadas con rumbo NE-SE corta las vetas, estas atraviesan a la secuencia volcánico-sedimentaria de Taxco y las rocas sobre yacientes. Las vetas más importantes alcanzan una longitud cercana a los 2,000 m, pero la mayoría de ellas varían entre 500 y 700 m, la anchura más común de las vetas varía entre 1 a 3 m. Los principales yacimientos se confinan en las siguientes unidades mineras: San Antonio-La Concha, el Solar-Mina Guerrero y mina Remedios, todas fueron operadas en forma conjunta por Grupo México S. A. (Miranda Huerta, et al., 2003).

El distrito minero de Taxco se caracteriza por ser un sistema complejo de vetas y mantos con mineralización de sulfuros de plata, plomo y zinc, el yacimiento está catalogado como epitermal de baja sulfuración, con temperaturas que oscilan entre 180 °C hasta 315 °C.

Las principales estructuras en este distrito están representadas por: vetas de relleno de fisura, cuerpos y mantos de reemplazamiento y stockworks una secuencia volcánica-sedimentaria de Taxco y rocas sedimentarias sobreyacientes. Regionalmente los depósitos de este distrito tienen relación con otros yacimientos enclavados en la Sierra Madre del Sur, alineándose a lo largo de una franja con tendencia NW-SE que atraviesa los estados de Michoacán, México, Morelos y Guerrero, siendo los depósitos de mayor importancia: Tlalpujahuá (oro y plata), Angangueo (oro y plata), Temascaltepec (oro y plata), Sultepec (oro y plata), Zacualpan (plata y plomo), Xitinga (oro y plata), Huahuaxtla y Huitzuco (mercurio) y Huautla (oro y plata) (Miranda Huerta, et al., 2003).

2.7. Mineralización

La mineralización se describe conforma a las tres principales minas de la zona, ya que los yacimientos se encuentran confinados dentro de ellas. En la Tabla 2 se encuentran las unidades mineras importantes de la zona junto con los principales minerales identificados en las mismas. Cada unidad minera está conformada de varias vetas, para fines prácticos solo se mencionarán los minerales reconocidos.

Tabla 2 Unidades mineras relacionados con los principales minerales encontrados en sus obras.

Mina	Minerales
Unidad minera San Antonio La concha	Galena, galena argentífera, argentita y esfalerita, en menor cantidad se presentan pirargirita, proustita y calcopirita, con ganga de pirita, cuarzo, hematita e ilvanita.
Unidad minera El Solar - Mina Guerrero	Hematita, limonita, esfalerita, galena argentífera con ganga de cuarzo, calcita, pirita, marcasita, arsenopirita, y hematita, las alteraciones observables son solidificación y oxidación principalmente.
Unidad minera remedios	Esfalerita en menor cantidad galena, argentita, galena argentífera y como ganga pirita, pirrotita, hematita, magnetita, ilvanita, cuarzo, calcita

(Miranda Huerta, et al., 2003).

III. Marco teórico

3.1. Drenaje ácido minero

La formación del drenaje ácido de mina (DAM) es una secuencia de procesos biogeoquímicos y de disolución de minerales (Dold, 2014), aunque el proceso de formación de DAM ocurre naturalmente, la minería promueve su generación incrementando la cantidad de sulfuros expuestos, las bacterias de origen natural pueden ayudar a acelerar la producción al descomponer los minerales de sulfuro (Ata & Soner, 2006).

Se produce cuando minerales que tienen sulfuro son expuesto a agua y oxígeno, al ser expuestos los minerales sulfurados se oxidan formando ácido sulfúrico que disuelve sales y moviliza metales pesados, creando un lixiviado ácido de color rojizo oscuro con valores de pH menores a 2.5, alta conductividad específica, siendo estas una de sus principales características, además de contener metales pesados y otros elementos tóxicos (Ata & Soner, 2006).

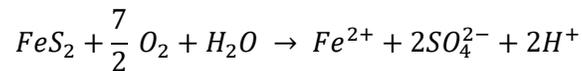
Existen distintos tipos de minerales de sulfuros, como la pirrotita (FeS) y la calcocita (Cu_2S) se diferencian entre sí por tener otras proporciones de sulfuro de metal y metales distintos del hierro. Los sulfuros de hierro son los más comunes, cuando estos minerales se oxidan forman un drenaje ácido rico en sulfato. Los principales ingredientes para la generación de ácido se pueden resumir en los siguientes: (1) minerales de sulfuro; (2) agua o ambiente húmedo y (3) un oxidante pudiendo ser el aire de la atmosfera o fuentes químicas. El mineral de sulfuro más común es la pirita (FeS_2) generada en la naturaleza y está ampliamente considerada como la causa principal de la DAM (Ilhwan Park, 2018). Las reacciones que llevan a la generación de ácido se ilustran mejor con este mineral. La oxidación de la pirita se lleva a cabo en varios pasos, incluida la formación de los productos secundarios metaestables según las condiciones geoquímicas como se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3 Minerales secundarios formados

Nombre	Formula
Ferrihidrita	$5Fe_2O_3 \cdot 9H_2O$
Schwertmannita	entre $Fe_8O_8(OH)_6SO_4$ y $Fe_{16}O_{16}(OH)_{10}(SO_4)_3$
Goetita	$FeO(OH)$
Jarosita	$(KFe_3(SO_4)_2(OH)_6)$
Hematita	Fe_2O_3

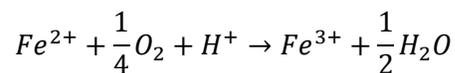
Se puede considerar que la oxidación de la pirita tiene lugar a los siguientes pasos principales: (Dold, 2014):

1. Oxidación del azufre. La oxidación del mineral de sulfuro en hierro disuelto, sulfato e hidrógeno:

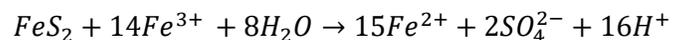


El Fe^{2+} , SO_4^{2-} y H^+ disueltos representan un aumento en los sólidos disueltos totales y la acidez del agua, por lo que inducen una disminución en el pH. Si el ambiente circundante es suficientemente oxidante (depende de la concentración de O_2 , el pH y la actividad bacteriana), gran parte del hierro ferroso se oxidará a hierro férrico, de acuerdo con la siguiente reacción (2) (Ata & Soner, 2006).

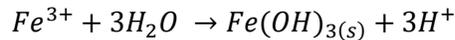
2. Oxidación del hierro ferroso



3. Oxidación de sulfuros en medio anaerobio por Fe^{3+} . Las velocidades de reacción aumentan fuertemente por la actividad microbiana



4. Hidrólisis y precipitación de complejos férricos y minerales. La hidrólisis y precipitación de los hidróxidos de hierro producirá la mayor parte del ácido en este proceso. Si el pH es inferior aproximadamente 2, los productos de hidrólisis férrica como el $Fe(OH)_3$ no son estables y el Fe^{3+} permanece en disolución:



Etapas del desarrollo del Drenaje Ácido según (Romero, 2018):

Etapa inicial: Predominan las reacciones de oxidación química en la que el O_2 es oxidante principal ecuación 1 y 2. Los sulfatos y protones liberados por la oxidación de los sulfuros metálicos, en esta etapa se favorece la precipitación de minerales secundarios que controlan la movilidad de los metales y metaloides potencialmente tóxicos liberados durante la oxidación.

Etapa intermedia: Coexisten las reacciones de oxidación biológica. El pH del drenaje disminuye a un intervalo de 3.5 a 4.5 y la oxidación puede ser catalizada por el tipo de bacterias "*Metallogenium*" produciendo entonces las condiciones favorables para el desarrollo de bacterias del género *Thiobacillus*.

Etapa final: Predominan reacciones de oxidación biológica la producción de protones H^+ ocurre a mayor velocidad que la de OH^- , cuando el medio alcanza un $pH < 3.5$ la oxidación es catalizada por microorganismos del tipo *Acidithiobacillus: ferroxidans*, *A. thiooxidans*. La oxidación de los sulfuros metálicos catalizados por bacterias puede ser hasta seis veces más rápida que la oxidación química.

Los principales factores que determinan la velocidad de generación de ácido son (Ata & Soner, 2006):

- pH
- Temperatura
- Contenido de oxígeno en la fase gaseosa
- Concentración de oxígeno en la fase acuosa
- Grado de saturación con agua
- Actividad química de Fe^{3+}
- Superficie del sulfuro metálico expuesto
- Energía química requerida para iniciar la generación del ácido
- Actividad bacteriana

También los factores químicos, físicos y biológicos son importantes para la determinación de la velocidad de generación del DAM. Los microorganismos aceleran la velocidad de la disolución de la pirita a través de la regeneración de Fe (III) (Edwards, et al., 2000).

3.1.1. Factores físicos

Temperatura: Es relevante para la conservación y desarrollo de bacterias, siendo la temperatura óptima entre 28° y 30°. Por encima de 35 °C su actividad se interrumpe y a temperaturas menores disminuye, aunque existen datos de bacterias activas a 4°C (Aduvire, 2006).

Tipo de mineral: Los minerales sulfurados son importantes en la formación del DAM, la pirita (FeS_2) es uno de los minerales más comunes, también existe la arsenopirita (FeAsS), calcopirita (CuFeS_2), galena (PbS), gersdorffita (NiAsS), pirrotita y esfalerita (ZnS),) tienen otras proporciones de sulfuro de metal y metales distintos del hierro y también contribuyen en la acidificación (Ilhwan Park, 2018), oxidantes adicionales y minerales de sulfuro tienen diferentes vías de reacción, estequiometría y velocidad (Ata & Soner, 2006). Cuando diferentes sulfuros están en contacto entre sí, es probable que se produzcan procesos electroquímicos que influyan en la reactividad de los sulfuros (Dold, 2014)

Superficie expuesta: El proceso de generación de drenaje ácido ocurre naturalmente, la industria minera ayuda a incrementar la superficie expuesta (Ata & Soner, 2006). El objetivo de la explotación de minerales es extraer los metales de interés económico, para poder lograrlo, se minimiza el tamaño de partícula, se comienza con la barrenación (uno de los primeros pasos en la explotación del mineral) hasta llegar al beneficio. Estas actividades exponen la superficie del mineral, es por eso, por lo que el DAM se puede generar en minas abandonadas, presa de jales y terreros, porque el mineral ya fue modificado físicamente por medios diferentes al natural.

3.1.2. Factores químicos

pH: La liberación de DAM se da en condiciones de pH bajo. Como ejemplo está la oxidación de la pirita. El hierro ferroso pasa a hierro férrico, el hierro férrico es el oxidante primario de este mineral. En condiciones abióticas la velocidad de oxidación de la pirita por el hierro férrico se controla mediante la velocidad de oxidación del hierro ferroso, que disminuye rápidamente al disminuir el pH. Por debajo de un pH de 3, la oxidación de la pirita por el hierro férrico es aproximadamente diez a cien veces más rápida que por el oxígeno (Dold, 2014).

Si se tiene una disolución rica en hierro ferroso y férrico, cuando esta solución entra en contacto con la superficie se oxidará y se hidrolizará, dependiendo del pH puede precipitar: ferrihidrita, schwertmannita, goetita o jarosita. La hidrólisis y precipitación de los hidróxidos de hierro producirá la mayor parte del ácido en este proceso. Si el $\text{pH} < 2$, los productos de hidrólisis férrica como el $\text{Fe}(\text{OH})_3$ no son estables y el Fe (III) permanece en disolución (Dold, 2014).

Oxígeno disuelto: El oxígeno del medio ambiente es necesario para la oxidación directa de los minerales sulfurados, en el caso de la pirita es preciso para la regeneración de hierro férrico, por lo que en ausencia de oxígeno se inhiben los procesos de generación del DAM (Aduvire, 2006).

3.1.3. Factor biológico

Una comunidad microbiana es la responsable de la oxidación de los sulfuros, formando nano ambientes que crecen sobre el sulfuro del mineral. Para que las bacterias prevalezcan, las condiciones ambientales deben ser favorables, por ejemplo *A. ferrooxidans* es más activo en agua con un pH inferior a 3.2. Si las condiciones no son favorables, la influencia bacteriana en la generación de ácido será mínima, por el contrario, cuando la aceleración bacteriana es significativa se involucran más factores para determinar el grado de actividad y la velocidad asociada a la generación del DAM (Ata & Soner, 2006).

Existen microorganismos como *Acidithiobacillus ferroxidans* o *Leptospirillum ferroxidans* que obtiene energía oxidando sulfuros de hierro Fe (II) a Fe (III), catalizan la reacción aumentando su velocidad hasta un factor de aproximadamente 100 sobre oxidación abiótica

(Dold, 2014). Bacterias como *Acidithiobacillus ferrooxidans* pueden acelerar la oxidación de sulfuros de antimonio, galio, molibdeno, arsénico, cobre, cadmio, cobalto, níquel, plomo y zinc (Ata & Soner, 2006).

En la Tabla 4 se muestran diferentes investigaciones donde se asocian el tipo de bacterias a la generación del DAM.

Tabla 4 Investigaciones con los macroorganismos asociados al DAM

Lugar	Microorganismos	Condiciones ambientales	Referencias
Iron Mountain, California.	<i>Archeal (acidarmanus)</i> y <i>Thermoplasmasles</i>	pH 0.5 T= 40°C	(Edwards, et al., 2000)
Ontario, Canadá. The Nickel Rim mine	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Leptosprillum ferrooxidans</i>	pH < 3	(Benner, et al., 1999)
Piuquenes, Chile	<i>Leptospirillum spp.</i> <i>Acidithiobacillus spp.</i> y <i>Acidiphillum spp</i>	pH 2.3 – 3 Eh= 750 [mV]	(Dold, 2014)
Pyhasalmi mine, Finalndia.	<i>Acidithiobacillus</i> , <i>Leptospirillum spp</i> , <i>Ferrovum myxofaciens</i> , <i>Ferrimicrobium</i> <i>Acidiphilum</i> y <i>Metallibacterium scheffleri</i> .	T= 24 [°C]	(Kay, et al., 2014)

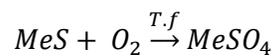
Las especies como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, se caracterizan por poseer cinco propiedades (Jensen & Webb, 1995):

- Quimiolitotrofo: La energía para el crecimiento la obtienen mediante la oxidación de hierro ferroso o de los compuestos de azufre reducido.
- Autótrofo: Utiliza el CO₂ como fuente de carbono natural acompañado de N y P necesarios para el crecimiento, junto con oligoelementos minerales de K⁺, Mg⁺, Ca⁺, Na⁺ y Co⁺.
- Aerobio: Promueve el crecimiento a una temperatura entre 20° y 40° [C] y la oxidación del hierro con una temperatura óptima cercana a 33°[C].

- pH: El crecimiento acidófilo se genera entre pH 1 y 4.5 alcanzando el óptimo entre 2 y 2.3. La supervivencia no se alcanza arriba de 6.5 o inferior a 1.
- Localización: Se produce generalmente en aguas de drenaje ácido, en minas de hierro o carbón bituminoso.

La disolución de los sulfuros metálicos se produce por dos mecanismos (Jensen & Webb, 1995):

1.- El mecanismo directo: las bacterias se adhieren a la superficie del sulfuro y solubilizan el metal (Me) de acuerdo con la siguiente reacción:



2.- El mecanismo indirecto: las bacterias oxidan Fe^{2+} a Fe^{3+} en la fase líquida y el Fe^{3+} a su vez libera el metal a través de una reacción química, como se muestra:



3.1.3.1. Fases del crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano implica un aumento de la masa celular que eventualmente conduce a la multiplicación celular. En organismos pluricelulares dicha multiplicación se traduce en un aumento del tamaño del individuo, mientras que en unicelulares ocurre un aumento de población (Fraile & Prieto, 1997)

El crecimiento en un sistema consta de varias fases (Fraile & Prieto, 1997):

- Fase de retraso o fase “lag”: En este periodo de tiempo el inóculo bacteriano se adapta a las condiciones del medio fresco sobre el que se ha sembrado. Se trata de un ajuste metabólico, su duración depende de varios factores como el tamaño del inóculo, estado metabólico previo del inóculo, medio del que procede, necesidad de neutralizar sustancias tóxicas, diferencia en la temperatura de los medios, entre otras.
- Fase de crecimiento exponencial: La reproducción celular alcanza una actividad máxima durante este período y su tiempo de generación llega a un mínimo constante. Como el tiempo de generación es constante, la representación

logarítmica del crecimiento durante esta fase exponencial es una línea recta. La fase logarítmica también es el momento en que las células presentan mayor actividad metabólica.

- Fase estacionaria: La tasa de crecimiento disminuye, el número de muertes microbianas compensa el de las células nuevas y la población se estabiliza. La actividad metabólica de las células que sobreviven también se torna lenta en esta fase, es un periodo de equilibrio.
- Fase de muerte: El número de muerte supera el número de nuevas células formadas y la población entra en esta fase y continúa hasta que la población disminuye a una pequeña fracción de células más resistentes o hasta que todas sus integrantes mueren. Muchas células bacterianas a menudo involucionan durante esta fase, lo que significa que, si morfología cambia de manera espectacular, lo que dificulta su identificación (Tortora, et al., 2007).

En la Figura 2 se puede apreciar la gráfica que describe las fases del crecimiento bacteriano, las cuales se describieron anteriormente.

