



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERIA QUIMICA

**Cuantificación de As removido mediante el uso de diversos
microorganismos aeróbicos en un concentrado de arsenopirita del Cantón
Zaruma**

**LAZO NOBLECILLA ADOLFO JOSUE
INGENIERO QUIMICO**

**MEDINA ZAMBRANO NATHALY NICOLE
INGENIERA QUIMICA**

**MACHALA
2022**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERIA QUIMICA

**Cuantificación de As removido mediante el uso de diversos
microorganismos aeróbicos en un concentrado de arsenopirita del
Cantón Zaruma**

**LAZO NOBLECILLA ADOLFO JOSUE
INGENIERO QUIMICO**

**MEDINA ZAMBRANO NATHALY NICOLE
INGENIERA QUIMICA**

**MACHALA
2022**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERIA QUIMICA

TRABAJOS EXPERIMENTALES

**Cuantificación de As removido mediante el uso de diversos
microorganismos aeróbicos en un concentrado de arsenopirita del
Cantón Zaruma**

**LAZO NOBLECILLA ADOLFO JOSUE
INGENIERO QUIMICO**

**MEDINA ZAMBRANO NATHALY NICOLE
INGENIERA QUIMICA**

PESANTEZ FREDIS FRANCO

**MACHALA
2022**

Cuantificación de As removido mediante el uso de diversos microorganismos aeróbicos en un concentrado de arsenopirita del Cantón Zaruma

por Adolfo Josue Lazo Noblecilla - Nathaly Nicole Medina Zambrano

Fecha de entrega: 11-mar-2023 07:04p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2034857859

Nombre del archivo: TESIS_LAZO_MEDINA.docx (105.07K)

Total de palabras: 9691

Total de caracteres: 52920

Cuantificación de As removido mediante el uso de diversos microorganismos aeróbicos en un concentrado de arsenopirita del Cantón Zaruma

INFORME DE ORIGINALIDAD

6%

INDICE DE SIMILITUD

6%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.ipicyt.edu.mx Fuente de Internet	1%
2	patents.google.com Fuente de Internet	<1%
3	qdoc.tips Fuente de Internet	<1%
4	doku.pub Fuente de Internet	<1%
5	Submitted to Universidad Rey Juan Carlos Trabajo del estudiante	<1%
6	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%
7	www.itson.mx Fuente de Internet	<1%
8	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1%

9	patents.glgoo.top Fuente de Internet	<1 %
10	pesquisa.bvsalud.org Fuente de Internet	<1 %
11	issuu.com Fuente de Internet	<1 %
12	repositorioacademico.upc.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
13	addi.ehu.es Fuente de Internet	<1 %
14	dspace.ups.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
15	www.brand.de Fuente de Internet	<1 %
16	www.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
17	repositorio.puce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
18	moam.info Fuente de Internet	<1 %
19	"Tesis Exploración de la relación entre rendimiento académico de alumnos de pregrado, consultas de los servicios de biblioteca y multidisciplinariedad, aplicando	<1 %

técnicas de minería de datos", Pontificia
Universidad Católica de Chile, 2016

Publicación

20

Jochen Bundschuh, Maria Aurora Armienta,
Nury Morales-Simfors, Mohammad Ayaz Alam
et al. "Arsenic in Latin America: New findings
on source, mobilization and mobility in
human environments in 20 countries based
on decadal research 2010-2020", Critical
Reviews in Environmental Science and
Technology, 2020

Publicación

<1 %

21

edoc.pub

Fuente de Internet

<1 %

22

es.transcend-info.com

Fuente de Internet

<1 %

23

www.agro.uba.ar

Fuente de Internet

<1 %

24

www.coursehero.com

Fuente de Internet

<1 %

25

es.slideshare.net

Fuente de Internet

<1 %

26

gredos.usal.es

Fuente de Internet

<1 %

27

old.oalib.com

Fuente de Internet

<1 %

28

www.buenosairespyme.gov.ar

Fuente de Internet

<1 %

29

www.malvernpanalytical.com

Fuente de Internet

<1 %

30

www.netsalud.umich.mx

Fuente de Internet

<1 %

31

Escudero González, Lorena. "Estudio de los genes implicados en el metabolismo del arsénico en cultivos y en sistemas naturales", Bellaterra: Universitat Autònoma de Barcelona,, 2009

Fuente de Internet

<1 %

32

Hui Wei, Yan Du, Jianzhen Kang, Erkang Wang. "Label free electrochemiluminescence protocol for sensitive DNA detection with a tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) modified electrode based on nucleic acid oxidation", Electrochemistry Communications, 2007

Publicación

<1 %

33

NINETTE CARTES-ENRIQUEZ, M. I. SOLAR RODRIGUEZ, R. QUINTANA LETELIER. " ", ReCALL, 2004

Publicación

<1 %

34

bibdigital.epn.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

35

detrasdela noticia.com.ar

Fuente de Internet

<1 %

36

eprints.qut.edu.au

Fuente de Internet

<1 %

37

repositorio.unesp.br

Fuente de Internet

<1 %

38

www.slideshare.net

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 10 words

Excluir bibliografía

Activo

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Los que suscriben, LAZO NOBLECILLA ADOLFO JOSUE y MEDINA ZAMBRANO NATHALY NICOLE, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado Cuantificación de As removido mediante el uso de diversos microorganismos aeróbicos en un concentrado de arsenopirita del Cantón Zaruma, otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.



LAZO NOBLECILLA ADOLFO JOSUE

1727410605



MEDINA ZAMBRANO NATHALY NICOLE

0706639002



UNIVERSITAS
MAGISTRO-
RUM
ET SCHOLAR-
IUM

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a; mis padres, por estar en mi vida como ejemplos de perseverancia.

A mi compañera de universidad, inalcanzable aliada Nathy, con la que realice este trabajo para finalizar mi vida universitaria, este nuestro último trabajo como estudiantes es la recopilación de todo lo que hemos realizado, como investigadores Jr., como emprendedores, como ganadores, el último trabajo para dejar en alto todo lo que aprendimos de esta noble institución.

Al Lucas, mi fiel corcel, que fue ese nexo entre la preocupación y amor que solo una mascota puede dar.

A mis hermanas y sobrina, por ver ese cambio profundo de tiempos entre mis ocupaciones, y el ser acompañantes de como esos tiempos también se vieron involucrados en sus actividades.

En la gran frase de “Dame, solamente, lo que más te guste, y nada más”

Los amo a todos.

Adolfo Josue Lazo Noblecilla

DEDICATORIA

A mis padres, Douglas y Carmen, por siempre apoyarme a lo largo de mi carrera no sólo monetariamente sino también emocionalmente, y también por demostrarme que nunca es demasiado tarde para convertirse en un profesional. Todos y cada uno mis logros les pertenecen.

A mi hermana mayor Michelle, por darme el orgullo y placer de convertirme en la tercera Ingeniera de la familia. A mi hermano menor Joshue, por alegrar mis días y hacerme la hermana más orgullosa del mundo con cada logro que alcanza.

A Adolfo, mi compañero, con el que recorrí este largo camino universitario de la mano, aprendiendo y creciendo mutuamente, cuidándome y queriéndome siempre. Por compartir con tanta ilusión este trabajo.

A mi mejor amigo y hoy un ángel en el cielo, Ronny, quién se lleva una mención honorífica por acompañarme en esta enorme travesía, siempre te voy a querer.

Por último, a mis mascotas Jonás y Jasper por ayudarme a entender que aún tengo mucho amor para dar.

Gracias Totales.

Nathaly Nicole Medina Zambrano

AGRADECIMIENTO

En el final de nuestra vida universitaria hay muchas personas a las cuales agradecer, los contactos, los amigos, la experiencia. Esta universidad nos entregó años que recordaremos para toda la vida, de una época irrepetible, y de la nos retiramos contentos de cumplir.

A nuestros padres; por estar presentes en la consecución de este objetivo, y darnos un sentido social a las acciones que realizaron.

A la Universidad Técnica de Machala, por su apertura para permitir formarnos como profesionales y habernos brindado muchas experiencias enriquecedoras junto a nuestros compañeros y amigos, a quienes hemos aprendido a querer y valorar.

A nuestro tutor, Dr. Fredis Franco Pesantez, por haber sido nuestro docente durante muchos años y haber impartido los conocimientos necesarios para realizar esta investigación.

Al Dr. Hugo Romero Bonilla, por haber contribuido con sus conocimientos y haber hecho posible la realización de este trabajo.

A nuestros grandes amigos con quienes mantuvimos buenos momentos, en especial a Kevin, Bruce, Fátima, Ermel, Angie, Hoover y Davis, que siempre estuvieron presentes. Los despedimos con esta gran frase: *“Los amigos de la Universidad, te salvan un poco la carrera, y otro poco la vida”*

Adolfo Josue Lazo Noblecilla
Nathaly Nicole Medina Zambrano

RESUMEN

Están en desarrollo varios proyectos académicos que investigan cómo la presencia del As puede retrasar los ingresos de países en vías de desarrollo y afectar la venta de materiales extractivos como oro, plata, cobre y otros metales de interés. Para abordar este problema se han propuesto varios mecanismos que buscan reducir la presencia de metales pesados que afectan directamente el valor de los metales de interés. Sin embargo, la implementación de estas soluciones puede generar costos significativos para la industria de la metalurgia extractiva y no resuelve otros problemas como la obtención de materiales de interés de relaves, desechos que contienen bajos niveles de metales o metales refractarios y amalgamas de metales pesados.

Se busca evaluar mecanismos para transformar el arsénico, que es un metal pesado, a fin de aumentar la rentabilidad en la industria de la metalurgia y cumplir con los estándares de desechos y normativas vigentes. Para abordar este problema, se propone el uso de microorganismos como método de degradación de metales pesados, el cual es más eficiente que otros métodos y no causa daños ambientales adicionales. Esta investigación se centra en las características del uso de microorganismos para la degradación de metales pesados.

Esta técnica presenta varias características notables, incluyendo una alta eficiencia en la degradación de metales pesados. Además, se utiliza una formulación de medio de cultivo 9K que emplea materiales químicos de bajo coste, lo que hace que sea económicamente viable. Este medio de cultivo es esencial para el crecimiento óptimo de los microorganismos utilizados en este método, que son *Rhizobium sp. NT-26*, *Leptospirillum Ferroxidans* y *Acidithiobacillus Thiooxidans*.

Este estudio presenta los resultados obtenidos a través de tres modelos analíticos diferentes. Uno de ellos es el modelo electroquímico, que permite evaluar las concentraciones de arsénico en función del tiempo, generando curvas de calibración que facilitan su evaluación. Además, se realizaron pruebas con otros métodos analíticos, como XRF y absorción atómica, para comparar los resultados obtenidos mediante electroquímica.

Se utilizaron dos técnicas electroquímicas para evaluar las muestras de los biorreactores, Voltamperometría Cíclica y Cronoamperometría.

Este método se utilizó un electrodo de teflón punta de oro, electrodo de Ag/AgCl, electrodo de alambre de platino. En este modelo se evalúa la oxoreducción de los componentes.

Se evaluó el comportamiento electroquímico del As en el electrodo de platino utilizando tres soluciones electrolíticas diferentes, incluyendo soluciones buffer de fosfato con pH de 2,4 y 6. Se observó que la oxidación del As ocurre en un rango de potencial de 0,5 V a 1 V en un rango de detección de 0 a 2 V. Los resultados se presentan en la sección de discusión de este documento.

La evaluación se optimiza a través de un análisis ANOVA, para obtener valores óptimos de degradación de arsénico, las caracterizaciones revelaron que el modelo de medición de cronoamperometría, cuyo rango de medición se optimiza a 4×10^{-5} mA hasta $1,75 \times 10^{-5}$ mA.

Los parámetros de control arrojaron respuestas electroquímicas a partir de la amplitud de 10 mV, así mismo el rango de escaneo se vio distribuido en aumentos constantes de 5 mV, las frecuencias generadas fueron de 5 Hz.

En los parámetros finales, se demostró una degradación de As, superior al 99%, en un espacio de evaluación de 14 días, el modelo no fue evaluado con una isoterma, por el diseño de los biorreactores, con un volumen muy pequeño, se puede mejorar este proceso a partir de un diseño de biorreactores de mayor volumen.

Palabras clave: cronoamperometría, voltamperometría de onda cuadrada, XRF, ANOVA, metales pesados, microbiología, metalurgia.

ABSTRACT

Several academic projects are being developed to investigate how the presence of As can delay the income of developing countries and affect the sale of extractive materials such as gold, silver, copper, and other metals of interest. To address this problem, several mechanisms have been proposed to reduce the presence of heavy metals that directly affect the value of the metals of interest. However, the implementation of these solutions can generate significant costs for the extractive metallurgy industry and does not solve other problems such as obtaining materials of interest from tailings, wastes containing low levels of metals or refractory metals, and amalgams of heavy metals.

The aim is to evaluate mechanisms for transforming arsenic, which is a heavy metal, to increase profitability in the metallurgy industry and comply with current waste standards and regulations. To address this problem, the use of microorganisms as a method of heavy metal degradation is proposed, which is more efficient than other methods and does not cause additional environmental damage. This research focuses on the characteristics of using microorganisms for the degradation of heavy metals.

This technique has several notable characteristics, including high efficiency in the degradation of heavy metals. Additionally, a 9K culture medium formulation is used, which employs low-cost chemical materials, making it economically viable. This culture medium is essential for the optimal growth of microorganisms used in this method, which are *Rhizobium sp. NT-26*, *Leptospirillum Ferroxidans*, and *Acidithiobacillus Thiooxidans*.

This study presents the results obtained through three different analytical models. One of them is the electrochemical model, which allows evaluating arsenic concentrations as a function of time, generating calibration curves that facilitate their evaluation. Additionally, tests were performed with other analytical methods such as XRF and atomic absorption to compare the results obtained by electrochemistry.

Two electrochemical techniques were used to evaluate the samples from the bioreactors, cyclic voltammetry, and chronoamperometry.

Teflon gold-tipped electrode, Ag/AgCl electrode, and platinum wire electrode were used as electrodes for this method. This model evaluates the redox behavior of the components.

The electrochemical behavior of As on the platinum electrode was evaluated using three different electrolytic solutions, including phosphate buffer solutions with pH values of 2.4 and 6. It was observed that the oxidation of As occurs in a potential range of 0,5 V to 1 V in a detection range of 0 to 2 V. The results are presented in the discussion section of this document.

The evaluation is optimized through an ANOVA analysis to obtain optimal values for arsenic degradation. Characterizations revealed that the chronoamperometry measurement model, whose measurement range is optimized from 4×10^{-5} mA to 1.75×10^{-5} mA, showed the best results.

The control parameters yielded electrochemical responses from an amplitude of 10 mV, and the scanning range was distributed in constant increments of 5 mV. The generated frequencies were 5 Hz.

In the final parameters, a degradation of As superior to 99% was demonstrated in an evaluation space of 14 days. The model was not evaluated with an isotherm due to the design of the bioreactors, which have a very small volume. This process can be improved by designing larger bioreactors.

Keywords: chronoamperometry, square wave voltammetry, XRF, ANOVA, heavy metals, microbiology, metallurgy.

INDICE

	pág.
DEDICATORIA	5
DEDICATORIA	6
AGRADECIMIENTO	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
INDICE	12
ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ÍNDICE DE ANEXOS	1
LISTA DE ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	4
Objetivo General	4
Objetivos Específicos	4
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Arsénico	5
1.2. Sistemas de eliminación de metales pesados en arsenopirita, y material minero de interés	5
1.3. Sistema de eliminación de metales pesados que utilizan microorganismos	6
1.4. Incidencia de los microorganismos en la metalurgia extractiva	7
1.5. Sistemas de detección de arsénico	8
1.5.1. Electroquímica	8
1.5.2. Espectrometría de fluorescencia de rayos x (XRF)	10
1.5.3. Absorción atómica	10
1.6. Microorganismos utilizados en la remoción de As (III)	11
1.6.1. Rhizobium sp. NT-26	11
1.6.2. Leptospirillum ferrooxidans	11

1.6.3. Acidithiobacillus Thiooxidans.....	11
1.7. Mecanismos de transformación de arsénico por microorganismos.....	11
1.7.1. Mecanismo de oxidación de As (III).....	11
1.7.2. Mecanismo de reducción de As (V).....	11
1.7.3. Enzima arsenito oxidasa (AOX).....	12
1.8. Situación actual y mercado mundial.....	13
1.9. Casos de aplicación en minería local. ⁴⁶	13
1.10. Evaluación ANOVA en modelos experimentales.....	14
1.10.1. Design Expert en modelos experimentales.....	15
1.10.2. SPSS.....	15
2. METODOLOGÍA.....	16
2.1. Tipo de estudio.....	16
2.2. Identificación de variables.....	16
2.2.1. Variable independiente.....	16
2.2.2. Variable dependiente.....	16
2.3. Población.....	16
2.4. Muestra.....	17
2.5. Materiales y métodos.....	17
2.5.1. Equipos.....	17
2.5.2. Materiales.....	17
2.5.3. Reactivos.....	17
2.5.4. Microorganismos.....	18
2.6. Desarrollo Experimental.....	18
2.6.1. Preparación de la muestra y caracterización.....	18
2.6.2. Preparación de medios de cultivo y crecimiento bacteriano.....	19
2.6.2.1. Preparación de medio de cultivo 9K.....	19
2.6.2.2. Preparación del medio agar papa dextrosa.....	19
2.6.2.3. Crecimiento bacteriano.....	19
2.6.3 Valoración de los microorganismos.....	21

2.6.3.1 Valoración colorimétrica.....	21
□ Arsenic test kit.	21
□ UV Visible	21
2.6.4 Determinación de la concentración de arsénico.....	22
2.6.4.1 Medición de As (III) y As (V)	22
2.6.4.2 Preparación de curva de calibración	23
2.6.4.3 Optimización de los parámetros para determinar As.	23
2.6.5 Análisis de datos	23
2.6.5.1 Determinación de la normalidad.....	24
□ Gráfico de caja y bigote	24
□ Prueba Shapiro-Wilk	24
2.6.5.2 Igualdad de varianzas.....	24
□ Test Levene.....	24
2.6.5.3 Representación Gráfica	24
□ IBM SPSS Statistics.....	24
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1. Resultados	26
3.1.1. Caracterización de las muestras de FeAsS.	26
3.1.2. Efecto del rango de escaneo en voltamperometría cíclica para As (III).	28
3.1.3. Efecto del rango de escaneo en voltamperometría biorreactores de arsenopirita.	29
3.1.4. Curva de calibración de las concentraciones de As (III).	30
3.1.4.1. Curva de calibración As. rango 1 ppm -100 ppm.	30
3.1.4.2. Curva de Calibración As. Rango 1 ppb -1000 ppb.	30
3.1.5. Relación colorimétrica y concentración.	31
3.1.6. Evaluación de la concentración de As por cronoamperometría.....	32
3.1.6.1. Evaluación experimental del biorreactor 1.....	32
3.1.6.2. Evaluación experimental del biorreactor 2.....	33
3.1.7. Evaluación de la concentración de As por cronoamperometría.....	33

