

## APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS PARA UNA MINERÍA MÁS LIMPIA: REVISIÓN

OSPINA, J.D.,<sup>1,A</sup> OSORNO, B.L.,<sup>2,B</sup> GIRALDO, B.J.,<sup>3,C</sup> MEJÍA, E.R.,<sup>4,D</sup> MÁRQUEZ, M.A.<sup>5,E</sup>

<sup>1</sup> MSc Ing., Materiales-Procesos, Coordinación de Investigación, Área de Mecánica,

<sup>2</sup> Ing., Biológica, Producción Industrial, Tecnológico Pascual Bravo - I.U. AA 6564. Colombia.

<sup>3</sup> Administrador Salud-Gestión Sanitaria y Ambiental, Producción Industrial, Tecnológico Pascual Bravo-I.U.

<sup>4</sup> MSc Ingeniería, materiales-procesos, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Centro de la Manufactura Avanzada. Cadena TIC's Electrónica. AA 1188. Colombia.

<sup>5</sup> PhD en Geología Grupo de Mineralogía Aplicada y Bioprocesos (GMAB), Universidad Nacional de Colombia, Medellín AA 1027. Colombia.

<sup>a</sup>juan.ospina@pascualbravo.edu.co <sup>b</sup>lauraosornobedoya@gmail.com <sup>c</sup>jimgiraldo@gmail.com <sup>d</sup>emejia@sena.edu.co <sup>e</sup>mamarcaez@unal.edu.co

### RESUMEN

La oxidación de sulfuros es importante en muchos procesos geoquímicos naturales y artificiales, tales como la formación de depósitos minerales, intemperismo de rocas y minerales en diversos tipos de ambiente, enriquecimiento supergénico de menas, formación de drenajes ácidos en minería, así como un método alternativo de pretratamiento oxidante para la liberación de oro en menas refractarias, lixiviación de otros metales de interés económico como el Cu, Zn, Ag, Ni, Co, alternativa para mejorar procesos de flotación, una opción para desulfurización de carbones, evitando así las emisiones de gases tóxicos como el SO<sub>2</sub> a la atmósfera, entre otros. La utilización de una variada cantidad de microorganismos quimiolitotórficos en la lixiviación/oxidación de minerales metálicos, ha venido ganando un gran auge debido al mejoramiento en la cinética y eficiencia de los mecanismos implicados en los procesos extractivos. La oxidación con bacterias ha mostrado un gran potencial debido a sus bajos costos de capital y operación, versatilidad en cuanto a la adaptación a diferentes tipos de proceso y menas, así como sus ventajas desde el punto de vista ambiental, comparada con métodos usados comúnmente en el beneficio de menas como lo son la tostación y la oxidación bajo presión.

**Palabras clave:** Biohidrometalurgia, biominería, biobeneficio, bioblanqueo, biodesulfurización

### ABSTRACT

Sulfide biooxidation is very important in many natural and artificial geochemistry processes, like the genesis of mineral deposits, rock and mineral weather in different environments, supergenic enrichment, acid mine drainage generation. Besides, sulfide biooxidation has many applications like oxidative pretreatment for the improving of the gold recuperation in refractory ores, bioleaching of base metals of economic interest like Cu, Zn, Ag, Ni, Co, an alternative to improve the froth flotation of minerals, an option to withdraw the sulfur contained in coals, minimizing the emission of toxic gases as the SO<sub>2</sub>, etc. The use of a varied quantity of chemolithoautotrophic microorganisms in the leaching/oxidation of metallic sulfides and other minerals has come gaining a big heyday

due to the improvement the kinetics and efficiency of the mechanisms involved in the extractive processes. The sulfide bacterial oxidation has showed a big potential due to his low costs of capital and operation, versatility as for the adaptation to the different types of process and ores, as well as his advantages from the environmental point of view, compared with other methods, used commonly ore beneficiation, as the roasting or the pressure sulfide oxidation.

**Key words:** Biohydrometalurgy, biominining, biobeneficiation, biobleaching, biodesulfurization

## 1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología de minerales es un campo de la ciencia de extracción de metales provenientes de minerales concentrados, rocas y soluciones, bajo el impacto de microorganismos y sus metabolitos (Karavaiko *et al.*, 1988). Los procesos microbiológicos que juegan un papel importante en la minería se puede resumir en tres grandes grupos, dentro de los cuales están la oxidación de sulfuros, azufre elemental y hierro ferroso, la producción de compuestos orgánicos, peróxidos y otros, mediante el uso de microorganismos organotróficos los cuales destruyen minerales y oxidan o reducen los elementos con diferentes valencias y, por último, la acumulación de elementos químicos o su precipitación por microorganismos. Dentro de los procesos biotecnológicos mencionados, la lixiviación bacteriana es uno de los procesos comercialmente exitosos. Este tipo de proceso viene siendo utilizado desde hace varias décadas para la extracción de Cu en menas sulfuradas, la oxidación de menas refractarias de oro y en años recientes en procesos de lixiviación de otros metales como como lo es el Zn. Varios autores han estimado que, por ejemplo, la biolixiviación de minerales de cobre contribuye con un porcentaje de entre el 10 y el 20 % a la producción total de cobre en el mundo (Rodríguez *et al.*, 2001a). De otro lado, el proceso industrial de lixiviación bacteriana usada para mejorar la extracción de metales de interés comercial, por algunos denominado biooxidación, ha ganado mucha atención en los recientes años, estimando por ejemplo un valor aproximado de US\$ 10 a US\$ 50 millones, en equivalentes de oro, por biooxidación de sulfuros en 1988, valor

que pudo aumentar a US\$ 3 billones para 1998 (Blake *et al.*, 1994).

Más recientemente, se han iniciado estudios en nuevas áreas potenciales en la biooxidación de sulfuros, como es la bioflotación, biodesulfurización, bioblanqueo entre otros. En la bioflotación selectiva, algunos microorganismos se han estudiado con el fin de ser usados para cambiar las propiedades superficiales de los minerales de interés, ya sea mediante su adhesión selectiva a los sulfuros o modificando químicamente su superficie, en búsqueda de nuevas opciones que reemplacen los compuestos químicos (de reconocida capacidad contaminante), usados comúnmente en la flotación comercial como floculantes, colectores o depresantes (cianuros, dicromatos, polisulfuros, etc.) (Santhiya *et al.*, 2006, Misra *et al.*, 1996; Chandraprabha y Natarajan, 2006; Chandraprabha *et al.*, 2004, 2005; Hosseini *et al.*, 2005). La biodesulfurización se ha venido estudiando desde hace un par de décadas con el fin de encontrar nuevas técnicas que permitan retirar el azufre contenido en carbones y crudos, como una opción para la obtención de combustibles fósiles más limpios. En este caso los microorganismos, mediante mecanismos de biolixiviación, solubilizan el azufre contenido el cual puede ser retirado de forma eficiente, minimizando la emisión de gases tóxicos del tipo SO<sub>x</sub>, actualmente con fuertes regulaciones por parte de las diferentes entidades ambientales que regulan este tipo de emisiones gaseosas. Existen métodos físicos y químicos alternativos, sin embargo estos suelen ser ineficientes y contaminantes, además de perjudicial para el

tratamiento en vista de que desmejoran las características de los combustibles como son su capacidad calorífica entre otros.

Dentro de las principales ventajas con las que cuenta la biolixiviación/biooxidación de sulfuros sobre otras tecnologías tradicionales se encuentran: (i) no producción de contaminantes gaseosos, siendo que los desechos sólidos y líquidos son ambientalmente aceptados y fácilmente controlables, (ii) simplicidad y versatilidad del diseño y las operaciones que hacen de esta tecnología apropiada para el uso en locaciones remotas, sin requerimientos de mano de obra muy calificada, (iii) puesta en marcha corta y costos de capital y operación bajos, comparados con las técnicas de tostación y oxidación por presión (Ortiz, 1992; Yannopoulos, 1990). Además del valor comercial de la lixiviación bacteriana, las interacciones de los microorganismos implicados con los minerales sulfurosos son un factor significativo en la formación de drenajes ácidos de minería, los cuales, cuando no son controlados adecuadamente, se constituyen en un problema ambiental serio. El conocimiento de los mecanismos de la oxidación bacteriana de minerales sulfurosos podría ser muy útil en la prevención de los drenajes ácidos y en la optimización del diseño y operación de las plantas de biolixiviación/biooxidación (Fowler y Crundwell, 1998 y 1999), así como los mecanismos que tienen implicancia en un proceso de bioflotación. En esta publicación se pretende hacer un pequeño recuento de las principales aplicaciones de la biotecnología en la minería, así como algunas características de su funcionamiento.

