

Determining the Oxidative Capacity of a Native Microbial Consortium on a Refractory Auriferous

Gabriela González L¹, Paulina Aguirre Ch²

¹Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador, gagonzalez2@utpl.edu.ec

²Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador, piaguirre@utpl.edu.ec

Abstract- Biooxidation is known as an alternative process (pre-treatment) for gold recovery from refractory ores, which had increased in developing countries. This process uses acidophilic microorganisms, which allows the gold present in a sulfurized ore matrix become available for the cyanidation process. This research had two main goals which were to isolate the native acidophilic microorganism from a natural acidic drainage and to determine its oxidation capacity in a stirring tank reactor by varying the pulp density (% w/v) to get better solubility of the mineral and greater gold recovery. For the isolation of acidophilic microorganisms, a Silverman and Lundgren (1959) medium culture - adjusted to pH 1.8 - was used; ferrous sulfate (FeSO₄ * 7H₂O) was used as an energy source. For the adaptation of these microorganisms and in order for them to reach optimal growing rates (u), successive cell replications were performed at the time the color of the culture changed from green to red. The biooxidation tests were conducted by using the following fixed variables: pH (1, 8), temperature (20°C), agitation (400rpm), aeration (3vvm), initial inoculum concentration (20%w/v), particle size (-200mesh) and four pulp densities (5, 10, 15 and 20 %w/v). The concentration of Fe²⁺, total Fe, sulfates and cell counting - in a Neubauer chamber - were measured for a 30-day period to determinate the microorganism growing kinetics during the oxidation process. The volumetric productivity obtained in the biooxidation process per batch was: Q_p Fe³⁺ of 2.20, 1.65, 0.80, 0.78 g/L day; Q_p SO₄ 2- of 3.17, 2.27, 2.10, 1.73 g/L day and the gold recovery values were 51, 40, 33 and 43% for pulp densities of 5, 10, 15 and 20 % w/v, respectively.

Key words- acidophilic microorganism, biooxidation, gold recovery, refractory minerals, volumetric productivity.

Digital Object Identifier (DOI): <http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2016.1.1.274>

ISBN: 978-0-9822896-9-1

ISSN: 2414-6390

14th LACCEI International Multi-Conference for Engineering, Education, and Technology: "Engineering Innovation for Global Sustainability", 20-22 July 2016, San Jose, Costa Rica.

Determinación de la capacidad oxidativa de un consorcio microbiano nativo sobre un mineral aurífero refractario

Gabriela González L¹, Paulina Aguirre Ch²

¹Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador, gagonzalez2@utpl.edu.ec

²Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador, piaguirre@utpl.edu.ec

Abstract- Biooxidation is known as an alternative process (pre-treatment) for gold recovery from refractory ores, which had increased in developing countries. This process uses acidophilic microorganisms, which allows the gold present in a sulfurized ore matrix become available for the cyanidation process. This research had two main goals which were to isolate the native acidophilic microorganism from a natural acidic drainage and to determine its oxidation capacity in a stirring tank reactor by varying the pulp density (% w/v) to get better solubility of the mineral and greater gold recovery. For the isolation of acidophilic microorganisms, a Silverman and Lundgren (1959) medium culture - adjusted to pH 1.8 - was used; ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) was used as an energy source. For the adaptation of these microorganisms and in order for them to reach optimal growing rates (μ), successive cell replications were performed at the time the color of the culture changed from green to red. The biooxidation tests were conducted by using the following fixed variables: pH (1, 8), temperature (20°C), agitation (400rpm), aeration (3vvm), initial inoculum concentration (20%v/v), particle size (-200mesh) and four pulp densities (5, 10, 15 and 20 %w/v). The concentration of Fe^{2+} , total Fe, sulfates and cell counting - in a Neubauer chamber - were measured for a 30-day period to determinate the microorganism growing kinetics during the oxidation process. The volumetric productivity obtained in the biooxidation process per batch was: $Q_p \text{Fe}^{3+}$ of 2.20, 1.65, 0.80, 0.78 g/L day; $Q_p \text{SO}_4^{2-}$ of 3.17, 2.27, 2.10, 1.73 g/L day and the gold recovery values were 51, 40, 33 and 43% for pulp densities of 5, 10, 15 and 20 % w/v, respectively.

Key words- acidophilic microorganism, biooxidation, gold recovery, refractory minerals, volumetric productivity.