3.1.7.1. Concentración control y puntos de referencia.	34
3.2. Optimización de los parámetros de control en voltamperometría de onda cuadrada	35
3.2.1. Efecto del biorreactor 1, en la concentración de As (III).	35
3.2.2. Efecto del biorreactor 2, en la concentración de As (III).	35
3.2.3. Evaluación de la concentración del analito a través del tiempo de exposición... ..	36
3.2.3.1. Evaluación superpuesta concentración de As (III).	36
3.2.4. Evaluación estadística de los resultados obtenido.....	37
3.3 Evaluación del proceso a través del porcentaje de la detección de As (III).....	38
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
4.1 Conclusiones	40
4.2 Recomendaciones.....	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS	49

ÍNDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición del medio de cultivo 9K.....	19
Tabla 2. Preparación del medio agar papa dextrosa	19
Tabla 3. Tratamientos instalados para la biolixiviación de arsenopirita	20
Tabla 4. Composición de la solución de Mohr.....	21
Tabla 5. Parámetros utilizados para los tres métodos electroanalíticos.....	23
Tabla 6. Análisis XRF para una muestra de arsenopirita aurífera	26
Tabla 7. Análisis de absorción atómica del concentrado de arsenopirita aurífera	27
Tabla 8. Análisis de electroquímica del concentrado de arsenopirita aurífera	27
Tabla 9. Evaluación de corriente y concentración para procesos de biorreactor.....	33
Tabla 10. ANOVA para promedio de Tiempo de tratamiento (días) por Concentración (As ppm).....	38
Tabla 11. Resultados obtenidos de los análisis de arsenopirita en el tratamiento	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Mecanismos de oxidación química y biológica del azufre a partir de minerales sulfurados.....	7
Figura 2. Clasificación de las técnicas electroquímicas.....	8
Figura 3. Modelo enzima arsenito oxidasa (AOX)	12
Figura 4. Ubicación geográfica	16
Figura 5. Acción química producida en los biorreactores	20
Figura 6. Esquema de la celda electroquímica con arreglo de tres electrodos.....	22
Figura 7. Voltamograma de concentraciones de As (III), para calibración de equipo, en diferentes rangos de escaneo	29
Figura 8. Voltamograma de biorreactores de arsenopirita, con presencia de As (III), en diferentes rangos de escaneo	29
Figura 9. Curva de calibración de patrón As (III), para lecturas de analitos en los biorreactores	30
Figura 10. Curva de calibración de patrón As (III), para lecturas de analitos en los biorreactores	31
Figura 11. Concentrado de muestras y control	31
Figura 12. Evaluación por Cronoamperometría de la concentración de arsénico en las muestras del tratamiento 1	32
Figura 13. Evaluación por Cronoamperometría de la concentración de arsénico en las muestras del tratamiento 2	33
Figura 14. Evaluación de las muestras en la curva de calibración ppm.....	34
Figura 15. Evaluación de las muestras en la curva de calibración ppb.....	34
Figura 16. Curva de calibración de patrón As (III), para lecturas de analitos de biorreactores	35

Figura 17. Curva de calibración de patrón As (III), para lecturas de analitos de biorreactores	36
Figura 18. Evaluación electroquímica de la concentración de As. Gráficas superpuestas	37
Figura 19. Medias y 99% de Tukey HSD	38

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Mineral de Arsenopirita aurífera	49
Anexo B. Trituración del mineral FeAsS	50
Anexo C. Distintos tamaños de partícula de FeAsS.....	51
Anexo D. Preparación de medio 9k para el crecimiento de los microorganismos	52
Anexo E. Biorreactores al comienzo del proceso con el cultivo mixto de microorganismos, junto con las correspondientes concentraciones de arsenopirita en la plancha de agitación.....	53
Anexo F. Biorreactores al final del proceso con el cultivo mixto de microorganismos, junto con las correspondientes concentraciones de arsenopirita	¡Error! Marcador no definido.
Anexo G. Medición de los parámetros electroquímicos en potenciostato CHI 1220B junto con celda de trabajo, electrodo de trabajo (alambre platino), electrodo de referencia (teflón dopado con punta de platino) y electrodo auxiliar (Ag/KCl)	55
Anexo H. Medición cualitativa para determinar presencia de As en las muestras obtenidas de los biorreactores mediante “Arsenic Test Kit”	56
Anexo I. Equipo utilizado en la valoración colorimétrica de las muestras obtenidas de los biorreactores	58
Anexo J. Reporte del laboratorio ANAVANLAB de los análisis de Arsénico de las muestras captadas de los biorreactores a sus respectivas concentraciones	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ArsC	Arsenito reductasa
AOX	Arsenito oxidasa
SWV	Voltamperometría de onda cuadrada
FeAsS	Arsenopirita
p-valor	Intensidad de pico
XRF	Fluorescencia de rayos X
NT	No cuantificable
Pit	Transporte inorgánico de fosfato
Pst	Transporte específico de fosfato
SCT	Suma de cuadrados totales
SCG	Suma de cuadrados entre grupos
SCD	Suma de cuadrados dentro de grupos
sp.	Especies en latín
mA	miliamperios
ppm	Partes por millón
ppb	Partes por billón
ppc	Partes por cuatrillón

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una preocupación en el mundo debido a las grandes necesidades de metales preciosos provenientes de la explotación minera, los mismos representan un grave problema ambiental para la matriz productiva de un país, esto tiene como consideración que los precios mundiales de los metales preciosos se ven acompañados de la calidad y pureza de los mismos, actualmente existen residuos que presentan contenidos de oro relevantes pero el tratamiento no es factible o no es tan sencillo por métodos convencionales. Las bajas recuperaciones y minerales cada vez más complejos hacen plantear una nueva estrategia para el tratamiento de estos minerales.¹

Aportando a la problemática, desde el sistema natural se forman amalgamas de sulfuros, y presencia de otros metales dentro de los procesos mineros, y estos mismos impiden que el oro alcance la pureza para poder ser lixiviado.² Entre las consideraciones de los metales pesados encontramos al arsénico que tiene presencia en arseniuros, silicatos, sulfuros, arseniatos y óxidos, además, se encuentra distribuido en alrededor de 250 formas, entre los que encontramos minerales con presencia de oro refractado, como subproducto de la lixiviación en las plantas de beneficio.³

La Biometalurgia se presenta como una solución experimental viable a la extracción de estos metales de interés, así mismo, se convierte en una forma de respuesta a los procesos clásicos que impiden el tratamiento de los sedimentos, para la obtención de estos materiales.⁴ En el Ecuador, menos del 10% de minas a nivel nacional han explotado estos recursos para poder utilizar microorganismos de sus minas para realizar los procesos correspondientes a la biolixiviación, el desaprovechamiento es parte de la falta de conocimiento de las propiedades de las bacterias, una de las cuales es eliminar las interferencias de azufre, hierro, sulfuro y arsénico que contienen oro, estos procesos pueden realizarse con microorganismos autóctonos de la misma mina.¹

El problema base es que la arsenopirita no contiene únicamente metales de interés, si no que, pueden resultar en un contaminante en caso de no ser disociados, en base a sus valencias, los subprocesos también cuentan como un pretratamiento preventivo a contaminación por estos materiales.¹

OBJETIVOS

Objetivo General

Cuantificar la cantidad de arsénico removido de concentrados de arsenopirita mediante el uso de diversos microorganismos aeróbicos, para beneficiar la explotación de los recursos mineros del cantón Zaruma.

Objetivos Específicos

- Desarrollar un modelo de biorreactores aeróbicos para degradar As (III) de las muestras seleccionadas.
- Caracterizar las muestras obtenidas para determinar la cantidad de As (III) y poder comparar los resultados obtenidos utilizando tres análisis de laboratorio distintos para su medición.
- Utilizar un modelo estadístico que permita evaluar la duración del proceso de degradación de As (III) en función de los días transcurridos.
- Identificar la presencia de microorganismos degradadores de As (III) a través de los cambios de color observados.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Arsénico

El arsénico es un metal pesado que está presente en la naturaleza en cuatro estados de oxidación distintos: arsénico, arsenito, arseniato y arsina. Es el 52° elemento químico en relación de abundancia en el planeta, distribuido según la zona geológica, además de poseer una toxicidad alta.¹

Sus concentraciones son variadas a razón de la polución humana por desechos industriales, los cuales oscilan los 100 a 300 ppc, en las zonas aledañas a las industrias, representando una diferencia notoria a los 1 a 3 ppc que presentan de concentración de este metal pesado en zonas alejadas de polución humana.²

En su estado oxidado, para arsenito y arseniato se presenta con valencias de (III) y (V), siendo esta última su forma menos tóxica, además de que su oxidación química presenta características de poseer elevados costos por los compuestos utilizados: Cl_2 , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, KMnO_4 .³

Ecuador tiene una incidencia significativa de este metal pesado dentro de su territorio, porque su presencia volcánica le ha permitido movilizarse en todo el país, lo podemos encontrar en sedimentos acuíferos, relaveras de montañas y menas de minerales.⁴

Existen concentraciones minerales de As en arseniuros, silicatos, sulfuros, arseniatos y óxidos. Y se distribuyen en torno a 250 maneras entre las que encontramos minerales con presencia de oro, como subproducto de la lixiviación en las plantas de beneficio. La liberación de este metaloide en las zonas afluentes de agua cercanas es peligrosa, ya que no se debe exceder la concentración de arsénico a más de 10 ppb, superando este rango se considera tóxica para el consumo humano según la OMS.⁵

1.2. Sistemas de eliminación de metales pesados en arsenopirita, y material minero de interés.

El arsénico es un elemento químico que se encuentra en la arsenopirita y puede ser liberado al medio ambiente cuando se extrae el mineral o cuando se procesa para obtener otros productos.⁴

La eliminación del arsénico del concentrado mineral de arsenopirita es importante por varias razones.

En primer lugar, la eliminación del arsénico puede reducir los efectos negativos en la salud humana y animal, ya que, puede causar una serie de enfermedades, como el cáncer, enfermedades cardíacas, diabetes enfermedades pulmonares.³

En segundo lugar, puede mejorar la calidad del agua y otros recursos naturales. El arsénico puede contaminar las fuentes de agua y hacer que el agua sea insegura para beber y usar en la agricultura. También puede afectar la calidad del suelo y dañar los ecosistemas naturales.⁴

En tercer lugar, puede mejorar la eficiencia y la rentabilidad de la extracción y el procesamiento de la arsenopirita. Debido a que, afecta el rendimiento de los procesos de extracción y procesamiento y puede reducir la calidad de los productos finales. Al eliminar el arsénico, se puede mejorar la eficiencia y la rentabilidad de los procesos mejorando la calidad de los productos finales.⁶

Por último, la eliminación del arsénico puede mejorar la imagen y la reputación de las empresas que extraen y procesan arsenopirita. El arsénico es un contaminante peligroso y su presencia puede afectar la percepción del público sobre la industria minera y su impacto en el medio ambiente, es por esto que, eliminando este metal, las empresas pueden demostrar su compromiso con la seguridad y la sostenibilidad y mejorar su reputación entre los consumidores y la comunidad en general.

1.3. Sistema de eliminación de metales pesados que utilizan microorganismos

Dentro de los sistemas que cuentan con microorganismos que lixivian concentrados de arsenopirita, proporcionan seis mecanismos para las reacciones químicas, tales como: acumulación intracelular; pared celular asociada; inmovilización de metales.⁶

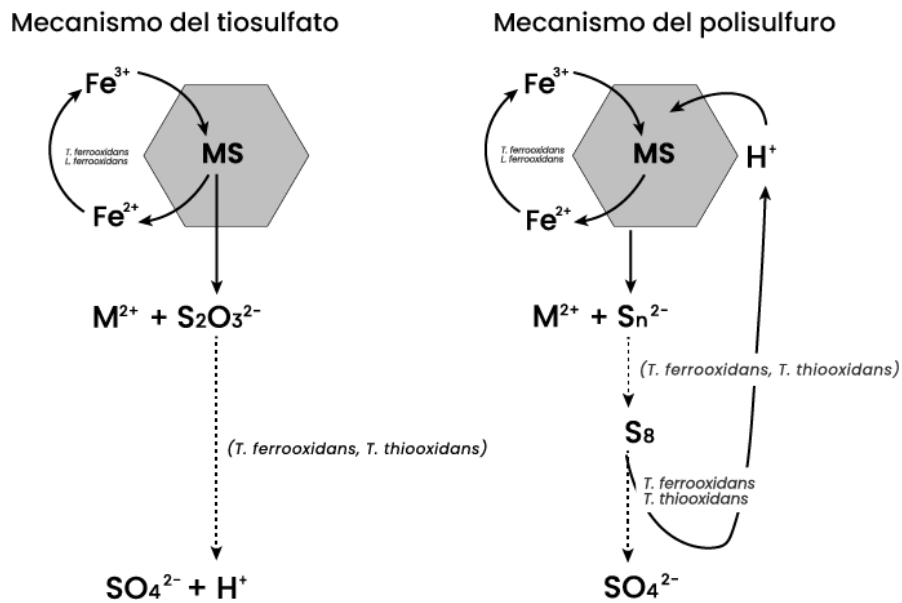
La utilización de microorganismos, baja los desechos antropogénicos desarrollados por la industria y se transforma en el método menos contaminante, ya que genera subproductos menos agresivos o de mayor facilidad a la hora de ser removidos como tratamientos biolixivantes.⁶

Los procesos fisicoquímicos descritos en el anterior párrafo tienen como incidencia las siguientes acciones interactivas, como son: precipitación, oxoreducción y adsorción, además de las medidas de afinidad para cuantificar metales, como: absorbancia, desorción y caracterización química que pueden ser involucradas dentro del proceso de biolixiviación.⁷

1.4. Incidencia de los microorganismos en la metalurgia extractiva

Para los procesos que provocan contaminación ambiental, encontramos aquellos que tratan minerales para purificar y extraer metales, las alternativas para generar un menor impacto son las bacterias, capaces de oxidar elementos contaminantes como las del tipo quimioheterótrofas (*Campylobacter*, *Pseudomonas*)⁸, a modo de ejemplo, estas bacterias transforman el azufre presente en los minerales en un componente de interés⁹, la reacción se encuentra detallada en la Figura 1.

Figura 1. Mecanismos de oxidación química y biológica del azufre a partir de minerales sulfurados



Fuente: (Tan et al., 2019)¹⁰

El proceso de lixiviación bacteriana tiene un impacto como cambiar las perspectivas para una minería más limpia, diversos experimentos desarrollados durante la década de los 70 proporcionaban datos de que las bacterias alimentadas del hierro podían incidir positivamente en la recuperación del mismo, y con un mecanismo de alimentación a través de CO_2 , se genera un espacio amplio en las tecnologías del uso de microorganismos en biolixiviación.¹¹

Históricamente, los microorganismos más comunes están descritos en dos géneros: las *Ferrobacillus* y las especies ferrooxidans, *sulfooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*, la ventaja económica es que complementan procesos químicos que no tienen impacto sobre las menas de baja ley, ya que este proceso no es rentable a causa de los métodos tradicionales, y a través de la utilización de estos microorganismos señalan a nuevos mercados, como la explotación de tierras raras de baja incidencia.⁷

1.5. Sistemas de detección de arsénico

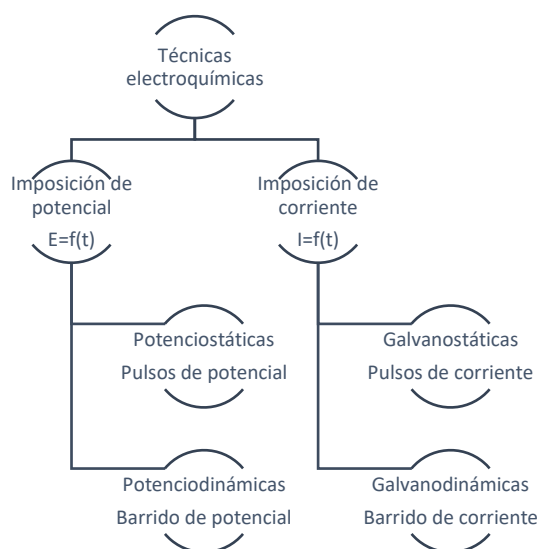
1.5.1. *Electroquímica*. Para las interfases descritas como conductor – disolución, hay procesos que se generan aleatoriamente o por perturbaciones, el estudio de los métodos de reacción descritas en estas fases se conocen como electroquímica analítica.¹²

Sobre las perturbaciones que se imponen tendrán un resultado diferente, que puede medirse, calibrarse y caracterizarse consecuentemente: las reacciones resultantes con el electrodo, cómo se produce esta alteración y la cantidad de analito, darán diversos tipos de información que deberán ser evaluadas según el tiempo hasta alcanzar un estado de equilibrio.¹³

La perturbación en un sistema químico puede ser caracterizada por una respuesta en el electrodo utilizado para medir las reacciones que ocurren en el sistema. Esta respuesta puede ser medida y calibrada para determinar la cantidad de analito presente en la muestra, y depende de la cantidad de analito presente en la muestra y de la perturbación que se está aplicando al sistema. Al analizarla, es posible obtener información sobre el analito y su concentración en la muestra.¹³

Este sistema utiliza una serie de principios teóricos que se basan en las reacciones oxido-reducción, para tener incidencia en la evaluación de semirreacciones, además de ser capaz de evaluar las curvas de intensidad y corriente, dando un potencial aplicado que mida la relación entre amperios y voltios, que sea evaluado por la intensidad de corriente que proporcione el electrodo de trabajo¹⁴, conforme se muestra en la Figura 2.