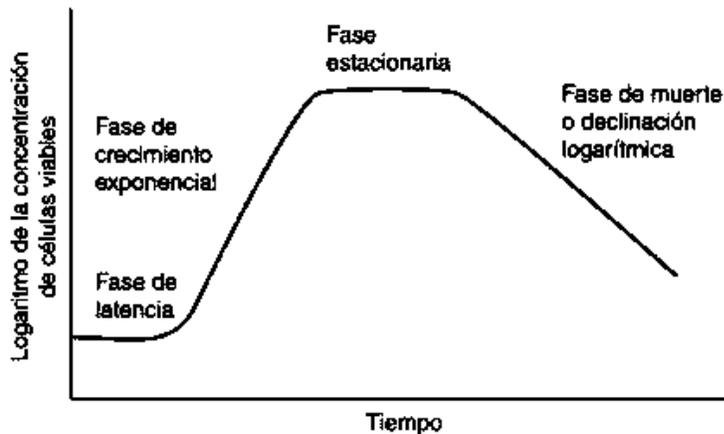


Figura 2 Curva de crecimiento bacteriano, muestra las cuatro fases que describen el crecimiento (Carroll, et al., s.f.)

3.2. Biolixiviación

La biolixiviación es un proceso que se produce por la catálisis que microorganismos ejercen durante la disolución de menas minerales (Rodríguez, et al., 2001) o residuos sólidos producidos en la extracción de los elementos de interés económico. El microorganismo usa el mineral como combustible, utilizan reacciones de oxidación y reducción, liberando así los metales, utilizando su propia energía.

Se puede decir que la biolixiviación es el ataque u solubilización de un mineral a través de la acción directa o indirecta de los microorganismos (Rodríguez, et al., 2001). Es considerada de bajo costo, alta seguridad, fácil de operar y respetuoso con el medio ambiente (Ye, et al., 2017), en comparación con los métodos comunes utilizados para el beneficio del mineral como la hidrometalurgia y la pirometalurgia.

Los microorganismos involucrados en estos procesos son bacterias acidófilas capaces de sobrevivir y evolucionar en niveles de pH ácidos, altas temperaturas, altas concentraciones de elementos metálicos (Rodríguez, et al., 2001). La biolixiviación se basa en la capacidad de los microorganismos de obtener fuentes de energía por la oxidación de Fe (II) a Fe (III) y de compuestos reducidos de azufre, dando como resultado la disolución mineral de sulfuro o metales pesados en forma de metales extraíbles para recuperarse o eliminarse (Baba, et al., 2011).

Las bacterias acidófilas capaces de atacar sulfuros minerales se clasifican de acuerdo con el intervalo de temperatura en el que crecen y se desarrollan, catalogándose en tres grupos: mesófilas, termófilas moderadas y termófilas extremas. *Thiobacillus ferroxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferroxidans* y *Leptospirillum* son microorganismos clasificadas como mesófilas tienen un rango de temperatura entre 25 °C y 45 °C (Rodríguez, et al., 2001) y se asocian principalmente con procesos de lixiviación por su capacidad de oxidar iones ferrosos (Fowler & Crundwell, 1998). La Figura 3 muestra las reacciones de oxidación de sulfuros mediadas por los microorganismos, en la columna izquierda se encuentran los microorganismos capaces de desarrollarse, según su temperatura óptima de crecimiento.

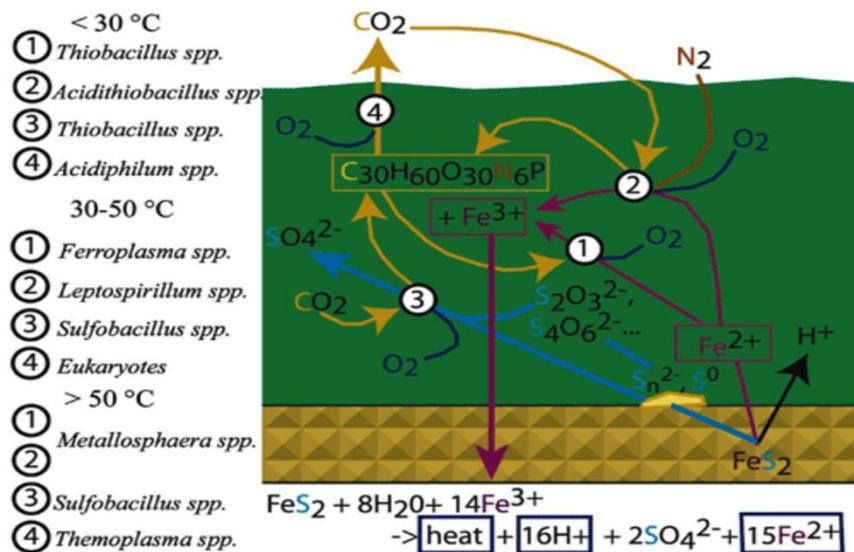


Figura 3 Potencial del ciclo del hierro, azufre y carbono basado en las capacidades metabólicas asociadas con los microorganismos generadores de DAM (Baker & Banfield, 2003).

Las principales ventajas de la lixiviación bacteriana son los bajos requerimientos de ácidos para la solubilización de metales y el alto rendimiento en la extracción de metales (Blais, et al., 1993). Por otra parte, las desventajas que destacan de este procedimiento es la duración del proceso, obtención de soluciones demasiado diluidas y el agua ácida que se genera la cual debe ser tratada antes de ser desechada (Rodríguez, et al., 2001).

3.2.1. Biolixiviación del zinc

La metalurgia del zinc puede llevarse básicamente por dos rutas: a) por un proceso hidrometalúrgico y b) por un proceso pirometalúrgico (fundición). El primero representa alrededor del 85% de la producción primaria de zinc, por el contrario, el proceso de fundición actualmente representa menos del 15% de la producción mundial de Zn.

Otras tecnologías incluyen la lixiviación a presión, lixiviación atmosférica directa y extracción con solventes. La hidrometalurgia convencional del zinc a partir de sulfuros tiene como etapas la tostación, lixiviación y electrolisis (Souza, et al., 2007).

Operado correctamente la biolixiviación ofrece una recuperación económica de recursos que serían demasiado marginales para otras rutas de proceso (Petersen & Dixon, 2006). Aunque este proceso es más lento que la lixiviación química, la biolixiviación de la esfalerita (ZnS) no requiere oxígeno en forma gaseoso, ya que la oxidación de Fe (II) se lleva a cabo gracias a los microorganismos (Souza, et al., 2007) y ésta a la vez promueve la oxidación de la esfalerita y la liberación del Zn.

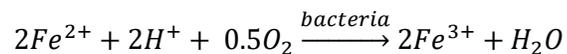
3.2.2. Mecanismos de biolixiviación

En la biolixiviación las bacterias acidófilas se utilizan para acelerar la disolución de la esfalerita a través de mecanismos descritos como directo e indirectos (Ghassaa, et al., 2017).

3.2.2.1. Mecanismo indirecto

Las bacterias oxidan los iones ferrosos Fe (II) a iones férricos Fe (III) y estos últimos oxidan el resto del azufre (S). Aquí los iones férricos actúan como oxidantes mediante la reducción a iones ferrosos y aumenta la cinética de disolución de la esfalerita o sulfuro de zinc al proporcionar electrones para la oxidación de los sulfuros (Ghassaa, et al., 2017).

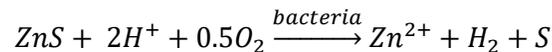
El producto de la oxidación de iones ferrosos y férricos es un oxidante fuerte capaz de oxidar minerales de sulfuro. El proceso de la lixiviación global se produce por la oxidación bacteriana de los iones ferrosos y lixiviación química del mineral, este proceso se describe mediante las siguientes ecuaciones que describe la lixiviación por bacterias del sulfuro de zinc (Fowler & Crundwell, 1998):



Los iones ferrosos que se producen en la biooxidación de la esfalerita son reo-oxidados a iones férricos por las bacterias y esto hace que la reacción de bio-disolución sea autosuficiente.

3.2.2.2. Mecanismo directo

Este mecanismo involucra la catálisis bacteriana de la disolución de minerales de sulfuro, requiere que las bacterias se adhieran a la superficie del sulfuro, por medio de los iones Fe (III), estos se complejan y luego comienzan a degradar los minerales sulfurados (Ye, et al., 2016). Existe una propuesta en donde las bacterias puedan interactuar directamente con el mineral y mejorar la velocidad de disolución del mineral por encima de la velocidad alcanzada durante la lixiviación química por iones férricos en las mismas condiciones. En el caso de la esfalerita, el mecanismo directo se puede representar con la siguiente reacción (Fowler & Crundwell, 1998):

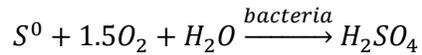
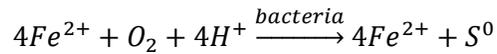
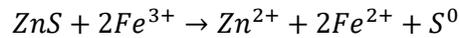


La eficiencia y optimización de la biolixiviación dependen de los factores físicos, químicos y biológicos del sistema, tomado como ejemplo la biolixiviación de metales pesados en donde este puede ser sensible a factores como la concentración de sólidos, temperatura, oxígeno, pH, potencial de oxidación, tensión bacteriana y la concentración celular, estos factores juegan un papel importante en la optimización del proceso de biolixiviación.

Los metales obtenidos durante la biolixiviación dependen en gran parte del pH ya que influye en la solubilización del metal durante la biolixiviación. Conocer y entender la concentración eficiente de sólidos y valores de pH permite entender la manera en que se realiza la biolixiviación (Ye, et al., 2016).

La presencia de bacterias acidófilas aumenta la velocidad de oxidación de los minerales de sulfuro por encima de la lograda en una reacción química con iones férricos en las mismas condiciones (Fowler & Crundwell, 1999).

Incluyendo los dos mecanismos en oxidación por bacterias del sulfuro de zinc o esfalerita, se pueden describir las siguientes tres reacciones (Lizama, et al., 2002):



El sulfuro de zinc oxida únicamente con iones férricos (Fowler & Crundwell, 1998). En ausencia de bacterias, se forma una capa compuesta por azufre elemental S en la superficie del mineral que reacciona, y la propagación de iones ferrosos por medio de esta capa se convierte en una limitante que perjudican a la velocidad de reacción. En cambio, en presencia de bacterias el azufre se oxida, no se genera la capa y la reacción de la superficie con el ion férrico se convierte en el paso limitante de la velocidad (Lizama, et al., 2002). Las bacterias aumentan la velocidad de reacción oxidando la capa de producto de azufre elemental. De este modo, se elimina la posible resistencia a la difusión y también aumenta la concentración de ácido sulfúrico (Baba, et al., 2011).

Las bacterias primero deben entrar en contacto con a la superficie del mineral, luego deben comenzar a multiplicarse para colonizar la superficie del mineral disponible, si las densidades celulares iniciales son muy altas la colonización es rápida.

Se ha demostrado que la reactividad del sulfuro de zinc es proporcional a su contenido de impurezas de hierro (Lizama, et al., 2002). En conclusión, el papel de las bacterias es oxidar los productos de la reacción de disolución, es decir, los iones ferrosos y el azufre (Fowler & Crundwell, 1999).

El proceso de la biolixiviación se puede aplicar en diferentes escenarios, ya sea en residuos/ jales de mina o como complemento en proceso hidrometalúrgico. Es por eso por lo que depende el caso el modo de empleo será diferente pues depende del contenido de sulfuro de zinc y el tamaño de la partícula de mineral (Lizama, et al., 2002).

3.2.3. Biooxidación de minerales de Fe

La biooxidación de la pirita o sulfuro de hierro sugiere un método de bajo costo para producir iones férricos. Las bacterias acidófilas oxidan sulfuro de hierro (FeS_2) a hierro ferroso Fe (II) y sulfato (SO_4^{2-}), los iones ferrosos se oxidan nuevamente a férrico y actúan como reactivo para disolver más pirita mediante la reducción de Fe (III) a Fe (II). El Fe (II) que se produce en la última reacción se vuelve a oxidar a Fe (III) y este ciclo continúa hasta que no hay pirita disponible para la disolución, es decir se consume el hierro disponible. Además, las bacterias producen ácido sulfúrico oxidando así el azufre elemental (Ghassaa, et al., 2017). Todo ese proceso se ilustra mejor en la Figura 4.

La generación del drenaje ácido de mina se produce por la biooxidación de la pirita. Como se muestra en la Figura 4 el producto final de la biooxidación de la pirita (o DAM) son

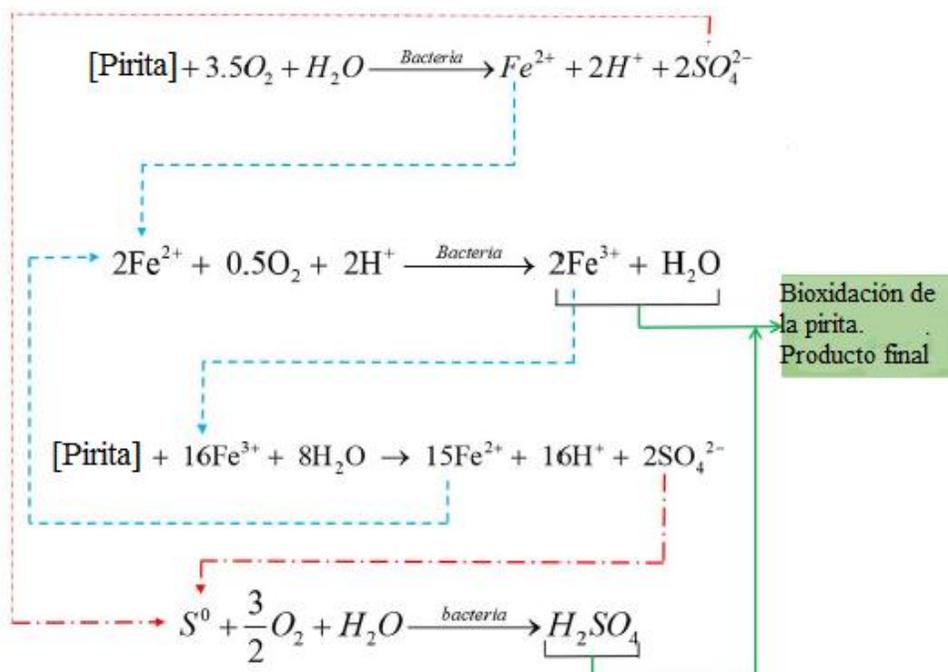


Figura 4 Reacciones químicas involucradas en la biooxidación de la pirita (FeS_2). (Ghassaa, et al., 2017)

iones férricos y ácido sulfúrico, por lo tanto, la generación de DAM se puede implementar como una fuente de Fe (III) para la lixiviación férrica (Ghassaa, et al., 2017).

IV. Metodología

4.1. Muestreo

4.1.1. Recolección de muestras líquidas

Proviene del socavón 1412, en donde el DAM comenzó a salir. En la Figura 5 se muestra el drenaje ácido de mina proveniente del socavón, en el cual se puede observar el color rojizo que lo caracteriza. Estas muestras fueron refrigeradas a 5°C hasta su análisis.



Figura 5 DAM proveniente del socavón 1412. Foto tomada de: (Romero, 2016)

4.1.2. Recolección de muestras sólidas

Se recolectó mineral almacenado dentro de la mina, ubicado en las metaleras del socavón 1412, se trata de rocas que contienen varios metales (polimetálicas) entre los que se encuentran de interés económico, tienen un tamaño entre 5 y 10 cm.

Las muestras fueron almacenadas en bolsas selladas a temperatura ambiente hasta su posterior análisis.

4.2. Caracterización fisicoquímica de las muestras líquidas

4.2.1. Caracterización fisicoquímica

La determinación de parámetros fisicoquímicos: pH, conductividad eléctrica (CE), potencial redox (Eh) temperatura y oxígeno disuelto (OD) se realizó con una sonda multiparamétrica marca HANNA HI 9828.

La sonda se desinfectó para cada medición con hipoclorito de sodio al 5% y para calibrar pH y la CE se utilizó una disolución estándar de calibración rápida marca HANNA instruments HI 9828-0. Para la calibración del parámetro E_h , se realizó con una solución Zobell marca Orion de 228 mV a 25°C con respecto al electrodo 4 M Ag/AgCl.

4.2.2. Cromatografía iónica

Para su caracterización, las muestras fueron analizadas por cromatografía iónica (IC) con un equipo 883 Basic IC Plus con auto muestreador 919 IC Autosampler plus y detección conductimétrica marca Metrohm, se analizó la concentración de cationes específicos: Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} y aniones mayoritarios: F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , NO_2^- , PO_4^- , SO_4^{2-} .

Para la determinación de cationes se utilizó una fase móvil compuesta por ácido oxálico y ácido nítrico, mientras que para el análisis de los aniones se utilizó un buffer compuesto por carbonatos y bicarbonatos en concentración en conjunto con una supresión química de ácido sulfúrico.

En cuanto a las columnas utilizadas, para cationes se ocupó la C4 250/4.0 (6.150.43) y para aniones la columna A supp 4 250/4.0 (6.1006.430)

Las muestras fueron filtradas previamente por una membrana de 0.45 μm para su análisis

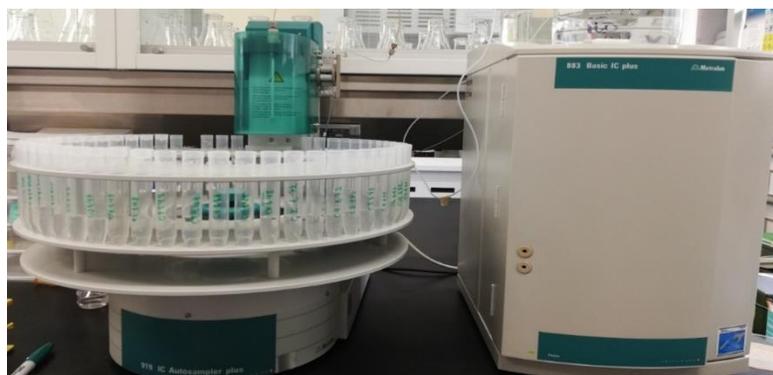


Figura 6 Cromatógrafo (883 Basic IC Plus) con automuestreador.