1. INTRODUCCIÓN

Se estima que la producción total de oro a nivel mundial proviene de minerales refractarios los cuales van en crecimiento, debido a que se están agotando las reservas de oro libre y oro cianurable. Una alternativa de pre-tratamiento para la recuperación de metales preciosos a partir de minerales refractarios y sulfuros, es la biooxidación. En Ecuador no se realiza pretratamiento a estas menas refractarias de manera comercial, razón por la que se vuelve importante esta investigación a nivel Nacional, debido a que se cree que existen pérdidas de oro y la biooxidación es una herramienta biotecnológica importante para mejorar la recuperación de

este metal. Esta tecnología se caracteriza principalmente por depender de la actividad de bacterias como: *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* con habilidad para acelerar la disolución oxidativa de minerales sulfurosos presentes en relaves de minas (Argelia, 2004), la presencia de estos microorganismos ayudan a la recuperación del metal de interés, pues son capaces de oxidar o disolver los sulfuros en donde está ocluido el metal de interés (e. g. oro, cobre, zinc, cobalto, etc.) (Akçil, 2004; Donati, 2006; Harneit *et. al.*, 2006). Esto a través de mecanismos de acción directa e indirecta utilizando como fuente de energía hierro y azufre, y como fuente de carbono el CO_2 (González, 2004; Drescher, 2004; Donati, 2006; Arroyave, 2008).

Bajo este contexto es importante destacar que la lixiviación bacteriana es un proceso ventajoso para las zonas mineras en desarrollo, no solo desde el punto de vista económico, al obtenerse mayores recuperaciones de metales preciosos como el oro, sino también porque ayuda a minimizar el impacto sobre el medio ambiente puesto, que la oxidación de los sulfuros como la piritita es un proceso monitoreado y controlado (Schippers *et. al.*, 1999). De esta forma se pretende aprovechar los recursos naturales del suelo, extrayendo los metales de interés y utilizando los insumos químicos de una manera racional y eficiente, por lo que este proceso se vuelve significativo en la industria minera a pequeña, mediana y gran escala (González, 1999; Jaramillo, 2014).

Por lo general, el proceso de biooxidación de sulfuros refractarios se ha efectuado en reactores de tanque agitado y se lo aplica como pretratamiento previo al proceso de cianuración de oro. En el proceso oxidativo se utilizan microorganismos acidófilos que son aislados de drenajes ácido de mina y adaptados a medios de cultivos específicos, estos microorganismos crecen a expensas de la liberación u obtención de electrones a partir de la oxidación del mineral, permitiendo así la liberación de las partículas de oro ocluidas en la matriz sulfurada (González *et. al.*, 2003, Akçil, 2004; Ospina *et. al.*, 2012).

A la par, es importante durante el proceso de biooxidación el papel que cumple la densidad de pulpa, así, cuando se utiliza densidades de pulpa menores al 20% la velocidad de

Digital Object Identifier (DOI): <http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2016.1.1.274>

ISBN: 978-0-9822896-9-3

ISSN: 2414-6390

14th LACCEI International Multi-Conference for Engineering, Education, and Technology: "Engineering Innovations for Global Sustainability", 20-22 July 2016, San José, Costa Rica.

solubilización del mineral es directamente proporcional a la concentración de sólidos (Arroyave, 2008; Deveci, 2004).

Por otro lado, al aumentar esta concentración aumenta la concentración de mineral (Kg/m^3) y la concentración de área superficial (m^2/m^3); por tal razón, un aumento área superficial hay aumento del número de bacterias que se adhieren al mineral (μ/m^2) y aumento de velocidad total de crecimiento. Esta última trae consigo velocidad de consumo de oxígeno y velocidad de producción de sulfatos e ion ferroso mediante la acción bacteriana, por ende el ión ferroso producido es oxidado a ión férrico (Arroyave, 2008; González, 1999).

Sin embargo, operar con densidades de pulpa mayores al 20% en reactores de tanque agitado no ha tenido buenos resultados (Rossi, 2001; Deveci, 2004) debido a un excesivo número de partículas de mineral para un inóculo de tamaño constante, ya que la fricción entre las partículas disminuye la relación bacteria/sólido y la velocidad de solubilización; debido a que estos factores causan daño celular y limitan las velocidades de transferencia de oxígeno incrementando a su vez el tiempo de biooxidación (Hansford *et. al.*, 1995, Rossi, 2001; Deveci, 2004; Arroyave, 2008).