Figura 2. Clasificación de las técnicas electroquímicas



Fuente: (Gómez-Biedma et al., 2002)¹⁵

Para las interfases descritas los componentes requeridos para esta prueba analítica encontramos los siguientes:

- Seleccionar los microorganismos óptimos para el proceso de remoción de arsénico.
- Potenciostato-galvanostato: dispositivo en el cual a través de un flujo constante de corriente nos permite tener evaluaciones electroanalítica, este tiene por características las evaluaciones de intervalo de potencias, precisiones y rangos de operaciones, que a razón de los componentes descritos en los siguientes ítems dan como resultados variables eléctricas que pueden ser comparadas.¹⁶
- Celda de trabajo: componente donde ocurren las reacciones redox, en este se depositan los electrodos que tendrán las funciones de ser transistores de la corriente empleada.¹⁷
- Electrodo de trabajo: se realiza la reacción de interés, tiene por característica que sea polarizable, que tenga como muestra un cambio considerable hacia valores positivos, en los intercambios iónicos de las semirreacciones de oxoreducción.¹⁷
- Electrodo de referencia: a diferencia del anterior este tiene que tener por características ser no polarizable, además de que su potencial eléctrico sea estable, ya que este es el paso de corriente, puede verse inmerso con una solución de cloruro de potasio, o cloruro de plata.¹⁷
- Contraelectrodo: evita la transición de corrientes de alta, para que el electrodo de referencias pueda mantener su potencial eléctrico estable. Los materiales utilizados normalmente para este es carbono o platino.¹⁸
- Electrolito: es una solución con pH generalmente de 4 o 7 que es añadida como buffer asegurando la conductividad, entre sus funciones es que la corriente no se involucre hacia otros electrodos y que la composición que se dé con el analito no se vea alterada.¹⁹
- Voltamogramas: son los gráficos mostrados luego de la estabilización del ciclo, estos pueden ser medidos según las características que se hayan desarrollado para cada medición.²⁰

Para la evaluación de la incidencia microbiana, y sus características en la remoción de arsénico en los compuestos auríferos podemos encontrar los siguientes como esquemas de medición:

- Voltamperometría cíclica²¹
- Voltamperometría de onda cuadrada²²
- Voltamperometría de barrido lineal^{23,24}
- Cronoamperometría²¹

1.5.2. *Espectrometría de fluorescencia de rayos x (XRF)*. La detección de arsénico es un proceso crucial en muchos campos, desde la seguridad alimentaria hasta la exploración minera. El método de fluorescencia de rayos X (XRF) es una técnica comúnmente utilizada para la detección de arsénico. Esta técnica se basa en la emisión de rayos X cuando los electrones de una muestra son excitados por una fuente de radiación de alta energía. Estos rayos X emitidos son característicos de los elementos presentes en la muestra, lo que permite identificar la presencia y concentración de arsénico.²⁵

La técnica de XRF es una herramienta no destructiva, que no requiere la destrucción de la muestra, lo que la hace ideal para su uso en la industria alimentaria, la investigación ambiental y la exploración minera.²⁵ Además, es una técnica rápida y precisa, ya que puede detectar niveles de arsénico en la muestra a niveles de partes por millón (ppm) en cuestión de segundos.

Los resultados se obtienen de manera inmediata, lo que permite la toma de decisiones en tiempo real. La detección de arsénico mediante el método de XRF es una técnica valiosa en la evaluación de la calidad del agua potable, la detección de contaminantes en suelos y la identificación de metales pesados en productos de consumo, asegurando la seguridad del consumidor y del medio ambiente.²⁵

1.5.3. *Absorción atómica*. El método de absorción atómica es una técnica analítica ampliamente utilizada en la detección de arsénico. Esta técnica se basa en la medición de la absorción de radiación electromagnética por los átomos de arsénico en una muestra. La muestra se descompone en átomos individuales, y la radiación electromagnética se hace pasar a través de la muestra. La cantidad de radiación absorbida se mide y se utiliza para determinar la cantidad de arsénico presente en la muestra.²⁶

El método de absorción atómica es una técnica altamente selectiva y sensible para la detección de arsénico. Es capaz de detectar niveles de arsénico en la muestra de partes por billón (ppb), lo que la hace adecuada para su uso en la evaluación de la calidad del agua potable, la detección de arsénico en suelos y la identificación de metales pesados en productos de consumo.

Además, el método de absorción atómica es una técnica precisa y reproducible, que puede ser automatizada para analizar grandes cantidades de muestras de manera eficiente.²⁶

1.6. Microorganismos utilizados en la remoción de As (III)

1.6.1. *Rhizobium sp. NT-26*. Es un oxidante de arsenito quimiolitotrófico facultativo gram-negativo que se ha utilizado como organismo modelo para estudiar varios aspectos de la oxidación de arsenito.²⁷

Los tres genes reguladores, *aiiX*, *aiiS* y *aiiR*, se transcriben cuando se cultiva NT-26 en presencia o ausencia de arsenito. El operón *aiiXSR* está regulado positivamente en la fase estacionaria pero no por la presencia de arsenito en el medio de cultivo.²⁷

1.6.2. *Leptospirillum ferrooxidans*. Es una bacteria oxidante del hierro, se ha utilizado ampliamente para la lixiviación de los metales pesados esta de aquí se presenta como oxidante del Fe (+2), y pertenece al grupo de los mesófilos.²⁸

El grupo *Leptospirillum*, representa un pH óptimo de trabajo de 1,5 que se adapta en crecimiento para un medio de cultivo 9k, tiene una forma de vibrio móvil.²⁸

1.6.3. *Acidithiobacillus Thiooxidans*. Es una bacteria oxidante del azufre, se ha utilizado ampliamente para la lixiviación de los metales pesados que están contenidos en los minerales de sulfuro, como la pirita, la calcopirita y la arsenopirita.²⁹

A. thiooxidans se considera más óptima para oxidar el azufre elemental, debido a que este compuesto se usa como fuente energética para generar ácido sulfúrico bajando los niveles de acidez aumentando así el potencial de oxidación y reducción (ORP) para lixiviar el As existente en los concentrados de oro de los residuos mineros.²⁹

1.7. Mecanismos de transformación de arsénico por microorganismos

1.7.1. *Mecanismo de oxidación de As (III)*. Es la forma más antigua de mecanismo de desintoxicación utilizado por los microorganismos para deshacerse del exceso de As en su entorno.²

El primero, las bacterias oxidan el As (III) en As (V) antes de expulsarlo de la célula, el segundo tipo, usan el As (III) como donante de electrones durante la oxidación aeróbica convierten el As (III) a As (V) ganando energía en el proceso.²

La principal diferencia es que cada una obtiene energía de fuentes alternas, para que las bacterias puedan desintoxicar el As presente necesitan la enzima arsenito oxidasa. Algunas bacterias que realizan este tipo de proceso es la cepa de NT-26 *Rhizobium*.⁶

1.7.2. *Mecanismo de reducción de As (V)*. Este mecanismo involucra tres pasos primordiales para llevarse a cabo, en donde los microorganismos reductores de arseniato reducen el As (V).

Este proceso, inicia con los transportadores de fosfato *Pit* (transporte inorgánico de fosfato) y *Pst* (transporte específico de fosfato) absorben As como arseniato utilizando ferredoxina o glutatión como donante de electrones³⁰ provocando la expulsión de As (III) por la proteína de extrusión.⁹

Además, la reducción de As (V) a As (III) se da mediante la catalización de la enzima arsenato reductasa (ArsC), la cual es la responsable de suministrar la tolerancia al As que podrían llegar a tener ciertos tipos de microorganismos.³¹

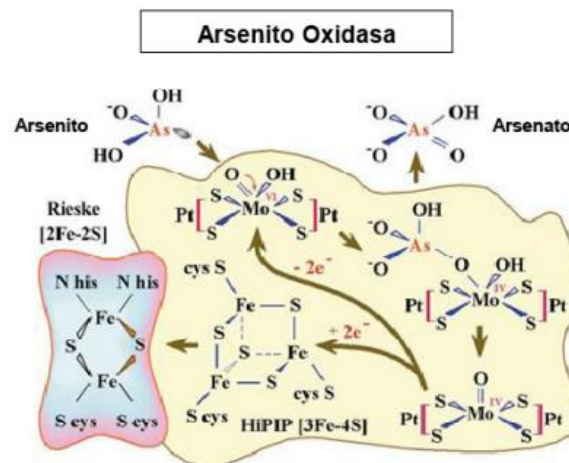
Otro mecanismo que tiene las bacterias para poder reducir el arseniato, es cuando hacen uso del As (V) como un receptor terminal de electrones.³⁰

1.7.3. *Enzima arsenito oxidasa (AOX)*. Es una enzima redox periplasmática con la capacidad de transformar As (III) a As (V), es mejor conocida como AOX, en sus siglas.² La estructura de esta enzima contiene una subunidad pequeña y otra grande.³⁰

El mecanismo de oxidación del arsenito mediante la enzima AOX radica en el ingreso de As (III) por un orificio en forma cónica que se encuentra en la superficie con dirección al lugar donde se encuentra el sustrato Mo (VI).²

Estos se encuentran dentro de la enzima produciendo una transferencia de un par de electrones del arsénico, en donde el arseniato se libera a través de la misma entrada y el Mo (VI) se reduce a Mo (IV). Más adelante, se completa la reacción oxidante de este ciclo catalítico por medio de una disociación de los productos de molibdeno (Mo) generando así en la estructura cristalina la enzima reducida.² Es por esto, que esta enzima AOX es fundamental para transformar As en vista de que se presenta en un sinnúmero de bacterias.

Figura 3. Modelo enzima arsenito oxidasa (AOX)



Fuente: (Montoya et al., 2015)¹

1.8. Situación actual y mercado mundial

La metalurgia del oro está en declive, sobre la base de las consideraciones del mercado mundial combinado con los conflictos internacionales, y las medidas monetarias. En el año en curso 2022, se explica que la incidencia de compra de oro, es una búsqueda necesaria desde el mercado ruso para fortalecer su moneda para frenar la embestida de occidente, en el bloqueo de sus materias primas. Esta repercusión, se ve explicada por la necesidad de inversión en otros commodities como: el gas natural, el recurso pétreo, y las tierras raras para la generación de chips que utilizan los mercados emergentes como base de trabajo.³²

Dado esto, la demanda de oro ha disminuido, y el mantenimiento del mercado dependerá de la inyección de oferta de este mineral, esto se puede ver a la generación de un nicho de explotación en el que se puede aprovechar el oro refractario. Se ha descubierto que los concentrados pueden estar enriquecidos con oro, ya que, el mineral puede unirse al arsénico mediante sitios estructurales del metal pesado. Químicamente, esto se ve explicado por los enlaces débiles que pueden generarse entre Au (II) y As (III), que hará que se estabilice en la molécula del mineral.³²

Los concentrados pueden ser caracterizados por la captura de arsénico y la liberación del oro a través de bombas que pueden utilizar diversos métodos para activar el mecanismo químico de captación de arsénico en sulfuros de hierro, otorgando facilidad en la liberación de grandes cantidades de oro.¹¹

1.9. Casos de aplicación en minería local.⁴⁶

Entre los procesos presentes para el tratamiento de minerales refractarios, se ha denotado un caso particular para ORENAS S.A, cuyo modelo innovador ha involucrado al proceso de biolixiviación como una solución objetiva a la rentabilidad de estos lechos mineros

Entre las características antes mencionadas de los relaves y recuperaciones refractarias se estudia la utilización excesiva de cianuro que representa un gasto innecesario ante la ineficiencia en el tratamiento de recuperación del oro y la plata, la formación de amalgamas que se anexan a la matriz mineralógica impiden el mecanismo de acción del cianuro con metales preciosos.³³

Dentro de los pretratamientos de los minerales refractarios se encuentran la molienda y trituración que transforman a estos minerales en un material fino.

Complementario a estos tratamientos, se desarrolla la flotación, buscando el desecho de minerales de condición estéril.³⁴

Los minerales refractarios presentes en la solución base tienen metales preciosos unidos a la pirita y la arsenopirita como amalgama, una de las características de esta solución es que en fase líquida presenta una condición de baja porosidad.³⁵

Al igual que otras consideraciones al proceso, hallamos el acondicionamiento de la solución con minerales con el fin de otorgar una superficie de contacto acorde a lo necesario con el uso de material pétreo inerte, facilitando las reacciones de oxidación - reducción de los microorganismos, punto importante es la torre de biolixiviación en la que el mecanismo de acción se ve condicionado por la interacción del licor lixivante, el aire y la solución con los metales de interés.³⁶

Entre las operaciones químicas que realizan los microorganismos se verán acciones de degradación u oxidación del material aurífero o de plata, que se transformarán en porosos, y la eliminación de otros metales pesados por oxidación del mismo como el caso de sulfuros y hierro.³⁵

La separación sólido-líquido se produce en la zona de descarga de la torre de biolixiviación, encontrando separaciones del material pétreo con adherentes del material que no se busca recuperar, así mismo los materiales pétreos son recirculados a otra etapa de acondicionamiento, los materiales de partícula fina que contiene oro, son llevados al proceso de cianuración en el que se descargan los líquidos residuales de la biolixiviación.³⁵

1.10. Evaluación ANOVA en modelos experimentales.

La evaluación de la varianza (ANOVA) es una técnica estadística comúnmente utilizada para analizar y comparar las medias de tres o más grupos en un proceso experimental, es una herramienta útil para determinar si hay diferencias significativas en los resultados de las pruebas en varios grupos, se divide en dos categorías principales: ANOVA de una vía y ANOVA de dos vías. El ANOVA de una vía se usa cuando hay un solo factor o variable independiente en el experimento, mientras que el ANOVA de dos vías se usa cuando hay dos o más factores o variables independientes en el experimento.³⁷

Este análisis permite a los investigadores evaluar la contribución relativa de cada uno de los factores del experimento en la variación de los resultados.

Para realizar una prueba ANOVA se calcula la suma de cuadrados totales (SCT) para toda la muestra y se descompone en la suma de cuadrados entre grupos (SCG) y la suma de cuadrados dentro de grupos (SCD).³⁷

El valor F se calcula dividiendo la variabilidad entre grupos por la variabilidad dentro de grupos. Si el valor de F es mayor que un valor crítico, se puede concluir que hay una diferencia significativa entre los grupos.³⁷

1.10.1. Design Expert en modelos experimentales. Es un programa informático que se utiliza en el diseño y análisis de modelos experimentales para procesos químicos y farmacéuticos, es útil para optimizar la formulación de productos, reducir los costos de producción y mejorar la calidad de los productos finales. Además, utiliza un enfoque de diseño de experimentos para analizar los datos, lo que permite a los investigadores identificar los factores críticos que influyen en los resultados del experimento y desarrollar modelos predictivos para optimizar el proceso.³⁸

Ofrece una variedad de funciones de análisis de datos, como análisis de varianza, gráficos de superficie de respuesta y análisis de regresión múltiple, que permiten a los investigadores visualizar y analizar los datos de manera efectiva, la herramienta ofrece una interfaz fácil de usar que permite a los usuarios crear diseños de experimentos complejos y realizar análisis estadísticos sofisticados sin la necesidad de una gran cantidad de experiencia en estadística.³⁸

1.10.2. SPSS. Es un software estadístico muy utilizado en el análisis de datos experimentales, esta herramienta es particularmente útil en la visualización de datos a través de gráficos, lo que permite a los investigadores identificar patrones y tendencias en los resultados de sus experimentos. En el caso de diseños experimentales, ofrece una variedad de opciones de gráficos para representar los datos de manera efectiva, incluyendo gráficos de barras, gráficos de líneas, gráficos de cajas y bigotes y diagramas de dispersión.³⁹

2. METODOLOGÍA

2.1. Tipo de estudio

El presente trabajo investigativo se desarrolló de carácter descriptivo, transversal y experimental, puesto que, se manipulan variables a analizar del mineral de arsenopirita, es decir, los diferentes tamaños de partícula de la muestra, con el objetivo de establecer la cantidad de As que puede removerse del concentrado mineral proveniente del cantón Zaruma, Provincia de El Oro.

2.2. Identificación de variables

2.2.1. Variable independiente

- Arsenopirita al 12%
- Cultivo microbiano mixto (cóctel)

2.2.2. Variable dependiente

- Parámetros microbiológicos (Biodisponibilidad)
- Parámetros electroquímicos (potencial de reducción, carga eléctrica, densidad de corriente, tiempo de análisis, eficiencia de la electrooxidación)

2.3. Población

La investigación tiene como zona de muestreo a una planta minera del sector Zaruma, cuyas coordenadas son descritas en la Figura 4.

Figura 4. Ubicación geográfica



Fuente: (Google Earth, 2022){Citation}

2.4. Muestra

Es importante asegurarse de obtener una muestra sólida de arsenopirita (FeAsS). Para lograr esto, se tomó varias muestras de diferentes áreas del depósito, además, se evitó la contaminación de la muestra durante el proceso de toma y almacenamiento, manteniéndola seca y libre de humedad.

Finalmente, se etiquetó claramente la muestra con información sobre su origen y fecha de recolección, para garantizar la trazabilidad y precisión de los resultados.

2.5. Materiales y métodos

2.5.1. Equipos

- Potenciómetro BOECO BT -6775
- Horno microondas
- Espectrofotómetro de UV Visible (UVmini-1240)
- Balanza analítica (Radwag modelo AS 220,X2)
- Potenciostato (CHI Instruments), equipado con un software CHI 1220B

2.5.2. Materiales

- Matraz Erlenmeyer 100 mL
- Varillas de vidrio
- Espátula
- Piseta
- Balón volumétrico 25 mL
- Frascos de vidrio 250 mL
- Celda electroquímica de 25 mL
- Electrodo de teflón punta de oro
- Electrodo de Ag/AgCl
- Electrodo de alambre de platino
- Lija de poro fino
- Micropipeta de 1 – 20 μL
- Micropipeta de 100 – 1000 μL
- Guantes desechables

2.5.3. Reactivos

- Patrón de As de 1000 $\mu\text{g/mL}$.
- Solución Buffer de acetato
- Solución Buffer de fosfato
- Solución Buffer sulfato ferroso

- MicroPolish powder
- Sulfato de amonio
- Sulfato de magnesio
- Sulfato ferroso
- Bifosfato de potasio
- Agarosa
- Ácido sulfúrico (98%)
- Agua destilada

2.5.4. *Microorganismos*

- Rhizobium sp. NT-26
- Leptospirillum Ferrooxidans
- Acidithiobacillus Thiooxidans

2.6. **Desarrollo Experimental**

Se investigará la capacidad de remoción de un proceso microbiológico a muestras de relaves y desechos mineros, buscando solucionar la eficiencia de los procesos y maximizar ganancias.

Se trabajó con 3 tratamientos los cuales tienen como incidencia dos repeticiones y se aplicó un tratamiento factorial con dos niveles. Cada una de las repeticiones estuvo compuesta por un biorreactor que albergaba un cóctel de cultivos microbianos más la concentración de arsenopirita.

2.6.1. Preparación de la muestra y caracterización. Para la preparación de una muestra de arsenopirita se desarrolla una serie de acciones desde el proceso de adquisición hasta su caracterización primaria.

Primero se debe obtener una muestra de arsenopirita en bruto extraída de un depósito de mineral, seguido a esto, se limpia la muestra para eliminar cualquier impureza visible como tierra o rocas adyacentes.

Adicionalmente, se tritura la roca utilizando un mortero de hierro hasta obtener partículas finas de aproximadamente 0,04 mm; 1,56mm y 3,485 mm, respectivamente.

Se utilizó una malla Tyler para el proceso de tamizado de muestra con el fin de separar fragmentos restantes, se debe conservar las muestras en un recipiente limpio y seco. La muestra se caracterizará mediante dos métodos: XRF GoldExpert y absorción atómica.

2.6.2. *Preparación de medios de cultivo y crecimiento bacteriano.* Las distintas cepas de los microorganismos a emplear *Rhizobium sp. NT-26*, *Leptospirillum Ferroxidans* & *Acidithiobacillus Thiooxidans*, fueron donadas por la planta de beneficio ORENAS que monitorea constantemente el proceso de biolixiviación.

2.6.2.1. *Preparación de medio de cultivo 9K.* El medio de cultivo 9K se realizó en base a las características descritas en la tabla 1, correspondiente al modelo propuesto por Silverman y Lundgren modificado a pH 2.