4.2.3. Especiación de hierro Fe (III) y Fe_{total}

La especiación de Fe (II)/Fe (III) se determinó por un método espectrofotométrico, a partir de la formación de un complejo colorido con ortofenantrolina, el método se detalla a continuación:

5. Disolución estándar de hierro (100 ppm)

A partir del estándar de Fe (HIGH-PURITY STANDARDS, Cat# 10M26-1, 10% HNO₃, Lot# 1605317) para ICP de 10,000 mg/L tomar 100 µl y diluir con agua MQ en un matraz de 10 mL.

6. Clorhidrato de hidroxilamina (NH₂OH)

Pesar 1 g de reactivo y diluir con agua MQ en un matraz de 10 mL.

7. Acetato de sodio (NaCH₃COO 3H₂O) 1.2 M

8. Disolución de ortofenantrolina, 5.54 x 10⁻³ M

El método consiste en la cuantificación de Fe (II) para ello se forma un complejo color rojo con la ortofenotralina, y es detectado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 510 nm y es correlacionado con la concentración por la ley de Lambert-Beer mediante una curva de calibración. Igualmente se puede determinar la concentración de hierro total si se reduce el hierro (III) a su forma Fe (II), para esto se agrega clorhidrato de hidroxilamina en disolución, para después ser cuantificado mediante la formación del complejo formado con la ortofenantrolina.

Por último, para la determinación de Fe (III) se obtiene de la siguiente manera:

$$[Fe^{3+}] = [Fe_{total}] - [Fe^{2+}]$$

Se usó espectrofotómetro marca Evolution201.

8.1. Caracterización de muestras sólidas

8.1.1. Preparación de muestras

La muestra de mineral colectada dentro de la mina, como se muestra en la Figura 7, fue marcada con la clave MT-RG1, para su preparación, la muestra fue secada a 105°C por una hora. Fue cuarteada, molida y tamizada de tal forma que cumpliera las características para analizar su composición química por fluorescencia de rayos X (FRX) y mineralógica difracción de rayos X (DRX).

Para homogeneizar el tamaño de partícula, la muestra fue tamizada por tres mallas: 100 (149 μm), 120 y 150 (105 μm), y para las pruebas se utilizó el retenido entre la malla 120 y 150, que corresponde a partículas con un tamaño entre 105-149 μm .

Posteriormente la muestra fue cuarteada y se seleccionó una muestra representativa para ser utilizada para los siguientes análisis químicos.



Figura 7 Muestra de mineral proveniente de la metalera

8.1.2. Análisis composicional

Para el análisis composicional de mineral colectado, se emplearon dos aplicaciones:

- Elementos mayoritarios: F, SiO_2 , TiO_2 , Al_2O_3 , Fe_2O_3 , MnO, MgO, CaO, Na_2O , K_2O , P_2O_5 , Cl, S, SO_3 , Zn, Pb y Ba.

Medidos en muestra fundida con tetraborato de litio, usando una concentración del 10% de muestra en base seca. La pérdida por calcinación (PXC) se determinó calentando 1 g de muestra a 950 [°C] durante dos horas, y calculando la diferencia de masa en porciento.

- Elementos traza: Rb, Sr, Y, Zr, Nb, V, Cr, Co, Ni, Cu y Th.

Los elementos traza, fueron medidos en muestra prensada.

La determinación de elementos mayoritarios como trazas fueron analizados en un espectrómetro secuencial RIGAKU PRIMUS II de WD-FRX equipado con tubo de Rh, en el laboratorio de FRX del laboratorio de Geoquímica y mineralogía del Instituto de Geología.

8.1.3. Análisis mineralógico.

Para el análisis de la mineralogía asociada, se utilizó un analizador portátil XRD-XRF TERRA, Olympus. La medición se realizó en un intervalo angular de 5° a 55° con un escaneo de 100 exposiciones de 20 s con una fuente de radiación de Co.

La identificación de las fases minerales se llevó a cabo con ayuda del software X Powder Ver. 2010.01.35 PRO con una base de datos PDF2.

8.2. Identificación de comunidades microbianas asociadas

Para llevar a cabo la identificación de las comunidades microbianas presentes en el DAM. Se filtró un volumen de 1L de DAM mediante el uso de una membrana de filtración de 0.22 µm, preservando el filtro con los microorganismos presentes, donde se realizó la extracción de ADN metagenómico de los microorganismos presentes.

Posteriormente dichas muestras fueron amplificadas mediante PCR y secuenciadas pro Illumina MiSeq para su identificación mediante el uso del gen 16S rRNA. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante QIIME y comparadas contra la base de datos GreenGenes.

8.3. Aislamiento y enriquecimiento de inóculo en medios de cultivo T&K modificado

4.5.1 Recuperación y aislamiento de bacterias acidófilas del DAM

Para la recuperación, aislamiento y propagación de las bacterias acidófilas presentes en el DAM, se utilizaron las siguientes técnicas de cultivo:

- Medio sólido T&K modificado a fin de promover un ambiente similar al presente en el DAM de Taxco, Guerrero, a fin de que fuera lo más parecido al DAM presente en Taxco, los componentes del cultivo se muestran en la Tabla 5, y fueron modificados

a partir de lo reportado por Touvinen y Kelly para el cultivo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Touvinen & Kelly, 1973)

Este medio fue inoculado por estriado radial en cuadrantes e incubado a temperatura ambiente 20-23 °C por 7 días en oscuridad, después de obtener el crecimiento, se procedió a tomar una colonia aislada y se realizó la reinoculación en el mismo medio de cultivo. Para verificar la pureza del cultivo, se realizó una tinción de Gram y se observó al microscopio a un aumento de 100x, mediante el uso de un microscopio marca Olympus BX51

4.5.2 Enriquecimiento de bacterias acidófilas del DAM en medio T&K modificado

- El medio líquido T&K modificado cuya composición se muestra en la Tabla 5. Se utilizó para llevar a cabo la propagación y enriquecimiento de los microorganismos, para este caso se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de medio como reactores, los cuales fueron incubados a temperatura ambiente 20-23 °C por 15 días con una agitación orbital a 250 rpm, inoculadas con 200 µL a partir de una suspensión microbiana procedente del aislamiento en medio sólido, por duplicado y un control sin inocular. Este se llevó a cabo en 2 etapas.

Tabla 5 Composición de los medios de cultivos utilizados para las bacterias contenidas en el DAM.

Medio Sólido*		Medio Líquido*	
Reactivo	T&K (g/L)	Reactivo	T&K (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4
K ₂ HPO ₄	0.4	K ₂ HPO ₄	0.4
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.4	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.4
FeSO ₄ *7H ₂ O	10	FeSO ₄ *7H ₂ O	10
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.114	ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.114
H ₂ SO ₄	1 mL	H ₂ SO ₄	1 mL
Agarosa	9	pH	2
pH	2		

*Los medios fueron esterilizados por filtración con un equipo Millipore HAWG 04700

Para el caso de los medios líquidos, se midieron diariamente los parámetros de fisicoquímicos; pH, CE, E_h , T y OD según lo descrito en el punto 4.2.1. Se colectaron diariamente muestras de 1 mL para la especiación de Fe (II) /Fe (III) /Fe total. Además de analizar por DRX del sólido precipitado. Por último, se cuantificaron las bacterias usando una cámara Neubauer marca Marienfeld y un microscopio marca Olympus BX51.



Figura 8 Reactores con medio de cultivo T&K modificado, inoculados con 200 [μl] de bacterias. La alteración por las bacterias aún no es visible

8.4. Evaluación de crecimiento en medio T&K modificado con la adición de mineral de la zona para la simulación de la generación de Drenaje Ácido de Mina

Para estas pruebas, se utilizó el medio líquido T&K modificado cuya composición se encuentra en la Tabla 5, pero sustituyendo la concentración de Fe por 1.00 g de mineral con un tamaño de partícula entre 105-149 μm ., previamente esterilizado en un horno a 180°C por día.

Las pruebas se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de medio de cultivo, con tapón de algodón y fueron incubados a temperatura ambiente que oscila entre 20 y 23 °C con agitación orbital a 250 rpm, e inoculado con 200 μL de medio enriquecido, en fase estacionaria por triplicado y un control sin inocular. Además del Fe no se agregaron las sales de Zn y de Mg.

Se midieron diariamente los parámetros fisicoquímicos por un periodo de 15 días los parámetros fisicoquímicos de pH, CE, E_h , T y OD, según lo descrito en el punto 4.2.1, además se colectaron diariamente muestras de 1 mL para especiación de Fe (II) /Fe (III) /Fe total, determinación de iones mayoritarios por IC y el conteo de bacterias, el cual se

realizó mediante el uso de una cámara de Neubauer marca Marienfeld y un microscopio marca Olympus BX51.

Al final del procedimiento, el mineral sobrante fue colectado, secado a 105°C por 24 h y se analizó su mineralogía según lo expuesto en el punto 4.3.3, sin embargo, el análisis composicional, se realizó en un equipo portátil de FRX Thermo Niton XL3t ultra con ánodo de Ag.

V. Resultados y análisis de resultados

5.1.2. Caracterización fisicoquímica de muestra líquida de Drenaje Ácido de Mina

Los resultados obtenidos para la muestra líquida de DAM colectada, que fue denominada como “Pileta”, se muestran en las Tablas 6 y 7., en la primera, en cuanto a la composición, se puede apreciar que existen altas concentraciones de sulfatos y zinc, demostrando el comportamiento natural del DAM al tener sulfato disuelto y iones en suspensión como Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} . Además, de contar con la presencia de Fe (III) y Fe (II) que pueden actuar como fuente de energía para las bacterias acidófilas y ser catalizadoras en la generación del DAM. (Baker & Banfield, 2003).

Tabla 6 Composición de la muestra de DAM recolectada

Muestra	Fe ³⁺ (mg/L)	Fe ²⁺ (mg/L)	Na ⁺ (mg/L)	Zn ²⁺ (mg/L)	K ⁺ (mg/L)	Mn ²⁺ (mg/L)	Mg ²⁺ (mg/L)	Ca ²⁺ (mg/L)	F ⁻ (mg/L)	Cl ⁻ (mg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)
Pileta	60.94	0.85	26.68	497.19	<LD	37.75	211.28	237.01	7.17	22.85	5.99	2925.00

Tabla 7 Parámetros fisicoquímicos de la muestra del DAM obtenidos en campo

Muestra	pH	CE (mS/cm)	E _h (mV)	%OD	T (°C)
Pileta	2.25	3.909	609.2	21.7	21

Por otra parte, según los parámetros fisicoquímicos de la muestra líquida colectados en campo, que se muestran en la Tabla 7, se observa que el DAM procedente de Taxco, Guerrero tiene un pH=2.25, se considera un pH ácido y característico del DAM (Romero, 2004). Además, la temperatura de 21 °C determinada en el DAM se encuentra dentro del rango aceptable para la sobrevivencia de las bacterias según lo reportado por Baker & Banfield en 2003, y fue tomada como base para la incubación de los experimentos posteriores.

5.1.3. Muestras sólidas

En la Tabla 8 se muestra los resultados del análisis composicional y mineralógico de la muestra de mineral colectado dentro de la mina:

Tabla 8 Caracterización de muestra de mineral colectado dentro de la mina

Muestra	%m/m												Principales minerales
	Fe ₂ O ₃	SiO ₂	CaO	Al ₂ O ₃	MnO	MgO	K ₂ O	Zn	S	Pb	Ba	Cu	
Mineral en mina MT-RG1	24.707	28.600	9.580	4.710	1.020	2.640	0.619	7.783	5.400	0.055	0.611	0.181	Cuarzo, Pirita, Calcopirita, Esfalerita, Wurzita

Tabla 9 Caracterización de elementos traza en la muestra sólida

Muestra	mg/kg							
	Rb	Sr	Y	Nb	V	Cr	Co	Ni
Mineral en mina MT-RG1	37	41	5	13	29	38	109	11

Según los resultados anteriores, el mineral dentro de la mina contiene una importante concentración de S y Fe en forma de pirita (FeS), que según lo reportado por Akcil & Koldas en 2006 y por Ilhwan Park en 2018 es el responsable de la generación del DAM, ya que este mineral puede funcionar como fuente de energía para la proliferación de bacterias acidófilas como *A. ferroxidans* (Baker & Banfield, 2003), lo cual se corrobora al compararlo con las elevadas concentraciones de Fe soluble presentes en el DAM de acuerdo con la Tabla 6, sin embargo, cabe resaltar que además presenta una enorme concentración de Zn de 7.78 %, que se encuentra distribuido como esfalerita y wurzita (ZnS) que también puede ser utilizado por las bacterias presentes en el DAM (Lizama, et al., 2002), liberando Zn al sistema, lo cual también puede observarse en la composición del DAM en la Tabla 6. Las elevadas concentraciones de estos elementos presentes en el DAM son indicios de la posible presencia de bacterias acidófilas que están descomponiendo estos minerales dentro de la mina y liberándolos al exterior en forma de DAM.

Por otra parte, también se observan dos elementos importantes, con gran riesgo para el medio ambiente, como son el Pb, Cu y Mn que pueden estar asociados a algunos de los minerales anteriores y que son liberados en los procesos de generación del DAM, según lo reportado para el análisis de trazas en el DAM (Romero et al, 2010).

De acuerdo con los resultados de la Tabla 8, se puede observar que los minerales presentes como cuarzo, esfalerita, calcopirita, pirita, wurzita coinciden con las investigaciones de la zona realizadas por Miranda Huerta et al; en 2003.

A continuación, se presenta el difractograma comparativo del mineral antes (rojo) y después (azul) del tratamiento con bacterias y los principales minerales sulfurados presentes

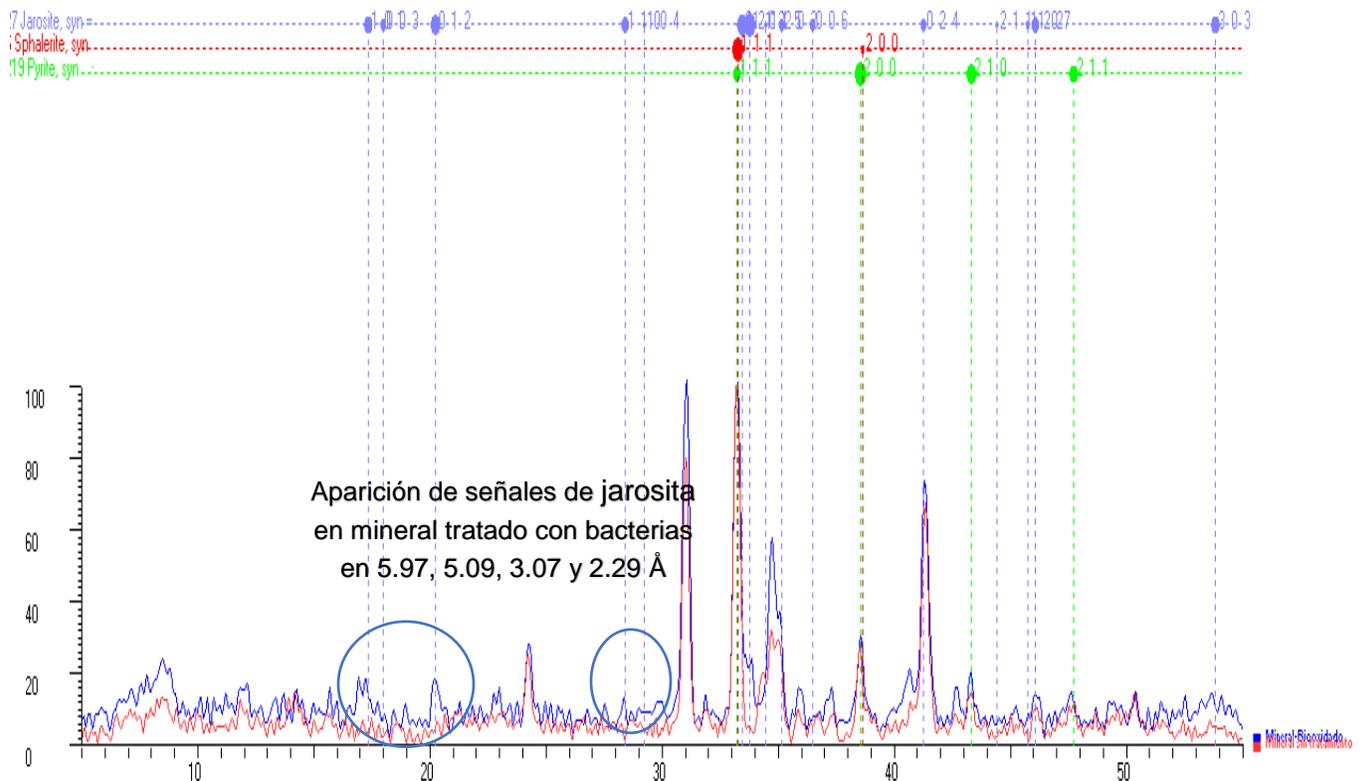


Figura 9 Difractograma comparativo de muestra MT-RG1 antes (rojo) y después del tratamiento con bacterias acidófilas

Según se observa en la Figura 9, después de que las bacterias interactúan con el mineral se forma jarosita producto de la precipitación del hierro. Al interactuar las bacterias utilizan el hierro como fuente de energía, comenzando así la oxidación y generando hierro (III), no todo el hierro es para su consumo, parte del él se precipita, como se puede observar en el difractograma de la Figura 9, donde se identificó un precipitado característico del DAM.