## 2. MICROORGANISMOS IMPLICADOS

La biolixiviación a partir de sulfuros y otros minerales menos comunes como óxidos, oxihidróxidos, silicatos, entre otros, se

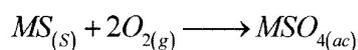
ha estudiado una variada cantidad de microorganismos acidófilos, principalmente quimiolitotrofos. Las bacterias mesófilas pertenecientes a los géneros *Acidithiobacillus sp.* y *Leptospirillum sp.*, en particular *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*, han sido los microorganismos más estudiados y usados a nivel mundial en el área industrial. Dentro de otras especies estudiadas se encuentran microorganismos moderadamente termófilos e hipertermófilos, las cuales en la actualidad se están estudiando y probando ostensivamente, ya que su capacidad de trabajo a mayores temperaturas (>40°C) mejora en principio la cinética de reacción, haciendo procesos más rápidos y eficientes en el tiempo. Dentro de los trabajos en reactores a temperaturas entre 40-50°C el microorganismo probablemente más reportado es el *Acidithiobacillus caldus* (Semenza *et al.* 2002, Zhou *et al.*, 2007, Aston *et al.*, 2009), sin embargo existen reportes de otras especies en este rango de temperatura con potencial en esta área de trabajo como lo son *Sulfobacillus sp.*, *Ferroplasma acidarmanus*, *Acidimicrobium ferrooxidans*, entre otras. Dentro de los microorganismos extremadamente termófilos (> 60°C) *Sulfolobus metallicus* (Hallberg y Johnson, 2001, Astudillo y Acevedo, 2008), *Acidianus sp.* y *Metallosphaera sp.*, son probablemente los más importantes. Dichas bacterias obtienen energía de la oxidación de iones ferrosos y de compuestos reducidos del azufre, siendo ésta una de las principales razones para que estos minerales se conviertan en recursos energéticos para ellas.

Los quimiolitótrofos acidófilos, se movilizan por medio de flagelos, los cuales permiten movimiento hacia ambientes más favorables. Ellos poseen receptores quimiotácticos que registran los cambios producidos en su ambiente y algunas disoluciones químicas del mineral. Estas disoluciones podrían ser controladas

por procesos electrostáticos tales como: generaciones de ánodos y cátodos debido a cargas desbalanceadas y distancias entre electrones. La unión de los microorganismos al mineral depende de la capacidad de éstos para disolver concentraciones de gradientes iónicos presentes en la vecindad inmediata del sólido. Se ha comprobado una respuesta quimiotáctica para iones metálicos y otros compuestos. Las señales para un gran número de atractantes y repelentes son procesadas por conjuntos de proteínas transmembranales estructuralmente relacionadas y conocidas como receptores quimiotácticos, la señal se dispara por la unión externa de un efector (Jerez, 2001).

### 3. MECANISMOS DE INTERACCIÓN MINERAL-BACTERIA

Debido a que la efectividad de los microorganismos para solubilizar metales de menas depende de la velocidad de los procesos de oxidación, un prerequisite necesario para la optimización de los procesos biohidrometalúrgicos es el correcto entendimiento de los mecanismos por los cuales los microorganismos catalizan los procesos oxidativos y utilizan la energía liberada (Blake *et al.*, 1994). La biolixiviación es el proceso de catálisis, directo o indirecto que generan algunos microorganismos en el proceso de solubilización de un componente presente en una matriz insoluble. En este proceso se pueden incluir una amplia variedad de especies que podrían recuperarse, pero generalmente este término se asocia con la recuperación de metales de baja ley (metales con concentraciones menores al 0.5 %p/p, generalmente). Este proceso se fundamenta en la transformación de sulfuros insolubles en sulfatos solubles y puede expresarse por medio de la siguiente ecuación:



Los mecanismos mediante los cuales los microorganismos participan en la lixiviación de

minerales sulfurados se definen de contacto y de no contacto. En el mecanismo "de contacto" las bacterias oxidantes de azufre son capaces de disolver azufre y otros intermediarios de éste mediante un mecanismo de contacto directo o indirecto sobre el mineral. En el mecanismo de "no contacto" la oxidación del mineral y consecuente lixiviación de los elementos contenidos en él, se da como consecuencia del ataque del  $Fe^{3+}$  (generado por la bacteria a partir de la oxidación de  $Fe^{2+}$  disponible en la solución) sobre sulfuros insolubles. Por otro lado, la oxidación de los diversos sulfuros se puede clasificar a partir de dos mecanismos diferentes, el "mecanismo vía tiosulfato" y "mecanismo vía polisulfuro" (Schippers y Sand, 1999). En el primero se encontró que la pirita, molibdenita y tugstenita (y otros disulfuros), donde éstos solo pueden ceder electrones desde bandas de valencia del metal (sin afectar el enlace azufre-metal), por lo que son denominados no solubles en ácido. Estos sulfuros no generan azufre como principal producto de oxidación sino tiosulfato, el cual es el primer producto librado por el sulfuro luego de seis pasos sucesivos de oxidación. Este tiosulfato es posteriormente oxidado por tetratiónato y otros politiónatos hasta sulfato. Este mecanismo solo lo generan bacterias hierro-oxidantes (Schippers y Sand, 1999). El mecanismo vía polisulfuro juega un papel esencial en sulfuros solubles en ácido como esfalerita (ZnS), galena (PbS), calcopirita ( $CuFeS_2$ ), novelita (CuS), arsenopirita (FeAsS), entre otros. En éstos el ataque del  $Fe^{3+}$  o protones ( $H^+$ ) genera la transferencia de electrones desde el sulfuro provocando la ruptura de la unión entre azufre metal. En este proceso una gran cantidad de sulfuro es oxidado a azufre elemental, el cual posteriormente puede ser oxidado por las células a azufre oxidante (Schippers y Sand, 1999).

Dada la complejidad de los mecanismos antes mencionados es muy difícil determinar cuál de los mecanismos dominan los procesos de lixiviación bacteriana o cómo es la interacción entre éstos. A pesar de que existe evidencia de la adsorción de los *Acidithiobacillus sp.*, a la superficie del



mineral, la contribución al proceso de oxidación por contacto directo, en comparación con las reacciones químicas indirectas por medio de iones férricos solubles, permanece sin aclarar, ya que hay dificultades para enumerar las partículas que poseen bacterias adheridas, siendo otro factor influyente la heterogeneidad de las muestras minerales. Las bacterias son además anfotéricas en virtud de los residuos iónicos en su superficie celular y por la adsorción preferencial de iones. Debido a esto, se ha tratado de investigar técnicas que estudien las interacciones y la estabilidad de sistemas coloidales para ser aplicados a las interacciones de las bacterias con su substrato mineral insoluble (Blake *et al.* 1994). Las interacciones electrostáticas son usualmente repulsivas ya que ambos, la bacteria y la superficie del mineral, tienen predominantemente carga negativa. El balance entre esas fuerzas de atracción y repulsión determinan la velocidad con la cual las partículas pueden aproximarse suficientemente cerca por posibles fuerzas de corto alcance como uniones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, contribuyendo así a la adherencia (Blake *et al.* 1994).

Es de considerar que el crecimiento de estas bacterias y por ende la oxidación de hierro o azufre, puede ser inhibido por altas concentraciones de los metales presentes en los sulfuros tales como Cu, Pb, Zn. Por ejemplo hay una inhibición de la oxidación del  $Fe^{2+}$  por la concentración de algunos iones presentes como el  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ , o  $Zn^{2+}$  y este fenómeno es competitivo. Además, se desconoce el efecto que puede tener diferentes valores de pH en los microorganismos y en la inhibición de la oxidación de dichos elementos (Suzuki *et al.*, 1999; Nagaoka *et al.*, 1999). La lixiviación de los minerales refractarios incluyendo piritita, calcopiritita, esfalerita entre otros, es fuertemente influenciada por la interacción de la temperatura, el pH, el potencial redox y el tamaño de la partícula, por esta razón puede existir un control bioquímico específico para cada mineral. Dicha lixiviación se puede monitorear indirectamente

determinado el pH, potencial redox y metales disueltos. Por ejemplo, cuando la lixiviación es activa los valores de redox pueden llegar alrededor de 600 mv. Los efectos galvánicos acoplados entre los minerales pueden disminuir las barreras cinéticas de la oxidación bacteriana, acentuando el papel del movimiento de los iones metálicos en la vecindad de la superficie del mineral y esto influye para determinar la velocidad de la reacción (Chaudhury *et al.*, 1985; Lasse y Tuovinen, 1991).

Los cambios fisicoquímicos antes mencionados tales como pH, Eh, temperatura T, concentración de metales disueltos, los cuales ocurren durante el curso de la oxidación del mineral proveen presiones selectivas que resultan en la emergencia de algunos microorganismos como los acidófilos, mientras que otros asociados con la muestra del mineral original serán reducidos o no tendrán importancia en el proceso de disolución, sin embargo ellos pueden tener efectos sinérgicos o antagónicos dentro del proceso general de biooxidación (Tuovinen *et al.*, 1994). Por lo expuesto anteriormente, se puede entender que la oxidación de los minerales no es un fenómeno constante, es más una sucesión de diferentes pasos que pueden estudiarse electroquímicamente, por tanto cada paso puede ser identificado por un comportamiento electroquímico, el cual puede cambiar con relación al contenido lixiviado, al crecimiento bacteriano y a parámetros físicos como patrones de corrosión entre otros. (Mustin, 1992).

Los microorganismos lixiviantes tienen un gran potencial para remediación de sitios con práctica minera, detoxificación de lodos activados, suelos y sedimentos contaminados con metales pesados. Los problemas de bioremediación de metales pesados son muy diferentes a los de contaminación orgánica. Los contaminantes orgánicos pueden ser degradados biológicamente siendo los productos  $CO_2$  y agua, pero los metales pesados no pueden ser descompuestos ni biológica química o físicamente, ellos podrán



ser solubilizados, podrían cambiar de valencia o su estado quelante, podrían ser inmovilizados, pero aún siguen siendo metales. Además altas concentraciones son tóxicas por lo tanto se hace necesario la adopción de programas de limpieza para recuperar el ambiente (Bosecker, 2001). Recientemente se ha investigado que puede existir una aceleración de la oxidación de los minerales sulfurosos, tanto en minas abandonadas como en minas con procesos industriales activos, debido a las interacciones existentes entre consorcios de acidófilos presentes en dichos lugares (Bacelar y Johnson, 1999; Bond *et al.*, 2000; Johnson, 1998 y 2001; Rawlings *et al.*, 1999). A continuación se hará un breve recuento (explicación) de las principales aplicaciones de la biotecnología en la minería.