TABLA 1. Composición del medio de cultivo 9K

Componente	Nomenclatura	g/100ml	Uso
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	1	Solución 1
Sulfato de magnesio	MgSO ₄	0,15	Solución 1
Fosfato de potasio	K ₃ PO ₄	0,05	Solución 1
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	2 ml 0,5N	Solución 2
Agarosa	D-galactosa 3,6-anhidro-L-galactosa	1	Solución 2
Sulfato Ferroso	FeSO ₄	1	Ajustar pH a 2

Fuente: (Silverman & Lungren, 1959)⁴⁰

2.6.2.2. *Preparación del medio agar papa dextrosa.* El medio agar papa dextrosa, se realizó en base a las características descritas en la tabla 2, correspondiente al modelo Narrea y Malpartida.⁴¹

TABLA 2. Preparación del medio agar papa dextrosa

Acción	Cantidad	Característica
Pesaje	15,6 mg	Medio Sólido
Calor	< 70 °C	Temperatura Constante
Diluir	100 ml	Medio Acuoso
pH	7	NaOH 0,1 N
Autoclave	15 psi 121°C	1

Fuente: (Narrea & Malpartida, 2013)⁴¹

2.6.2.3. *Crecimiento bacteriano.* Se colocaron 6 biorreactores aireados con capacidad de 300 ml, a partir de que se realizarán 3 tratamientos con 2 repeticiones en donde se encontrará el mineral a tratar en conjunto con el microorganismo biolixivante.

A continuación, en la tabla 3 se señalan los tratamientos experimentales con los tamaños de partícula pasante de: malla Tyler 325, < 14 y > 6, respectivamente.

TABLA 3. Tratamientos instalados para la biolixiviación de arsenopirita

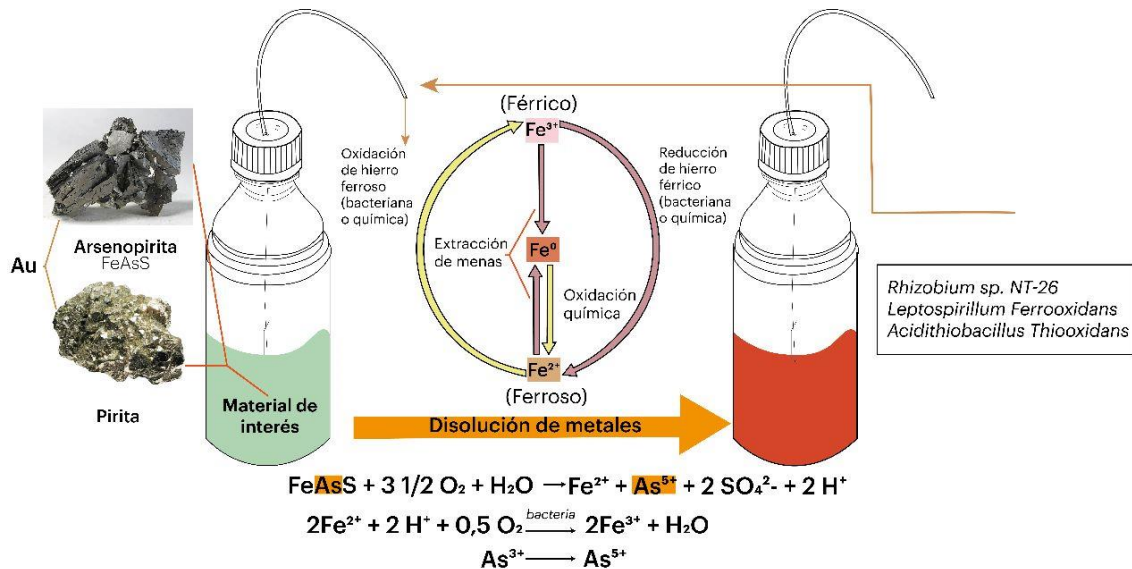
Tratamiento	Medio de cultivo 9k	Cultivo mixto	Mineral FeAsS	Tamaño de Partícula
T1 25 °C	B1	100 ml	140 ml	2 g
	B2	100 ml	140 ml	2 g
T2 25 °C	B3	100 ml	140 ml	3,5 g
	B4	100 ml	140 ml	3,5 g
T3 25 °C	B1	100 ml	140 ml	5 g
	B3	100 ml	140 ml	5 g

Fuente: Elaboración Propia

Al principio, los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente (alrededor de 26 a 28°C) sin agitarse y tardaron alrededor de 14 días en crecer.

Sin embargo, cuando se agitaron los cultivos a 60 rpm sin variar la temperatura, el tiempo de crecimiento se acortó a solo 7 días y se puede observar su accionar en la Figura 5.

Figura 5. Acción química producida en los biorreactores



Fuente: Elaboración propia.

2.6.3 Valoración de los microorganismos

2.6.3.1 *Valoración colorimétrica.* La valoración colorimétrica del arsénico es un conjunto de técnicas analíticas que se utiliza para determinar la cantidad de arsénico presente en una muestra.

- Arsenic test kit.

Este método es útil en la evaluación de la presencia de arsénico en las aguas residuales, ya que la presencia de arsénico puede tener graves consecuencias para la salud humana. La técnica de valoración colorimétrica del arsénico es sensible y precisa, lo que la convierte en una herramienta valiosa para la monitorización y control de la calidad del agua potable.

En el cual, las especies de arsénico acuoso se convierten en hidruro de arsénico gaseoso mediante la adición de reductores químicos agentes en una botella de reacción. El gas hidruro de arsénico resultante reaccionará con una tira de prueba de bromuro de mercurio ubicada en el espacio de cabeza de la botella del reactor, formando un complejo coloreado que cambia de amarillo a naranja a marrón con concentraciones crecientes de arsénico. El final el color se comparará con una tabla de colores calibrada por concentración proporcionado por el fabricante para determinar el arsénico del agua concentración.

- UV Visible

Se determinó la formación de un complejo estable entre el arsénico y el cloruro de hierro (III) para que en ella se determinará la longitud de onda específica en función del valor de la absorbancia.

Para el desarrollo de este método, se utiliza una solución de Mohr, que permita la evaluación de este método, para preparar esta solución se utilizó una relación 1:1 entre sus componentes, la misma se encuentra descrita en la tabla 4.

TABLA 4. Composición de la solución de Mohr

Compuesto	Nomenclatura	Concentración	Cantidad utilizada
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	98%-99%	10 ml
Cloruro Férrico	FeCl ₃	3%	10 ml

Fuente: Elaboración Propia

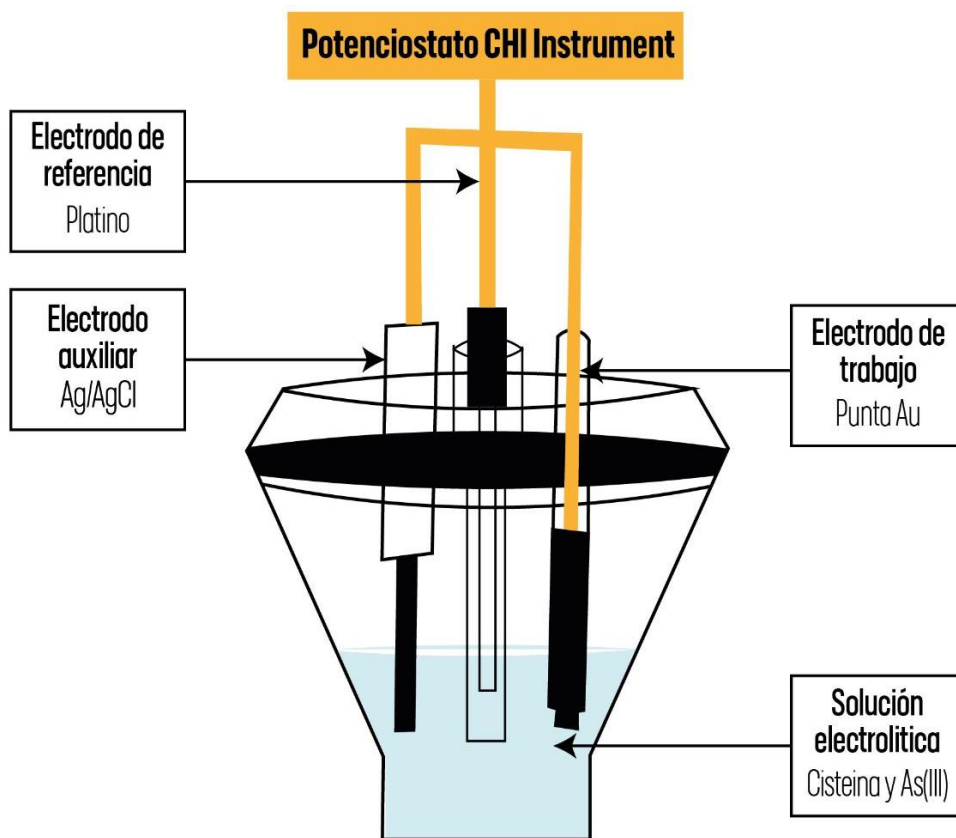
La colorimetría del medio varía una vez el crecimiento bacteriano se desarrolla en los biorreactores, teniendo como indicador un color pardo rojizo por la oxidación de iones Fe (II) a iones Fe (III), así mismo se generó un cambio en el sustrato para poder tener una mayor formación de colonias.

2.6.4 Determinación de la concentración de arsénico. La determinación de la concentración de arsénico se realizó en el laboratorio de electroanalítica de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud en la Universidad Técnica de Machala.

2.6.4.1 Medición de As (III) y As (V). Fue determinada en función a las metodologías analíticas de referencia a predominando el uso de tres métodos analíticos, empleando el potencióstato CHI 1220B. Se utilizó los electrodos de: teflón punta de oro, plata cloruro de plata y alambre de platino, en función a la mayor eficiencia en base a la oxidación de arsénico durante la medición de As (III).

La Figura 6 muestra la configuración, el electrodo de referencia se colocó dentro de un contenedor electrolítico que contenía la misma solución electrolítica de NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sin analito, para evitar su contaminación.

Figura 6. Esquema de la celda electroquímica con arreglo de tres electrodos



Fuente: Elaboración Propia

2.6.4.2 *Preparación de curva de calibración.* Se preparan los estándares de arsénico mediante la adición de volúmenes específicos de una solución patrón de 1000 ppm a balones volumétricos de 25 mL. Se obtuvieron diluciones con agua destilada desde la solución patrón de 0,1, 1, 5, 10 y 20 ppm. Se realizó la lectura de las concentraciones en base a la intensidad versus el amperaje empleando en el software CHI 1220B, y se proceden a leer los datos de la curva, y de las muestras a evaluar, para poder llevar los datos al sistema de tabulación.

2.6.4.3 *Optimización de los parámetros para determinar As.* Se aplicaron la técnicas y condiciones descritas en la tabla 5, sumergiendo los electrodos en la celda acompañados de una solución cisteína en concentración 0,01 M.

TABLA 5. Parámetros utilizados para los tres métodos electroanalíticos

Voltamperometría de Onda Cuadrada							
Init E (V)	High E (V)	Incr E (V)	Amplitude (V)	Frequency (Hz)	Quiet time (sec)	Sensivity (A/V)	
1	-1	0,004	0,025	15	2	1 e-005	
Voltamperometría Cíclica							
Init E (V)	High E (V)	Low E (V)	Final E (V)	Initial Scan Polarity	Scan Rate (V/t)	Sweep Segments	Sensivity (A/V)
0	1	-1	0	Negative	0,05	3	1 e-005
Cronoamperometría							
Init E (V)	High E (V)	Low E (V)	Initial Scan Polarity	Number of Steps	Sample Interval (sec)	Quiet time (sec)	Sensivity (A/V)
0	1	-1	Negative	2	0,001	2	1 e-005

Fuente: Elaboración Propia

2.6.5 *Análisis de datos.* Para hacer la recopilación de datos se evaluaron los microorganismos, el tiempo de tratamiento y la repetición de cada proceso en un biorreactor diferente, para obtener valores que puedan cumplir con la determinación de la normalidad, la igualdad de varianzas y un análisis ANOVA.

2.6.5.1 Determinación de la normalidad.

- *Gráfico de caja y bigote*

Se denotó la distribución de los datos a través de la representación gráfica de la media, mediana, cuartiles y valores atípicos. Así mismo se comprobó que la distribución es normal para que los puntos en el gráfico deberían formar una línea recta y sin valores atípicos.

- *Prueba Shapiro-Wilk*

Se verificaron los requisitos de una distribución normal de los datos mediante el estadístico W.

Si el valor-p es mayor que un nivel de significación establecido se puede asumir que los datos son normales. Ejecutamos esta prueba a través del estadístico en ec(1).

Ecuación 1. Estadístico de la prueba Shapiro-Wilk

$$W = \frac{(\sum_{i=1}^n \alpha_i x_i)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (1)$$

Fuente: (Hanusz et al., 2016)⁴²

2.6.5.2 Igualdad de varianzas

- *Test Levene*

Se comparó las varianzas de dos o más grupos para determinar si existen diferencias significativas entre ellas. Si el valor-p es mayor que un nivel de significación establecido se puede asumir que las varianzas son iguales.⁴³

2.6.5.3 Representación Gráfica

- *IBM SPSS Statistics*

Los valores analizados serán graficados en SPSS, por la facilidad de integrar estos resultados previos con el programa y obtener gráficas que facilitan la interpretación de los resultados, se obtuvieron además las caracterizaciones de las varianzas, con el fin de interpretar cuanto es la eficiencia de cada uno de los biorreactores con el objetivo de tesis.⁴⁴

Para graficar los resultados de un diseño experimental en SPSS, se debe seleccionar la opción de "gráficos" en el menú de análisis. Ofrece opciones para personalizar los gráficos, como la adición de etiquetas, títulos y leyendas, para que los investigadores puedan comunicar de manera efectiva sus resultados.⁴⁴

Además, los gráficos generados por SPSS pueden exportarse a otros programas, como Microsoft Word o Excel, para su posterior uso en informes y presentaciones. En resumen, SPSS es una herramienta útil para la visualización de datos experimentales a través de gráficos personalizables y exportables.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados

3.1.1. *Caracterización de las muestras de FeAsS.* La caracterización de la muestra se realizó a través de un equipo analizador XRF GoldExpert utilizando 7,6 gr de muestra de material con 3 repeticiones descrito en la tabla 3.

Para corroborar esta información se tomó como recurso a un laboratorio certificado con el método de absorción atómica cuyos resultados se encuentran descritos en el Anexo 10.

TABLA 6. Análisis XRF para una muestra de arsenopirita aurífera

Elemento	Concentración	
LE	89,62	%
Si	4,73	%
Al	2,28	%
Fe	7668	ppm
Mg	6300	ppm
S	5860	ppm
K	5208	ppm
Ca	4540	ppm
As	675	ppm
Ti	779	ppm
Zn	338	ppm
Au	260	ppm
Mn	151	ppm
Cu	140	ppm
Pb	109	ppm

Fuente: Laboratorio TecnoEscala

TABLA 7. Análisis de absorción atómica del concentrado de arsenopirita aurífera

Codificación	Fecha	Concentración (ppm)	Tiempo de proceso (días)	Incertidumbre
M1-B1	16-01	480,59	0	± 0,025
M1-B2	16-01	460	0	± 0,030
M1-B3	18-01	530,15	0	± 0,025
M1-B4	22-01	512,22	0	± 0,030
M2-B1	20-01	180,15	4	± 0,030
M2-B2	20-01	210,20	4	± 0,030
M2-B3	21-01	220	3	± 0,030
M2-B4	25-01	215	3	± 0,025
M3-B1	23-01	110,08	7	± 0,020
M3-B2	23-01	108	7	± 0,030
M3-B3	25-01	140,54	7	± 0,020
M3-B4	29-01	130,12	7	± 0,030
M4-B1	30-01	15.007	14	± 0,025
M4-B2	30-01	18	14	± 0,030
M4-B3	02-02	32	14	± 0,030
M4-B4	06-02	20	14	± 0,025

Fuente: Elaboración Propia

TABLA 8. Análisis de electroquímica del concentrado de arsenopirita aurífera

Codificación	Fecha	Concentración (ppm)	Tiempo de proceso (días)	Incertidumbre
M1-B1	16-01	450	0	± 0,025
M1-B2	16-01	440	0	± 0,030
M1-B3	18-01	490	0	± 0,025
M1-B4	22-01	480	0	± 0,030
M2-B1	20-01	250	4	± 0,030
M2-B2	20-01	240	4	± 0,030
M2-B3	21-01	280	3	± 0,030
M2-B4	25-01	270	3	± 0,025
M3-B1	23-01	110	7	± 0,020
M3-B2	23-01	120	7	± 0,030

TABLA 8. (Continuación)

Codificación	Fecha	Concentración (ppm)	Tiempo de proceso (días)	Incertidumbre
M3-B3	25-01	150	7	± 0,020
M3-B4	29-01	140	7	± 0,030
M4-B1	30-01	20	14	± 0,025
M4-B2	30-01	10	14	± 0,030
M4-B3	02-02	40	14	± 0,030
M4-B4	06-02	20	14	± 0,025
M5-B1	07-02	4	21	± 0,030
M5-B2	07-02	4	21	± 0,030
M5-B3	09-02	10	21	± 0,030
M5-B4	11-02	8	21	± 0,030
M6-B1	12-02	0,780	28	± 0,030
M6-B2	12-02	0,900	28	± 0,030
M6-B3	14-02	4	28	± 0,030
M6-B4	16-02	1	28	± 0,025

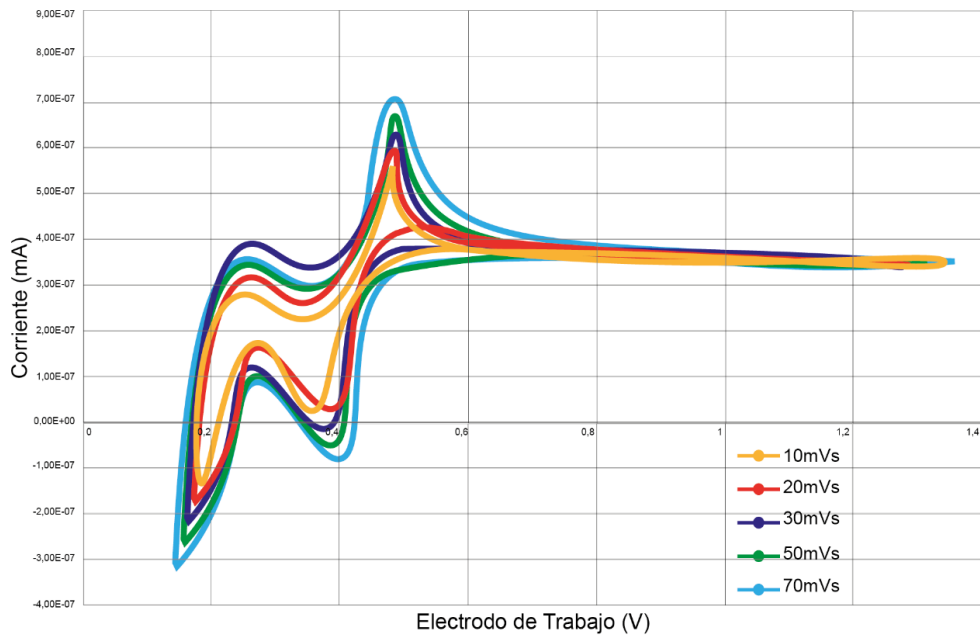
Fuente: Elaboración Propia

3.1.2. *Efecto del rango de escaneo en voltamperometría cíclica para As (III).* Para el método de voltamperometría cíclica se tomaron correcciones a la caracterización de As, se realizó un voltamograma cíclico de electrodo de Pt en una solución de arsénico con una concentración de 1 ppm y un pH de 6,5. Se obtuvieron datos a diferentes rangos de escaneo.