Es por ello que los objetivos de esta investigación fueron: aislar microorganismos acidófilos nativos de drenajes ácidos de mina y determinar su capacidad oxidativa en un reactor de tanque agitado, variando la densidad de pulpa (%p/v) para una mejor solubilización del mineral y mayor recuperación de oro.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Aislamiento de microorganismos

Se obtuvieron las muestras a partir de drenajes ácidos, lodos y sedimentos del yacimiento San Vicente (UTM 17769305 E, 9553081 N, a 1456 msnm), ubicado al sur del Ecuador. Las muestras fueron colocadas en frascos estériles, se midió temperatura y pH en el lugar de muestreo. Para el aislamiento se empleó el medio 9K (Silverman y Lundgren, 1959) compuesto por: sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 3.0 g/L, cloruro de potasio (KCl) 0.1 g/L, fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) 0.5 g/L, sulfato de magnesio (MgSO_4) 0.5 g/L y sulfato de ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) como fuente de energía, en una proporción de 44.2 g/L (Ossa *et. al.*, 2005; Barrie, 2006).

Se probaron cultivos a pH 1.8 y 3.4; temperatura de 30 y 20°C con agitación de 200 rpm en un agitador orbital. Como un indicativo de aislamiento de consorcio microbiano fue el cambio de color en el medio de cultivo de verdoso a rojizo, debido a la oxidación de sulfato (Arias *et. al.*, 2013). Para dar seguimiento al crecimiento de estos microorganismos se

midió Fe^{2+} , Fe total y sulfatos. Para demostrar cuales fueron las mejores condiciones de crecimiento (pH y temperatura) se realizó un análisis factorial en el software Minitab 16.

B. Experimentos de biooxidación

El consorcio aislado fue adaptado a un mineral refractario, cuya composición fue: Albita 7%, cuarzo 60%, caolinita 2%, muscovita 8% y piritita 23% (DEMEX). Con una ley de cabeza de oro de 5.10 Kg/Ton, el material es un relave previamente tratado por los mineros de la zona de San Vicente-Zamora Chinchipe, el cual fue concentrado previamente en mesa gravimétrica.

Los experimentos de biooxidación se realizaron en un reactor de tanque agitado de 5 L con un volumen de operación de 3 L, en el que se varió la concentración de pulpa (5, 10, 15 y 20 % p/v). Para favorecer la suspensión de sólidos y la oxidación bacteriana, el reactor operó a una altura de rotor desde el fondo del tanque de 3.5 cm, flujo de aire de 3 vvm, agitación de 400 rpm, temperatura de 20° C, pH de 1.8, tamaño de partícula de -200 mallas (Deveci, 2004) y 20% v/v de concentración de inóculo, el medio utilizado fue 9K modificado.

El proceso de biooxidación finalizó cuando la concentración de Fe^{2+} se mantuvo constante en el tiempo. Además se determinó la cinética de crecimiento, se midió pH, y se cuantificó Fe^{2+} y Fe total por el método de Muir y Andersen (1977), sulfatos por turbidimetría (González, 1999) y conteo celular en cámara de Neubauer.

C. Cianuración

Para cuantificar el oro liberado después del pretratamiento biooxidante, se llevó a cabo la cianuración de las muestras. Para lo cual se eliminó las jarositas mediante lavados consecutivos del mineral con agua ácida, agua pH 7 y cal. Finalmente, este proceso se llevó a cabo en el equipo de jarras Phipps y Bird en un tiempo de 24 horas, se determinó cianuro libre y consumo de cal.

D. Determinación de oro

Mediante la técnica de ensayo a fuego para metales preciosos se cuantificó oro y plata (doré) presentes en las muestras minerales cianuradas. Mediante espectrofotometría de absorción atómica se determinó la concentración de oro en solución y se realizó los respectivos balances metalúrgicos para la obtención del rendimiento final.

III. RESULTADOS

A. Aislamiento de microorganismos

Las muestras acidas obtenidas (agua, lodo y sedimento) del yacimiento San Vicente, crecieron en medio selectivo para bacterias acidófilas al pH y temperatura evaluados.