#### 4. ALGUNAS APLICACIONES A NIVEL DE LA INDUSTRIA

##### 4.1. Biooxidación de menas refractarias de oro

La necesidad de procesar depósitos de oro refractario cada vez más complejos ha generado presiones económicas debido a la sostenibilidad de las explotaciones auríferas localizadas en este tipo de depósitos. Se estima que la tercera parte de la producción total de oro en el mundo proviene de depósitos refractarios (Das y Sen, 2001). En las menas de oro refractario este metal está íntimamente asociado a sulfuros insolubles, típicamente pirita y arsenopirita (Das y Sen, 2001; Karamanev *et al.*, 2001; Gallego *et al.*, 2005; Márquez *et al.*, 2006). Estos sulfuros impiden el contacto entre el cianuro y el oro en los procesos hidrometalúrgicos convencionales (cianuración), aún después de una molienda fina, resultando en bajas recuperaciones del metal (Das y Sen, 2001). Por la dificultad, ya sea química o física, para extraer los metales de interés, se requiere de un pretratamiento que permita destruir la matriz de sulfuros que contienen encapsulado o en solución sólida al oro. Entre las tecnologías usadas comercialmente se encuentran la oxidación por presión, la oxidación química, la

tostación y la biooxidación (Karamanev *et al.*, 2001; Das y Sen, 2001).

La oxidación bacteriana presenta ventajas con respecto a los otros procesos alternativos, porque es una tecnología ampliamente versátil, que ofrece multitud de posibilidades, en cuanto a su economía y complejidad, para la solución de problemas en el campo de la recuperación de metales a diferentes escalas. Adicionalmente, es una tecnología reconocida internacionalmente como *más limpia* (Thomas, 1991; Das y Sen, 2001; Karamanev *et al.*, 2001). Desde 1980, diferentes estudios de biooxidación a escala de laboratorio y planta piloto se han realizado en reactores de tanque agitado y columnas *air lift*, siendo los reactores continuos de tanque agitado los más implementados en las operaciones industriales a gran escala para el tratamiento de menas de oro refractario, debido a sus ventajas técnicas y económicas (Rossi, 2001; Deveci, 2002; González *et al.*, 2004). Actualmente, este proceso biotecnológico es aplicado para la recuperación de oro en ocho plantas a nivel comercial, entre las que se encuentran las establecidas en Australia, Sudáfrica, Ghana, Perú y Brasil (Das y Sen, 2001, González *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos sugieren que el proceso de biooxidación es una alternativa técnica, económica y ambientalmente viable, al compararla con las técnicas convencionales de oxidación por presión, tostación y oxidación química (D'Hugues *et al.*, 1997; Das y Sen, 2001, González *et al.*, 2003). Se ha estimado aproximadamente que un valor de US\$ 10 a US\$ 50 millones de equivalentes en oro fue recuperado por biooxidación en 1988 y que este valor pudo aumentar a US\$ 3 billones para 1998 (Robert *et al.*, 1994).

La biooxidación es un proceso en el cual ciertos microorganismos oxidan y disuelven los sulfuros a través de una acción directa e indirecta de los mismos. Estos microorganismos utilizan como fuente primaria de energía las especies reducidas de hierro y azufre, y el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono para su síntesis

celular. El *Acidithiobacillus ferrooxidans* es el microorganismo más estudiado y utilizado en la oxidación bacteriana de minerales sulfurados (Rodríguez *et al.*, 2001), así como el uso de consorcios de este con *A. thiooxidans* (Arroyave, 2008) y *L. ferrooxidans* (Sampson y Phillips, 2001). Más recientemente se han venido haciendo estudios encaminados a la utilización de microorganismos moderadamente termófilos y extremadamente termófilos, con el objeto de en principio mejorar la cinética de los procesos mediante el aumento de la temperatura a niveles arriba de 40°C para el primer grupo y por encima de los 60°C para los últimos. Dentro de algunos de los microorganismos estudiados se encuentran: *Sulfolobus metallicus* (70°C) (Astudillo y Acevedo, 2008), *Sulfobacillus thermosulfidoxidans* y *Sulfobacillus acidophilus* (50°C) (Sampson y Phillips, 2001), *Acidithiobacillus caldus* and *Sulfobacillus* spp. (45–50°C) y *S. metallicus* (65–70°C) (Lindström *et al.*, 2003). Aunque en las últimas décadas la oxidación de sulfuros por medio de microorganismos ha tenido un gran impacto en el mundo en la preparación de minerales refractarios antes de la lixiviación con cianuro de sodio, en Colombia esta tecnología es poco conocida y actualmente no es aplicada a escala comercial en la industria minera.

#### 4.2. La biodesulfurización de carbones

Entre los diversos elementos que se encuentran en el carbón, el azufre, el cual se encuentra tanto en la forma de compuestos inorgánicos (principalmente sulfuros (pirita) y sulfatos), como ligado a la estructura del carbón en forma de componentes orgánicos (Bozdemir *et al.*, 1996), juega un papel importante en casi todos los sistemas que usan carbón, en especial los carbones utilizados en los procesos de combustión, donde se generan compuestos volátiles sulfúricos principalmente SO<sub>2</sub>, el cual se encuentra dentro del grupo de las sustancias más tóxicas que polucionan la atmósfera (Juszczak *et al.*, 1995). Es por eso que las investigaciones en procesos de desulfurización están más enfocadas hacia este tipo de carbones (Acharya *et al.*,

2001). Entre los procesos de desulfurización tradicionales, los métodos físicos son incapaces de remover completamente el azufre (Cara *et al.*, 2003), por lo cual ha llevado al desarrollo de muchos procesos de desulfurización químicos y físico-químicos. Aunque con estos métodos se logran mayores tasas de reducción, sus costos son altos y por lo general implican la generación de residuos y efluentes contaminantes, además de la disminución de las propiedades del carbón (Prayuenyong, 2002).

En la búsqueda de tecnologías para eliminar el azufre del carbón, que sean amigables tanto ambiental como económicamente, los métodos biológicos son los que han despertado mayor interés, debido a su simplicidad de diseño y construcción, además otras ventajas que poseen respecto a los métodos convencionales (Bozdemir *et al.*, 1996; Juszczak *et al.*, 1995). La biodesulfurización, basada en mecanismos de biolixiviación, consiste en una oxidación de sulfuros metálicos insolubles catalizada por microorganismos acidófilos en un medio acuoso, para volverlos solubles en forma de sulfatos (Cara *et al.*, 2005; Kodali *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2006; Cardona y Márquez, 2009). La mayoría de los estudios sobre la aplicación de métodos biológicos en la desulfurización del carbón, han sido enfocados netamente en la oxidación del azufre pirítico, utilizando principalmente microorganismos mesófilos quimiolitotróficos del género *Acidithiobacillus*, especialmente *A. ferrooxidans* (Cartmell y Lancaster, 1983). Las primeras investigaciones reportadas en la literatura (1959 - 1961), empezaron evaluando los efectos de varios factores físicos en la velocidad de disolución de pirita en el carbón, utilizando *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* como oxidantes, mostrando resultados de oxidación acelerada en muestras de pirita contenida en el carbón, en comparación a ensayos con pirita pura (Silverman *et al.*, 1961; Zarubina *et al.* 1959 en Eligwe, 1988). Por otra parte, se proponen métodos que involucran tratamientos combinados físicos y biológicos en continuo (1973), donde se reportan remociones del 84% de azufre pirítico, y hasta un 94%, cuando se recirculan las soluciones obtenidas previamente en el proceso (Butler y Kempton, 1986).



Otros estudios han comparado la capacidad de biodesulfurización de bacterias mesófilas (*A. ferrooxidans*), con cultivos mixtos de bacterias termófilas tales como *Sulfolobus acidocaldarius* y *ferrolobus*, microorganismos que también actúan en la oxidación de formas reducidas de azufre. Por otra, se investigaron desarrollos de procesos en dos fases, con el fin de eliminar el azufre orgánico ligado a la estructura del carbón, en la cual la pirita es oxidada primero por microorganismos autótrofos, y después utilizando cultivos mixtos de bacterias heterótrofas (*Acidophilus*, *T. novellus* y *T. perometabolis*) se oxidaban los compuestos de azufre orgánico, de lo cual se obtuvieron remociones de hasta un 90 % del azufre total presente en el carbón (Eligwe, 1988; Clark *et al.* 1993). En los últimos años se han realizado estudios sobre perfeccionamiento de los procesos con base en factores químicos y físicos del proceso como pH, temperatura, concentración de hierro en el lixiviado, oxígeno disuelto, CO<sub>2</sub>, etc., y biológicos como el tipo de inóculo de microorganismos a ser utilizados (Cara *et al.*, 2003; Gleisner *et al.*, 2006) y cómo afecta la concentración de partículas suspendidas de carbón, pirita y metales pesados en la biodesulfurización (Nies, 1999; Malik *et al.*, 2004). Se han desarrollado mecanismos de biolixiviación en reactores agitados y de lecho empacado a nivel de laboratorio (Cara *et al.*, 2006), realizando algunos ensayos a nivel de planta piloto (Morán *et al.*, 1997), evaluándose los procesos que tengan mayor viabilidad económica para poderse llevar a nivel industrial, así como propuestas para su optimización (Morán *et al.*, 1997; Cara *et al.*, 2005). También se han realizado estudios de aplicabilidad como un proceso complementario a un pretratamiento físico a nivel piloto, buscando alcanzar un proceso óptimo de desulfurización (Martínez *et al.*, 2003).