En el voltamograma cíclico, se observó un pico anódico de corriente I_a a 0,5 V y un pico catódico de corriente I_c a 0,4 V. Estos picos indican la presencia de un proceso cuasi reversible, la intensidad de la corriente de pico aumenta a medida que se incrementa el rango de escaneo.

No obstante, se encontró que al utilizar un rango de escaneo alto (igual o superior a 70 mVs⁻¹), se producen más interferencias durante el proceso. Por lo tanto, se determinó que la velocidad óptima de trabajo es de 50 mVs⁻¹.

Figura 7. Voltamograma de concentraciones de As (III), para calibración de equipo, en diferentes rangos de escaneo

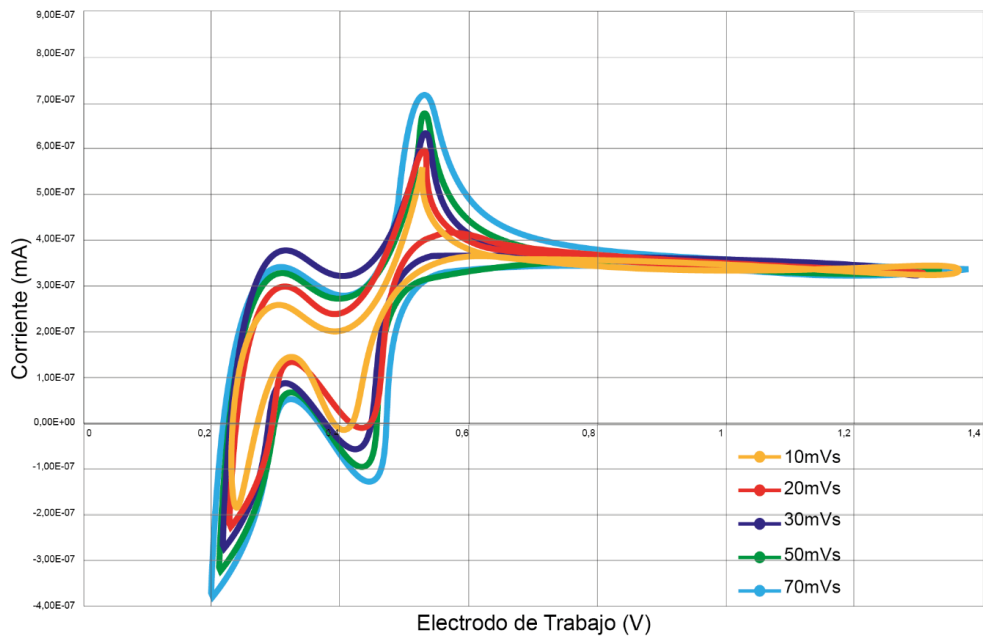


Fuente: Elaboración Propia (Equipo CHI 1220b)

3.1.3. Efecto del rango de escaneo en voltamperometría biorreactores de arsenopirita.

Se realizó un voltamograma cíclico de electrodo de Pt en muestras de biorreactores de 2 g de arsenopirita a una concentración de +200 ppm As y un pH de 6 a una temperatura de 25°C. Se obtuvieron datos a diferentes rangos de escaneo.

Figura 8. Voltamograma de biorreactores de arsenopirita, con presencia de As (III), en diferentes rangos de escaneo



Fuente: Elaboración Propia (Equipo CHI 1220b)

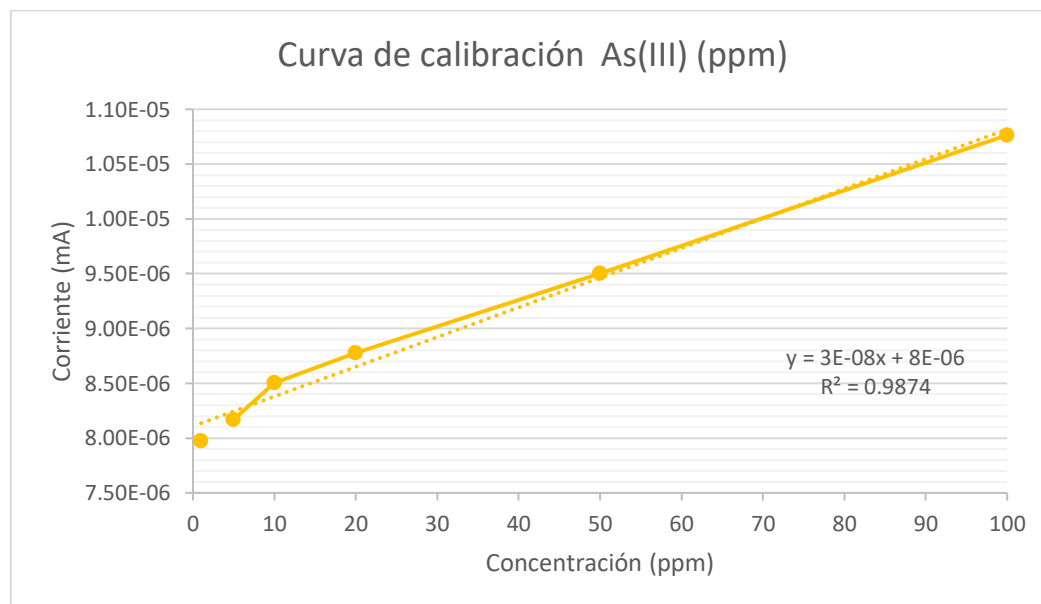
En las muestras de los biorreactores, se observó que el voltamograma cíclico presentó un pico anódico de corriente I_a a 0,5 V. Sin embargo, no se detectó ningún pico catódico de corriente, lo que indica que el proceso es irreversible.

Asimismo, se observó que al igual que con el As (III), la intensidad de la corriente de pico aumenta proporcionalmente con el aumento del rango de escaneo, al utilizar una velocidad igual o superior a 70 mV s^{-1} , se presentan más interferencias en la gráfica. Por lo tanto, se determinó que la velocidad óptima es la misma expuesta en la Figura 7.

3.1.4. Curva de calibración de las concentraciones de As (III).

3.1.4.1. Curva de calibración As. rango 1 ppm -100 ppm. Esta curva nos permite verificar la linealidad y sensibilidad del sistema, usando un patrón de As certificado, así mismo nos permite corregir errores en el potencial. Las muestras fueron evaluadas en concentraciones de: 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm y 100 ppm. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: $f=10 \text{ Hz}$, $\Delta E_p=100 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$.

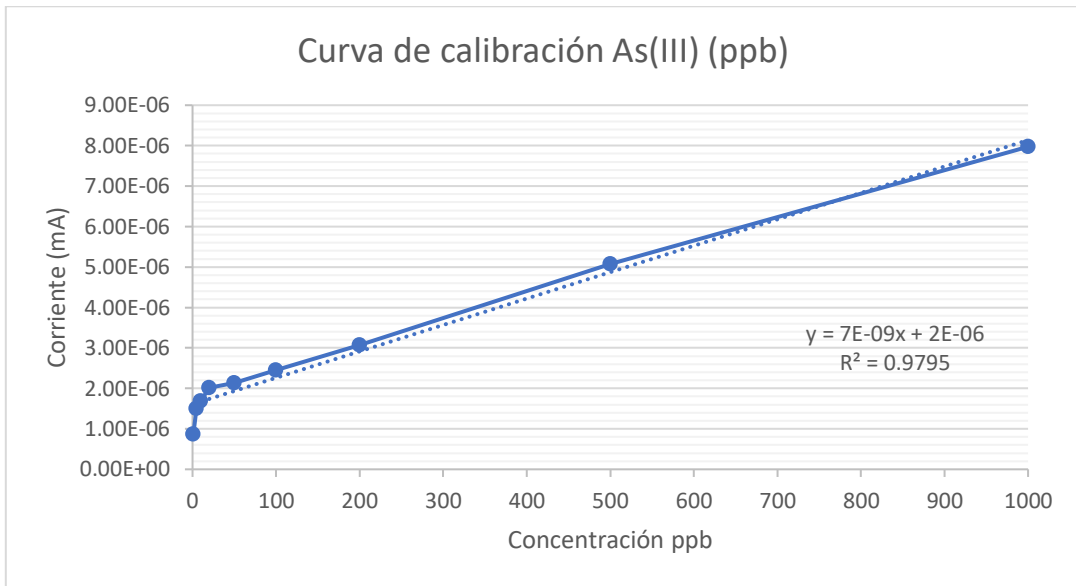
Figura 9. Curva de calibración de patrón As (III), para lecturas de analitos en los biorreactores



Fuente: Elaboración propia (Microsoft Excel)

3.1.4.2. Curva de Calibración As. Rango 1 ppb -1000 ppb. Estas muestras fueron evaluadas en concentraciones de: 1 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 50 ppb, 100 ppb, 200 ppb, 500 ppb y 1000 ppb. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: $f=10 \text{ Hz}$, $\Delta E_p=100 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$.

Figura 10. Curva de calibración de patrón As (III), para lecturas de analitos en los biorreactores

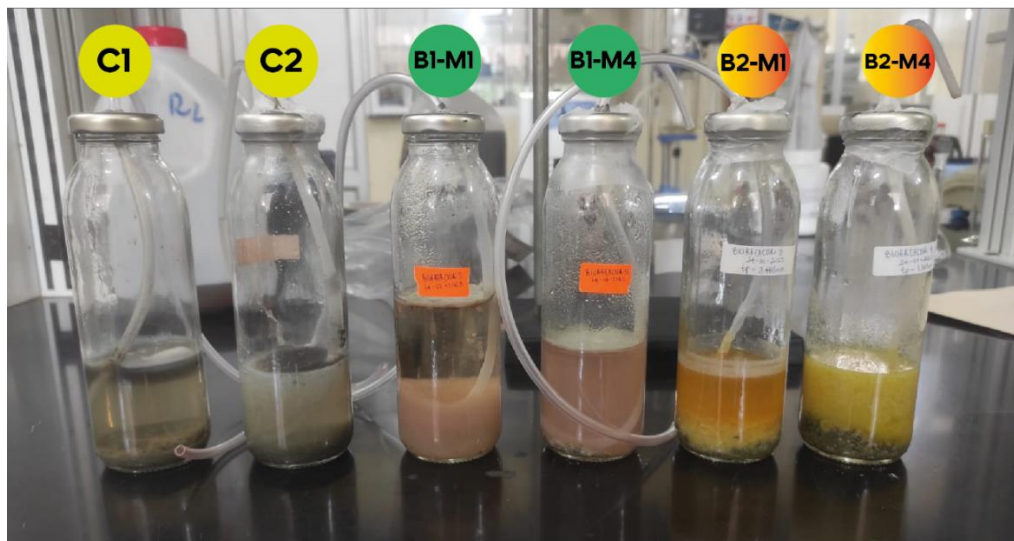


Fuente: Elaboración propia (Microsoft Excel).

La validez de los resultados se comprobó a través de análisis de laboratorio certificado para tener constancia de la medición exacta del potenciostato, así mismo, se vio dirigida por variaciones de concentraciones a razón de las reacciones químicas desarrolladas.

3.1.5. Relación colorimétrica y concentración. La evaluación colorimétrica de Arsénico (As) en medios de cultivo es una técnica ampliamente utilizada para detectar la presencia de este contaminante en muestras ambientales, incluidos los medios de cultivo utilizados en microbiología.

Figura 11. Concentrado de muestras y control



Fuente: Elaboración propia.

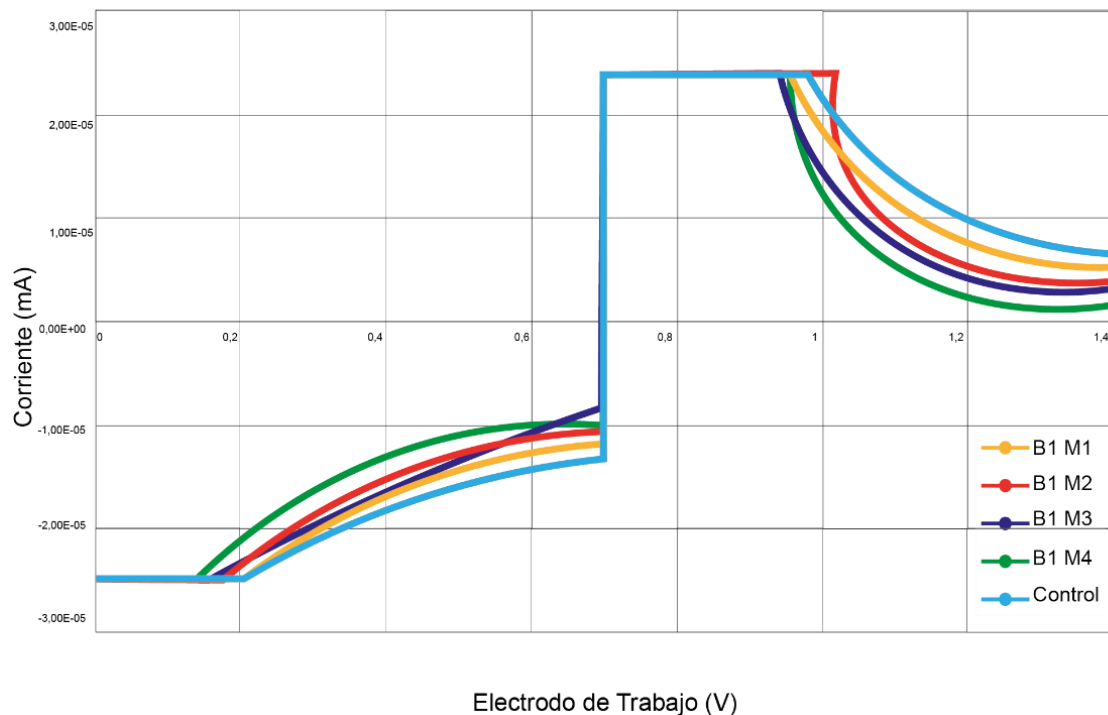
El medio de cultivo 9K es un medio comúnmente utilizado para el cultivo de bacterias nitrificantes, que son importantes para el ciclo del nitrógeno en el suelo y el agua. Los medios de control, son evaluados a partir de la formulación del medio 9K, desarrollado en la metodología de este trabajo de investigación.

El tiempo mínimo necesario para alcanzar la fase de crecimiento exponencial es de 3 a 4 días, llegando su punto estacionario a partir del día 15. Entre las características de cambios, es el color de los biorreactores, dependiendo del material evaluado y las condiciones de pH, puede variar entre un rojo pardo, a un amarillo.

3.1.6. *Evaluación de la concentración de As por cronoamperometría.* La concentración de As se puede calcular utilizando la Ley de Faraday, que relaciona la cantidad de As reducido en el electrodo con la corriente medida en la solución. Con esta técnica se puede lograr una detección muy sensible y selectiva para la especie de interés.

3.1.6.1. *Evaluación experimental del biorreactor 1.* En este biorreactor, se observa como a través de la toma de muestras, el nivel de detección del metal pesado va disminuyendo, así mismo cumple con el principio de linealidad. Como pico del sistema vemos una corriente cercana a 9×10^{-6} mA.

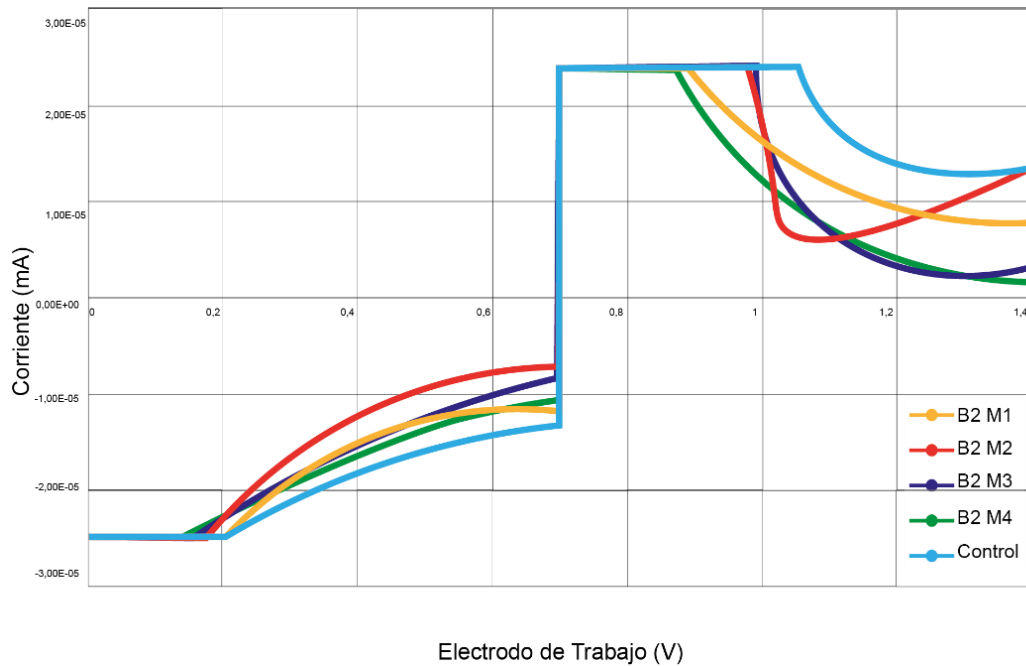
Figura 12. Evaluación por Cronoamperometría de la concentración de arsénico en las muestras del tratamiento 1



Fuente: Elaboración propia (Equipo CHI 1220b).

3.1.6.2. *Evaluación experimental del biorreactor 2.* En este biorreactor, se observa como a través de la toma de muestras el nivel de detección del metal pesado va disminuyendo, así mismo, cumple con el principio de linealidad, como pico del sistema vemos una corriente cercana a 1.3×10^{-5} mA.

Figura 13. Evaluación por Cronoamperometría de la concentración de arsénico en las muestras del tratamiento 2



Fuente: Elaboración propia (Equipo CHI 1220b).

