

**Evaluación del efecto de la biooxidación como pretratamiento a la  
cianuración de un mineral refractario del distrito minero Vetas California  
Santander**

**Jimmy Alexander Gamboa Rueda**

**Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ingenierías Físicoquímicas  
Escuela de Ingeniería Química  
Bucaramanga  
2015**

**Evaluación del efecto de la biooxidación como pretratamiento a la  
cianuración de un mineral refractario del distrito minero Vetas California  
Santander**

**Jimmy Alexander Gamboa Rueda**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de  
magister en Ingeniería Química**

**Director**

**Viviana Sánchez Torres, Ph.D.**

**Co-Directores**

**Julio Andrés Pedraza Avella, Dr.**

**Marco Antonio Márquez Godoy, Dr.**

**Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ingenierías Físicoquímicas  
Escuela de Ingeniería Química  
Bucaramanga  
2015**

## DEDICATORIA

*A dios, por ser mi guía en este camino de aprendizaje*

*A mis padres German Gamboa y Ana Dolores Rueda por ser fuente de motivación y aliento en cada momento, este logro está fuertemente soportado en su incondicional apoyo*

*A mi hermano y ángel de la guarda German A. Gamboa, siempre mis logros serán dedicados a su memoria*

*A mis compañeros de estudio y amigos, Sául, Camilo, Jose y Liliana por tener siempre una sonrisa, una palabra de aliento o una enseñanza para acompañar este arduo, pero satisfactoria mundo de la investigación*

*A Jessica Parra, por su amor, cariño y apoyo incondicional..*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la doctora Viviana Sánchez Torres por su guía y aporte continuo en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al profesor Julio Andrés Pedraza por sus enseñanzas y aportes, sin ellas el trabajo no podría haberse realizado.

Al profesor Julio Elías Pedraza quien tuvo un valioso aporte a partir de su amplia experiencia y conocimiento.

Al Grupo de Investigaciones en Minerales Biohidrometalurgia y Ambiente GIMBA por garantizar las condiciones técnicas y logísticas requeridas para dar avance al proceso investigativo.

Al profesor Marco Antonio Márquez por haberme permitido hacer parte de la familia del Grupo de Mineralogía Aplicada y Bioprocesos GMAB, indudablemente su apoyo fue clave para desarrollar satisfactoriamente este estudio.

A la empresa minera AUX Colombia y empresa Minera Reina de Oro Ltda por proveer las muestras minerales.

A los técnicos Ambrosio Carrillo y Yury López por su apoyo, guía y tiempo dedicado durante el trabajo en el laboratorio.

Al ingeniero Humberto Rangel por el préstamo del equipo de concentración Knelson de su propiedad.

Al laboratorio de rayos X y el laboratorio de microscopia electrónica de la Universidad Industrial de Santander-parque tecnológico Guatiguará.

A COLCIENCIAS y la Vicerrectoría de Investigación y Extensión VIE por el soporte económica brindado mediante la convocatoria 617 - jóvenes investigadores-2013.

Al programa de Movilidad VIE por financiar el proceso de ponencia internacional realizado con este trabajo.

## CONTENIDO

pág.

INTRODUCCIÓN.....	20
1. FUNDAMENTO TEÓRICO .....	22
1.1 MINERALES AUROARGENTÍFEROS.....	22
1.2 PROCESO EXTRACTIVO DE ORO .....	22
1.2.1 Concentración.....	23
1.2.2 Cianuración.....	25
1.3 MINERALES REFRACTARIOS A LA CIANURACIÓN .....	26
1.4 MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO A LA CIANURACIÓN .....	29
1.5 ESTUDIOS Y MEJORAS DEL PROCESO EXTRACTIVO EN EL DISTRITO MINERO VETAS-CALIFORNIA .....	31
1.6 BIOOXIDACIÓN.....	34
1.6.1 Mecanismo de la biooxidación.....	35
1.6.2 Bacterias empleadas en la biooxidación.....	36
1.6.2.1 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....	36
1.6.2.2 <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> .....	37
1.6.2.3 <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> .....	37
1.6.2 Factores que afectan la biooxidación.....	41
1.6.2.1 Temperatura .....	41
1.6.2.3 Tamaño de partícula del mineral y su mineralogía .....	42
1.6.2.4 Concentración del mineral en el medio .....	42
1.6.2.5 Potencial redox (Eh) .....	42