5.1. Comunidades asociadas

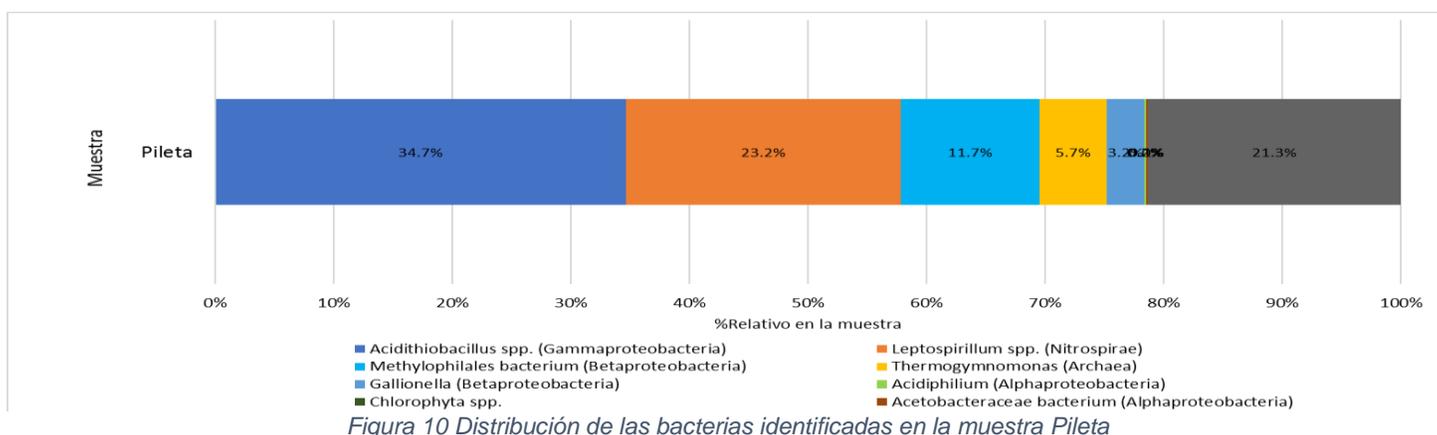
Las bacterias identificadas en la muestra líquida llamada Pileta, se muestran en la Tabla 10. Se encontraron en mayor proporción las bacterias *Acidithiobacillus ssp.* con 34.7% siendo esta la bacteria principal del DAM y *Leptospirillum spp.* con un 23.3 % del total.

Estos dos géneros de bacterias son conocidas por encontrarse en el DAM además de contribuir a su generación y acelerar el proceso (Kay, et al., 2014) y (Dold, 2014).

Tabla 10 Bacterias identificadas en las muestras líquidas

ID	Pileta
<i>Acidithiobacillus spp.</i> (Gammaproteobacteria)	34.7%
<i>Leptospirillum spp.</i> (Nitrospirae)	23.2%
<i>Methylophilales bacterium</i> (Betaproteobacteria)	11.7%
<i>Thermogymnomonas</i> (Archaea)	5.7%
<i>Gallionella</i> (Betaproteobacteria)	3.2%
<i>Acidiphilium</i> (Alphaproteobacteria)	0.2%
<i>Chlorophyta spp.</i>	0.0%
<i>Acetobacteraceae bacterium</i> (Alphaproteobacteria)	0.1%
Otros generos	21.3%
Fuente de C y energía inorgánica	Litotrofos

Bacterias como *Acidiphilium* se ha reportado en la generación del DAM, para este proyecto no resulta importante considerarlo pues el porcentaje de presencia no es relevante en la muestra. En la Figura 7 se muestra el gráfico de distribución de las bacterias presentes en Pileta, en esta se pueden apreciar los dos principales géneros de bacterias que dominan en la muestra.



5.2. Recuperación y aislamiento de bacterias acidófilas presentes en el DAM

A continuación, se presentan los resultados del aislamiento en medio sólido de bacterias en la muestra de la Pileta:

Tabla 11 Características morfológicas y microscópicas de bacterias acidófilas aisladas en muestra Pileta

Características morfológicas de muestra Pileta	
Tamaño (mm)	Menor a 1mm
Forma	Puntiforme
Elevación	Crateriforme
Borde/Margen	Ondulado, presencia de halo en capas alrededor de las colonias.
Color	Anaranjado-marrón
Aspecto	Seca
Distribución/Superficie	Rugosa e invasiva
Consistencia/Textura	Vítrea
Luz Reflejada	Mate
Luz Transmitida	Opaca
Características Microscópicas	
Gram	Negativo
Forma	Bacilos con un largo entre 1.2-1.7 μm y ancho de 0.6 μm
Agrupación	Sin agrupación característica.

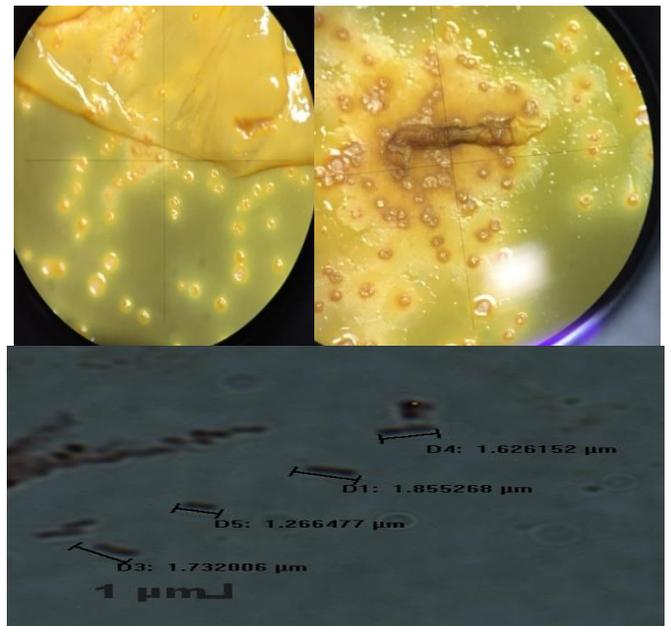


Figura 11 Características microscópicas de muestra Pileta. Tinción de Gram 100x

Arriba izq. Colonias puntiformes crateriformes, a la derecha twitching y sliding. Abajo medidas de bacilos Gram (-)

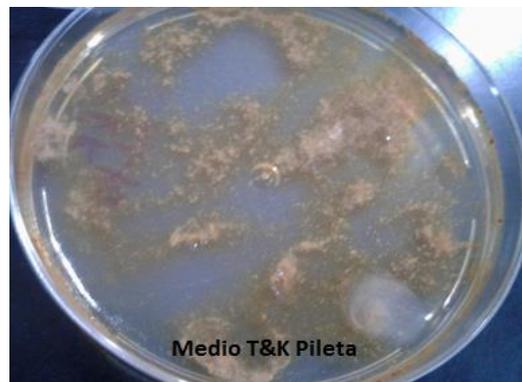


Figura 12 Aislamiento de bacterias acidófilas presentes en el DAM en medio sólido T&K modificado

Según los resultados observados en la Figura 12 y el informe de comunidades microbianas presentes en el DAM, se logró el aislamiento de una bacteria Gram (-) acidófila (que crece a $\text{pH} < 2.0$) y que oxida el Fe (II) del medio a Fe (III), produciendo un halo de precipitación de oxihidróxidos de Fe alrededor, lo cual es típico para *Acidithiobacillus ferroxidans*, que es el microorganismos más abundante en el DAM de Taxco, Guerrero, según lo informado en la Tabla 10.

5.3. Enriquecimiento de bacterias acidófilas del DAM en medio T&K modificado

5.3.1. Primera etapa

A continuación, se presentan los resultados del seguimiento del crecimiento de las bacterias aisladas del DAM en el medio T&K modificado.

Tabla 12 Parámetros fisicoquímicos y concentración de hierro en control de oxidación química en medio T&K modificado sin bacterias.

Control etapa 1										
Día de incubación	CE [mS/cm]	Eh [mV]	DO%	DO [mg/L]	pH	Temperatura [°C]	Bacterias [bacterias/mL]	Fe total [mg/L]	Fe (II) [mg/L]	Fe (III) [mg/L]
0	7.39	560.4	68.2	4.42	2.24	20.91	0.00E+00	1930.14	1817.86	112.28
2	7.456	646.7	60.3	3.89	2.04	21.27	0.00E+00	1972.55	1830.34	142.22
4	7.292	632.6	70.3	4.54	1.66	21.17	0.00E+00	1852.79	1850.30	2.50
6	7.002	613.4	70.3	4.56	1.89	20.85	0.00E+00	1852.79	1962.57	0.00
8	7.221	527.8	71.6	4.57	1.69	21.8	0.00E+00	1910.18	1740.52	42.42
10	7.011	546.3	77.22	4.97	1.91	21.57	0.00E+00	1780.44	1757.98	22.46
13	7.721	622.9	79.8	5.19	1.64	20.66	0.00E+00	1645.71	1802.89	0.00
15	7.338	535.6	64.6	4.07	1.71	22.5	0.00E+00	1757.98	1895.21	0.00
16	7.268	548	71.3	4.46	1.66	22.86	0.00E+00	1830.34	1897.70	0.00

Tabla 13 . Parámetros fisicoquímicos y concentración de hierro en experimento de oxidación biológica en medio T&K modificado, inoculado con bacterias de muestra de Pileta

Promedio en medio T&K etapa 1										
Día de incubación	CE [mS/cm]	Eh [mV]	DO%	DO [mg/L]	pH	Temperatura [°C]	Bacterias [bacterias/mL]	Fe total [mg/L]	Fe (II) [mg/L]	Fe (III) [mg/L]
0	7.648	673.8	69.55	4.47	2.1	21.3	1.60E+05	1988.77	1832.83	157.19
2	7.3195	657.8	65.9	4.25	2.04	21.255	3.60E+05	1854.04	1731.79	122.26
4	7.2575	588.45	67.95	4.37	1.57	21.43	1.88E+06	1703.09	1194.11	508.98
6	4.8275	713.65	54.65	3.58	1.985	20.75	6.88E+06	1328.84	68.56	1260.28
8	5.2645	803.35	69.95	4.49	1.65	21.905	2.62E+07	1100.55	49.27	920.29
10	5.069	799	71.2	4.565	1.835	22.19	2.69E+07	1061.88	46.94	1014.94
13	5.935	792.35	66.7	4.38	1.45	20.495	2.56E+07	898.45	67.44	831.01
15	5.8945	812.85	67.05	4.225	1.465	22.625	2.88E+07	826.10	78.54	747.55
16	5.9215	807.05	78.6	4.89	1.375	23.365	2.82E+07	924.65	76.05	848.60

Según los resultados del control en la Tabla 12, se observa que los parámetros fisicoquímicos se mantienen constantes, sin embargo, se observa una pequeña oxidación del Fe (II) del medio que pasa a Fe (III), esto puede asociarse a la reacción de este elemento con el oxígeno y correspondería a una oxidación química del Fe (II), sin embargo, está es despreciable comparada con la alta concentración de Fe (III) formado durante la oxidación biológica propiciada por el metabolismo bacteriano, la cual al aumentar su concentración incrementa el valor del Eh en la zona de predominio del Fe (III). Según se observa en la Tabla 13, al final del tiempo de incubación casi el 90% del Fe (II) ha sido oxidado a Fe (III) por la acción bacteriana, se observa una fuerte disminución del pH debido a la hidrólisis del Fe (III) donde se liberan átomos de H⁺ que se forma durante el proceso, y como consecuencia se obtiene un pH aún más ácido. Lo anterior se puede describir con la siguiente reacción:



A continuación, en las Figuras 13 y 14 se encuentran los gráficos correspondientes a las cinéticas de crecimiento bacteriano obtenidas para la primera etapa del cultivo *A. ferroxidans*, en las cuales se observa el efecto de crecimiento de bacteriano en la especiación del Fe (II)/Fe (III) en los medios de cultivo T&K modificado con respecto a los blancos control, en los que se evalúa la oxidación química:

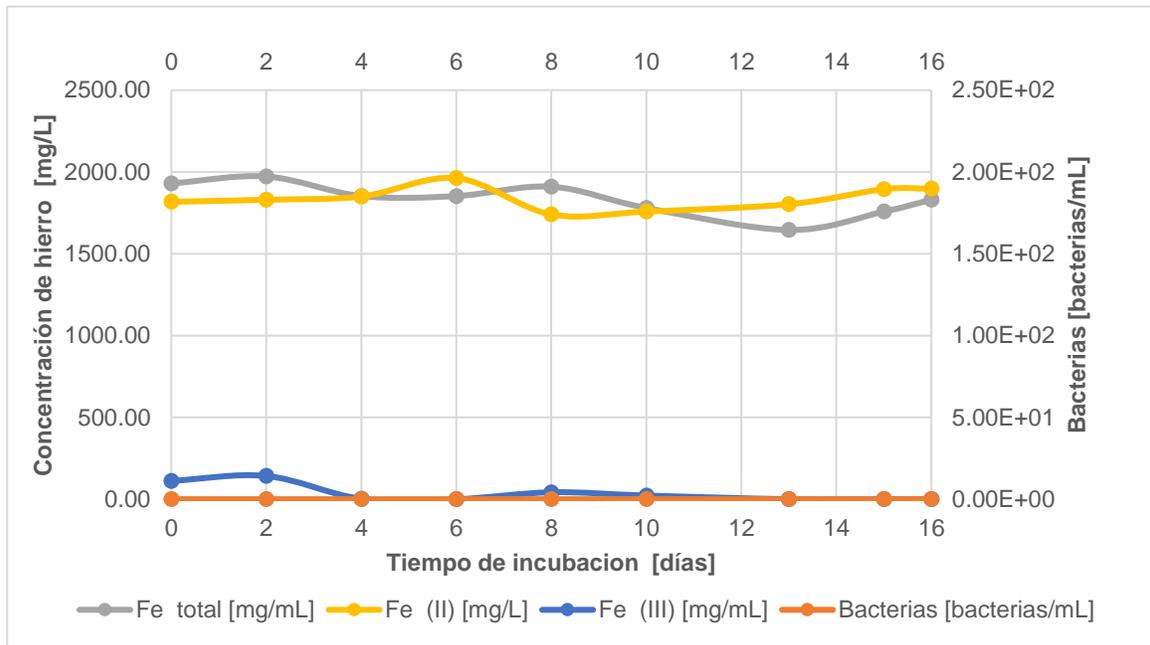


Figura 13 Curva de crecimiento y oxidación de hierro en control de oxidación química en medio T&K sin ocular de la primera etapa.

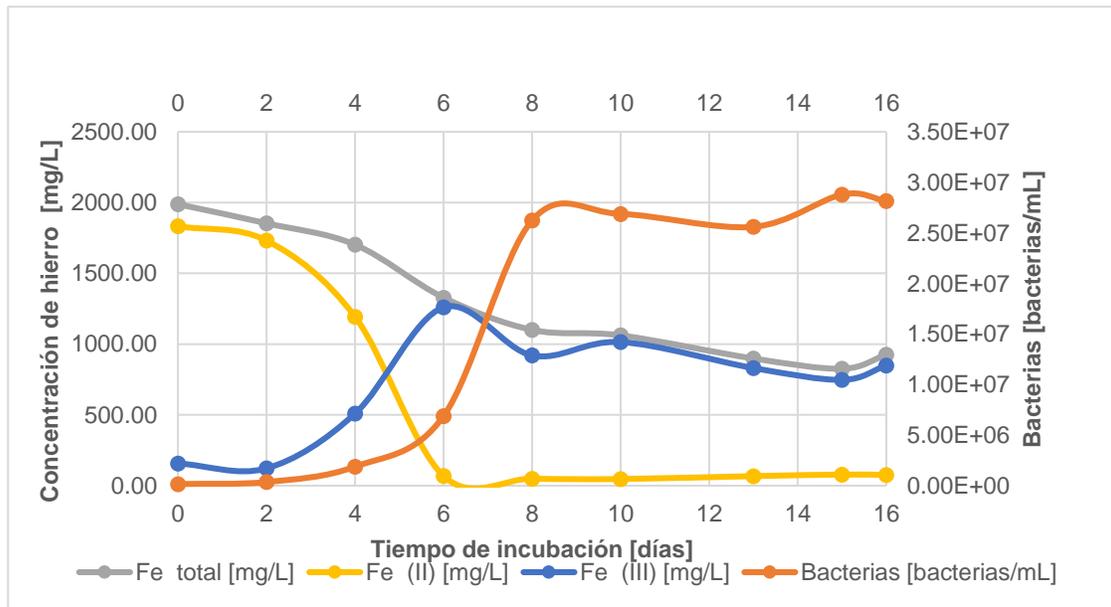


Figura 14 Curva de crecimiento y oxidación del hierro en medio T&K inoculado con *A. ferrooxidans* aislado de la muestra de DAM Pileta en primera etapa.

Según los gráficos de evaluación cinética para los medios inoculados y el control en las Figuras 13 y 14, se observa que se inicia con pH=2, asemejando las condiciones de pH presentes en la muestra de DAM de la "Pileta", según la información de su caracterización en la Tabla 7. De los resultados, se tiene un incremento en la población de bacterias, como

consecuencia el pH disminuyó y el Eh aumento significativamente debido a la oxidación del hierro ferroso, el cual decrece al ser oxidado a hierro férrico, esto sucede de manera más evidente a partir del cuarto día de incubación, en el cual se presenta la fase de crecimiento exponencial bacteriano, ya que las bacterias están utilizando el Fe (II) como fuente de energía para su metabolismo, transformándolo en Fe (III) por otra parte, posterior al día de incubación seis se tienen los cambios importantes tanto pH como en los otros parámetros. Además de que el líquido de los reactores cambió su coloración de blanco, transparente a una rojiza.

Lo anterior es consistente con lo que se ha reportado para bacterias como *A. ferroxidans* capaces de acelerar el proceso de generación del DAM debido a la oxidación del hierro ferroso como los describe (Fowler & Crundwell, 1998), lo cual se puede observar en esta primera etapa.