3.1.7. *Evaluación de la concentración de As por cronoamperometría.* Para el análisis de concentración se utilizó la fórmula, previamente obtenida en la curva de calibración: $y = -3 \times 10^{-8}x + 10^{-5}$ & $y = -7 \times 10^{-9}x + 10^{-6}$. Las muestras fueron diluidas para su medición en una proporción 1/10.

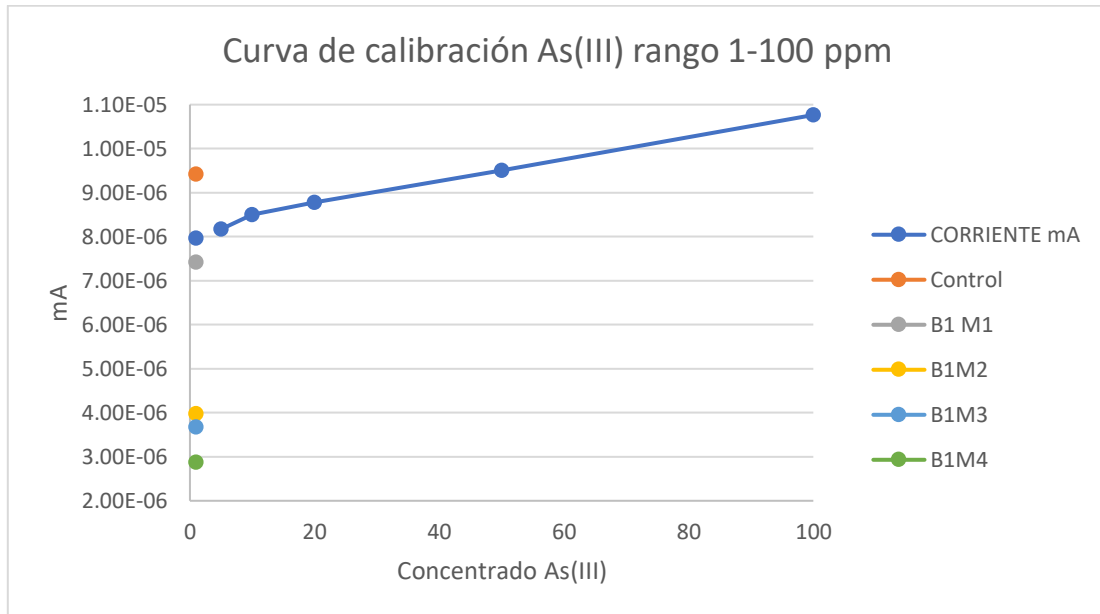
Tabla 9. Evaluación de corriente y concentración para procesos de biorreactor

	Corriente	Concentración (ppm)	Tiempo de proceso (días)	Varianza (ppm)
Control	0,000009423	46	0	0
B1-M1	0,000007427	0,8	4	-45,2
B1-M2	0,000003985	0,7	7	-0,1
B1-M3	0,000003676	0,1	10	-0,6
B1-M4	0,000002876	0,09	13	-0,001

Fuente: Elaboración propia.

3.1.7.1. *Concentración control y puntos de referencia.* En la siguiente imagen se muestra puntos de control de los biorreactores como base de referencia en la curva de calibración de As (III), con rango de detección en ppm.

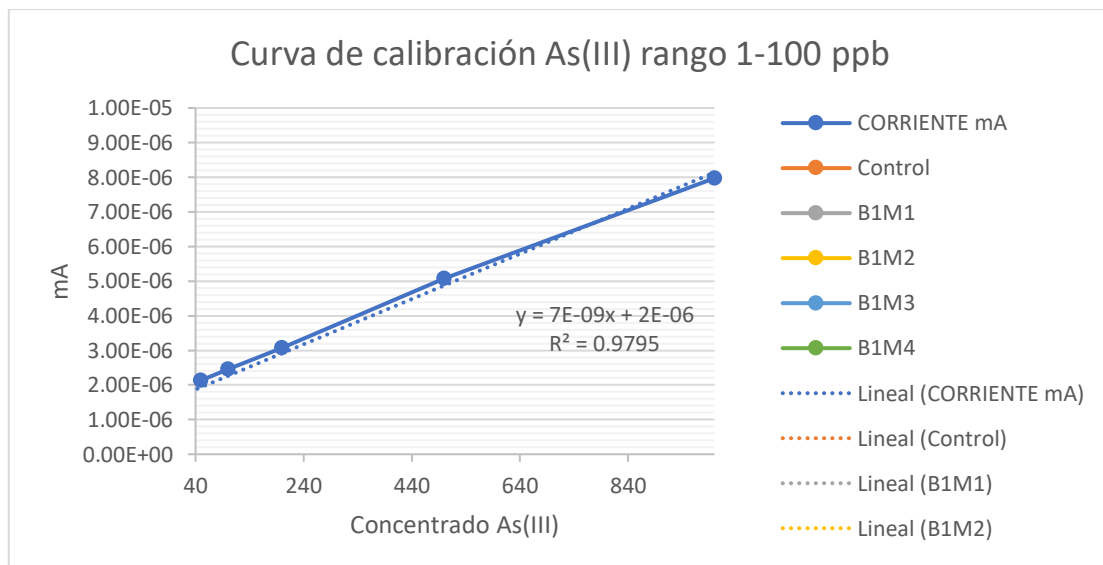
Figura 14. Evaluación de las muestras en la curva de calibración ppm



Fuente: Elaboración propia (Microsoft Excel).

Figura 15. Evaluación de las muestras en la curva de calibración ppb

En la siguiente imagen se muestra puntos de control de los biorreactores como base de referencia en la curva de calibración de As (III), con rango de detección en ppb.

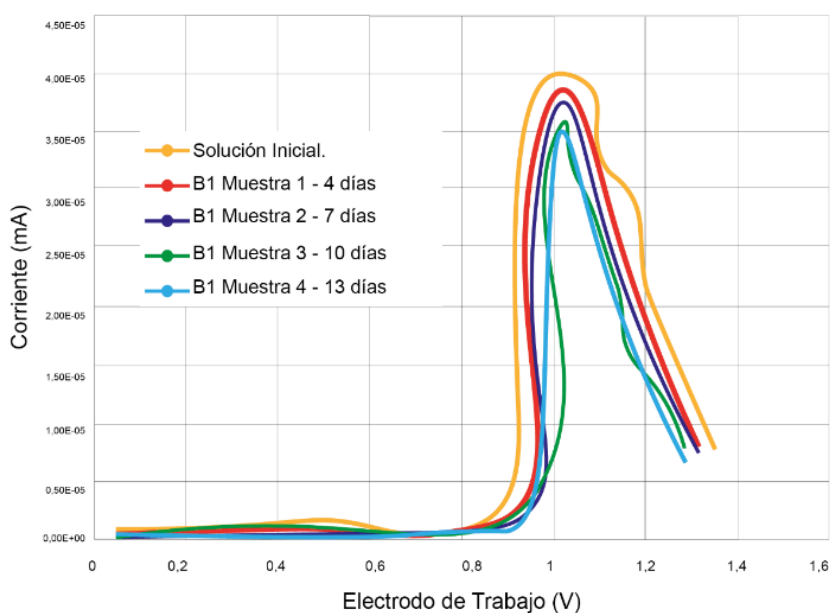


Fuente: Elaboración propia (Microsoft Excel).

3.2. Optimización de los parámetros de control en voltamperometría de onda cuadrada

3.2.1. *Efecto del biorreactor 1, en la concentración de As (III)*. Se llevó a cabo un estudio para evaluar el efecto de los biorreactores utilizando como modelo una muestra con una concentración inicial de 240 ppm y una caracterización final de 25 ppm.

Figura 16. Gráficas superpuestas, voltamperometría de onda cuadrada tratamiento 1.



Fuente: Elaboración Propia (Equipo CHI 1220b)

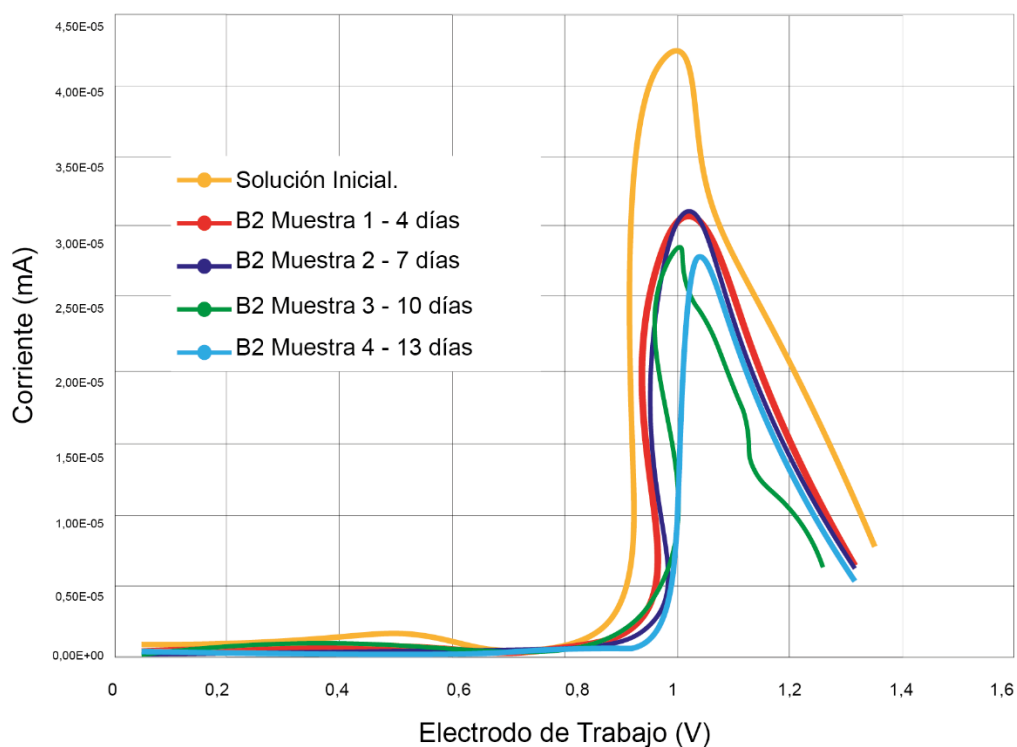
Las condiciones de la SWV utilizada fueron: $f=10$ Hz, $\Delta E_p=100$ mV, $\Delta E_s = 10$ mV. Los resultados obtenidos muestran una mejora en la respuesta electroquímica en las muestras tratadas en los biorreactores, lo que se evidenció en una intensidad de pico más pronunciada y definida en comparación con la muestra original sin tratamiento.

Además, se encontró que las características del diseño experimental dieron como resultado una disociación del arsénico hacia un estado más excitado, lo que sugiere una mayor eficiencia en el proceso de eliminación de arsénico en las muestras tratadas en los biorreactores.

3.2.2. *Efecto del biorreactor 2, en la concentración de As (III)*. Se llevó a cabo un estudio para evaluar el efecto de los biorreactores en la respuesta electroquímica utilizando como modelo una muestra concentrada.

Parte con una concentración inicial de 330 ppm y una caracterización final de 40 ppm. Las condiciones de la SWV utilizada fueron: $f=10$ Hz, $\Delta E_p=100$ mV, $\Delta E_s = 10$ mV.

Figura 17. Gráficas superpuestas, voltamperometría de onda cuadrada tratamiento 2.



Fuente: Elaboración Propia (Equipo CHI 1220b)

Hay una incidencia en la corriente, que indica que la concentración inicial es mucho más alta en este proceso. Además, se encontró que las características del diseño experimental dieron como resultado una disociación del arsénico hacia un estado más excitado, lo que sugiere una mayor eficiencia en el proceso de eliminación de arsénico en las muestras tratadas en los biorreactores.

3.2.3. Evaluación de la concentración del analito a través del tiempo de exposición. Cada biorreactor fue evaluado, según las características del experimento, a través de su cambio de coloración, en los biorreactores 3 y 4, esta incidencia se dio a través de una colorimetría de color amarillo, mostrada en la Figura 11, y para los biorreactores 1 y 2, la misma se dio de color pardo rojizo. Ambos demuestran la presencia de microorganismos, en el desarrollo de él.

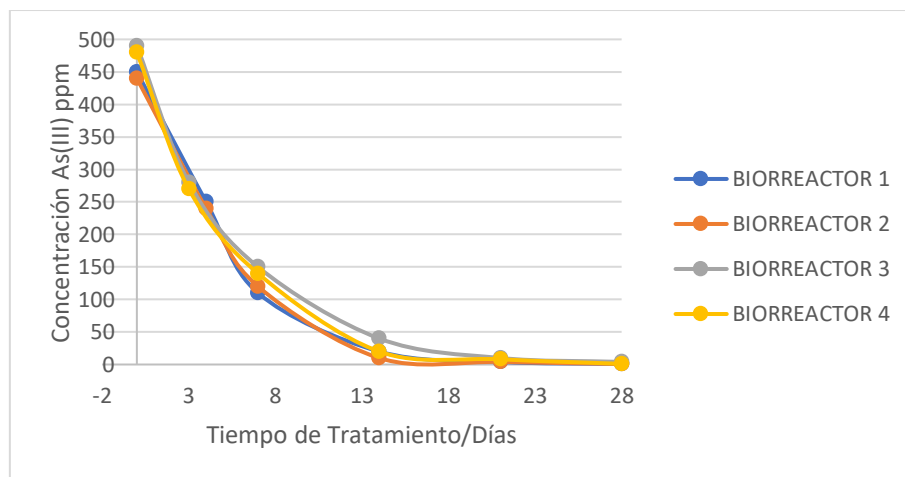
3.2.3.1. Evaluación superpuesta concentración de As (III). Los gráficos presentan datos de concentración de cuatro biorreactores diferentes (biorreactor 1, 2, 3 y 4) durante un período de 28 días. Cada biorreactor se identifica por un código (M1B1, M1B2, M1B3, M1B4 para el primer día, y así sucesivamente). La concentración de compuestos orgánicos en cada biorreactor se mide en ppm y se registra en intervalos de tiempo específicos.

La Figura 18 muestra que los cuatro biorreactores se comportan de manera diferente a lo largo del tiempo, con diferentes concentraciones de compuestos orgánicos en cada uno. Biorreactor 1 tiene la concentración más alta al principio del experimento, pero disminuye rápidamente y alcanza una concentración muy baja en el día 28. Para el biorreactor 2 tiene una concentración inicial ligeramente menor y disminuye de manera similar. Mientras que biorreactor 3 y 4 tienen concentraciones iniciales más bajas y disminuyen más lentamente. En general, las gráficas descritas en la Figura 18, sugiere que los cuatro biorreactores están siendo operados con éxito para degradar el As presente en el sistema, pero con diferentes eficiencias y velocidades de tratamiento.

En términos de eficiencia, el biorreactor más eficiente logró la mayor reducción en la concentración As en el menor tiempo posible.

Observando los datos de la Figura 18, muestra la mayor eficiencia el biorreactor 1, ya que comenzó con la concentración inicial más alta de compuestos orgánicos (450 ppm) y logró reducir esta concentración a 0,78 ppm en el día 28. Esto indica que el biorreactor 1 fue capaz de degradar los metales pesados evaluados de manera eficiente en un período de tiempo relativamente corto en comparación con los otros biorreactores.

Figura 18. Evaluación electroquímica de la concentración de As. Gráficas superpuestas



Fuente: Elaboración propia.

3.2.4. *Evaluación estadística de los resultados obtenido.* Según los resultados del análisis de concentraciones (Tabla 7), se encontró que el Valor-p del factor tiempo de tratamiento fue menor a 0,05. Lo que indica que no hay una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de As entre los diferentes niveles de velocidad de

agitación obteniendo un nivel de confianza del 95,0%. Estos hallazgos se pueden confirmar con la Figura 20, y sugieren que el tiempo de tratamiento tiene una influencia limitada en la reducción de concentración de As.

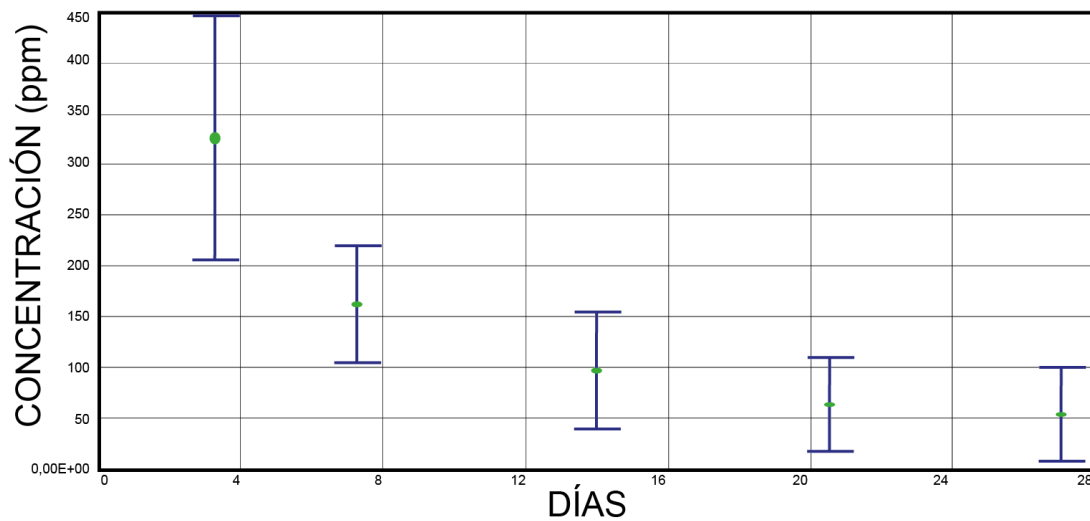
Tabla 10. ANOVA para promedio de Tiempo de tratamiento (días) por Concentración (As ppm)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón - F	Valor-P
Entre grupos	0,19971	4	0,0898466	0,97	0,03637
Intra grupos	4.39550	16	0,0919949		
Total (Corr.)	4.59521	20			

Fuente: Elaboración propia.

Figura 19. Medias y 99% de Tukey HSD

Se superpone las varianzas de concentración a través de los días de tratamiento, la medición se realizó a través de cronoamperometría.



Fuente: Elaboración propia.

3.3 Evaluación del proceso a través del porcentaje de la detección de As (III)

Tabla 11. Resultados obtenidos de los análisis de arsenopirita en el tratamiento

BIORREACTORES	Colorimetría	Varianza de Concentración (ppm)	As (III) Disuelto	Criterio de aceptación
Biorreactor 1	Pardo Rojiza	449	99,93%	Entre 99% - 100 %
Biorreactor 2	Pardo Rojiza	439	99,91%	
Biorreactor 3	Amarilla	486	99,10%	
Biorreactor 4	Amarilla	479	99,92%	

Fuente: Elaboración propia

*Porcentaje de remoción = $[C_{\text{disminuido}}/C_{\text{inicial}}] \times 100\%$

Los resultados obtenidos por el método propuesto para el porcentaje de recuperación se encuentran dentro del rango reportado en la literatura, que varía entre el 99% y el 100% en otros métodos.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

La estrategia para alcanzar el objetivo del estudio fue desarrollar un sistema de biorreactores capaces de realizar las reacciones bioquímicas de los microorganismos presentes en el medio 9K haciendo factible la degradación de As, en estas reacciones. Así mismo, la evaluación de concentraciones se optimizó y se implementaron materiales que permitan la replicabilidad de los experimentos para poder ser evaluados con otras muestras, como es el caso de los compuestos con Au refractario, que contienen As como amalgama.