En la Fig. 1 se puede observar que las mejores condiciones de crecimiento microbiano se dieron a pH 1.8 y 20°C; esto con respecto a la productividad volumétrica de ión férrico ($Q_p \text{ Fe}^{3+}$, g/L día). Alegre (1997) indica que el pH óptimo para las bacterias acidófilas es de 1.8, esto con la finalidad de evitar la formación considerable de precipitados en forma de hierro, situación que puede presentarse a pH mayores a 2. La influencia de la temperatura no fue significativa debido a que se encuentra dentro del rango establecido para bacterias mesófilas que es 20-35°C como lo indica Muzzio (2002).

B. Ensayos de Biooxidación

En la Fig. 2 se visualiza la velocidad de crecimiento bacteriano μ (día⁻¹) para cada densidad de pulpa, se obtuvo valores de 0.784, 0.736, 0.918 y 0.874 día⁻¹ para 5 %p/v (A), 10%p/v (B), 15%p/v (C) y 20%p/v (D), respectivamente.

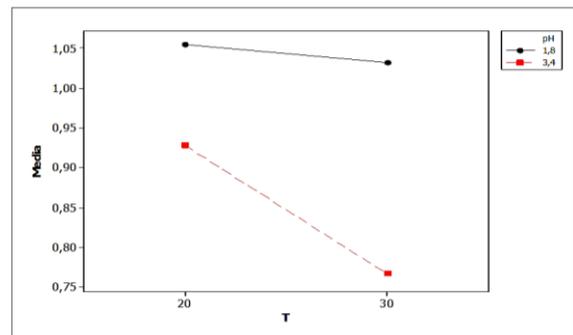


Fig. 1. Interacción de pH y temperatura con respecto a la productividad volumétrica de ion férrico ($Q_p \text{ Fe}^{3+}$, g/L día) durante el aislamiento del consorcio microbiano.

En comparación a Alegre (1997), las velocidades de crecimiento obtenidas en este estudio fueron mayores. Lo mismo que pudo deberse al tipo de mineral empleado, el cual contenía alto porcentaje de pirita y ausencia de arsénico. Mientras que el mineral empleado por Alegre (1997) contenía arsénico, el cual produce un efecto inhibitorio durante el crecimiento microbiano.