5.3.2. Segunda etapa

Este experimento tuvo como objetivo mejorar la adecuación del cultivo y lograr el enriquecimiento y propagación de las bacterias procedentes de la etapa anterior, para esto se usó el mismo medio de cultivo, pero sólo se tuvieron dos reactores, un blanco de control y el segundo donde se incubaron 200 µL de bacterias, en este caso se realizó el seguimiento por 14 días de incubación y se midieron y tomaron parámetros cada día. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 14 y 15.

Tabla 14 Parámetros fisicoquímicos y concentración de hierro en control de oxidación química en medio T&K modificado sin bacterias

Control etapa 2										
Día de incubación	CE [mS/cm]	Eh [mV]	DO%	DO [mg/L]	pH	Temperatura [°C]	Bacterias [microorganismos /mL]	Hierro total [mg/L]	Hierro (II) [mg/L]	Hierro (III) [mg/L]
0	5.261	777	72.2	4.71	2.14	21.04	0	1925.15	1877.74	47.41
1	5.634	809.5	72.1	4.56	2.05	22.59	0.00E+00	1795.41	1720.56	74.85
2	6.366	620.7	66.1	4.14	2.09	22.91	0.00E+00	1852.79	1817.86	34.93
3	5.554	751.1	70.2	4.43	2.25	22.01	0.00E+00	1807.88	1735.53	72.36
4	5.009	595.8	71.8	4.71	2.02	20.97	0.00E+00	1805.39	1865.27	0.00
6	5.85	490.2	77.6	5.09	1.93	20.59	0.00E+00	1752.99	1608.28	144.71
8	4.844	539.9	61.5	3.89	1.95	22.74	0.00E+00	1802.89	1476.05	326.85
9	5.604	512.7	68.8	4.37	1.89	22.28	0.00E+00	1595.81	1880.24	0.00
10	5.038	532.3	70	4.48	1.87	22.01	8.00E+04	1623.25	1688.12	0.00
11	5.428	542.9	64.5	4.22	1.82	20.87	8.00E+04	1757.98	1688.12	69.86
14	5.456	552.7	67.3	4.34	1.89	21.53	1.36E+06	1832.83	1513.47	319.36

Tabla 15 Parámetros fisicoquímicos y concentración de hierro en medio T&K modificado con bacterias de la muestra Pileta

Promedio en medio T&K etapa 2										
Día de incubación	CE [mS/cm]	Eh [mV]	DO%	DO [mg/L]	pH	Temperatura [°C]	Bacterias [microorganismos/mL]	Hierro total [mg/L]	Hierro (II) [mg/L]	Hierro (III) [mg/L]
0	5.315	712.3	67.7	4.37	2.02	21.44	1.60E+05	1865.27	1603.29	261.98
1	5.714	728	57.9	3.77	1.94	20.99	2.40E+05	1550.90	1550.90	0.00
3	5.388	669.9	70.2	4.49	2.18	22.21	1.36E+06	1530.94	1670.66	0.00
4	5.054	597.1	74.5	4.9	1.84	20.86	1.68E+06	1266.47	1481.04	0.00
6	5.13	608.4	57.7	3.82	1.97	20.31	8.96E+06	1266.47	804.89	461.58
8	4.834	647.9	72.1	4.53	1.75	23.09	1.54E+07	1313.87	386.03	927.84
9	4.5	669.1	65.2	4.11	1.61	22.91	1.54E+07	1194.11	203.24	990.87
10	4.219	693.1	72.8	4.62	1.52	22.65	1.66E+07	1159.18	127.89	1031.29
11	3.981	737.6	76.4	5.04	1.52	20.62	2.05E+07	764.97	274.25	490.72
14	4.349	787.6	70.4	4.48	1.41	22.38	2.18E+07	819.86	34.58	785.28

Según los resultados anteriores, las bacterias tienen un incremento significativo en el día ocho de incubación siguiendo una tendencia similar al primer experimento, además de su disminución en el pH el cual es un indicador del trabajo que están realizando las bacterias.

En este caso, según se observa en la Figura 16, la fase de crecimiento exponencial se logra entre en día 4 y 8 corroborando la cinética de crecimiento microbiano identificada para este microorganismo en estas condiciones. En las Figuras 15 y 16 que se encuentran a continuación se muestran los gráficos de la etapa dos, inoculada y sin inocular.

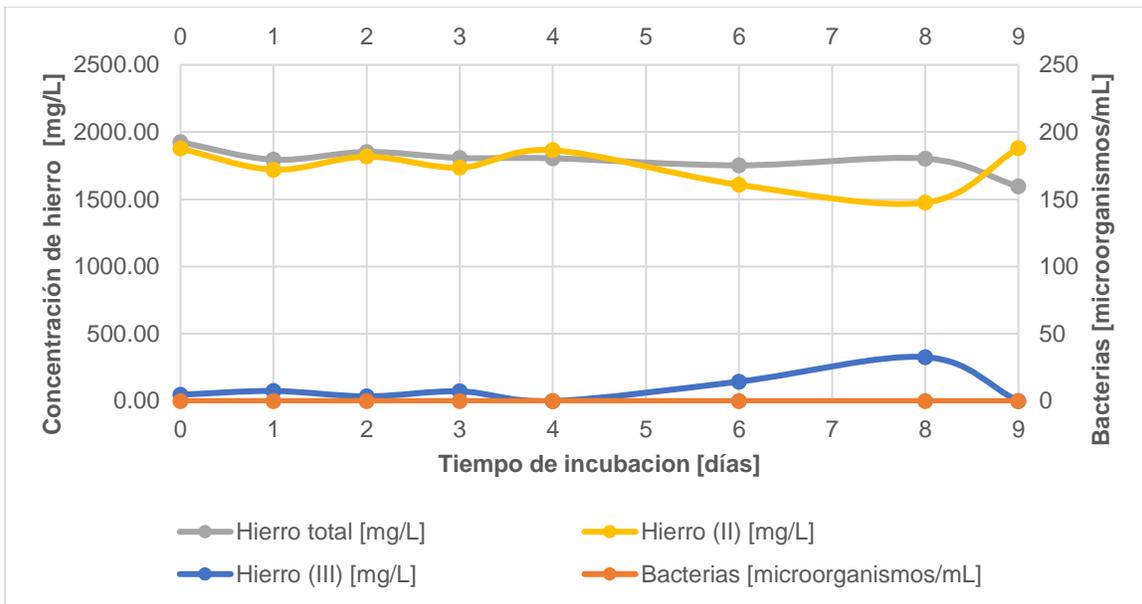


Figura 15 Curva de crecimiento de las bacterias y concentración de hierro en control de oxidación química en medio T&K modificado sin bacterias

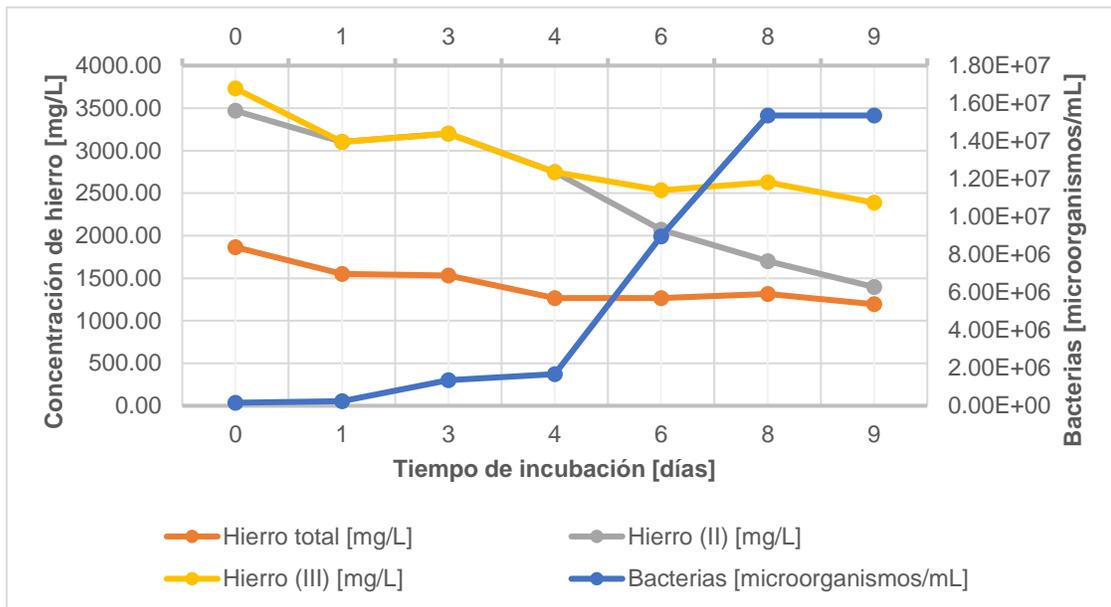


Figura 16 Curva de crecimiento de las bacterias y concentración de hierro en medio T&K inoculado con muestra Pileta

Esta segunda etapa corrobora lo ocurrido en la primera etapa con una diferencia de adaptación de un día, en el periodo exponencial de crecimiento comparten similitudes alcanza la fase estacionaria en el día ocho. La fase exponencial está asociada al consumo de hierro (II) en estas dos etapas concuerdan el mismo tiempo por tener el mismo medio de cultivo, es decir, el proceso esta secundado.

Además, el crecimiento de bacterias acidófilas ocurre en el mismo día en que el pH disminuye debido a la reacción que se está llevando a cabo, pues existe una liberación de protones H^+ .

5.4 Evaluación de crecimiento en medio T&K modificado con la adición de mineral de la zona para la simulación de la generación de DAM

Para realizar el experimento de simulación de DAM mediado por bacterias se usó el mineral del sitio y parte del medio T&K modificado, cabe mencionar que no se utilizaron las sales presentes en la muestra de mina como hierro y zinc (pirita y esfalerita son sus respectivos minerales), se realizó este medio de cultivo para que las bacterias tomaran energía del hierro natural presente.

Tabla 16 Parámetros físicoquímicos y concentración de hierro en control de simulación de DAM por oxidación química en medio T&K con mineral añadido sin bacterias

Control medio T&K con mineral										
Día de incubación	CE [mS/cm]	Eh [mV]	DO%	DO [mg/L]	pH	Temperatura [°C]	Bacterias [microorganismos/mL]	Fe total [mg/L]	Fe (II) [mg/L]	Fe (III) [mg/L]
0	2.67	593.20	81.45	5.27	2.03	21.72	0.00E+00	7.51	9.63	0.00
1	2.55	747.00	76.50	5.03	3.00	21.07	0.00E+00	16.62	12.38	4.24
4	2.41	774.55	74.30	4.81	3.55	21.94	0.00E+00	3.19	9.26	0.00
6	2.73	434.65	75.80	4.71	3.67	24.10	0.00E+00	4.77	4.14	0.62
8	2.78	590.85	76.05	4.80	3.81	23.36	0.00E+00	5.89	3.30	2.59
11*	2.53	525.25	71.80	4.45	3.73	24.54	0.00E+00	5.64	4.07	2.24
15	2.53	594.45	56.60	3.76	2.81	20.77	S/D	2.57	1.70	0.87
18	2.88	607.25	56.35	3.59	2.48	22.79	S/D	0.00	0.57	0.00
20	2.89	511.05	55.80	3.58	2.51	22.45	S/D	0.20	0.00	0.20
22	3.12	655.80	69.05	4.38	2.57	22.86	S/D	0.07	0.77	0.00
25	3.17	483.55	54.60	3.28	2.57	25.44	S/D	0.52	0.52	0.37

*A partir del día de incubación 11 no se contabilizó la población de bacterias por problemas de la cámara Neubauer, por eso aparecerá como

S/D: sin detección

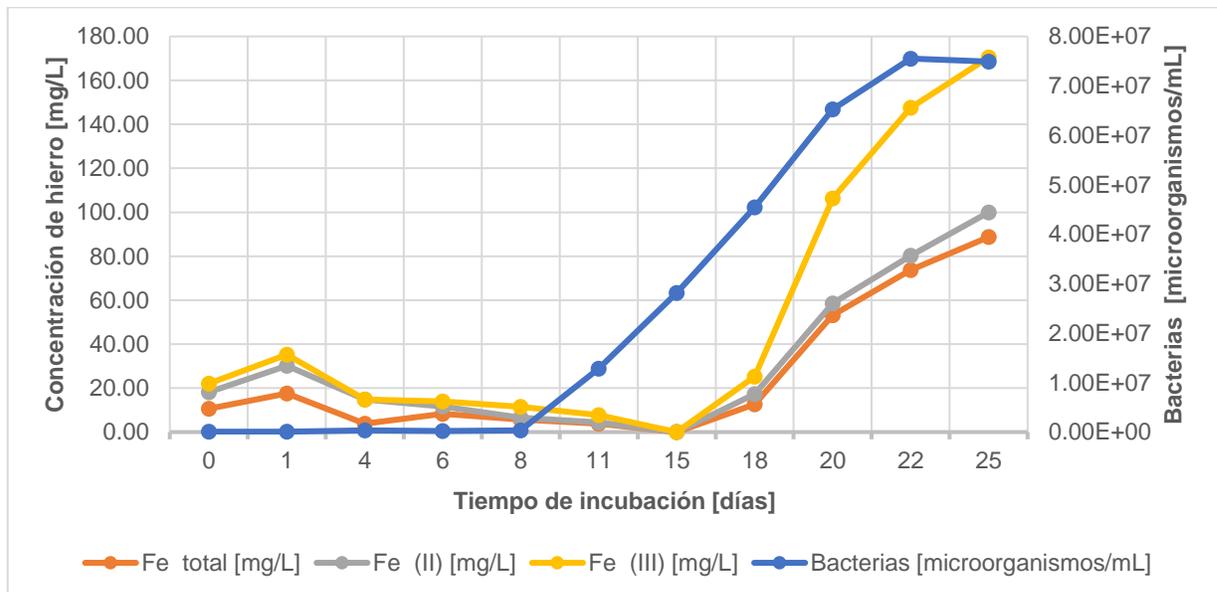
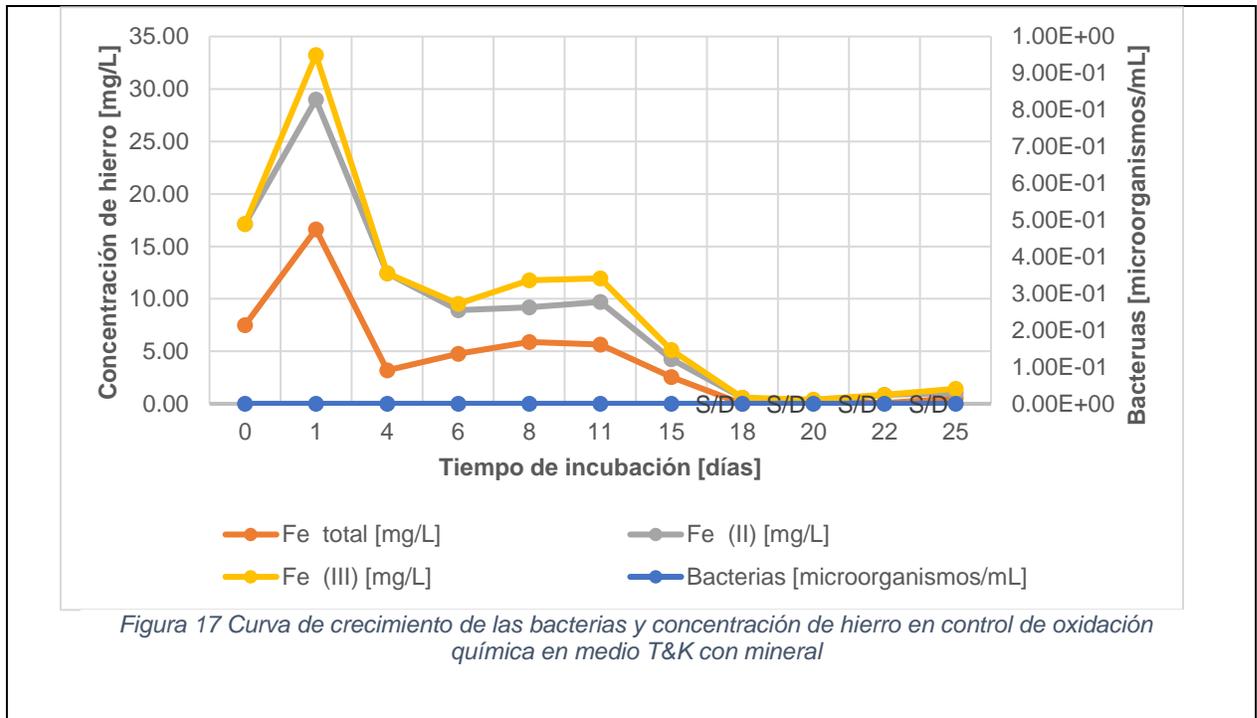
Tabla 17 Parámetros fisicoquímicos y concentración de hierro en experimento de simulación de generación de DAM por oxidación biológica mediante el uso de *A. ferroxidans* aislada de pileta

Promedio medio T&K con mineral e inoculado										
Día de incubación	CE [mS/cm]	Eh [mV]	DO%	DO [mg/L]	pH	Temperatura [°C]	Bacterias [microorganismos/mL]	Fe total [mg/L]	Fe (II) [mg/L]	Fe (III) [mg/L]
0	2.668	594	80.55	5.175	2.01	22.205	8.00E+04	10.63	7.51	3.99
1	2.52	724.5	77.65	5.115	2.98	21.015	8.00E+04	17.61	12.50	5.11
4	2.4365	738.05	82.25	5.375	3.36	21.395	3.60E+05	3.77	11.00	0.00
6	2.674	462.85	75.8	4.69	3.47	24.365	2.40E+05	8.26	3.39	2.37
8	2.79	608.2	67.75	4.265	3.04	23.375	3.20E+05	5.76	0.82	4.94
11	2.841	629.85	68.3	4.285	2.505	23.46	1.28E+07	3.89	0.55	3.34
15	2.72	669.4	57.7	3.84	2.1	20.62	2.82E+07	0.00	0.00	0.00
18	3.319	730.55	51.3	3.25	2.09	23.13	4.54E+07	12.62	4.64	7.98
20	3.696	761.3	51.9	3.36	1.925	21.795	6.53E+07	53.17	5.32	47.85
22	4.607	772.5	39.85	2.365	1.87	26.1	7.55E+07	73.75	6.51	67.24
25	4.3955	768.6	57.6	3.595	1.88	23.355	7.49E+07	88.72	11.25	70.48

Como se observa en las Tablas 16 y 17, en el experimento de oxidación biológica el Fe (III) aumenta progresivamente, a diferencia del control, en el cual disminuye, por otra parte, el pH en el experimento de oxidación biológica disminuye progresivamente hasta alcanzar valores de 1.88, debido a la producción de H_2SO_4 como respuesta de la oxidación de los sulfuros, lo cual se ha reportado anteriormente (Ata & Soner, 2006) la creación de ácido sulfúrico contribuye a la acidificación y a la liberación de metales pesados, además, la disminución de pH también está asociado al incremento de átomos de hidrógeno.