La presencia de microorganismos degradadores de As (III) se identificó a través de la evaluación de color de los biorreactores revelando la presencia de microorganismos del tipo *Rhizobium sp. NT-26*, *Leptospirillum Ferrooxidans* y *Acidithiobacillus Thiooxidans*. Además, la variación de la colorimetría se le atribuyó a la presencia de Fe (III) y a la conversión iónica, conductores principales para la formación de oxisales que determinan la coloración del proceso. En este proyecto de titulación se llevó a cabo cuatro repeticiones, utilizando una corrección de método que permitió evaluar tres concentraciones con distinto tamaño de partícula, influyendo positivamente en la evaluación de la degradación de As. Los resultados obtenidos indicaron que, para alcanzar el resultado óptimo debe existir una proporcionalidad entre la retención de los microorganismos, un menor tamaño de partícula y una mayor velocidad de reacción.

Para la caracterización se observaron otras variables del proceso, como la generación de otros compuestos químicos (sulfatos, Fe II y As V), así como el crecimiento de microorganismos en condiciones de pH ácido con alta proporción de oxígeno. La utilización de microorganismos para la degradación del As se presenta como una alternativa prometedora y sostenible que puede disminuir la presencia de este elemento en el medio ambiente.

Este proyecto es relevante porque se demostró la posibilidad de utilizar la electroquímica como una herramienta para obtener resultados rápidos en la evaluación del As (III) y abre posibles líneas de investigación en otros minerales de mayor valor comercial, como el oro refractario y la plata.

El proceso de biolixiviación con medio 9K fue efectivo para el crecimiento de bacterias que degradan As en muestras mineras. Los resultados indicaron que la degradación del As puede alcanzar hasta el 99% en un período de 28 días en un biorreactor aireado.

Para el desarrollo estadístico del proceso, se determinó a través de un análisis ANOVA, que comprueba los datos de remoción del 99% en todas las muestras tratadas. Se indicó que no hay una diferencia significativa en la concentración de As ($p < 0,05$), en las velocidades de agitación. Así mismo, dentro del análisis de varianza se comprobó que, a razón de los días, los valores de la concentración decaen significativamente desde 450 ppm As hasta 0.780 ppm As. Concluyendo, que los biorreactores con un menor tamaño de partícula T1 Biorreactor 1, T1 Biorreactor 2 tuvieron una mayor eficiencia según la evaluación estadística realizada en este proyecto.

Cerramos esta investigación, con resultados positivos, en los campos que estuvieron involucrados en la misma: electroanalítica, microbiología, investigación de campo, biolixiviación.

4.2 Recomendaciones

El desarrollo de este proyecto requiere obtener un medio de cultivo certificado, que será utilizado para optimizar el proceso. Es importante contar con un control adecuado del crecimiento de los microorganismos para evitar que ciertos reactivos, como la agarosa, afecten el crecimiento de otros microorganismos durante el proceso. Las interferencias en el proceso pueden ser causadas por la falta de equipos, como un agitador, ya que se necesitará un equipo disponible para agitar las muestras, que tendrán un volumen aproximado de 500 ml por experimento.

Durante esta investigación, se caracterizaron las muestras mediante tres análisis distintos, y se pudo demostrar que una adecuada calibración de los equipos puede proporcionar una detección fiable de la cantidad de As en cada etapa del desarrollo experimental. Sin embargo, se observaron interferencias en el electrodo de alambre de platino debido a una soldadura presente en el mismo minimizando la capacidad de detección en el método electroanalítico.

En esta investigación, los límites de detección representan una desventaja ya que para obtener la certificación de muestras en días posteriores se requerirán análisis más completos, lo que aumentará el valor de obtención de los datos. Además, es importante tener en cuenta que la presente evaluación se enfocó únicamente en la presencia de As y no en la detección de otros metales pesados o microorganismos que puedan generarse con el tratamiento expuesto.

El modelo experimental utilizado en este estudio ha sido efectivo en la degradación del As. Sin embargo, se recomienda la apertura de nuevas líneas de investigación para evaluar la incidencia de esta experimentación en otros residuos mineros. Además, se sugiere la búsqueda de un modelo que pueda incorporar tratamientos microbiológicos para expandir los mercados de la biolixiviación, la biorremediación de metales pesados y la generación de campos estratégicos evaluados por la electroquímica.

Por último, es importante mencionar que los comportamientos de los microorganismos fueron evaluados bajo condiciones atmosféricas de la región Costa, lo que significa que su crecimiento puede variar dependiendo de factores como: la humedad y la cantidad de oxígeno presente. Por esta razón, se recomienda llevar a cabo réplicas adicionales que mantengan el material en las plantas de biotratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Montoya, E. A. R.; Hernández, L. E. M.; Escareño, M. P. L. Impacto del arsénico en el ambiente y su transformación por microorganismos. 2015, 16. <http://www.investigacionyposgrado.uadec.mx/site/wp-content/uploads/2020/07/bn-carlos-AsBQM-bkchap-only.pdf> (09/01/2022).
- (2) Rodríguez Martínez, H. L.; Peña Manjarrez, M.; Gutiérrez Reyes, A. V.; González Trevizo, C. L.; Montes Fonseca, S. L.; López Avalos, G. G. Biorremediación de Arsénico Mediada Por Microorganismos Genéticamente Modificados. *Terra Latinoam.* 2017, 35(4), 353–361. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0187-57792017000400353&lng=es&nrm=iso&tlng=es (09/01/2022)
- (3) Prieto-Barajas, C. M.; Elorza-Gómez, J. C.; Loeza-Lara, P. D.; Sánchez-Yáñez, J. M.; Valencia-Cantero, E.; Santoyo, G. Identification and analysis of ars genes in strains of *Bacillus hyper* tolerant to arsenic, isolated from thermal pools in Araró, Mexico. *TIP Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas* **2019**, 21 (S1), 22–29. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=84937> (accessed 3/8/2023).
- (4) Rueda, E. S. Microorganismos extremófilos: potenciales héroes contra el Arsénico. *Rev. Cicterránea* **2019**, 3, 36–37. <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/cicterranea/article/view/32164> (09/01/2022).
- (5) Aveiga Ortiz, A. M.; Noles Aguilar, P. J.; Macías, F. P.; Herrera, E. M.; Aveiga Ortiz, A. M.; Noles Aguilar, P. J.; Macías, F. P.; Herrera, E. M. Distribución de Arsénico En Agua Superficial y Sedimento En La Cuenca Del Río Carrizal, Manabí - Ecuador. *Rev. Soc. Quím. Perú* **2020**, 86 (3), 260–275. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v86i3.299>.
- (6) Medrado Roldán, H.; Galán Wong, L. J. *Bioteología de Minerales*, Primera Edición.; México, **2000**, 1, 56-57. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v15n2/v15n2a06.pdf> (15/10/2022)
- (7) Zhou, Y.; Meng, J.; Zhang, M.; Chen, S.; He, B.; Zhao, H.; Li, Q.; Zhang, S.; Wang, T. Which Type of Pollutants Need to Be Controlled with Priority in Wastewater Treatment Plants: Traditional or Emerging Pollutants *Environ. Int.* 2019, 131 (June). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104982>.

- (8) Cbrales-González, A. M.; Martínez-Prado, M. A.; Núñez-Ramírez, D. M.; Meléndez-Sánchez, E. R.; Medina-Torres, L.; Parra-Saldivar, R. Bioleaching of As from Mine Tailings Using an Autochthonous *Bacillus Cereus* Strain. *Rev. Mex. Ing. Quím.* **2022**, 21 (2), Bio2723–Bio2723. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2723>.
- (9) Delgado Romero, J. A.; Gómez Fernández, E. J.; González Grau, J. M. La vida microbiana en condiciones adversas. ¿Los microorganismos viven frecuente o esporádicamente a tasas de crecimiento casi nulas? **2018**. <https://doi.org/10.13039/501100011011>.
- (10) Yu, L.; Li, S.; Liu, Q.; Deng, J.; Luo, B.; Liang, Y.; Zhao, L.; Lai, H. Gold Recovery from Refractory Gold Concentrates by Pressure Oxidation Pre-Treatment and Thiosulfate Leaching. *Physicochem. Probl. Miner. Process.* **2019**, Vol. 55, iss. 2. <https://doi.org/10.5277/ppmp18166>.
- (11) Ródriguez, J.; Cerda, J.; Ulíbarri, G.; Marquez-Benavides, L.; Cortés, D.; Sanchez-Yañez, J. *Biolixiviación Mejorada de Minerales Refractarios de Oro y de Plata*; 2016. https://www.researchgate.net/publication/321153563_Biolixiviacion_mejorada_de_minerales_refractarios_de_oro_y_de_plata (05/09/2022).
- (12) Zhang, G.; Chao, X.; Guo, P.; Cao, J.; Yang, C. Catalytic Effect of Ag⁺ on Arsenic Bioleaching from Orpiment (As₂S₃) in Batch Tests with *Acidithiobacillus Ferrooxidans* and *Sulfobacillus Sibiricus*. *J. Hazard. Mater.* **2015**, 283, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.022>.
- (13) Huang, J.-H. Impact of Microorganisms on Arsenic Biogeochemistry: A Review. *Water. Air. Soil Pollut.* **2014**, 225 (2), 1848. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1848-y>.
- (14) Mohd, S.; Kushwaha, A. S.; Shukla, J.; Mandrah, K.; Shankar, J.; Arjaria, N.; Saxena, P. N.; Khare, P.; Narayan, R.; Dixit, S.; Siddiqui, M. H.; Tuteja, N.; Das, M.; Roy, S. K.; Kumar, M. Fungal Mediated Biotransformation Reduces Toxicity of Arsenic to Soil Dwelling Microorganism and Plant. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, 176, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.053>.
- (15) Islam, A. B. M. R.; Maity, J. P.; Bundschuh, J.; Chen, C.-Y.; Bhowmik, B. K.; Tazaki, K. Arsenic Mineral Dissolution and Possible Mobilization in Mineral–Microbe–Groundwater Environment. *J. Hazard. Mater.* **2013**, 262, 989–996. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.07.022>.

- (16) Sophocleous, M.; Atkinson, J. K. A Review of Screen-Printed Silver/Silver Chloride (Ag/AgCl) Reference Electrodes Potentially Suitable for Environmental Potentiometric Sensors. *Sens. Actuators Phys.* **2017**, *267*, 106–120. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2017.10.013>.
- (17) Cervantes, C.; Gamiño, N. S. Diversidad de genes de resistencia a arsénico en procariotas. *Cienc. Nicolaita* **2017**, No. 70. <https://doi.org/10.35830/cn.vi70.360>.
- (18) Rener, C. N. S.; Faé, J.; Ferraz, I. F.; de Oliveira Junior, R. C.; de Santa'anna, S. A. C.; de Miranda, P. R. B.; Pavão, J. M. S. J. Caracterização do elemento químico arsênio e a biorremediação de solos contaminados | *Diversitas Journal*. **2022**, *7* (2). https://www.diversitasjournal.com.br/diversitas_journal/article/view/2017 (01/09/2022).
- (19) Coelho, R. S.; Teixeira, M. C. Biorremediação de solos contaminados com arsênio por meio de lavagem de solo usando biossurfactantes. *Eng. Sanit. E Ambient.* **2020**, *25*, 543–553. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522020197400>.
- (20) González, H. G. M.; Camacho, B. R. EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA DE MATERIALES NANOESTRUCTURADOS PARA APLICACIÓN EN ENERGÍAS ALTERNAS. *JÓVENES EN CIENCIA*. **2018**, *4* (1), 2815–2819. <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/2747> (04/09/2022).
- (21) Rudnicki, K.; Landová, P.; Wrońska, M.; Domagała, S.; Čáslavský, J.; Vávrová, M.; Skrzypek, S. Quantitative Determination of the Veterinary Drug Monensin in Horse Feed Samples by Square Wave Voltammetry (SWV) and Direct Infusion Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (DI–ESI–MS/MS). *Microchem. J.* **2018**, *141*, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.05.032>.
- (22) Rodríguez, J.; Castañeda, G.; Lizcano, I. Electrochemical Sensor for Leukemia Drug Imatinib Determination in Urine by Adsorptive Stripping Square Wave Voltammetry Using Modified Screen-Printed Electrodes. *Electrochimica Acta* **2018**, *269*, 668–675. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.03.051>.
- (23) Filik, H.; Avan, A. A. Dextran Modified Magnetic Nanoparticles Based Solid Phase Extraction Coupled with Linear Sweep Voltammetry for the Speciation of Cr (VI) and Cr (III) in Tea, Coffee, and Mineral Water Samples. *Food Chem.* **2019**, *292*, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.058>.

- (24) Cornejo Ponce, L.; Acarapi Cartes, J.; Arenas Herrera, M. Desarrollo y validación de un método para la determinación simultánea de arsénico, antimonio, selenio y mercurio en plantas mediante espectrometría de fluorescencia de rayos x de energía dispersiva. *Interciencia Rev. Cienc. Tecnol. América* **2018**, 43 (6), 425–433. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6457607> (08/03/2023).
- (25) Guijarro, M.; Remedios, M. Análisis Instrumental. Espectrometría de Absorción Atómica (EAA). **2020**. <https://riunet.upv.es/handle/10251/138418> (08/03/2023).
- (26) Poddar, N.; Santini, J. M.; Maher, M. J. Crystal Structure of a Complex between the Electron-Transfer Partners Arsenite Oxidase and Cytochrome C552, from the Arsenite Respiring Bacterium *Rhizobium* Sp. NT-26. *Acta Crystallogr. Sect. Found. Adv.* **2021**, 77 (a2), C433–C433. <https://doi.org/10.1107/S0108767321092539>.
- (27) Díaz, J. A.; Serrano, J.; Leiva, E. Bioleaching of Arsenic-Bearing Copper Ores. *Minerals* **2018**, 8 (5), 215. <https://doi.org/10.3390/min8050215>.
- (28) Yang, L.; Zhao, D.; Yang, J.; Wang, W.; Chen, P.; Zhang, S.; Yan, L. Acidithiobacillus Thiooxidans and Its Potential Application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, 103 (19), 7819–7833. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10098-5>.
- (26) Poddar, N.; Santini, J. M.; Maher, M. J. Crystal Structure of a Complex between the Electron-Transfer Partners Arsenite Oxidase and Cytochrome C552, from the Arsenite Respiring Bacterium *Rhizobium* Sp. NT-26. *Acta Crystallogr. Sect. Found. Adv.* **2021**, 77 (a2), C433–C433. <https://doi.org/10.1107/S0108767321092539>.
- (27) Díaz, J. A.; Serrano, J.; Leiva, E. Bioleaching of Arsenic-Bearing Copper Ores. *Minerals* **2018**, 8 (5), 215. <https://doi.org/10.3390/min8050215>.
- (28) Yang, L.; Zhao, D.; Yang, J.; Wang, W.; Chen, P.; Zhang, S.; Yan, L. Acidithiobacillus Thiooxidans and Its Potential Application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, 103 (19), 7819–7833. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10098-5>.
- (29) Mengmeng, Z.; Brown, E.; Taotao, F.; Juanli, W.; Junbo, N. Mechanisms of Bacterial Degradation of Arsenic. *Indian J. Microbiol. Res.* **2018**, 5 (4), 436–441. <https://doi.org/10.18231/2394-5478.2018.0090>.
- (30) Miranda, A. V. C. BIORREMEDIACIÓN BACTERIANA DEL ARSÉNICO: MECANISMOS DE ÓXIDO REDUCCIÓN. *Ciencias* **2018**, 2 (1), 94–101. <https://doi.org/10.33326/27066320.2018.1.851>.
- (31) Ugarteche, O.; Ocampo, A.; de León, C. La economía mundial, la pandemia y las perspectivas. **2020**, 113–131. <http://hdl.handle.net/10469/17110> (05/09/2022).

- (32) Nazareno Coloma, J. A. Implementación del programa de producción mas limpia en la planta de beneficio de oro Orenas S.A. **2018**. <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/43452> (05/09/2022).
- (33) Iglesias, N.; Carranza, F.; Palencia, I. La biolixiviación como pretratamiento de menas auríferas refractarias en matriz de sulfuros. *Rev. Metal.* **1998**, 34 (1), 29–38. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.1998.v34.i1.656>.
- (34) Restrepo, E.; Ciro, E. Residuos mineros, una fuente alternativa de materias primas. *Rev. Colomb. Mater.* **2021**, No. 18, 1–2. <https://doi.org/10.17533/RCM/udea.rcm.n18a00>.
- (35) Baylón, A. R.; Chávez, S. F. La influencia de la velocidad de agitación en la lixiviación dinámica de minerales alterados. *Rev. Inst. Investig. Fac. Minas Metal. Cienc. Geográficas* **2009**, 12 (24), 133–140. <https://doi.org/10.15381/iigeo.v12i24.391>.
- (36) St»hle, L.; Wold, S. Analysis of Variance (ANOVA). *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1989**, 6 (4), 259–272. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(89\)80095-4](https://doi.org/10.1016/0169-7439(89)80095-4).
- (37) Elsayed, I. Design of Pharmaceutical Experiments Using Design Expert Software. *J. Pharm. Care Health Syst.* **2018**, 05. <https://doi.org/10.4172/2376-0419-C4-035>.
- (38) Rodríguez-Rodríguez, J.; Reguant-Álvarez, M. Calcular la fiabilidad de un cuestionario o escala mediante el SPSS: el coeficiente alfa de Cronbach. *REIRE Rev. Innovació Recer. En Educ.* **2020**, 13 (2), 1–13. <https://doi.org/10.1344/reire2020.13.230048>.
- (39) Malpartida-Zevallos, J.; Narrea-Cango, M.; Dale-Larraburre, W. PATOGENICIDAD DE *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., SOBRE EL GUSANO DEFOLIADOR DEL MARACUYÁ *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) EN LABORATORIO. *Ecol. Apl.* **2013**, 12 (2), 75–81. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=34129468002> (08/03/2023).
- (40) Schultz, B. B. Levene's Test for Relative Variation. *Syst. Biol.* **1985**, 34 (4), 449–456. <https://doi.org/10.1093/sysbio/34.4.449>.
- (41) Stehlik-Barry, K.; Babinec, A. J. *Data Analysis with IBM SPSS Statistics*; Packt Publishing Ltd, **2017**. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=imgMnLCQRPMC&oi=fnd&pg=PP2&dq=IBM+SPSS+Statistics&ots=LJV90AFZd&sig=ZDZ43nx9Byr5zhhDDn-EWqPXtA8#v=onepage&q=IBM%20SPSS%20Statistics&f=false> (03/09/2023).