#### 4.3. Biolixiviación de Cu y Zn a partir de calcopirita y esfalerita

Desde hace algunas décadas se implementa en la industria minera, a nivel internacional como

Brasil, Chile, España, Australia, entre otros, el empleo de microorganismos para facilitar la extracción de metales base, tales como cobre y zinc entre otros, a partir de sulfuros. Esta práctica es denominada biolixiviación, término general acuñado para describir como algunos microorganismos solubilizan estos metales, base de la economía y desarrollo de los sectores mineros, mediante la combinación de procesos químicos y microbiológicos (Rawlings, 2007). El uso de microorganismos en la lixiviación de minerales metálicos, especialmente de bajo grado, ha venido ganando, en las últimas décadas, un gran auge, debido a sus bajos costos de capital, operación y versatilidad en cuanto a la adaptación a los diferentes tipos de proceso (Brierley e Luinstra, 1993; Watling, 2006). Además, estos procesos presentan grandes ventajas desde el punto de vista ambiental, comparada con otros métodos usados rutinariamente en el beneficio de menas como son la tostación y la oxidación bajo presión (Gilbert *et al.*, 1988; Marsden & House, 1992).

La calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>) es la fuente primaria de cobre, representando alrededor del 70% de las reservas de cobre en el mundo (Dutrizac, 1981, Ribadeneira, 2006). La recuperación de cobre de la calcopirita generalmente se hace vía pirometalúrgica, luego de ser sometida a un proceso de concentración por flotación (Córdoba *et al.*, 2008). El interés en la biohidrometalurgia se ha incrementado recientemente con el fin de minimizar las emisiones de dióxido de azufre a la atmósfera y reducir el consumo energético generado en los procesos convencionales (Al-Harashsheh *et al.*, 2006). Sin embargo, en los procesos de biolixiviación de calcopirita se recupera solo una parte del cobre, ya que la velocidad de disolución de este metal es más lenta que en otros minerales de cobre como calcocita (Cu<sub>2</sub>S) y bornita (Cu<sub>5</sub>FeS<sub>4</sub>) (Hiroyoshi *et al.*, 2000, Parker *et al.*, 2003). Luego de casi un siglo de investigación sobre los mecanismos de disolución de calcopirita, existe un consenso respecto a la formación de una película en la superficie de mineral que pasiva la salida de

cobre al medio. A pesar de esto, la naturaleza de esta película es aún desconocida, aunque se ha postulado que debe tener baja porosidad o ser un mal conductor eléctrico (Córdoba *et al.*, 2008). Diversas teorías han sido propuestas con el fin de explicar la naturaleza y la composición de la película que genera la pasivación de este mineral, las cuales son: formación de una película de azufre elemental, deficiencias de metal en la superficie del mineral, formación de polisulfuro  $XS_n$  en la superficie, formación de una película de jarosita  $XFe_3(SO_4)_2(OH)_6$  en la superficie (Dutrizac, 1981, Hackl, 1995, Yin *et al.*, 1995, Bevilaqua *et al.*, 2002, Córdoba *et al.*, 2008). Klauber (2008) realizó un *review* sobre las características químicas de película formada en la superficie de la calcopirita y sugirió que las teorías más acertadas son deficiencias de metal en el sulfuro generada por la disolución no estequiométrica de la calcopirita y formación de una capa de azufre elemental en la superficie de la calcopirita (Acero *et al.*, 2007, Sasaki *et al.*, 2009). Además todos los estudios realizados llegan a la conclusión que la precipitación de jarosita está estrechamente relacionada con la pasivación de la calcopirita. Por lo anterior, es muy importante abordar la investigación desde diferentes ángulos con el fin de comprender el mecanismo de pasivación de la calcopirita. En el laboratorio de Biomineralogía, de la Universidad nacional de Colombia, sede Medellín, se está desarrollando un trabajo que pretende elucidar en el mecanismo de biolixiviación de la calcopirita (Mejía *et al.*, 2009).

La esfalerita ( $Zn_xFe_{1-x}S$ ) es la fuente primaria de zinc en el mundo presentando gran interés en diferentes industrias como la metalúrgica, química y la industria textil (Peng *et al.*, 2005, Harmer *et al.*, 2006). La recuperación de zinc a nivel mundial se hace actualmente por métodos hidrometalúrgicos y pirometalúrgicos (Le-xian *et al.*, 2008). El interés en la biohidrometalurgia del zinc se ha incrementado recientemente debido a que ésta presenta beneficios como la explotación de minerales de bajo grado y permite el tratamiento de concentrados de zinc,

los cuales son difíciles de procesar por métodos convencionales; además, la biolixiviación de zinc no exige altos costos y es ambientalmente más amigable (Rodríguez *et al.*, 2003). Recientes estudios en la biolixiviación de la esfalerita (ZnS), con microorganismos acidófilos muestran una buena recuperación del zinc (Fowler y Crundwell, 1998, Rodríguez *et al.*, 2003, Donati and Sand 2006, Zapata *et al.*, 2007). Sin embargo, algunos autores han encontrado que el azufre elemental formado durante el proceso de lixiviación, cubre las partículas de esfalerita disminuyendo la eficiencia del proceso (Crundwell 1987, Fowler y Crundwell, 1998, Da Silva *et al.*, 2003 y Peng *et al.*, 2005 y Zapata *et al.*, 2007). Es evidente que aún no existe un acuerdo sobre los mecanismo de lixiviación de la esfalerita durante este tipo de proceso, ni una teoría aceptada que lo explique (Rodríguez *et al.*, 2003).

#### 4.4. Biolixiviación de hierro y bioblanqueo de arcillas

El caolín es usado en una gran cantidad de industrias debido a sus propiedades físicas y químicas características, tales como su forma, tamaño de partícula, suavidad, no abrasividad, baja capacidad de intercambio iónico, relativa insolubilidad, entre otras. Debido a los compromisos entre sus propiedades físicas y químicas, éste es usado en las industrias del papel, caucho, cerámicos, cemento, plásticos, pinturas, catálisis, insecticidas, productos farmacéuticos, entre otros (Murray, 1961). Algunos de los principales requerimientos exigidos por la industria son el color, la blancura y el brillo, los cuales se ven afectados, de una u otra manera y de forma especial, por el contenido de minerales acompañantes, muchas veces finamente intercrecidos con la caolinita, los cuales son principalmente del grupo de los óxidos y de hierro, tales como la goethita, hematita, magnetita dentro de los más comunes y óxidos de titanio como el rutilo e ilmenita. Otros óxidos de Mn, Cr, etc. pueden generar cambios en el color, sin embargo estos son poco frecuentes o se encuentran en cantidades mínimas en este

tipo de ambiente. Es importante agregar que además de esto, la presencia de elementos cromóforos en la estructura cristalina de la caolinita, como es el caso del Fe o Ti (dentro de los más comunes) los cuales pueden sustituir al Al en el sitio octaédrico o, con mayor dificultad, en el tetraédrico, son generadores de color.

El color en la caolinita varía de acuerdo al estado en que se encuentre el hierro. Generalmente los colores rojizos pueden deberse a contaminación con hierro férrico en estado no hidratado (hematita) y a medida que ello aumenta se tiende a colores amarillentos (goethita). El color verdoso se asocia al hierro en forma ferrosa y alta hidratación (Blanco y Ospina, 1994). Desde hace varias décadas, los métodos biotecnológicos aplicados a diversas áreas de la ingeniería vienen siendo estudiados y en algunos casos utilizados como una alternativa que, además de ser clasificada como ambientalmente limpia, presenta, debido a su versatilidad y manejo relativamente simple, un panorama favorable en procesos de extracción de valiosos, lixiviación de metales con diversos intereses, tratamiento de materiales, remediación de suelos, biosíntesis, etc. En el área de blanqueo de caolines y otros minerales industriales como arenas de cuarzo, feldespatos, etc., se ha venido estudiando la competencia de microorganismos heterotróficos, donde su habilidad para remover hierro a partir de éstos mejora la calidad de caolines, aumentando su brillo y blancura (Mesquita *et al.*, 1996; Cameselle *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002; Groudev *et al.*, 1985, 1989 in Mesquita *et al.* 1996; Groudev, 1987 in Mesquita *et al.*, 1996).

Existe otro método para remover el hierro, vía biotecnológica, en el cual se parte de la forma oxidada del Fe<sup>3+</sup> que es insoluble, por lo que es reducido a Fe<sup>2+</sup>, el cual es soluble. Los microorganismos que se han utilizado son: *Pseudomonas s.p.*, *Azotobacter s.p.* y *Aspergillus niger*. Las bacterias heterótropas y fungi en crecimiento en la presencia de materiales sólidos son hábiles para lixiviar metales pesados.

El ataque de minerales es debido al efecto de ácidos orgánicos producidos (ácido oxálico, ácido cítrico, ácido glucónico), aminoácidos y otros metabolitos que son excretados dentro del medio de cultivo. Los metales pesados son disueltos por desplazamiento directo de los iones metálicos de la matriz del mineral por iones hidrógeno y por la formación de complejos metálicos solubles y quelatos. Estos microorganismos requieren una fuente de carbono orgánico para el crecimiento y suministro de energía.