5.3.3. Efecto de la presencia de bacterias en experimentos con un medio T&K sobre los minerales de Fe durante la generación del DAM

En las Figuras 17 y 18, se presentan los gráficos de crecimiento bacteriano y efecto en la concentración del Fe soluble durante los experimentos de simulación de DAM



Los gráficos de las Figuras 17 y 18 corresponde al crecimiento bacteriano con relación al hierro presente. En la Figura 18 se observa un aumento en la cantidad de bacterias, así como una disminución en la concentración de Fe (II) esto se debe a la acción metabólica y el Fe total es consumido o precipitado. La disminución de la concentración de hierro ferroso se presenta a partir del cuarto día, en el día quince las concentraciones de hierro tienen un despegue que coincide con la oxidación de hierro ferroso, por otra parte, el hierro total incrementa su concentración pues parte del hierro se comienza a precipitar.

En la Figura 17 describe la curva de crecimiento de las bacterias en el medio T&K sin inocular, el control no tiene crecimiento de bacterias, el pH no decrece rápidamente y el Fe (II) se mantienen prácticamente las mismas concentraciones al igual que el hierro total, esto se debe a que se está llevando a cabo una oxidación química lenta que el cambio es imperceptible.

La generación de DAM ocurre por la presencia de un mineral sulfurado, en este caso la pirita (FeS_2) y un medio ambiente oxidante el cual incluye la presencia de agua y oxígeno al tener estos tres elementos combinados inicia la generación del DAM. El sitio de estudio es una mina abandonada con pirita como parte de su mineral de ganga, es decir existe una gran cantidad de mineral expuesto que no puede ser remediado por la naturaleza, como consecuencia se inició la reacción de oxidación y se generó DAM en la mina de Taxco, Guerrero.

La pirita es una fuente de Fe (II) y esta se oxida a Fe (III). En el sitio de estudio se encuentra una gran cantidad este mineral, dicho de otro modo, la fuente de hierro ferroso es abundante y mientras exista, la oxidación se llevará a cabo. La velocidad de oxidación depende de la presencia de oxígeno como primer oxidante, siguiendo con el Fe (III) el cual es el encargado de oxidar nuevamente el mineral sulfurado aún más rápido que el O_2 del medio ambiente y por último la presencia de bacterias acidófilas como *Acidithiobacillus ssp.*, Estas bacterias existen debido a las condiciones ácidas del sitio, se encargan de acelerar aún más la oxidación, ocasionado que las reacciones sean más rápidas y generen a gran velocidad el DAM, tal como ocurrió en el sitio de estudio.

En las primeras dos etapas enriquecidas con medio T&K modificado en los cuales se pueden observar en las Figuras 12 y 13 para la primera etapa y en las Figuras 14 y 15 para la segunda, se puede identificar la diferencia entre el control y el inoculado con respecto a

las bacterias y su crecimiento, en el control no se desarrolla una población y no existe un incremento de hierro férrico significativo. Además, el hierro ferroso y el hierro total se mantienen constantes a sus niveles iniciales, lo cual coincide con la inexistencia de bacterias ya que no hubo algún factor por el cual se oxidarán o precipitarán además del químico. Este comportamiento se puede observar en ambas etapas con medio T&K modificado.

En el experimento con mineral de control el comportamiento de las bacterias es similar a las anteriores a pesar de tener un medio natural no hubo un desarrollo de bacterias. Por otro lado el hierro presente como parte del mineral tuvo un comportamiento distinto a los anteriores, por la concentración inicial de hierro que al no interactuar con microorganismos fueron disminuyendo las concentraciones hasta tener un comportamiento constante tanto de hierro ferroso como férrico como se puede observar en la Figura 17.

En cuanto al crecimiento de las bacterias, los experimentos inoculados y en un medio T&K modificado, tuvieron un periodo de adaptación de 3 a 4 días, mientras que el periodo de adaptación para el mineral inoculado fue de 8 días.

Para la primera etapa a partir del día cuatro se aprecia un incremento en la comunidad de bacterias, pero desde el día 6 se puede observar un incremento significativo de los microorganismos el cual coincide con el incremento de Fe (III) y la disminución del Fe (II) que es progresiva pero significativa del día 4 al 6. Al iniciar la oxidación de la pirita la cual contiene sulfuro y Fe (II), este último al tener un ambiente oxidante ya sea por la presencia de agua, oxígeno o en este caso microorganismos se oxida incrementando la concentración de Fe (III). La pirita aún presente puede ser oxidada nuevamente tanto por el medio ambiente, por el Fe (III) en este paso la velocidad de esta oxidación aumenta por la presencia de bacterias acidófilas ya identificadas como *Acidithiobacillus ssp* (véase la Figura 11). Es por esto por lo que hierro ferroso va disminuyendo mientras que el hierro férrico va aumentando, pues Fe (II) tiene un papel significativo en la oxidación. De igual manera esto se puede apreciar en la Figura 16 correspondiente a la segunda etapa, donde el ciclo se dio de igual manera disminuye la concentración de hierro ferroso y coincide con el aumento del hierro férrico este cambio se aprecia a partir del cuarto día de incubación lo cual también cuadra con el acondicionamiento de las bacterias.

El medio con mineral presenta el mismo comportamiento, el periodo de adaptación termina en el día 8 y el aumento es significativo en el día 13, a su vez esto coincide con el aumento

de la concentración de hierro férrico, esto ocurre en menor cambio de concentraciones pues no depende de un medio enriquecido si no de un mineral sólido, pero no significa que no se puedan apreciar el comportamiento, se muestra en la Figura 18.

La oxidación del Fe (II) y la oxidación de sulfuros por la presencia de Fe (III) aumenta con la presencia de las bacterias *Acidithiobacillus* ssp. lo cual indica que tiene influencia en la oxidación aumentando la velocidad natural que ocurriría si no estuvieran estas bacterias. El incremento de las bacterias coincide con los cambios principales de oxidación de hierro ferroso a férrico. Además de involucrarse en otros procesos de oxidación como la del mineral del sulfuro las bacterias también aumentan la velocidad de reacción.

En las Tablas 18 y 19 se muestran las concentraciones de los elementos mayoritarios leídos por IC, los resultados corresponden a los experimentos de simulación en medio T&K con minera e inoculado con bacterias *Acidithiobacillus* ssp. de la muestra piletta.

Tabla 18 Concentración de elementos mayoritarios liberados durante la simulación en medio T&K con mineral sin bacterias

Incubación (días)	Na ⁺ [mg/L]	NH ⁴⁺ [mg/L]	Zn ²⁺ [mg/L]	K ⁺ [mg/L]	Mn ²⁺ [mg/L]	Mg ²⁺ [mg/L]	Ca ²⁺ [mg/L]	Cl ⁻ [mg/L]	NO ³⁻ [mg/L]	PO ₄ ³⁻ [mg/L]	SO ₄ ²⁻ [mg/L]
0	19.66	97.26	21.69	167.92	12.30	50.92	266.47	23.41	41.33	82.68	1327.99
1	15.72	94.96	29.83	162.02	13.80	49.85	262.74	15.96	33.42	118.51	1313.21
4	22.34	91.25	34.08	156.48	13.29	46.51	261.50	27.35	23.89	56.78	1279.62
6	23.98	93.69	42.18	160.35	13.98	47.74	263.80	26.91	18.13	79.99	1318.46
8	27.74	94.66	39.30	164.25	14.81	48.68	265.37	27.22	0.00	79.15	1357.35
11	31.00	94.94	39.42	167.28	14.86	50.99	270.25	31.16	14.82	49.37	1367.91
13	28.96	94.18	42.22	173.38	16.17	51.21	268.32	37.12	18.97	42.65	1378.42
15	27.76	90.91	47.08	177.36	15.35	49.19	265.45	34.29	0.00	81.84	1403.61

Tabla 19 Concentración de elementos mayoritarios en medio T&K con mineral inoculados con muestra Piletta

Incubación (días)	Na ⁺ [mg/L]	NH ⁴⁺ [mg/L]	Zn ²⁺ [mg/L]	K ⁺ [mg/L]	Mn ²⁺ [mg/L]	Mg ²⁺ [mg/L]	Ca ²⁺ [mg/L]	Cl ⁻ [mg/L]	NO ³⁻ [mg/L]	PO ₄ ³⁻ [mg/L]	SO ₄ ²⁻ [mg/L]
0	14.31	97.71	21.81	171.27	12.17	50.10	266.02	19.36	<LD	65.35	1340.02
1	<LD	99.33	31.85	166.37	14.57	49.32	269.83	<LD	27.58	94.12	1389.52
4	9.11	103.99	36.99	173.18	15.37	52.67	286.23	<LD	53.32	77.30	1407.69
6	14.91	98.77	38.70	169.47	15.08	55.46	276.42	18.59	69.30	49.37	1389.57
8	9.05	91.17	50.56	153.89	14.17	48.11	249.16	<LD	52.70	64.34	1304.08
11	<LD	101.79	108.01	173.98	16.92	53.84	283.79	<LD	34.26	44.66	1603.47
13	<LD	95.76	138.62	166.57	16.57	50.60	272.80	<LD	<LD	<LD	1630.28
15	<LD	98.34	153.68	171.11	17.48	53.99	277.20	<LD	23.43	<LD	1711.11

En la Tabla 18 se observan las concentraciones que se obtuvieron por CI, si bien esta Tabla representa el experimento con control en donde se llevaba cabo la oxidación química, en este caso la concentración del zinc (II) incremento 2.06 veces. Al contrario, la Tabla 19 muestra la concentración de paso de 21.81 mg/L a 153.68 mg/L donde la concentración inicial aumento 7.04 veces, a diferencia de la Tabla 18 esta se encuentra inoculada con bacterias que explican la liberación del zinc.

También se puede observar los demás elementos mayoritarios, por ejemplo, los sulfatos, la concentración de este ion está ligada a la solubilidad del Zn, ya que en el control de oxidación química la concentración aumenta sólo 76 mg/L durante los 15 días del experimento (ver Tabla 18), lo cual puede asociarse a la oxidación de la esfalerita por el oxígeno disuelto en el medio (Tabla 16), en contraposición, en el medio inoculado con bacterias la concentración aumentó 407. 1 mg/L en el mismo periodo de tiempo, es decir, fue 5.4 veces mayor, lo cual está vinculado a la oxidación microbiana de los sulfuros presentes en el cultivo y está asociado al crecimiento microbiano (véase Figura 18) y esta concentración es similar a la encontrada en el DAM de Taxco como se observa en la Tabla 6.

5.4. Modelación de generación del DAM vía minerales de Fe

La molalidad de hierro para el medio T&K modificado es 0.035 mol/kg obtenida a partir de la concentración total del hierro al inicio de la incubación. Para el medio T&K modificado se describe con el diagrama de la Figura 20. Se comenzó con un pH de 2.1 y 0.673 V (punto naranja) como potencial de oxidación, el hierro se encontraba unido al sulfuro en forma de pirita (FeS_2) y cambia a hierro férrico, conforme el pH desciende el Eh aumenta, como se puede observar en el diagrama de Pourbaix al ser más ácida la solución el hierro férrico se oxida o se precipita en $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Las condiciones más ácidas se encuentran a pH 1.38 y un Eh de 0.807 (punto amarillo), en estas condiciones se tiene principal presencia de Fe (III) lo cual coincide con la concentración de Fe leída con UV visible como se muestra en la Tabla 15, en ese punto se tiene una concentración de 848.60 mg/L.

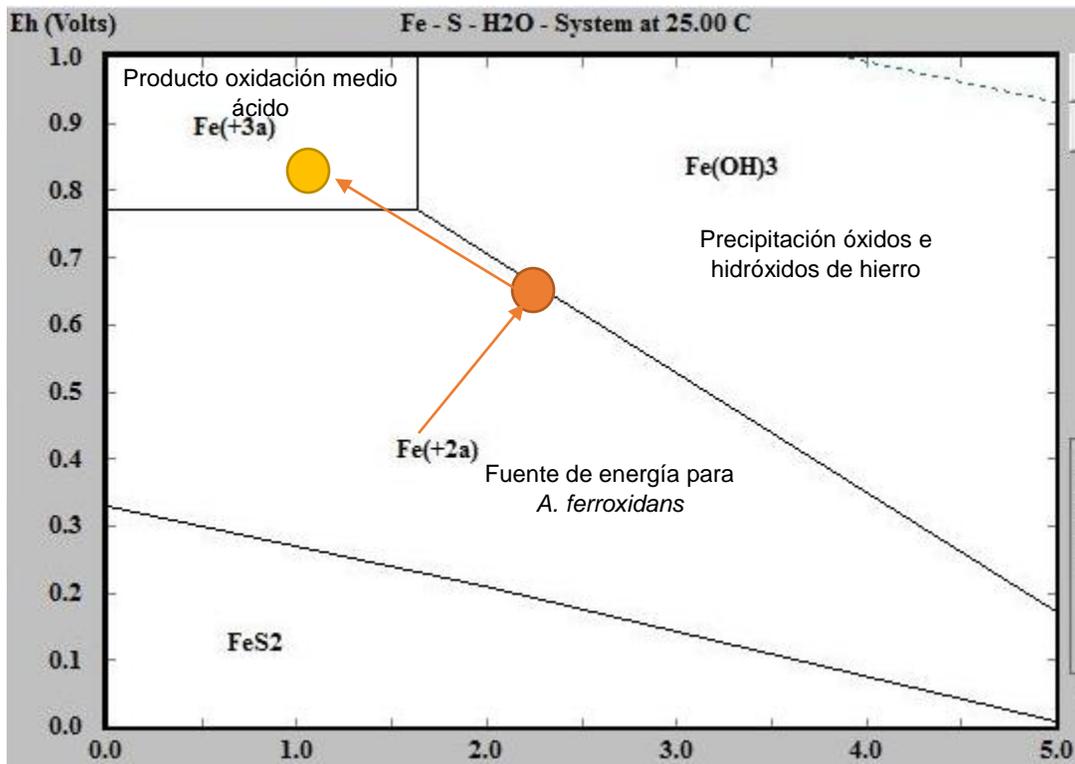


Figura 19 Diagrama de Pourbaix del hierro para el medio T&K modificado

El círculo naranja representa las condiciones iniciales del medio, al inicio se encontraba como hierro (II), una parte se precipitó, mientras que la otra se oxidó a hierro (III), tal como se muestra en el diagrama de la Figura 19. Las condiciones finales se representan el círculo amarillo, en este lapso de tiempo, la mayoría se había oxidado. Este comportamiento se

describe para las primeras dos etapas en medio T&K modificado, a diferencia del experimento en medio con mineral.

La molalidad inicial de hierro para el medio con mineral es de 0.0001909 mol/kg, a esta concentración el hierro ferroso en el diagrama tiene una expansión en el eje de pH presentándose a partir de 2.5 como se observa en la Figura 20.

El medio con mineral, la pirita comienza a oxidarse a hierro ferroso, a partir del día cuatro de incubación hasta el ocho, el pH se vuelve más ácido, pH=3 y Eh de 0.608 V (círculo azul). Con estas condiciones la pirita se precipita como $\text{Fe}(\text{OH})_3$, a partir de este día de incubación el pH nuevamente comienza a bajar, el hierro ferroso se oxida y pasa a hierro férrico esto concuerda con el diagrama de la Figura 20.

Durante los días de incubación entre el trece y quince no se tienen concentraciones de hierro ferroso y férrico, a partir del día 18 de incubación aparecen concentraciones de hierro férrico que coinciden con las fases descritas en el diagrama, así hasta llegar a pH 1.88 y Eh 0.768 V (círculo amarillo) donde se observa la máxima concentración de hierro férrico, es decir, la oxidación del hierro ferroso.