(42) Tan, J.; Lu, X.; Fu, L.; Yang, G.; Chen, J. Quantification of Cl-PAHs and Their Parent Compounds in Fish by Improved ASE Method and Stable Isotope Dilution GC MS. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *186* (October), 109775. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109775>.

(43) Gómez-Biedma, S.; Soria, E.; Vivó, M. Análisis Electroquímico. *Rev. Diagnóstico Biológico* **2002**, *51* (1), 18–27. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-79732002000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es (08/03/2023).

ANEXOS

Anexo A. Mineral de Arsenopirita aurífera



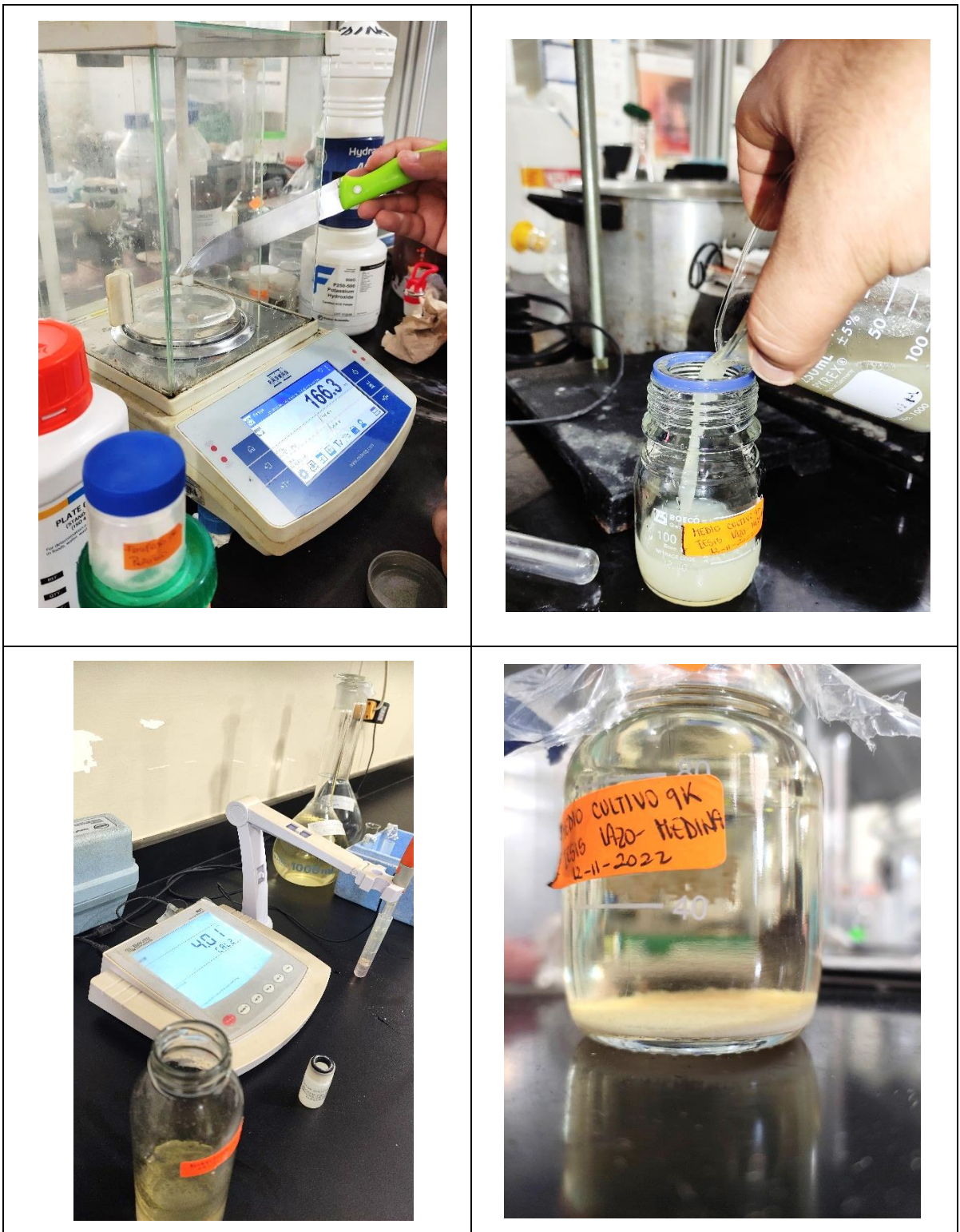
Anexo B. Trituración del mineral FeAsS



Anexo C. Distintos tamaños de partícula de FeAsS



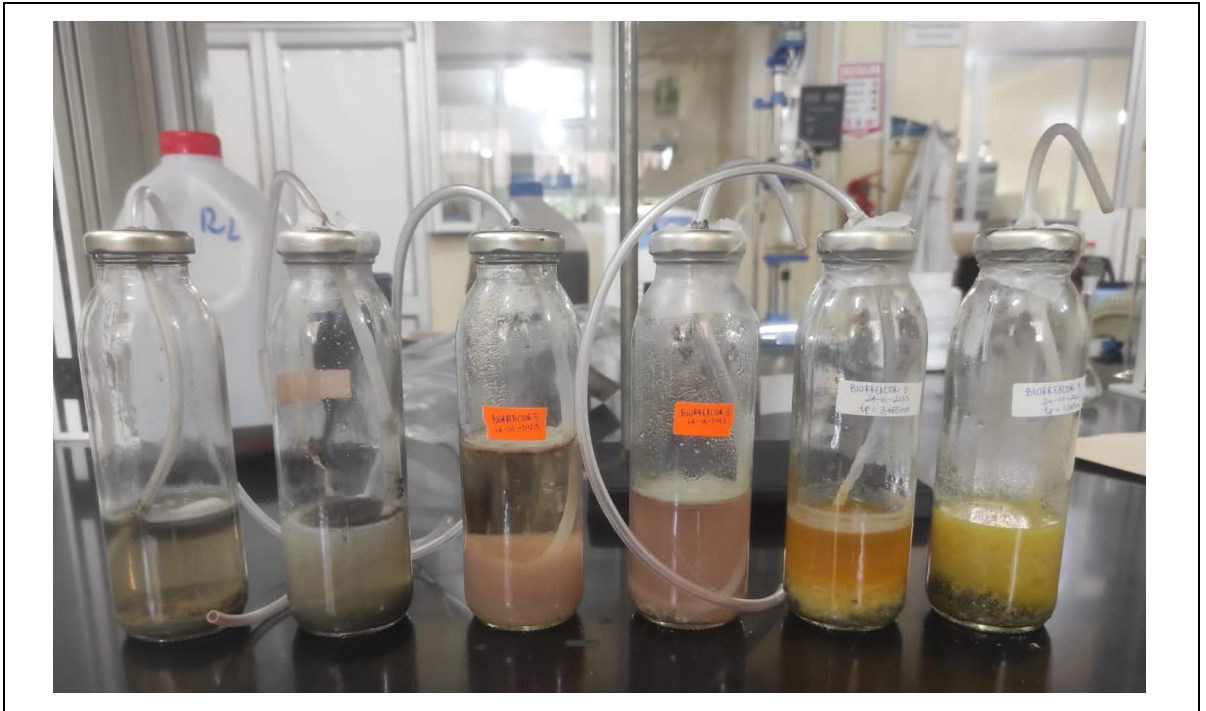
Anexo D. Preparación de medio 9k para el crecimiento de los microorganismos



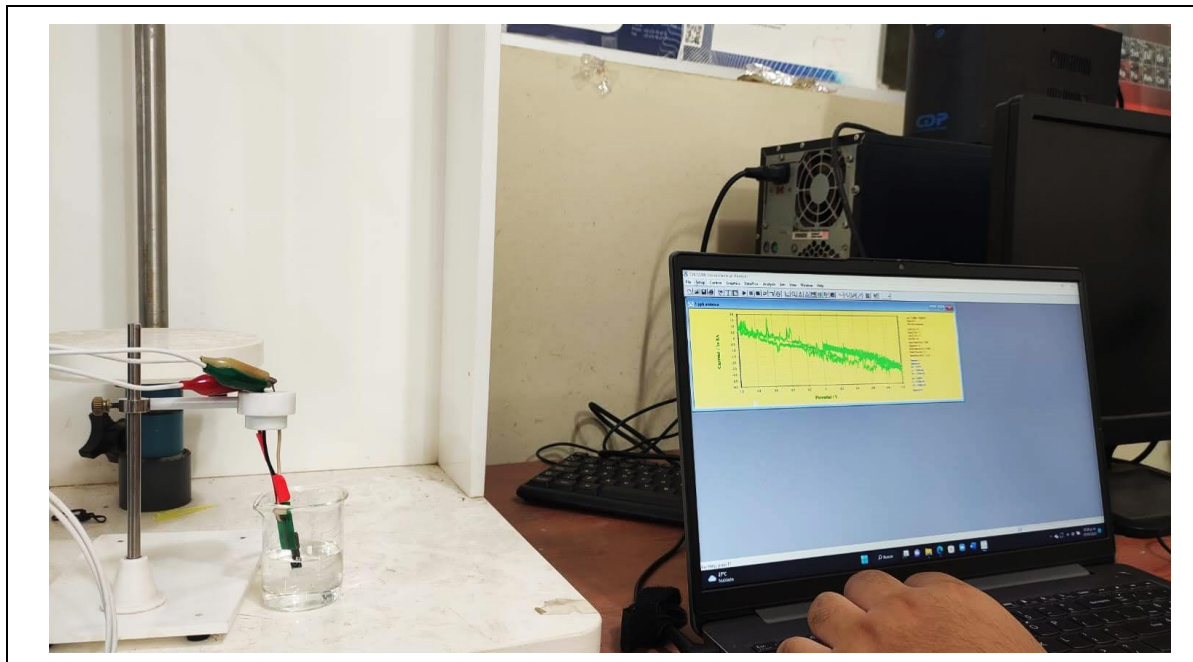
Anexo E. Biorreactores al comienzo del proceso con el cultivo mixto de microorganismos, junto con las correspondientes concentraciones de arsenopirita en la plancha de agitación



Anexo F. Biorreactores al final del proceso con el cultivo mixto de microorganismos, junto con las correspondientes concentraciones de arsenopirita

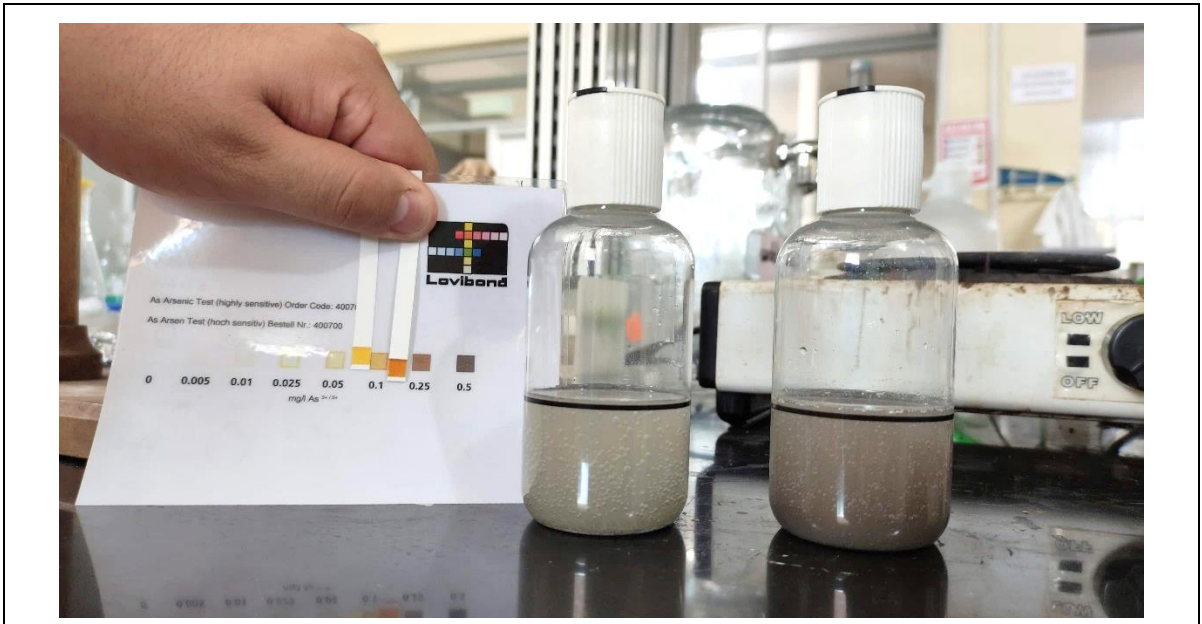


Anexo G. Medición de los parámetros electroquímicos en potenciostato CHI 1220B junto con celda de trabajo, electrodo de trabajo (alambre platino), electrodo de referencia (teflón dopado con punta de platino) y electrodo auxiliar (Ag/KCl)

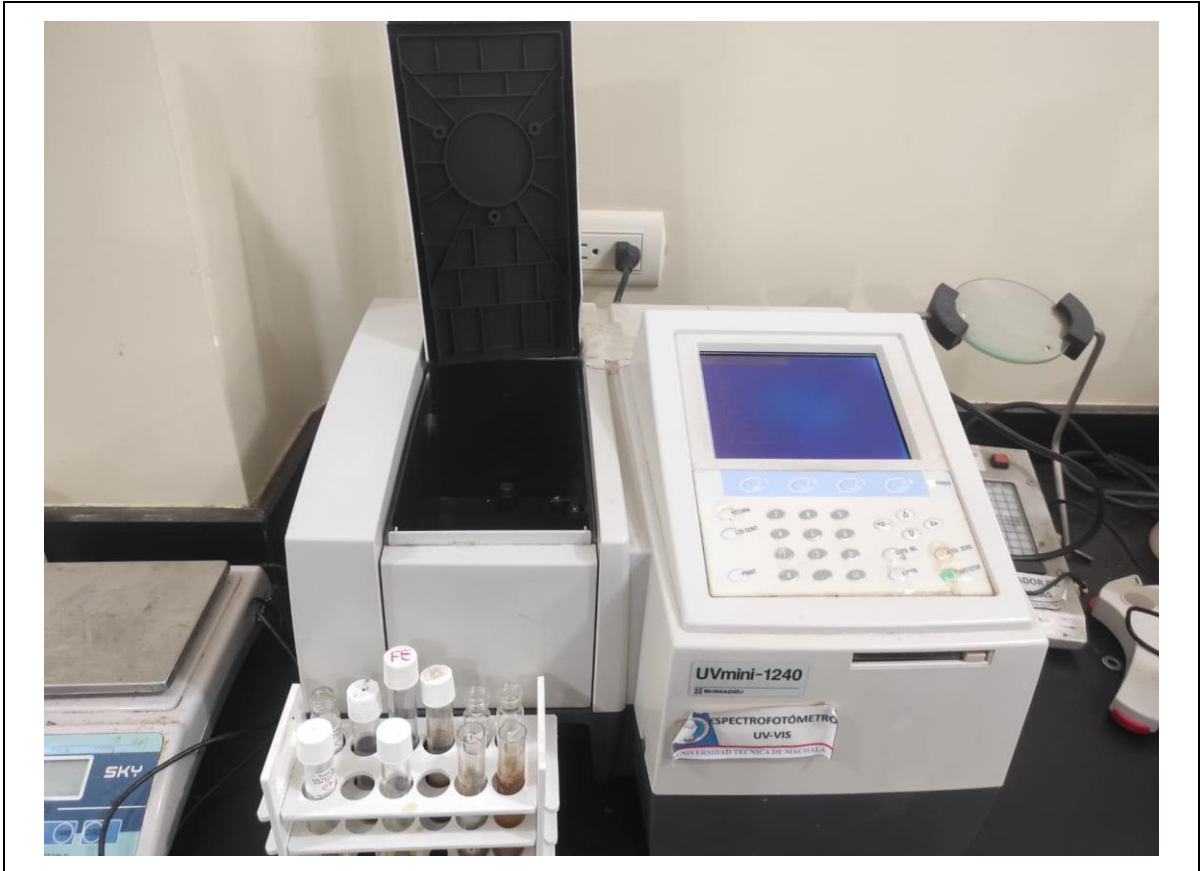


**Anexo H. Medición cualitativa para determinar presencia de As en las muestras
obtenidas de los biorreactores mediante “Arsenic Test Kit”**







**Anexo I. Equipo utilizado en la valoración colorimétrica de las muestras
obtenidas de los biorreactores**



Anexo J. Reporte del laboratorio ANAVANLAB de los análisis de Arsénico de las muestras captadas de los biorreactores a sus respectivas concentraciones

	 <p style="text-align: center; font-size: small;"> Acreditación N° SAE LEN 13-006 LABORATORIO DE ENSAYOS </p>						
INFORME DE RESULTADOS							
INF.DIV-FE.65045a							
DATOS CLIENTE							
Cliente:	ADOLFO JOSUE LAZO NOBLECILLA						
Dirección:	Universidad Técnica de Machala; Km.5 1/2 Vía Machala Pasaje						
Teléfono:	0979454052						
DATOS DE LA MUESTRA							
Descripción:	MUESTRAS DE ARSENOPIRITA CON TRATAMIENTO MICROBIOLÓGICO						
Lote	...						
Fecha de Elaboración:	2023-01-16						
Fecha de Recepción:	2023-02-18						
Fecha de Análisis:	2023-02-18						
Material de Envase:	Frasco Ámbar						
Toma de Muestra realizada por:	El Cliente						
Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a los datos y las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio						
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA							
Color:	Rojo Pardo/Amarillo/Plomo						
Estado:	Líquido						
Temperatura de la muestra:	AMBIENTE						
Olor:	Característico						
Conservación:	Al Ambiente						
RESULTADOS							
MUESTRA	PARAMETROS	RESULTADO	UNIDAD	MÉTODO DE ANÁLISIS INTERNO	MÉTODO DE ANÁLISIS DE REFERENCIA	INCERTIDUMBRE	ESPECIFICACIONES
M1:B2 16-01	ARSENICO	<480.59	mg/L	MFQ-106	Espectroscopia de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado ICP.	± 0.025	Máx. 1000 mg/L
M2:B1 18-01	ARSENICO	<180.15	mg/L	MFQ-106	Espectroscopia de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado ICP.	± 0.025	Máx. 1000 mg/L
M2:B3 18-01	ARSENICO	<110.08	mg/L	MFQ-106	Espectroscopia de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado ICP.	± 0.025	Máx. 1000 mg/L
M3:B2 20-01	ARSENICO	<15.007	mg/L	MFQ-106	Espectroscopia de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado ICP.	± 0.025	Máx. 1000 mg/L
M1:B2 01-02	ARSENICO	<530.15	mg/L	MFQ-106	Espectroscopia de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado ICP.	± 0.025	Máx. 1000 mg/L
M1:B3 01-02	ARSENICO	<512.22	mg/L	MFQ-106	Espectroscopia de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado ICP.	± 0.025	Máx. 1000 mg/L