Lee *et al.* (2002), reportaron que la reducción bacteriana de Fe<sup>3+</sup> en arcillas caoliníticas se da en un proceso anaerobio, acoplado al metabolismo del carbono y transporte de electrones del Fe<sup>3+</sup> reducido por las bacterias nativas presentes en el caolín. Se utilizaron varios azúcares como fuente de carbono: glucosa, galactosa, sucrosa y sacarosa, obteniendo los mejores resultados en cuanto a mayor cantidad de hierro reducido (3.4 mg de Fe<sup>2+</sup>/g de arcilla) con la glucosa en un tiempo de 65 horas. También se comparó la cantidad de hierro reducido, proveniente de un recipiente con bacterias nativas sin inóculo y de un recipiente con bacterias nativas suplementadas con bacterias reductoras de hierro. El resultado fue que en el segundo recipiente se produjo mayor cantidad de hierro reducido (3.1 mg de Fe<sup>2+</sup>/g de arcilla) en un tiempo de 60 horas. Después de la purificación bacteriana, el brillo del caolín purificado mejoró con el incremento de la blancura y disminución del color rojo comparado con material sin tratar. La purificación microbiana no produjo ninguna modificación en la composición mineralógica del caolín. Por otro lado Cameselle *et al.* (2003) han reportado otro trabajo en el cual la biolixiviación se probó en dos procesos levemente diferentes, el primero "in situ" y el segundo biolixiviación en dos etapas. En el primer proceso se utilizaron dos cepas de *Aspergillus niger* (CBS 246-65 y 1120) creciendo en un medio de cultivo adecuado, para la producción de metabolitos activos, los cuales sirven en el proceso de lixiviación. Luego el medio de cultivo gastado fue utilizado en la segunda etapa como un agente lixivante para el

mineral. El medio de cultivo utilizado fue extracto de malta 30 kg/m<sup>3</sup>, peptona 3 kg/m<sup>3</sup> y agar 15 kg/m<sup>3</sup>, a un pH de 5.6, utilizado para el crecimiento y mantenimiento del microorganismo.

Para el proceso de biolixiviación "in situ" mediante la cepa *Aspergillus niger* (CBS 246-65), los mejores resultados se dieron con 5 g de caolín y una concentración de 106 esporas de *A. niger* / cm<sup>3</sup> (valor fijo utilizado en todos los experimentos), donde se consiguió una lixiviación de 49 g de hierro disuelto /m<sup>3</sup> (12% del hierro lixiviable), en un tiempo de 15 horas. Por otro lado, la cepa de *Aspergillus niger* 1120 alcanzó la mayor remoción de hierro, usando las mismas condiciones que la cepa anterior, lixiviando un total de 300 g de hierro disuelto/m<sup>3</sup>, en un tiempo aproximado de 15 horas, siendo por lo tanto una remoción de hierro del 75%. En el segundo proceso, biolixiviación en dos etapas, en la primera se cultivó la cepa de *A. niger* 1120 (cepa con mejores resultados), la cual se cultivó en sucrosa suplementada con nitrato de amonio y fosfato ácido de potasio, a un pH controlado de 6. Después de dos días se produjo ácido oxálico (27.2 kg/m<sup>3</sup>) con una razón muy alta 0.3 g ácido oxálico/g de sucrosa consumido. En la segunda etapa el licor del cultivo gastado fue usado para la lixiviación del hierro. Las condiciones operacionales fueron temperatura 45º, pH (2, 3 y 6) y una agitación a 200 min<sup>-1</sup>. A un pH de 2 se alcanzó una remoción del 100% de hierro (1200 g/m<sup>3</sup>) en 40 horas, a un pH 3 se alcanzó la misma remoción de hierro (100%) pero en un tiempo de 80 horas y, finalmente, a un pH 6 solamente se removió el 9% del hierro. El índice de blancura incrementó de 56.5% a 80%, valor adecuado para la mayoría de aplicaciones industriales (Cameselle *et al.*, 2003).

Mesquita *et al.* (1996), usaron en su trabajo una biolixiviación en dos etapas: la fermentación y el blanqueamiento. Esta última etapa se realizó mediante ácidos orgánicos (ácido oxálico y cítrico, a una temperatura de 60°C, en recipientes de 250 ml con un contenido de 50 ml de caolín y 50 ml de solución blanqueadora), adicionando además los metabolitos producidos en la fermentación

a partir de cepas aisladas de *Aspergillus niger* de una mina de talco. Los mejores resultados se obtuvieron con el ácido oxálico (0.25 M), produciendo un incremento (resultado de la diferencia entre el brillo inicial y final) en el brillo de las muestras MAC-1 y MAC-2 de 4.9 y 3.6 respectivamente. El medio filtrado de la fermentación (ácido cítrico 0.14 M y ácido oxálico 30 mM) también obtuvo buenos resultados incrementando el brillo de las muestras MAC-1 y MAC-2 a 3.3 y 4.7 respectivamente. En la tabla 4 se observan los resultados sobre la remoción de hierro, la cual fue superior con el ácido oxálico y con el medio filtrado. Otros trabajos utilizaron una mezcla de *Bacillus cereus* y *Bacillus pumilus*, aislados de un depósito de caolín en Eslovaquia (Mockovčiaková, *et al.*, 2007), con el fin estudiar el proceso de disolución de hierro, aluminio y silicio durante 100 días, bajo condiciones anaerobias. Para este estudio se usaron dos tipos de caolinitas KG1 (caolinita ordenada con 0,22% de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) y KG2 (caolinita desordenada con 1,17% de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Se encontró que había una mayor lixiviación de hierro (12% vs 8%) para la caolinita pobremente ordenada KG2, indicando que estas bacterias fueron más efectivas sobre los defectos estructurales. Por otra parte, las condiciones anaerobias previnieron la oxidación y precipitación del hierro. Un tratamiento con las mismas bacterias en combinación con separación electromagnética fue aplicado a tres muestras de feldespato con un porcentaje de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> entre 0,18% y 0,29%. La remoción se incrementó en un 75% al combinar estos dos procesos (Štyriaková, *et al.*, 2006)

Maurice *et al.* (2001), hicieron un estudio cuantitativo relacionado con la reducción de Fe<sup>3+</sup> acoplado a la oxidación de carbono orgánico utilizando *Shewanella putrefaciens*. Las primeras medidas directas mostraron que: (i) la bacteria podía acoplar la reducción de el Fe<sup>3+</sup> enlazado a la esméctica con el ciclo del carbono, (ii) los ligandos orgánicos incrementaron la biodisponibilidad del Fe<sup>3+</sup> enlazado en las arcillas, (iii) la reducción del Fe<sup>3+</sup> en presencia de ligandos orgánicos podía llevar a la disolución de los minerales.

Por otra parte, la reducción microbiana de las arcillas podría afectar la superficie química de arcillas expandibles, haciendo que se presenten cambios en el área superficial y en la capacidad de intercambio catiónico (Xie y Walter, 1992). En procesos patentados similares que tienen que ver con la reducción de  $Fe^{3+}$  como mecanismo de la lixiviación se usaron microorganismos heterótrofos como *Enterobacter aerogens* y *Leuconostoc mesenteroides* (WO 03024888 (A1)). De otro lado, Lee *et al.* (2002), probaron la capacidad de bacterias reductoras de  $Fe^{3+}$  aisladas del caolín (3,22%  $Fe_2O_3$ ), utilizando diferentes fuentes de carbono (maltosa, glucosa, sucrosa y galactosa) bajo condiciones anaerobias. El mayor porcentaje de remoción de 28% se obtuvo con glucosa. En este trabajo se consideró que la reducción del hierro fue el producto de la cooperación de microorganismos con diferentes procesos metabólicos que dieron origen a dos etapas en el proceso. La primera una fermentación, seguida de la reducción del hierro y disolución como oxalato. Este proceso no alteró las propiedades mineralógicas del caolín.

Shelobolina *et al.* (2002), llevaron a cabo un estudio muy interesante en el cual se aislaron e identificaron las comunidades microbianas naturales presentes en varios depósitos de caolín de Rusia y Ucrania, utilizados para producir cerámicas. Los grupos de microorganismos encontrados y aislados fueron bacterias: heterotróficas aerobias, fermentativas, denitrificantes, sulfato reductoras y reductoras de hierro. La estimulación del crecimiento de las bacterias presentes en el caolín y el tratamiento del mismo con las bacterias produjo un aumento en el hierro extraído por separación magnética, pasando de 12% a 57%. Estos microorganismos producen ácidos orgánicos y otros metabolitos, haciendo que decline el pH, aumente el potencia redox y se produzca la lixiviación de minerales de hierro. Ryu *et al.* (1995) y Ryu *et al.*, (1994), usaron bacterias quimiolitotrofas como *Acidithiobacillus ferrooxidans* para tratar un caolín de origen marino y con un alto contenido

de hierro pirítico (11,14%). A partir de este tratamiento se removió entre el 82% y 90% de la pirita. El tiempo transcurrido estuvo entre 5 y 12 días, utilizando una densidad de pulpa de 70% (p/v). La rata de remoción de pirita estuvo entre 270 y 914 mg pirita/L.d, dependiendo de la densidad de pulpa. Este microorganismo fue útil debido a su capacidad para oxidar compuestos de azufre y hierro. Este panorama muestra un gran potencial de estos y otros organismos que siguen siendo probados en búsqueda de una opción biotecnológica, ambientalmente más limpia, que pueda reemplazar o al menos complementar métodos físicos y químicos que en general presentan inconvenientes debido a aspectos de tipo ambiental, además de, en algunos casos, ineficiencia.