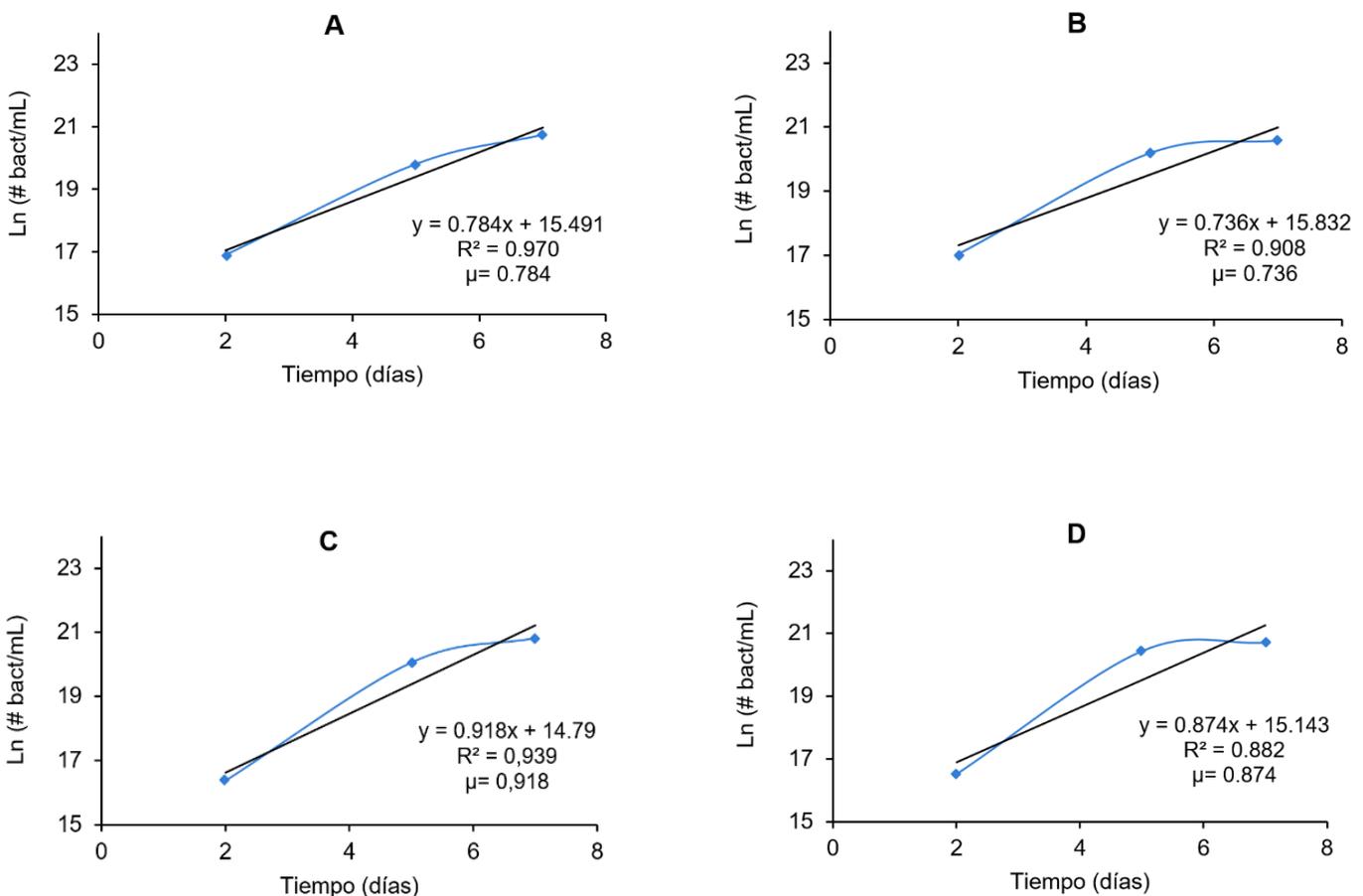


Fig. 2. Velocidad de crecimiento del consorcio microbiano a diferentes densidades 5% (A), 10% (B), 15% (C) y 20% (D) de pulpa en un sistema por lotes

C. Seguimiento químico del proceso oxidativo a diferentes densidades de pulpa.

En la Fig. 3 se muestra la variación en la concentración de ión ferroso, ión férrico, hierro total y producción de sulfatos en solución durante el proceso por lotes, para las cuatro densidades de pulpa. A la par se ve un incremento en la concentración de ion férrico (Fe^{3+}) y disminución del ion ferroso (Fe^{2+}), indicando que existe una oxidación biológica.

Mientras que el ion sulfato presenta concentración dos veces mayor que la de hierro total, debido a la degradación de la matriz mineral. Acevedo y Gentina (2005) indican que en el

caso de la pirita por cada molécula de FeS_2 atacada, se da la formación de dos moléculas de sulfato. Además, en la Fig. 3 se puede observar que la máxima concentración de Fe^{3+} (g/L) en solución que se alcanzó fue: 46.78, 33.13, 24.41, 16.09 y para SO_4^{2-} (g/L) fue: 78.86, 64.62, 56.76, 55.95 para el 5, 10, 15 y 20 (% p/v), respectivamente.

Se aprecia que al final del proceso oxidativo tanto el ion férrico como sulfato disminuyeron a medida que aumentó la densidad de pulpa. Al 5% p/v se alcanzó las mayores concentración de Fe^{3+} y SO_4^{2-} seguido de 10, 15 y 20 % p/v, es decir, se da mejor solubilización del mineral refractario al 5% p/v; esto en un tiempo aproximado de 20 días.