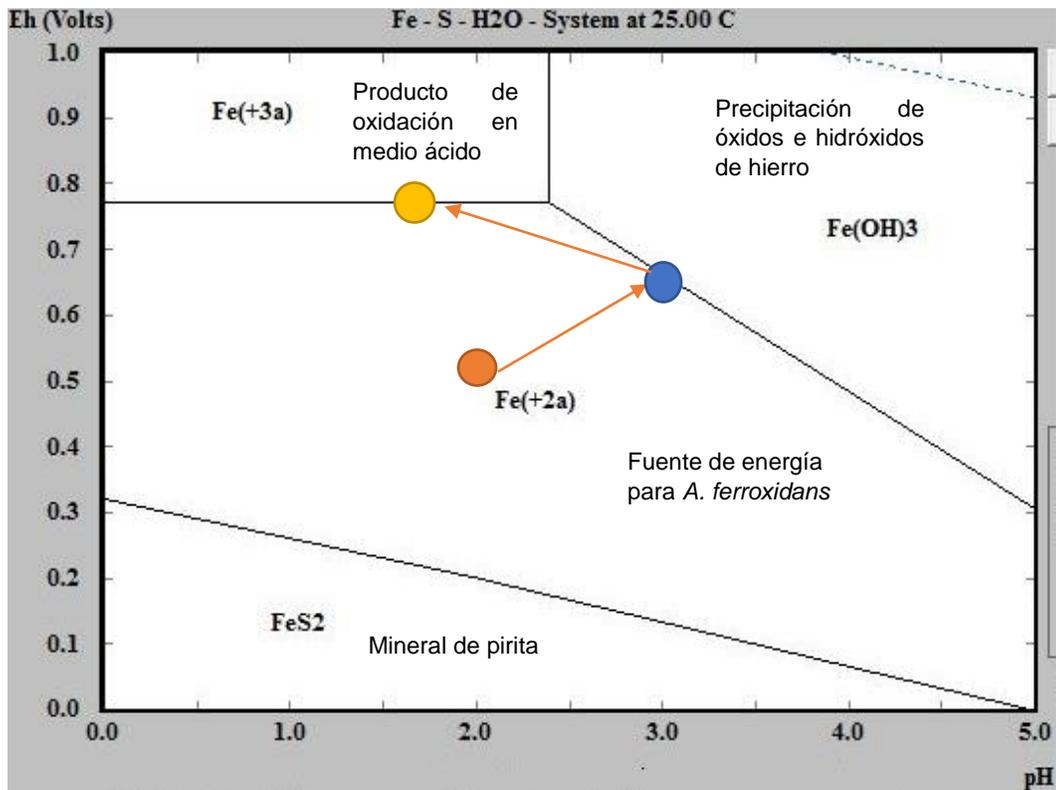


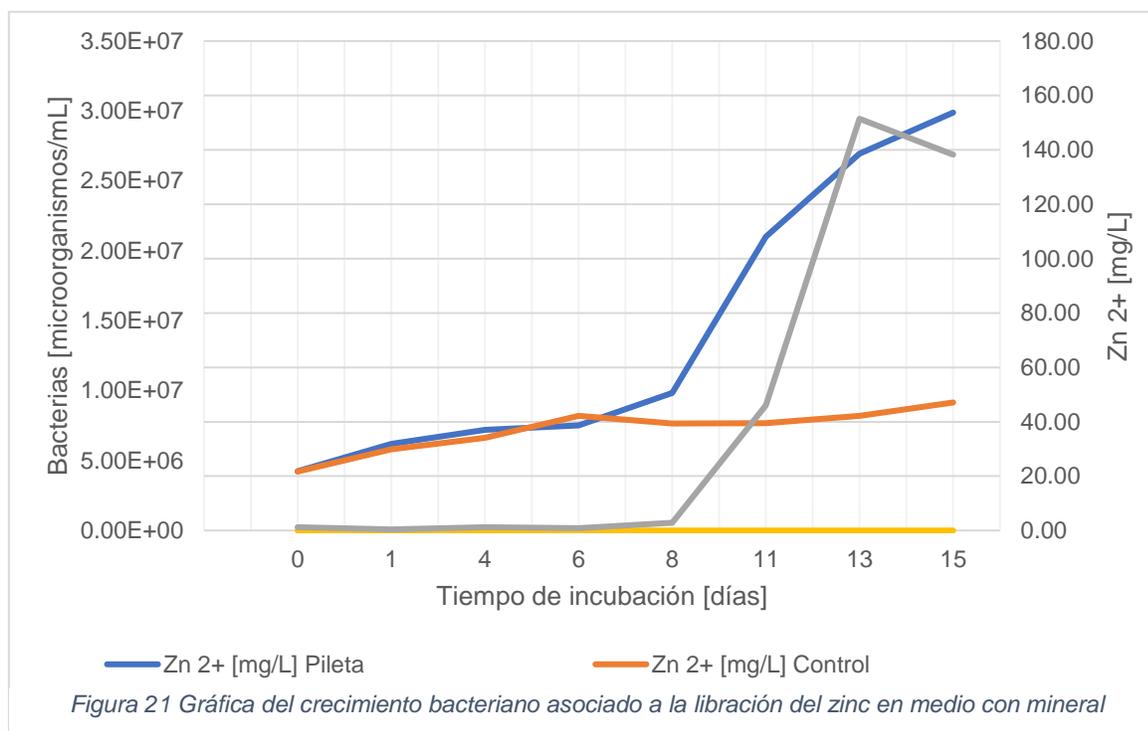
Figura 20 Diagrama de Pourbaix para el hierro en medio con mineral.

Las condiciones iniciales se representan con el círculo naranja. Como se observa en la Tabla 17 tuvo un incremento de pH y de Eh se representa el círculo azul, estos resultados se deben a la generación de precipitados que se presentaron como un sólido naranja. El círculo amarillo representa las condiciones finales, en donde el medio se acidificó encontrando el hierro en su mayoría en forma férrico.

5.4.1. Efecto de la presencia de bacterias en experimentos en medio T&K sobre los minerales de zinc durante la generación del DAM

Cuando se lleva a cabo la biolixiviación de Zn, que está presente en la esfalerita, las bacterias utilizan el S° o el Fe (II), como fuente de energía para disolver metales de sulfuro en forma de metales extraíbles: El proceso se describe de la siguiente manera: el hierro ferroso se oxida, la bacteria *Acidithiobacillus* ssp. se adhiere al hierro férrico y ataca a los sulfuros metálicos reduciéndolos nuevamente a hierro ferroso, esto se convierte en un ciclo hasta que no quede mineral de sulfuro disponible.

En el medio con mineral donde se identificó esfalerita como un mineral de mena, se asoció el crecimiento de las bacterias *Acidithiobacillus* ssp. Se pudo determinar Zn²⁺ soluble en el medio, ver Figura 21, se puede observar un aumento en la concentración de zinc en un medio inoculado y en un medio no inoculado.



Los microorganismos del género *Acidithiobacillus* ssp. incrementan la concentración de zinc soluble, esta concentración se puede ver reflejada durante los primeros 15 días. La muestra control presenta una concentración de 47 mg/L en el día. La muestra con medio mineral inoculado presentó de 154 mg/L en el día quince esto indica un incremento de 3.3 veces en ese tiempo de incubación.

5.5. Modelación de generación de DAM vía minerales de Zn

Las condiciones de pH y Eh tanto en medio T&K modificado como en medio con mineral se encuentran en los siguientes rangos:

- pH, de 3.47 a 1.38
- Eh, de 0.462 a 0.812 V

La Figura 22 el diagrama de Pourbaix, se puede observar que a pH ácidos se libera Zn^{2+} , sin presentarse precipitados.

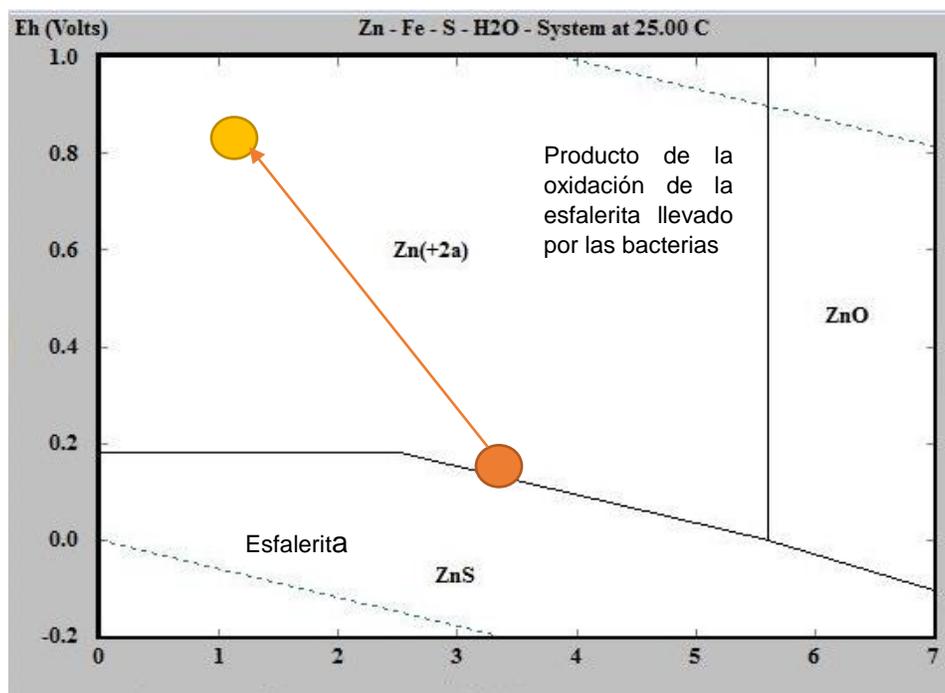


Figura 22 Diagrama de Pourbaix para el zinc en medio con mineral

En sus condiciones iniciales la esfalerita se encontraba como mineral en forma de sulfuro (círculo naranja) conforme pasaron los días de incubación, el zinc se presentó como zinc (II) ya no como un sulfuro (círculo amarillo).

5.5.1. Cinética de crecimiento de bacterias y cinética de disolución de minerales de Fe y Zn en experimentos de simulación de generación de DAM

Para el experimento en medio T&K la fase de retraso ocurre en los primeros tres días, el periodo de crecimiento en donde las bacterias ya se adaptaron se encuentra entre los días cuatro al ocho, la fase estacionaria se puede observar entre los días ocho al dieciséis donde la curva se hace constante, es decir, los microorganismos se encuentran en equilibrio. En esta curva no se presenta la fase de declinación o muerte, posiblemente por los días de incubación, además de que depende del hierro disponible en la solución.

En cambio, la curva de crecimiento del experimento con mineral presenta en su primera fase un tiempo de ocho días un mayor tiempo respecto al primer experimento. La fase de crecimiento está dividida en dos periodos el primero del día ocho al trece, el segundo del día quince al veintidós. A partir del día veintidós la presenta una tendencia conocida como la fase estacionaria, en este experimento tampoco se puede observar la fase de muerte, ya que la vida de las bacterias y su desarrollo depende de la disponibilidad del mineral de hierro presente en la muestra, para observar la última fase el experimento requiere un periodo mayor tiempo de incubación.

Ambas gráficas que se muestran en la Figura 23 presentan fases de crecimiento de bacterias, a distintos tiempos a pesar de tener condiciones ambientales similares como lo es el pH. La adaptación de las bacterias dependerá entonces del medio en que se encuentra, en este caso para el medio con mineral tuvo un periodo más largo pues al ser un medio natural contiene otros minerales que intervienen en un ambiente adecuado para su desarrollo.

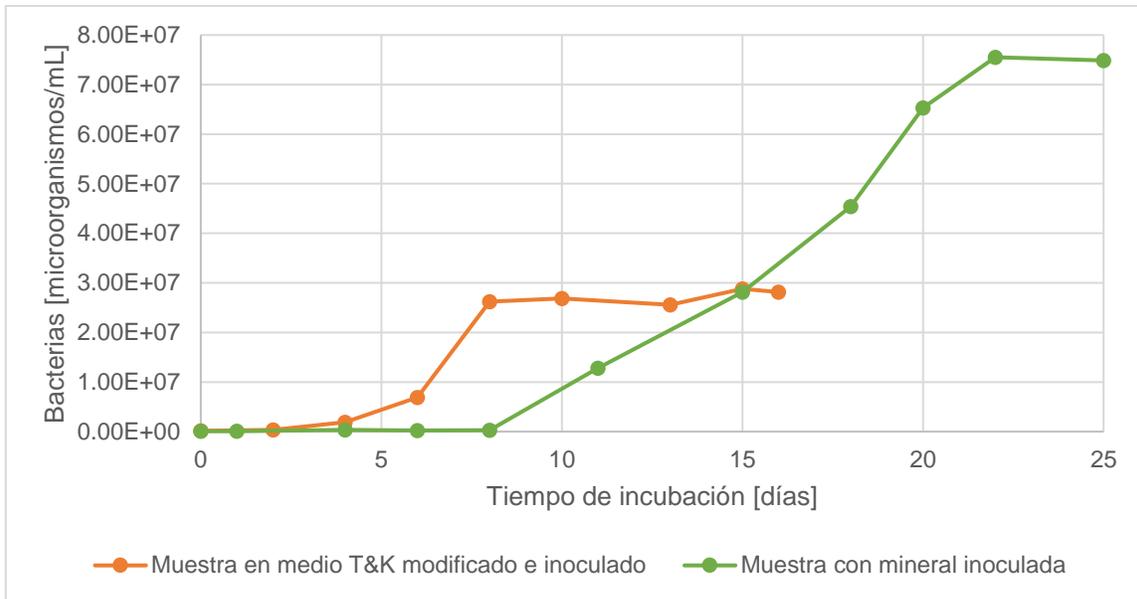


Figura 23 Gráfica de curva de crecimiento de las bacterias presentes en el medio T&K y con mineral.

La Figura 23 representa el gráfico del crecimiento de las bacterias. Para el medio T&K se tomará la línea entre los días dos y ocho para obtener su ecuación lineal, mientras tanto para el medio con mineral se tomará la línea entre los días ocho y trece, aunque ya se mencionó que este experimento presenta dos curvas de crecimiento, solo se tomará una de ellas.

Tabla 20 Ecuación lineal que representa el crecimiento de las bacterias, así como su constante de crecimiento k

Medio	Ecuación lineal	Pendiente	k
Con T&K modificado	$Y = 0.3076X + 4.9839$	0.3076	0.31
Con Mineral	$Y = 0.079X + 6.2464$	0.079	0.08

Para la obtención de la constante de velocidad específica de crecimiento k (Madigan, et al., 2012) se utilizó la curva de crecimiento con bacterias logarítmicas tomando en cuenta la pendiente y el tiempo de incubación, según la siguiente ecuación:

$$k = \frac{\log_{10}(N) - \log_{10}(N_0)}{t - t_0}$$

Donde:

t_0 es el tiempo inicial,

t es el tiempo final

N_0 es el número de bacterias en t_0 , y

N es el número de células en t

La constante con medio T&K modificado (medio sintético) describe la velocidad con que las bacterias se desarrollaron, contrario a la constante de medio con mineral, este supone un medio natural capaz de formarse en una mina.

Como se puede observar en la Tabla 20 las constantes difieren entre sí, la constante k del medio sintético es casi cuatro veces mayor que la del medio con mineral, esto se debe a que las bacterias que se encuentran en el medio con mineral están en contacto directo con pirita que tienen que deshacer pues requieren de hierro ferroso para conseguir energía, caso contrario del medio sintético, en este caso el hierro ferroso se encuentra de manera diluida por lo que las bacterias ya no tienen que desintegrar un medio sólido. Esto, también se puede observar con el tiempo de adaptación como se puede ver en las Figuras 15 y 17 donde el periodo fue de 3 a 4 días diferente a la de medio con mineral donde el periodo de adaptación fue de ocho días.

5.5.2. Cinética química para la disolución de la esfalerita

Para obtener la cinética de disolución de la esfalerita, se obtuvo el orden de la reacción como se presenta en la Tabla 21.

Tabla 21 Modelo de ecuaciones para obtener el orden de la reacción según el tipo de oxidación: química y biológica

Orden de reacción	Modelo	Oxidación biológica	Oxidación química
		Valor de r^2 al ajustar	
0	$y (Zn^{2+}) = k t + (Zn^{2+})_0$	0.8879	0.9016
1	$\ln y (Zn^{2+}) = k t + \ln (Zn^{2+})_0$	0.9488	0.8406
2	$1/y (Zn^{2+}) = k t + 1/(Zn^{2+})_0$	0.9206	0.7589

A partir de la Tabla 21 se puede decir que la oxidación biológica tiene un orden de reacción 1, mientras que la química tiene un orden de reacción 0, es decir para la oxidación biológica

Para la obtención de la constante cinética de reacción se obtuvieron los modelos gráficos que se muestran en la Figura 24.