#### 4.5 Bioflotación de sulfuros

La flotación es un proceso fisicoquímico de concentración, el cual se basa en la separación de minerales hidrofóbicos de hidrofílicos. La flotación de sulfuros ha sido usada para la separación de los minerales de la mena y la ganga, así como para la separación de los diferentes sulfuros entre si y la recuperación de metales como el oro desde hace más de un siglo (Marsden & House, 1992). De una forma muy simple, el proceso de una forma global consiste en un tratamiento químico superficial de una pulpa de mineral, molido finamente, con el objeto de generar condiciones favorables para que las partículas de un determinado mineral (de acuerdo con los objetivos específicos de cada caso) se adhieran a burbujas de aire (siendo que los otros minerales acompañantes se hundirán en la solución). Estas burbujas llevarán el mineral hasta la superficie de la solución, para de esta forma ser recuperado (concentrado) y separado por diferentes medios mecánicos simples.

Cuando un mineral es colocado en el agua, la interfase de las dos fases se altera para acomodarse al nuevo ambiente. De esta forma, una doble capa eléctrica es establecida en la interfase sólido-líquido, balanceando las

cargas en el sistema. Este mecanismo afecta las propiedades y el comportamiento de los granos de mineral con relación a su intención con ciertos reactivos químicos, factor crucial en los procesos de separación que dependen de la superficie química, como es el caso de la flotación (Marsden & House, 1992). En términos más técnicos, el principio básico que rige la flotación es la reducción en la atracción de los minerales con relación al agua, es decir, el incremento en su hidrofobicidad (Marsden & House, 1992). Los reactivos usados para la flotación pueden ser clasificados como: (i) colectores, (ii) activadores, (iii) depresores, (iv) dispersantes y (v) espumantes. Los colectores son compuestos heterogéneos (alkyl xantatos, dialkil ditionofosfatos, etc.) que tienen un grupo polar activo, el cual se adsorbe sobre el mineral, generando una superficie no polar y de esta forma hidrofóbica, haciendo selectivamente hidrofóbicos los minerales de interés. Los activadores son compuestos inorgánicos ( $\text{Cu}^{2+}$ , iones sulfuro, etc.) que aumentan la eficiencia de la flotación, reaccionando o siendo adsorbidos por los minerales de interés, haciendo más fuertes los enlaces con los colectores. Los depresores pueden ser compuestos orgánicos o inorgánicos (cianuros, sulfitos, etc.) que disminuyen selectivamente la recuperación de los minerales de la ganga o de algún sulfuro específico u otro mineral que no se tenga el interés de flotar (separar) junto con el concentrado específico. Los espumantes por último, tienen la función de generar burbujas con superficies de moléculas activas no iónicas, generando una gran interfase estable aire-agua, la cual asegura que el material de interés permanezca adherido a las burbujas y flote (Marsden & House, 1992).

Vale la pena anotar que, debido a la complejidad de cada proceso, es muy importante conocer la mineralogía del depósito específico, con el fin de establecer el tipo de flotación que será empleada, así como prever los diferentes inconvenientes que se puedan presentar. En la flotabilidad de los diferentes sulfuros son muy importantes los cambios relativos a la superficie, debidos a la

susceptibilidad de cada mineral la oxidación y a las propias características fisicoquímicas de su superficie más externa (últimas capas atómicas). En la literatura han sido reportadas diferencias en la flotabilidad de especies con composición química similar y diferente estructura cristalina (polimorfos), como es mencionado por Bhatti *et al.* (1993) para la pirrotita hexagonal y la monoclinica. Por otro lado, Rehwald *et al.* (1966), mencionan por ejemplo que las esfaleritas con Fe en su estructura cristalina presentan un comportamiento diferente en los sistemas de flotación que las libres de Fe. Jones *et al.* (1992), en sus trabajos sobre la alteración de la superficie de la pirrotita, encontraron que al inicio la reacción ácida genera películas parcialmente hidrofóbicas favorables a la flotación, sin embargo, conforme la reacción progresa, se genera una película hidrofílica de hidróxido de hierro, que evita la flotación de ésta.

Por otro lado, a pesar de que las características específicas de la superficie de cada mineral varían de acuerdo con su composición química (específica o dictada por la entrada de elementos en solución sólida) y su estructura cristalina, las diferencias, en muchas ocasiones, no son suficientemente grandes para que el proceso de flotación (separación) se dé de una forma eficiente. Es por esto que en la bioflotación selectiva, algunos microorganismos como *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Amini *et al.* 2009; Hosseini *et al.* 2005; Kolahdoozan *et al.*, 2004), *Lepstospirillum ferrooxidans* (Vilinska y Hanumantha, 2008) y menos comúnmente especies como *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus firmus* y *Bacillus subtilis* (Langwaldt y Kalapudas, 2007) y *Bacillus polymyxa* (Subramanian *et al.* 2003), han sido estudiados con el fin de ser usados para cambiar (modular) las propiedades superficiales de los minerales de interés, ya sea mediante su adhesión selectiva a los sulfuros o modificando químicamente su superficie, en búsqueda de nuevas opciones que reemplacen los compuestos químicos (de reconocida capacidad contaminante), usados comúnmente en la flotación comercial como floculantes,



colectores o depresantes (cianuros, dicromatos, polisulfuros, etc.) (Santhiya *et al.*, 2006, Misra *et al.*, 1996; Chandraprabha y Natarajan, 2006; Chandraprabha *et al.*, 2004, 2005; Hosseini *et al.*, 2005).

Esta interacción mineral-bacteria resulta en varias consecuencias importantes y relevantes en la bioflotación (biomodulación) de minerales (Deo y Natarajan, 1998; Sharma, 2001): (i) la adhesión de microorganismos a la superficie de minerales, por un periodo de tiempo prolongado, la cual resulta en la formación de biopelículas, con características fisicoquímicas diferentes a las del mineral precursor; (ii) reacciones de reducción y oxidación biocatalizada, lo que ocurre cuando este tipo de microorganismos interactúan con las superficies minerales que sirven de sustratos, generando cambios a nivel químico, físico o una combinación de los dos a nivel de los últimos nanómetros de la superficie de éste, modulando su superficie con relación al mineral precursor; (iii) la quimisorción de productos metabólicos que resulta en la modificación superficial debido a la disolución de constituyentes del mineral. Todos estos aspectos, en principio, podrían sobrellevar el problema de la semejanza en comportamiento hidrofóbico de los diferentes minerales específicos, permitiendo procesos de separabilidad por flotación más eficientes, sobre la hipótesis de superficies específicas más disímiles.

## 5. CONCLUSIONES

Los procesos biotecnológicos, además de ventajas competitivas como su amplia versatilidad a la hora de decidir el método indicado, el cual puede ir desde una operación *in-situ*, hasta reactores finamente controlados con capacidad de tratamiento de alrededor de 1000 t.p.d. para oro, el hecho de no producir contaminantes gaseosos, fácil y económica neutralización y disposición desechos sólidos y líquidos, ambientalmente aceptados y fácilmente controlables, la simplicidad y versatilidad del diseño que permite su uso en locaciones remotas, sin requerimientos de mano de obra muy calificada y su puesta en marcha corta y costos de capital y operación

bajos comparativamente con otros procesos ya implementados en la industria, poseen la habilidad de poder ser usados en montajes complejos, como complemento de procesos físicos y químicos ya existentes. De otro lado, los procesos biotecnológicos aplicados a la minería son considerados internacionalmente como una alternativa "más limpia", mostrando ventajas tanto desde el punto de vista ambiental como económico. Es por esto que las aplicaciones biotecnológicas se imponen como alternativas con gran potencial para la solución a múltiples problemas generados por la industria minero-metalúrgica, utilizándose, a nivel mundial en diversos procesos como lo son pretratamiento oxidante de materiales refractarios a la recuperación de metales como el oro y la plata, lixiviación para posterior recuperación de metales base como son el Zn, Cu, Pb, Co, Ni y Ti, biotratamiento de diversos materiales utilizados en la industria como la desulfurización de carbones, bioblanqueo, etc.

## 6. AGRADECIMIENTOS

A las Subdirecciones de Biotecnología y Energía y Minería de Colciencias por su apoyo incondicional. Al Laboratorio de Biomineralogía de la Universidad Nacional de Colombia. A las empresas ARGOS, CDI S.A. y Prominerales S.A. por creer en nosotros. A las administraciones de los municipios de Titiribí (Antioquia) y Marmato (Caldas) por su apoyo. Al DIME y a la Dirección de Laboratorios de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín. A la empresa Centricol. Al Grupo de Mineralogía Aplicada y Bioprocesos de la Universidad de Colombia. Al Tecnológico Pascual Bravo I.U., por su interés en el desarrollo de nuevas tecnologías.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACERO, P., CAMA, J., AYORA, C. Kinetics of chalcopyrite dissolution at pH 3. *Eur. J. Mineral.* 19, 173-182, 2007.
- ACHARYA C., SUKLA L., MISRA V. Biological elimination of sulphur from high sulphur coal by *Aspergillus*-like fungi. *Fuel.* 84, 1597-1600, 2005.