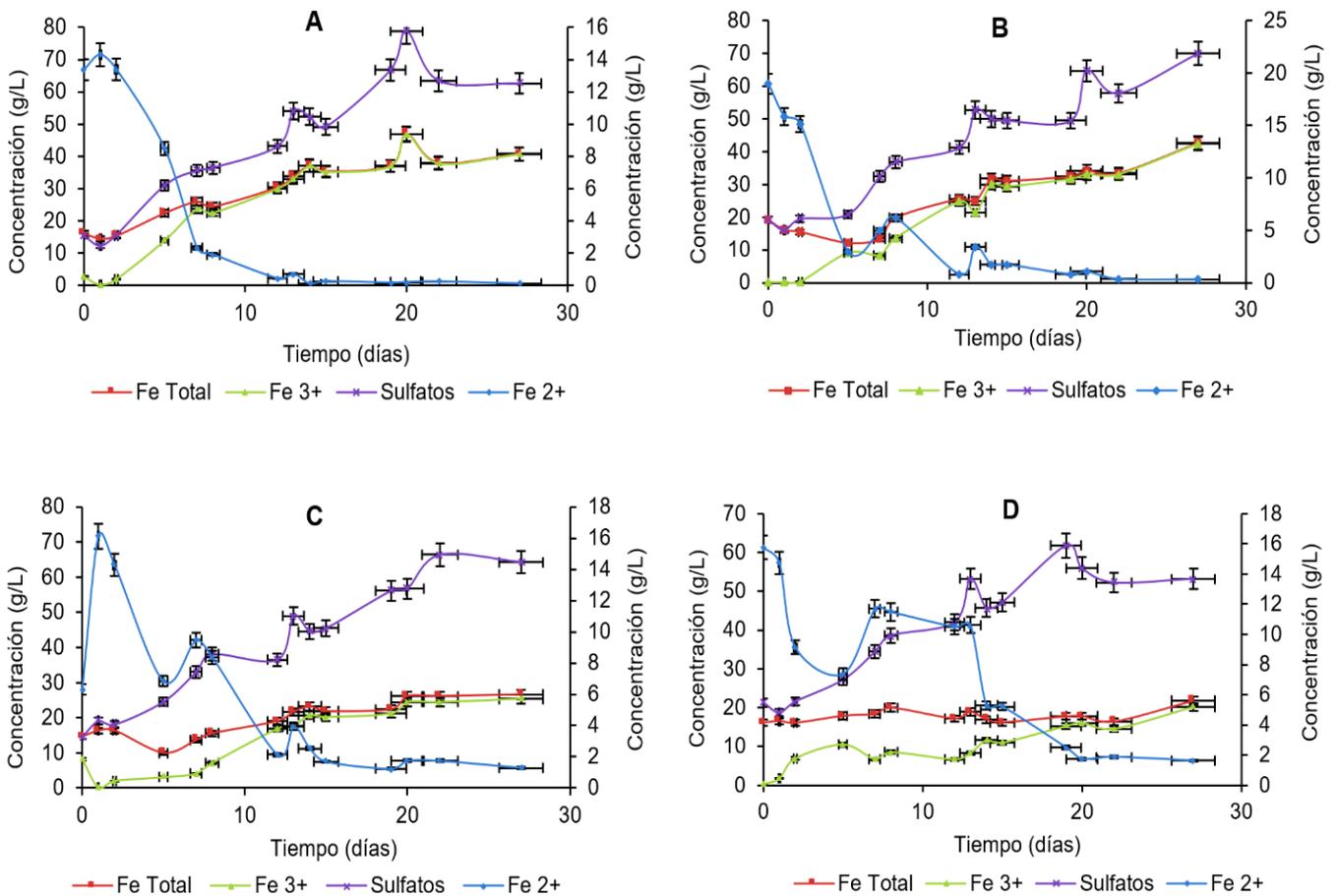


Fig. 3. Variación de la concentración de Fe total, Fe^{3+} y sulfatos (eje primario) y Fe^{2+} (eje secundario) a densidad de pulpa del 5, 10, 15, 20 % (p/v) en un sistema por lotes.

La Fig. 4 indica la productividad volumétrica de ion férrico ($Q_p \text{ Fe}^{3+}$, g/L día) e ion sulfato ($Q_p \text{ SO}_4^{2-}$, g/L día) alcanzadas a diferentes densidades de pulpa en un tiempo de 20 días. Se puede apreciar que a una densidad de pulpa del 5 % p/v se obtuvo mayor productividad de ión férrico y sulfatos. Mientras que al aumentar la densidad (10, 15 y 20 % p/v) la productividad volumétrica de ion férrico y sulfato fueron menores.

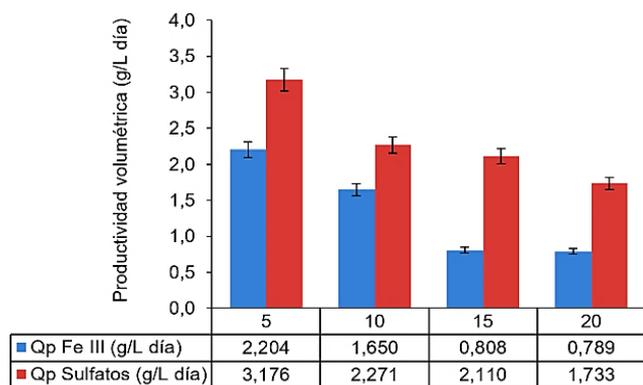


Fig. 4. Comparación de $Q_p \text{ Fe}^{3+}$ y $Q_p \text{ SO}_4^{2-}$ con respecto a la densidad de pulpa (5, 10, 15 y 20 % p/v).