2. OBJETIVOS.....	44
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
3. METODOLOGÍA .....	45
3.1 SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MINERAL DE ESTUDIO .....	45
3.1.1 Selección del mineral.....	46
3.1.1.1 Ajuste del tamaño de partícula.....	46
3.1.1.2 Concentración del mineral 2 .....	47
3.1.1.3 Determinación del tenor de oro y plata .....	47
3.1.1.4 Cianuración en botella.....	48
3.1.2 Caracterización del mineral seleccionado.....	48
3.1.2.1 Técnicas analíticas y análisis químicos.....	48
3.1.2.2 Lixiviación diagnóstica. ....	49
3.1.2.3 Ajuste tamaño de partícula para la biooxidación.....	49
3.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA BIOOXIDACIÓN..	50
3.2.1 Tamizado de las cepas de trabajo. ....	51
3.2.2 Adaptación.....	52
3.2.3 Influencia de la combinación de bacterias y pH inicial en la biooxidación.....	53
3.2.4 Influencia del tamaño de partícula y la concentración de mineral en la biooxidación .....	54
3.3 BIOOXIDACIÓN EN BIORREACTOR DE 5 L.....	55
3.4 COMPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE ORO CON LOS PRETRATAMIENTOS DE BIOOXIDACIÓN Y OXIDACIÓN QUÍMICA ANTES DE LA CIANURACIÓN .....	56
3.4.1 Experimentos de oxidación química. ....	56
3.4.2 Cianuración del mineral biooxidado y oxidado químicamente .....	58

4. RESULTADOS.....	59
4.1 SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MINERAL DE ESTUDIO .....	59
4.1.1 Selección mineral.....	59
4.1.1.1 Ajuste tamaño de particular. ....	59
4.1.1.2 Concentración mineral 2 .....	60
4.1.1.3 Determinación del tenor de oro y plata .....	60
4.1.2 Caracterización del mineral seleccionado.....	62
4.1.2.1 Caracterización química y mineralógica .....	62
4.1.2.2 Lixiviación diagnóstica .....	67
4.2 ENSAYOS DE BIOOXIDACIÓN .....	67
4.2.1 Tamizado de las cepas de trabajo .....	67
4.2.2 Adaptación.....	70
4.2.3 Influencia de la combinación de especies bacterianas y pH inicial en la biooxidación.....	76
4.2.3.1 Densidad celular .....	76
4.2.3.2 pH. ....	79
4.2.3.3 Eh .....	81
4.2.3.4 Concentraciones Fe y Fe <sup>+2</sup> .....	83
4.2.3.5. Concentración de sulfato .....	87
4.2.3.6 Selección del consorcio de trabajo para pruebas posteriores.....	89
4.2.4 Influencia del tamaño de partícula y concentración mineral. ....	97
4.3 ENSAYO DE OXIDACIÓN EN BIOREACTOR .....	100
4.4 COMPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE ORO CON LOS PRETRATAMIENTOS DE BIOOXIDACIÓN Y OXIDACIÓN QUÍMICA ANTES DE LA CIANURACIÓN .....	104
4.4.1 Experimentos de oxidación química. ....	104

5. CONCLUSIONES .....	108
6. RECOMENDACIONES.....	110
REFERENCIAS .....	111
BIBLIOGRAFÍA.....	121
ANEXOS.....	131

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Disociación HCN, CN <sup>-</sup> en función del pH a 26°C.	25
Figura 2. Clasificación de minerales auríferos según la refractariedad.	27
Figura 3. Diagrama de flujo de la planta de beneficio de la empresa Reina de Oro Ltda.	33
Figura 4. Metodología empleada durante la investigación.	45
Figura 5. Selección y caracterización del mineral.	46
Figura 6. Determinación de las condiciones para la biooxidación.	50
Figura 7. Distribución granulométrica inicial para el mineral 1.	59
Figura 8. Porcentaje de disolución de oro para ambos minerales.	62
Figura 9. Caracterización mineralógica. (a) Difractograma DRX. (b) espectro FTIR. M: Moscovita; A: Alunita (jarosita); Q: cuarzo; P: Pirita; R: Rutilo; W: Agua; C: CO <sub>2</sub> .	65
Figura 10. Análisis SEM-EDS para el mineral. (a) Micrografía grano de pirita. (b) Micrografía grano de alunita.	66
Figura 11. Asociaciones de oro y plata de acuerdo a la lixiviación diagnóstica.	67
Figura 12. Comparación valores de Eh y pH obtenidos para la activación y tamizado de las 21 cepas de referencia. (a) A. ferrooxidans. (b) L. ferrooxidans. (c) A. thiooxidans.	68
Figura 13. Perfiles de adaptación para <i>A. ferrooxidans</i> DSMZ 14442. (a) pH. (b) Eh. (c) densidad celular. (d) Radio Fe <sup>+3</sup> /Fe.	71
Figura 14. Perfiles de adaptación para <i>L. ferrooxidans</i> DSMZ 2705. (a) pH. (b) Eh. (c) densidad celular. (d) Radio Fe <sup>+3</sup> /Fe.	73
Figura 15. Perfiles de adaptación para <i>A. thiooxidans</i> DSMZ 504. (a) pH. (b) Eh. (c) densidad celular. (d) sulfato.	75
Figura 16. Perfiles de densidad celular para cada una de las combinaciones de bacterias. (a) pH inicial 1,6. (b) pH inicial 2,0.	77