- AL-HARAHSEH, M., KINGMAN, S., RUTTEN, F., BRIGGS, D. ToFSIMS and SEM study on the preferential oxidation of chalcopryrite. *International Journal of Mineral Processing*, 80, 205-214, 2006.
- AMINI, E., OLIAZADEH, M., KOLAHDOOZAN M. Kinetic comparison of biological and conventional flotation of coal. *Minerals Engineering*, 22, 4, 344-347, 2009.
- ARROYAVE, D.M. Escalamiento del proceso de Biooxidación de sulfuros, mina El Zancudo (Titiribí-Antioquia). Maestría en Ingeniería de Materiales y Procesos- Facultad de Minas- Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín. 2008.
- ASTON, J. E., APEL, W.A., LEE, B.D., PEYTON, B.M.. Toxicity of select organic acids to the slightly thermophilic acidophile *Acidithiobacillus caldus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28, 2, 279-286, 2009.
- ASTUDILLO, C., ACEVEDO, F. Adaptation of *Sulfolobus metallicus* to high pulp densities in the biooxidation of a flotation gold concentrate. *Hydrometallurgy*, 92, 1-2, 11-15, 2008.
- BACELAR-N., JOHNSON D. B. Leaching of pyrite by acidophilic heterotrophic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed cultures. *Applied And Environmental Microbiology*, 65, 2, 585-590, 1999.
- BEVILAQUA, D., LEITE, A.L.L.C., GARCIA JR., O., TUOVINEN, O.H. Oxidation of chalcopryrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. *Process Biochemistry*, 38, 587-592, 2002.
- BHATTI, T.M., BIGHAM, J.M., VUORINEN, A., TUOVINEN, O.H. Biological leaching of sulfides with emphasis on pyrrhotite and pyrite. In: *Proceedings of International Symposium on Biotechnology for Sustainable Development*, Kausar A, Malik, Anwar Nasim & Ahmad M. Khalid, NIBGE, Faisalabad, Pakistan, 299-308, 1993.
- BLAKE, R.C., SHUTE, E.A., HOWARD, G.T. Solubilization of minerals by bacteria: electrophoretic mobility of *Thiobacillus ferrooxidans* in the presence of iron, pyrite, and sulfur. *Applied And Environmental Microbiology*, 60, 9, 3349-3357, 1994
- BLANCO, V.E.H., OSPINA, V.A. 1994. Análisis bibliográfico del blanqueo de caolín. Tesis (Ingeniero químico)- Universidad Nacional de Colombia (Medellin) Facultad de Minas. 103 p.
- BOND, P.L., DRUSCHEL G.K. and BANFIELD J.F. Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Applied And Environmental Microbiology*, 66, 11, 4962-4971, 2000.
- BOSECKER K. Microbial leaching in environmental clean-up programmes. *Hydrometallurgy*, 59, 245-248, 2001.
- BOZDEMIR T., DURUSOY T., ERINCIN E., YÜRÜM Y. Bodesulfurization of Turkish lignites. *Fuel*, 75, 13, 1596-1600, 1996.
- BRIERLEY, J.A., LUINSTR, L. Biooxidation-heap concept for pretreatment of refractory gold ore. In: *Biohydrometallurgical Technologies*, A.E. Torma, J.E. Wey & V.L. Lakshmanan Eds., The Minerals, Metals & Materials Society, 437-448, 1993.
- BUTLER B.J., KEMPTON A.G. The effect of particle size and pH on the removal of pyrite from coal by conditioning with bacteria followed by oil agglomeration. *Hydrometallurgy*, 15, 325-336, 1986.
- CAMESELLE, C. RICARTA, M.T., NÚÑEZ, M.J., LEMA J.M. Iron removal from kaolin. Comparison between "in situ" and "two-stage" bioleaching processes. *Hydrometallurgy*, 68, 97-105, 2003.
- CARA J., CARBALLO M., MORÁN A., BONILLA D., ESCOLANO O., GARCÍA F. Bodesulphurization of high sulphur coal by heap leaching. *Fuel*, 84, 1905-1910, 2005.
- CARA J., MORÁN A., CARBALLO T., ROZADA F., ÁLLER A. The bodesulphurization of a semianthracite coal in a packed-bed system. *Fuel*, 82, 2065-2068, 2003.
- CARA, J., VARGAS, M., MORAN, A., GOMEZ, E., MARTINEZ, O., GARCIA FRUTOS, F.J. Bodesulphurization of a coal by packed-column leaching. Simultaneous thermogravimetric and mass spectrometric analyses. *Fuel*, 85, 12-13, 2006.
- CARDONA, I.C., MARQUEZ, M.A. Bodesulfurization of two Colombian coals with native microorganisms. *Fuel*. In press. 2009
- CARTMELL L., LANCASTER J. A microbial study of an artificial coal spoil. *Proc. Okla. Acad. Sci*, 63, 21-24, 1983.
- CHANDRAPRABHA, M.N., NATARAJAN, K.A. Surface chemical and flotation behaviour of chalcopryrite and pyrite in the presence of *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Hydrometallurgy* 83, 146-152, 2006



- HEE WOOK RYU, KYEOUNG SUK CHO, YONG KEUN CHANG, SANG DONE KIM, AND TADAIRO MORI. Refinement of Low-Grade Clay by Microbial Removal of Sulfur and Iron Compounds Using *Thiobacillus ferrooxidans*. JOURNAL OF FERMENTATION BIOENGINEERING Vol. 80, No. 1, 46-52, 1995
- HEE WOOK RYU, KYEOUNG SUK CHO, YONG KEUN CHANG, SANG DONE KIM, TADAIRO MORI. Improvement of a marine clay by a microbial desulfurization process. Journal of the Korean Institute of chemical engineers HWAHAK KONGHAK. Vol. 32, No 2: 179-186, 1994.
- HIROYOSHI, N., MIKI, H., HIRAJIMA, T., TSUNEKAWA, M. A model for ferrous-promoted chalcopryrite leaching. Hydrometallurgy. 57, 31- 38, 2000.
- HOSSEINI, T. R., KOLAHDOOZAN, M., TABATABAEI, Y. S. M., OLIAZADEH, M., NOAPARAST, M., ESLAMI, A., MANAFI, Z., ALFANTAZI, A. Bioflotation of Sarcheshmeh copper ore using *Thiobacillus ferrooxidans* bacteria. Minerals Engineering, 18, 3, 371-374, 2005.
- JEREZ, C.A. Chemotactic transduction in biomining microorganisms. Hydrometallurgy 59, 347-356, 2001
- JOHNSON D. B. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. FEMS Microbiology Ecology. 27, 307-317, 1998.
- JOHNSON D. B. Importance of microbial ecology in the development of new mineral technologies. Hydrometallurgy. 59, 147-157, 2001.
- JONES, F.J.; LeCOUNT, S.; SMART, R.; WHITE, T.J. Compositional and structural alteration of pyrrhotite surfaces in solution: XPS and XRD studies. Applied Surface Science. 55, 65-85, 1992.
- JONES, R., KOVAL, S., NESBITT, H. Surface alteration of arsenopyrite (FeAs<sub>2</sub>) by *Thiobacillus ferrooxidans*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 67, 5, 955-965, 2003
- JUSZCZAK A., DOMKA F., KOZLOWSKY M., WACHOWSKA H. Microbial desulfurization of coal with *Thiobacillus ferrooxidans* bacteria. Fuel, 75, 5, 725-728, 1995.
- KARAMANEV, D., MARGARITIS, N., CHONG, N., The application of ore immobilization to the bioleaching of refractory gold concentrate. International Journal of Mineral Processing. 62, 231-241, 2001.
- KARAVAIKO, G.I. Methods of isolation, evaluation and studying of microorganisms. In: Karavaiko, G.I., Rossi, G., Agate, A.D., Groudev, S.N., Avakyan, Z.A. (Eds.), Biotechnology of Metals—Manual. Center for International Projects GKNT, Moscow. 47-79, 1988.
- KLAUBER, C. A critical review of the surface chemistry of acidic ferric sulphate dissolution of chalcopryrite with regards to hindered dissolution. Int. J. Miner. Process. 86, 1-17, 2008.
- KODALI B., RAO B., NARASU L., POGAKUB R. Effect of biochemical reactions in enhancement of rate of leaching. Chemical Engineering Science, 59, 5069-5073, 2004.
- KOLAHDOOZAN, M., TABATABAEI YAZDI, S.M., YEN, W.T., HOSSEINI TABATABAEI, R., SHAHVERDI, A.R., OLIAZADEH, M., NOAPARAST, M., ESLAMI, A., MANAFI Z. Bioflotation of the low grade Sarcheshmeh copper sulfide. Trans. Indian Inst. Met. 57, 5, 485-490, 2004.
- LANGWALDT, J., KALAPUDAS, R. Bio-beneficiation of multimetal black shale ore by flotation. Physicochemical Problems of Mineral Processing (Fizykochemiczne Problemy Mineralurgii). 41, 291-299, 2007.
- LASSE A., TUOVINEN, O. Temperature effects on bacterial leaching of sulfide minerals in shake flask experiments. Applied Environmental Microbiology. 57, 1, 138-145, 1991.
- LEE, E.Y.; CHO, KYUNG-SUK, RYU, H.W. Microbial refinement of kaolin by iron-reducing bacteria. Applied Clay Science. 22, 47-53, 2002.
- LE-XIAN XIA, JIAN-SHE LIU, LI XIAO, JIA ZENG, BAN-MEI LI, MEI-MEI GENG, GUAN-ZHOU QIU. Single and cooperative bioleaching of sphalerite by two kinds of bacteria—*Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China. 18, 1, 190-195, 2008.
- LINDSTRÖM, BÖRJE, E., SANDSTRÖM, Å., SUNDKVIST, J.E. A sequential two-step process using moderately and extremely thermophilic cultures for biooxidation of refractory gold concentrates. Hydrometallurgy, 71, 1-2, 21-30, 2003
- MÁRQUEZ, M.A., GASPAS, J.C., BESSLER, K.E., MAGELA G. Process mineralogy of bacterial oxidized gold ore in São Bento Mine (Brasil). Hydrometallurgy. 83, 1-4, 114-123, 2006.