Por otro lado, se obtuvo porcentajes de hierro extraído de 62.860, 20.328, 5.946 y 1.524 para el 5, 10, 15 y 20 (%p/v), respectivamente. Esto confirma que al aumentar la densidad de pulpa el porcentaje de hierro extraído disminuye.

D. Análisis estadístico para las diferentes densidades de pulpa.

Se aplicó la prueba de hipótesis basado en el análisis ANOVA de un factor. Se tomó como variable independiente la densidad de pulpa (5, 10, 15 y 20 % p/v), y como variable respuesta la productividad volumétrica de Fe^{3+} y SO_4^{2-} (g/L día). La prueba se empleó con la finalidad de comparar la variabilidad de medias que hay entre las densidades de pulpa ($p=0.05$).

Tabla 1. ANOVA de un factor respecto a $Q_p \text{ Fe}^{3+}$ y $Q_p \text{ SO}_4^{2-}$ para un proceso de biooxidación por lote. Programa estadístico IBM SPSS Statistics 20.

Variables de respuesta	Tipo de grupo	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
$Q_p \text{ Fe}^{3+}$ (g/L día)	Inter-grupos	4.876	3	1.625	453.44	0.000
	Intra-grupos	0.029	8	0.004		
	Total	4.905	11			
$Q_p \text{ SO}_4^{2-}$ (g/L día)	Inter-grupos	3.920	3	1.307	50.17	0.000
	Intra-grupos	0.208	8	0.026		
	Total	4.128	11			

En la Tabla 1 del análisis ANOVA se observa una significancia de 0.000, para ambos casos.

Claramente muestra que existe diferencia significativa entre los grupos (5, 10, 15, 20% p/v), los niveles de significancia son menores a 0.05, indicando que la densidad de pulpa influye en la productividad volumétrica obtenida en el proceso de biooxidación.

E. Ensayos de cianuración

Los ensayos de cianuración se realizaron para cuantificar la extracción de oro después del proceso de biooxidación. Finalmente se realizó ensayos de fundición-copelación con el fin de determinar la ley de oro (Au) del relave de cianuración.

En la Tabla 2 se indica el resultado obtenido de la recuperación de oro después de haber tratado el mineral refractario por biooxidación, en ella se evidencia que se recuperó hasta el 51% para una densidad de pulpa del 5 % p/v. Mientras que para las demás densidades de pulpa la recuperación fue de aproximadamente el 40%. En los estudios realizados por Arroyave (2009) se obtuvo recuperaciones de oro hasta el 79%, este valor es mayor al obtenido que la presente investigación, puesto que se utilizó las colas de un mineral previamente cianurado.

Tabla 2. Rendimiento de la recuperación de oro en el proceso de biooxidación a una densidad de pulpa del 5% p/v.

Peso Muestra (Kg)	0.1
Ley Au cabeza (ppm)	5.1
Vol. Solución (L)	0.175
Ley Au sol (ppm)	1.115
Peso relave (Kg)	0.09
Ley Au relave (ppm)	0.713
Recuperación de Au (%)	50.98

IV. CONCLUSIONES

A partir de aguas, lodos y sedimentos ácidos del yacimiento minero San Vicente se aisló un consorcio microbiano utilizando un medio de cultivo específico para bacterias acidófilas con sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) como fuente de energía. Las condiciones óptimas de este consorcio fueron: pH 1.8 y temperatura de 20°C; el mismo que se cree está formado por los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum*, debido a las características obtenidas en el aislamiento.