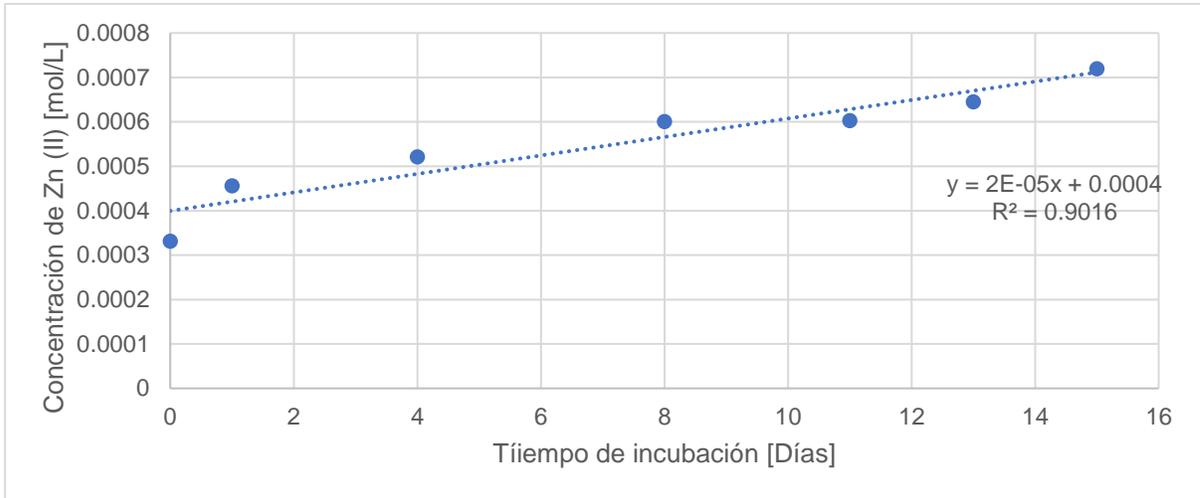


Figura 24 Gráfico de las concentraciones de zinc (II) para la oxidación química con orden de reacción cero

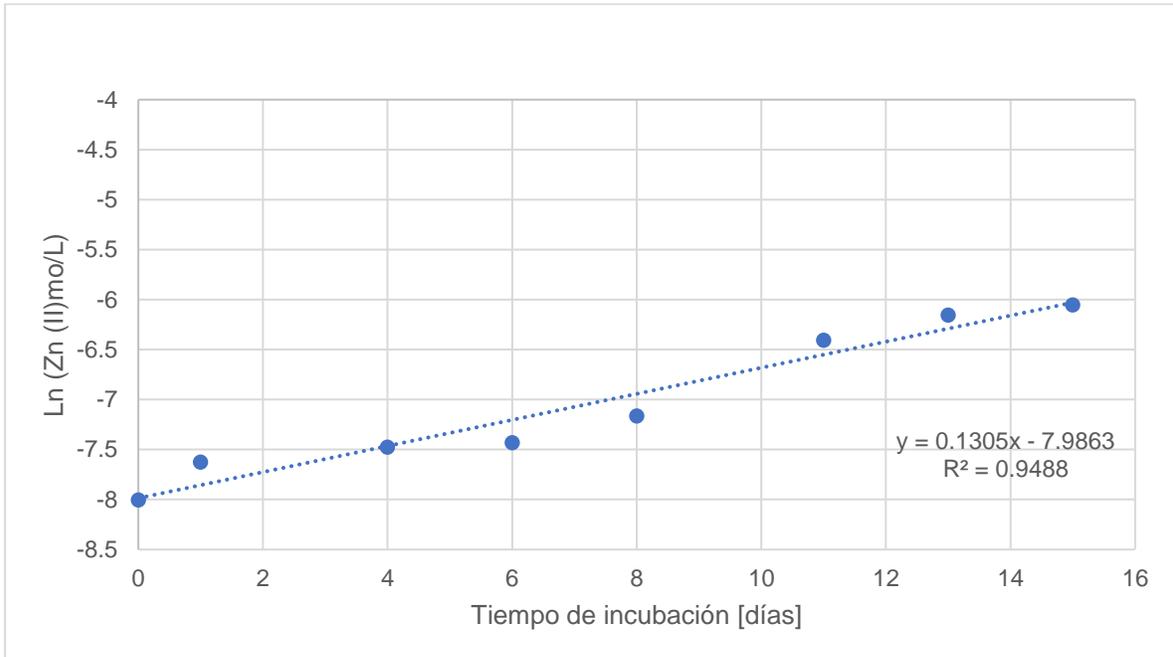


Figura 25 Gráfico de las concentraciones de zinc (II) en ln para la oxidación biológica con orden de reacción uno

Por otra parte, para la oxidación biológica que corresponden a un orden de reacción uno se muestra en la Figura 25, a partir de este modelo se obtuvo el orden. Además, se obtuvo la constante cinética para la velocidad de la reacción química como se muestra en la Tabla 22

Tabla 22 Constante de cinética de reacción para la oxidación química y biológica

	Oxidación química	Oxidación biológica
Orden de reacción	k [mol/día]	
0	2.00E-05	
1		0.1305

La constante de velocidad que describe la reacción es k y tiene un valor 2.0×10^{-5} mol/día para la oxidación química y 0.1305 mol/día, para la oxidación biológica. La oxidación biológica es 6525 veces más rápida que la oxidación química, lo cual se interpreta que las bacterias tienen un efecto catalizador significativo en la oxidación de la esfalerita dando lugar a su disolución y liberación en forma de zinc (II), lo cual explica las altas concentraciones de Zn (II) presentes en el DAM original, como puede observarse en la Tabla 6.

Conclusiones

- Se identificó la presencia de dos bacterias dominantes en el DAM proveniente del socavón 1412 en Taxco, Guerrero: *Acidithiobacillus ssp.* y *Leptospirillum spp.* Las cuales están asociadas a la generación de DAM en esta zona.
- Se llevó a cabo el aislamiento y adecuación de un cultivo de *Acidithiobacillus ferroxidans* en medio T&K modificado para simular las condiciones del DAM procedente de la muestra de DAM de Taxco, Guerrero.
- El crecimiento de *Acidithiobacillus ssp* en un medio sintético en condiciones de laboratorio tardaron de 3-4 días en la fase de adaptación, seguido por una fase exponencial con una caída de pH de 2.18 a 1.84 observándose que la oxidación biológica del hierro (II) a hierro (III) es más rápida que la oxidación química observada en los controles.
- En la simulación del DAM con *Acidithiobacillus spp.*, que constó de un medio T&K adicionado con los minerales provenientes de la mina como son; pirita y esfalerita, se observó que el periodo de adaptación de los microorganismos fue de 8 días, el doble de tiempo que en un medio sintético. El pH disminuyó de 3.08 a 2.55 por la acción de las bacterias, por el contrario, en el control donde no existe presencia de bacterias no se registró una disminución significativa del pH.

En cuanto a la oxidación biológica del hierro para medio con mineral tuvo un incremento de hierro férrico a los 8 días, que coincide con la fase de crecimiento exponencial, pero el cambio significativo ocurrió a los 18 días que es consistente con la fase de crecimiento exponencial, junto con una disminución del Fe (II) y aumento de Fe (III) soluble.

Por otra parte, se observó la precipitación de minerales de hierro como la jarosita producto de la acción bacteriana, como resultado la concentración de Fe total soluble disminuyó junto con la del Fe (II).

- El DAM se genera naturalmente aún sin la existencia de bacterias acidófilas, pues la oxidación del hierro se lleva a cabo mediante reacciones químicas, sin embargo, al intervenir este tipo de microorganismo incrementan la velocidad de oxidación de los minerales presentes en la mina, oxidando el hierro férrico se genera ácido sulfúrico y protones que disminuyen el pH, esto provoca que otros iones se solubilicen, como es el caso del zinc.

- La presencia de bacterias como *Acidithiobacillus* *ssp* aumenta la velocidad de oxidación de esfalerita y su liberación al DAM hasta 6525 veces. Estas bacterias acidófilas son una gran influencia en la disolución de la esfalerita, liberando el Zinc (II) al DAM.
- El DAM en Taxco, Guerrero se genera debido a la acción bacteriana de bacterias acidófilas como *Acidithiobacillus* *ssp* sobre los minerales dentro del socavón 1412, El pH disminuye progresivamente, aumenta la concentración de Fe (III) que precipita en forma de jarosita, además, se propicia la liberación de otros iones como lo es el Zn^{2+} , lo cual explica las altas concentraciones de Zn que superan a las de Fe en el DAM.

Perspectivas

El drenaje ácido de mina conocido como DAM por sus siglas, es conocido como un contaminante que de no ser controlado o tratado puede causar un gran impacto ambiental pues al comenzar la oxidación ya sea química o biológica la reacción ya conocida genera ácido sulfúrico, este a su vez llega a liberar elementos considerados como tóxicos que están presentes de manera natural o por un proceso metalúrgico.

Además, si también se cuentan con bacterias acidófilas como *Acidithiobacillus ssp* el proceso de oxidación se da con mayor rapidez. Las reacciones químicas llevadas a cabo en presencia de bacterias son considerablemente más rápidas comparándolas con las reacciones en ausencia de ellas. Son capaces de oxidar el hierro ferroso formando hierro férrico, este a su vez funciona como oxidante de la esfalerita oxidando y liberando el zinc que contiene el mineral.

Este proceso de oxidación puede ser utilizado a favor ayudado a lixiviar el zinc, puede ser utilizado en la industria minera y no solo como auxiliar en un proceso de extracción, si no como una parte fundamental del proceso, además también puede funcionar en presas de jales donde existe mineral de interés económico que no pudo ser recuperado, se pueden utilizar *Acidithiobacillus ssp* para recuperar el mineral atrapado utilizando la oxidación biológica en beneficio y dándole uso.

Tomando como ventaja este hecho, se puede utilizar el potencial oxidante procedente del metabolismo bacteriano, en conjunción con el ácido sulfúrico generado durante este proceso para mejorar los procesos de extracción de zinc por hidrometalurgia, a través de la biolixiviación según lo que ha sido reportado (Baba, et al., 2011; Souza, et al., 2007; Ye, et al., 2016) .

Tomando en cuenta los resultados de esta investigación, es posible proponer el uso de la cepa de *Acidithiobacillus spp.* , aislada a partir del DAM de Taxco, Guerrero para mejorar la lixiviación de la esfalerita mediante procesos de hidrometalurgia a temperatura ambiente, ya que, como se demostró en experimentos en laboratorio, la velocidad de disolución de la esfalerita vía oxidación biológica es 6525 veces mayor y logra extraer 3 veces más Zn que en un proceso de lixiviación sin el uso de microorganismos, incluso con la presencia de una baja concentración de Fe (II) y Fe (III) esto podría tener una aplicación a gran escala como pretratamiento de concentrados de Zn ricos en esfalerita, lo cual podría mejorar substancialmente los procesos de extracción de Zn.

Por lo tanto, se propone que el uso de las bacterias acidófilas se implemente a nivel industrial en la recuperación de Zn, en minerales de baja ley o en los contenidos en presa de jales, en donde se concentran minerales de interés económico que no son alcanzados a recuperar con los métodos convencionales.

La lixiviación en piletas ha sido usada para la recuperación de minerales de mena, en dónde comúnmente se utiliza ácido sulfúrico para la obtención del metal. Para la biolixiviación en la recuperación del Zinc, se realizaría una inoculación de *Acidithiobacillus ssp.* y *Leptospirillum spp.* Que actuarían como lixivante con la esfalerita y se pueda recuperar el zinc, posteriormente se tendrá que realizar un proceso de concentración de mineral.

La principal ventaja de la biolixiviación el bajo costo que genera la aplicación del método, no se necesita adicionar ácido sulfúrico, es amigable con el medio ambiente, se les da un uso a las bacterias acidófilas y se puede aplicar a minerales de baja ley o minerales que no se alcanzan a recuperar después del proceso de beneficio.

Una de las desventajas que al usar bacterias requieren un ambiente en dónde pueda desarrollarse y llegar a la fase estacionaria, el tiempo para la recuperación puede ser tratado comparado con los métodos convencionales, se liberan metales considerados tóxicos.

Referencias

- Aduvire, O., 2006. *Instituto geológico y minero de España, IGME.* [En línea]
Available at: http://info.igme.es/SIDIMAGENES/113000/258/113258_0000001.PDF
[Último acceso: 29 Enero 2019].
- Ata, A. & Soner, K., 2006. Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. *Journal of cleaner production*, 14(12-13), pp. 1139-1145.
- Baba, A. A. y otros, 2011. Bioleaching of Zn(II) and Pb(II) from Nigerian sphalerite and galena ores by mixed culture of acidophilic bacteria. *Science Press*, 21(2011), pp. 2535-2541.
- Baker, B. & Banfield, J., 2003. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology*, Mayo, 44(2), pp. 139-152.
- Benner, S. G., Gould, W. D. & Blowes, D. W., 1999. Microbial populations associated with the generation and treatment of acid mine drainage. *Chemical Geology*, 169(2000), pp. 435-448.
- Blais, J. F., Tyagi, R. D. & Aclair, J. C., 1993. Bioleaching of metals from sewage sludge: Effects of temperature. *Pergamon Press Ltd.*, 27(1), pp. 111-120.
- CAMIMEX, 2016. *Mapa de indicadores mineros 2016.* [En línea]
Available at: https://www.camimex.org.mx/index.php/mapa_nacional/
[Último acceso: 14 02 2019].
- Carroll, K. C., Morse, S. A., Mietzner, T. A. & Miller, S., s.f. *Microbiología médica.* 27 ed. s.l.:McGraw-Hill.
- CONAGUA, 2013. *CONAGUA.* [En línea]
Available at: <https://www.gob.mx/conagua>
[Último acceso: 2014 Febrero 2019].
- CONAGUA, C. N. d. A., 2010. *Acuerdo por el que se dan a conocer los estudios técnicos de aguas nacionales superficiales de la Región Hidrológica número 18 Balsas*, Ciudad de México: s.n.
- Dold, B., 2014. *SUMIRCO.* [En línea]
Available at: www.mdpi.com/journal/minerals
[Último acceso: 19 Diciembre 2019].
- Edwards, K., Bond, P. & Banfield, J., 2000. Characteristics of attachment and growth of *Thiobacillus caldus* on sulphides minerals: a chemostatic response to sulphur minerals. *Environmental Microbiology*, Volumen 2, pp. 324-332.
- Edwards, K. J., Bond, P. L., Gihring, T. M. & Banfield, J. F., 2000. An Archaeal Iron-Oxidizing Extreme Acidophile Important in Acid Mine Drainage. *Science*, 287(5459), pp. 1796-1799.

Fowler, T. A. & Crundwell, F. K., 1998. Leaching of Zinc Sulfide by Thiobacillus ferrooxidans: Experiments with a Controlled Redox Potential Indicate No Direct Bacterial Mechanism. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 64(10), pp. 3570-3575.

Fowler, T. A. & Crundwell, F. K., 1999. Leaching of Zinc Sulfide by Thiobacillus ferrooxidans: Bacterial Oxidation of the Sulfur Product Layer Increases the Rate of Zinc Sulfide Dissolution at High Concentration of Ferrous Ions. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 65(12), pp. 5285- 5292.

Fraile, M. d. I. R. & Prieto, J. P., 1997. *Microbiología en ciencias de la salud, conceptos y aplicaciones*. segunda ed. Madrid: Elsevier.

GEOINFOMEX-SGM, 2019. *GEOINFOMEX*. [En línea]
Available at: <https://www.sgm.gob.mx/GeoInfoMexGobMx/>
[Último acceso: 14 02 2019].

Ghassaa, S., Noaparasta, M., Shafaeia, S. Z. & Abdollahia, H., 2017. A study on the zinc sulfide dissolution kinetics with biological and chemical ferric reagents. *ELSEVIER*, 171(2017), pp. 362-373.

Ilhwan Park, C. B. T. S. J. X. L. K. S., 2018. A review of recent strategies for acid mine drainage prevention and mine tailings recycling.. *Chemosphere* , 219(2019), pp. 588-606.

Industrial Minera Mexico, 2017. *Trabajos de restauración presas de jales de Taxco de Alarcón* , Gro.. s.l., s.n., p. 72.

INEGI, I. N. d. E. y. G., 2009. *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Taxco de Alarcón, Guerrero.*, Taxco de Alarcón: INEGI.

Jensen, A. B. & Webb, C., 1995. Ferrous Sulphate Oxidation Using Thiobacillus ferrooxidans: a Review. *ELSEVIER*, 30(3), pp. 225-236.

Kay, C. M., Haanel, A. & Johnson, D. B., 2014. Microorganisms in subterranean acidic waters within Europe's. *ELSEVIER*, 165(2014), pp. 705-712.

Lizama, H., Fairweather, M., Dai, Z. & Allegretto, T., 2002. How does bioleaching start?. *ELSEVIER*, 69(2003), pp. 109-116.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A. & Clarck, D. P., 2012. *Brock. Microbiology og Microorganism*. Treceaba ed. s.l.:Pearson .

Miranda Huerta, A., Bustamante García, J. & Ramírez Espinoza, J., 2003. *Carta geológica-minera Taxco E14-A68. Escala 1:50,000 estado de Guerrero, México y Morelos*, s.l.: SGM.

Petersen, J. & Dixon, D. G., 2006. Modelling zinc heap bioleaching. *ELSEVIER*, 85(2007), p. 127–143.

Rodríguez, Y., Blázquez, M. L., F.González, A. B. & Muñoz, J. A., 2001. La biolixiviación al comienzo del siglo XXI. *Revista Metalurgica* , 37(5), pp. 616-627.

Romero, F., 2004. *Procesos geoquímicos que controlan la movilidad de metales y metaloides en jales de sulfuros metálicos. "El Fraile", Taxco-Guerrero. Tesis de maestría.* D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.

Romero, F. M., 2018. *Seguimiento y control de las acciones de remediación para atender la problemática ambiental en la zona minera de Taxco, Guerrero.*, Ciudad de México: s.n.

Romero, L., 2016. *Gaceta Digital UNAM.* [En línea]
Available at: <http://www.gaceta.unam.mx/20160905/la-unam-al-rescate-ambiental-de-taxco/>
[Último acceso: 12 Febrero 2019].

Romero, L., 2016. La UNAM, Al rescate ambiental de Taxco. *Gaceta Digital UNAM*, 05 09.810(4).

Singley, J. E. & Black, A. P., 1967. Hydrolysis Products of Iron (III). *Journal American Water Works Association*, 12(59), p. 1532.

Souza, A. D. d., Pina, P. S. & Leao, V. A., 2007. Bioleaching and chemical leaching as an integrated process in the zinc industry. *ELSEVIER*, 20(2007), pp. 591-599.

Tortora, G. J., Funke, B. R. & Funk, C. R., 2007. *Introducción a la microbiología.* Novena ed. Buenos Aires: Panamericana .

Touvinen, O. & Kelly, D., 1973. Studies on the Growth of Thiobacillus ferrooxidans. *Archiv für Mikrobiologie*, 88(4), pp. 285-298.

Walsh, F. & Mitchell, R., 1972. An Acid-tolerant Iron-oxidizing Metallogenium. *Journal of General Microbiology*, Volumen 72, pp. 369-376.

Ye, M. y otros, 2017. Removal of metals from lead-zinc mine tailings using bioleaching and followed by sulfide precipitation. *ELSEVIER*, 2017(185), pp. 1189-1196.

Ye, M. y otros, 2016. Bioleaching combined brine leaching of heavy metals from lead-zinc mine tailings: Transformations during the leaching process. *ELSEVIER*, 168(2017), pp. 115-1125.