- MARSDEN, J., HOUSE, I. The chemistry of gold extraction. Ed. Ellis Horwood Limited, England. 1992.
- MAURICE, P.A., VIERKORN, M.A., HERSMAN, L.E., FULGHUM, J.E., FERRYMAN, A. Enhancement of kaolinite dissolution by anaerobic *Pseudomonas mendocina* bacterium. *Geomicrobiology Journal*. 1(15), 21-35, 2001.
- MEJÍA, E.R., OSPINA, J.D. MÁRQUEZ M.A., MORALES. A.L. *Advanced Materials Research*. Vols. 71-73. P.p 385-388. 2009.
- MESQUITA L. M. S. DE, RODRIGUES T. AND GOMES S. S. Bleaching of Brazilian kaolins using organic acids and fermented medium. *Minerals Engineering*. 9, 965-971, 1996.
- MISRA M, BUKKA K, CHEN S. The effect of growth medium on pyrite flotation. *Minerals Engineering*. 9, 157-168, 1996.
- MURRAY, H.H. Industrial applications of kaolin. *Symposium on Industrial Applications Clays and Clay Minerals*. 10, 291-298, 1961.
- MUSTIN, C., BERTHELIN, J., MARION, P., DONATO, de P. Corrosion and electrochemical oxidation of a pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied Environmental Microbiology*. 58, 4, 1175-1182, 1992
- NAGAOKA, T., OHMURA, N., SAIKI, H. A novel mineral flotation process using *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied And Environmental Microbiology*, 65, 8, 3588-3593, 1999.
- NIES D. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 51, pp. 730-750, 1999.
- ORTIZ, F. *Geología de los Depósitos Minerales Metálicos*. Centro de Publicaciones Universidad Nacional, Medellín. 218 pp., 1992.
- PARKER, A., KLAUBER, C., KOUGIANOS, A., WALTUNG, H.R., VAN BRONSWIJK, W. An x-ray photoelectron spectroscopy study of the mechanism of chalcopyrite leaching. *Hydrometallurgy*. 71(1-2), 265-276, 2003.
- PENG, P., HUIQIN X., LIZHU, L. Leaching of a sphalerite concentrate with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HNO<sub>3</sub> solutions in the presence of C<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>. *Hydrometallurgy*. 80, 265-271, 2005
- PETERSEN J., DIXON D. Competitive bioleaching of pyrite and chalcopyrite. *Hydrometallurgy*, 83, 40-49, 2006.
- PRAYUENYONG P. Coal biodesulphurization processes. *Journal Science Technology*, 24, 493-507, 2002.
- RAWLINGS, D.E., JOHNSON, B.D. Relevance of cell physiology and genetic adaptability of biomining microorganisms to industrial processes. In: *Biomining*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Capítulo 9, 177-195, 2007.
- RAWLINGS, D.E., TRIBUTSCH, H., HANSFORD, G.S. Reasons why "*Leptospirillum*"-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology*. 145, 5-13, 1999.
- REHWALD, G. The application of ore-microscopy in beneficiation of ores of the precious metals and the nonferrous metals. In: Hugo Freund Ed., *Applied ore microscopy, theory and technique*, New York, 439-537, 1966.
- RIVADENEIRA, J. Introduction. Mining innovation in Latin America Report. Publication via on-line (<http://www.mininginnovation.cl/content.htm>). Santiago, Chile, pp. 6-7, 2006.
- ROBERT C. BLAKE II, ELIZABETH A. SHUTE, GARY T. HOWARD. Solubilization of minerals by bacteria: electrophoretic mobility of *Thiobacillus ferrooxidans* in the presence of iron, pyrite, and sulfur. *Applied And Environmental Microbiology*. 60, 9, 3349-3357, 1994.
- RODRÍGUEZ Y., BALLESTER A., BLÁZQUEZ M.L., GONZÁLEZ F., MUÑOZ J.A. Mecanismo de biolixiviación de sulfuros metálicos. *Revista Metalúrgica Madrid*. 37, 6, 665-672, 2001.
- RODRÍGUEZ Y., BLÁZQUEZ, M. L., BALLESTER, A. GONZÁLEZ, F., MUÑOZ, J. A.. Mecanismo de los procesos de lixiviación bacteriana. *Revista de Metalurgia* 37, 641-720, 2001.
- RODRÍGUEZ, Y., BALLESTER, A., BLÁZQUEZ, M., GONZÁLES, F., MUÑOZ, J. New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy*. 71, 57-66, 2003.
- ROSSI G. The design of bioreactors. *Hidrometallurgy*. 59, 2-3, 217-231, 2001.
- SAMPSON, M. I., PHILLIPS, C. V. Influence of base metals on the oxidising ability of acidophilic bacteria



during the oxidation of ferrous sulfate and mineral sulfide concentrates, using mesophiles and moderate thermophiles. *Minerals Engineering*, 14, 3, 317-340, 2001.

SANTHIYA, D., TING YEN-PENG. Use of adapted *Aspergillus niger* in the bioleaching of spent refinery processing catalyst. *Journal of Biotechnology*, 121, 62-74, 2006.

SASAKI, K., NAKAMURA, Y., HIRAJIMA, T., TUOVINEN, O.H. Raman characterization of secondary minerals formed during chalcopyrite leaching with *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 95, 153-158, 2009

SCHIPPERS A., SAND W. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 1, 319-321, 1999.

SEMENZA, M., VIERA, M., CURUTCHET G., DONATI, E. The role of *Acidithiobacillus caldus* in the bioleaching of metal sulfides. *Latin American Applied Research*, 32, 303-306, 2002.

SHARMA PRASHANT, K. Surface Studies Relevant to Microbial Adhesion and Bioflotation of Sulphide Minerals. PhD thesis 2001.

SHELOBOLINA, E.T., PARFENOVA, E. Y., AVAKYAN, Z.A. Microorganisms of kaolins and their role in the processes of iron solubilization and transformation. *Biohydrometallurgy and the environment toward the mining and the 21st century; proceedings of the international biohydrometallurgy simposium, IBS'99*, 559-568, 1999.

ŠTYRIAKOVÁ, I., ŠTYRIAK, I., MALACHOVSKÝ, P., VEČERA, Z., KOLOUŠEK, D. Bacterial clay release and iron dissolution during the quality improvement of quartz sands. *Hydrometallurgy*, 89, 1-2, 99-106, 2007.

SUBRAMANIAN, S., SANTHIYA, D., NATARAJAN, K. A. Surface modification studies on sulphide minerals using bioreagents. *International Journal of Mineral Processing*, 72, 1-4, 175-188, 2003.

SUZUKI I., LEE D., MACKAY B., HARAHUC L., OH, J.K. Effect of various ions, pH, and osmotic pressure on oxidation of elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 11, 5163-5168, 1999.

THOMAS K.G. Economics of treating gold ores. *Mineral Processing. CIM Bulletin*, 84, 953, 33-37, 1991.

TUOVINEN OH, BHATTI TM, BIGHAM JM, HALLBERG KB, GARCIA JR O, LINDSTRÖM EB. Oxidative dissolution of arsenopyrite by mesophilic and moderately acidophilic thermophiles. *Appl Environ Microbiol*, 60, 3268-3274, 1994.

VILINSKA, A., HANUMANTHA RAO, K.. *Leptospirillum ferrooxidans*-sulfide mineral interactions with reference to bioflotation and bioflocculation. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*, 18, 1403-1409, 2008.

WATLING, H.R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides—a review. *Hydrometallurgy*, 84, 81-108, 2006.

XIE, Z., WALTHER, J.V. Incongruent dissolution and surface area of kaolinite. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 56, 3357-3363, 1992.

YANNOPOULOS, J.C. *The Extractive Metallurgy of Gold*. Kluwer Academic Publishers, New York, 296 pp., 1990.

YIN, Q., KELSALL, G.H., VAUGHAN, D.J., ENGLAND, K.E.R. Atmospheric and electrochemical oxidation of the surface of chalcopyrite (CuFeS<sub>2</sub>). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59, p 1091-1100, 1995.

ZAPATA, D.M., MÁRQUEZ, M.A., OSSA, D.M. Sulphur product layer in sphalerite biooxidation: Evidences for a mechanism of formation. *Advances Materials Research*, 20-21, 134-138, 2007

ZAPATA, D.M., OSSA, M, MÁRQUEZ, M.A. Caracterización mineralógica de los productos de oxidación del sistema esfalerita-pirita por bacterias nativas oxidantes de Fe. *Dyna*, 75, 154, 59-64, 2008.

ZHOU, Q.G., BO, F. BO, Z.H., XI, L., JIAN, G., FEI, L.F., HUA, C.X. Isolation of a strain of *Acidithiobacillus caldus* and its role in bioleaching of chalcopyrite. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1217-1225, 2007.