La mayor recuperación de oro, se logró con la menor densidad de pulpa (5 %p/v), siendo a la vez con la que se obtuvo mejores velocidades de crecimiento y productividades volumétricas de solubilización de hierro y sulfato.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos de la Universidad Técnica Particular de Loja-Ecuador, por lo que los autores agradecen a esta Institución por los fondos destinados para la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

- Acevedo F. y Gentina J. (2005). Mecanismos de la biolixiviación, Fundamentos y perspectivas de las Tecnologías Biomineras. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso, Chile.
- Akcil, A. (2004). Potential bioleaching developments towards commercial reality: Turkish metal.
- Alegre, C. (1997). Biooxidación de concentrados refractarios de oro en tanques agitados. Tesis de Maestría, Universidad católica de Valparaíso, Chile.
- Argelia, A. (2004). Biolixiviación de minerales sulfuroferroso en jales: aislamiento y caracterización de cultivos puros y mixtos de microorganismos involucrados. Tesis de Doctorado, Universidad de Colima, México.
- Arias V; Rodríguez C; Ramírez P; Nonones E; Salazar D; Gil J; Paredes J; Jamanca G. (2013). Aislamiento de bacterias acidófilas a partir del drenaje ácido proveniente de las inmediaciones a las unidades mineras de Julcani y Recuperada, Huancavelica. 15, 59-66.
- Arroyave D; Márquez M; Gallego D; Pacheco G. (2009). Evaluación y caracterización mineralógica del proceso de biooxidación en un reactor continuo de tanque agitado. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 77, 164, 18-28.
- Barrie J. (2006). Biohydrometallurgy and the environment: Intimate and important interplay. Hydrometallurgy, 83, 153-166.
- Deveci, H. (2004). Effect of particle size and shape of solids on the viability of acidophilic bacteria during mixing in stirred tank reactors. Hydrometallurgy. 71, 385-396.
- Donati E. (2006). Biominería: Una tecnología alternativa. <http://www.voces.antahualan.com.ar/edi11.html>. (Consultado 01 Enero del 2015).
- Dresher. W. (2004). Cooper Applications in Mining and Extraction. http://www.copper.org/innovations/2004/05/producing_copper_natures_way_bi_oleaching.html. (Consultado 01 de Enero de 2015).
- González, R. (1999). Biooxidación de un mineral concentrado refractario de oro en sistema continuo. Tesis de Maestría. Universidad católica de Valparaíso, Chile.
- González, R; Gentina, J; Acevedo, F. (2003). Electron. J. Biotechnol. 6, 233-243.
- González R, Gentina J, Acevedo F. (2004). Biooxidation of a gold concentrate in a continuous stirred tank reactor: mathematical model and optimal configuration. Biochemical Engineering Journal. 19, 33-42.
- Hansford, G. & Chapman, J. (1995). Batch and continuous Biooxidation Kinetics of a Refractory Gold-Bearing Pyrite Concentrate. 5. 597-612.
- Harneit, K; Goeksel, A; Kock, D; Klock, J; Gehrke, T; Sand, W. (2006). Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*. Hydrometallurgy. 83, 245-254.
- Jaramillo, K. (2014). Influencia del tiempo de residencia sobre la solubilización de un mineral aurífero refractario del distrito minero Portovelo en un sistema continuo de biooxidación en reactores de tanque agitado a escala laboratorio. Tesis de Ingeniería Química. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Mejía, E. (2010). Mineralogía del proceso de lixiviación bacteriana de calcopirita (CuFeS₂), esfalerita (ZnS) y galena (PbS). Tesis de Maestría, Universidad Nacional De Colombia, Colombia.
- Muzzio, T. (2002). Cinética de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en un medio definido con sulfato ferroso como fuente de energía. Tesis de Maestría, Chile-Valparaíso.
- Ospina, J; Mejía, E; Osorno, L; Márquez, M; Morales, A. (2012). Rev. Colomb. Biotecnol. 14, 135-145.
- Ossa, D. Márquez, M (2005). Biooxidación de sulfuros mediante cepas nativas de acidófilos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *thiooxidans*, mina de oro el Zancudo, (Titiribí, Colombia). Revista Colombiana de biotecnología. 7, 55-66
- Rossi G. (2001). The design of bioreactors. Hidrometallurgy. 59, 217-231.
- Schippers, A. and Sand, W. (1999). Bacterial Leaching of Metal Sulfides Proceeds by Two Indirect Mechanisms via Thiosulfate or via Polysulfides and Sulfur. Applied and Environmental Microbiology. 65, 319-321.
- Silverman, M. and Lundgren, D. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. An improved medium and a harvesting procedure for secure high cell yields. J. Bacterial. 77, 642-647.