Figura 17. Perfiles de pH para cada una de las combinaciones de bacterias. (a) pH inicial 1,6. (b) pH inicial 2,0.	80
Figura 18. Perfiles de Eh para cada una de las combinaciones de bacterias. (a) pH inicial 1,6. (b) pH inicial 2,0.	82
Figura 19. Perfiles de Fe total para cada una de las combinaciones de bacterias. (a) pH inicial 1,6. (b) pH inicial 2,0.	84
Figura 20. Perfiles de Fe <sup>+2</sup> para cada una de las combinaciones de bacterias. (a) pH inicial 1,6. (b) pH inicial 2,0.	86
Figura 21. Perfiles de sulfato para cada una de las combinaciones de bacterias. (a) pH inicial 1,6. (b) pH inicial 2,0.	88
Figura 22. Resultados de biooxidación para la combinación bacteriana y el pH inicial. (a) Porcentaje máximo de disolución de hierro. (b) Eh máximo. (c) Máxima producción de sulfato.	90
Figura 23. Difractogramas DRX antes y después de la biooxidación usando el consorcio FTL. (a) pH inicial 2,0. (b) pH inicial 1,6.	93
Figura 24. Espectros FTIR antes y después de la biooxidación usando el consorcio FTL. (a) pH inicial 2,0. (b) pH inicial 1,6.	96
Figura 25. Análisis estadístico del efecto del pH inicial y el tiempo sobre la biooxidación del consorcio FTL. (a) gráfico de efectos principales para la productividad volumétrica de Fe <sup>+3</sup> . (b) gráfico de efectos principales para la productividad volumétrica de sulfato.	97
Figura 26. Resultados diseño experimental para tamaño de partícula y concentración de mineral. (a) Concentraciones de hierro total y hierro ferroso. (b) porcentaje de disolución de hierro. (c) Concentración de sulfato.	98
Figura 27. Análisis estadístico del tamaño de partícula, la concentración del mineral y el tiempo en la biooxidación del consorcio FTL. (a), (b) Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para la productividad volumétrica de Fe <sup>+3</sup> . (c), (d) Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para la productividad volumétrica de sulfato.	100

Figura 28. Perfiles biooxidación prueba reactor 5L. (a) Densidad celular y Eh. (b) pH y sulfato. (c) Hierro total y hierro ferroso (Fe+2). (d) Porcentaje de oro y plata disuelto.	103
Figura 29. Disolución de hierro para pruebas preliminares de oxidación química.	104
Figura 30. Porcentaje disolución oro mineral oxidado químicamente.	107

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Potenciales de electrodo para diferentes sulfuros metálicos	28
Tabla 2. Mecanismos de biooxidación	35
Tabla 3. Estudios de biooxidación usando cepas <i>A. ferrooxidans</i> , <i>L. ferrooxidans</i> y <i>A. thiooxidans</i>	39
Tabla 4. Condiciones de operación de la Mesa Wilfley y del concentrador Knelson	47
Tabla 5 Listado cepas de referencia utilizadas en el tamizado	51
Tabla 6 Diseño de experimentos de combinación de bacterias	53
Tabla 7. Diseño de experimentos factorial para la concentración de mineral y el tamaño de partícula	55
Tabla 8. Pruebas preliminares oxidación química con peróxido de hidrógeno	56
Tabla 9. Diseño de experimentos oxidación química con peróxido de hidrógeno	57
Tabla 10. Concentración del mineral 2	60
Tabla 11. Tonelajes oro y plata para minerales de estudio	60
Tabla 12. Composición elemental del mineral (Análisis FRX)	63
Tabla 13. Resumen resultados del tamizado para las 21 cepas de referencia	69
Tabla 14. Velocidades específicas de crecimiento y densidades celulares máximas	78
Tabla 15. Valores-P para el efecto del pH inicial sobre la densidad celular	79
Tabla 16. Valores-P para el efecto del pH inicial sobre el pH	81
Tabla 17. Valores-P para el efecto del pH inicial sobre el Eh	83
Tabla 18. Valores-P para el efecto del pH inicial sobre el hierro	85
Tabla 19. Valores-P para el efecto del pH inicial sobre el Fe <sup>+2</sup>	87

Tabla 20. Valores-P para el efecto del pH inicial sobre el sulfato	88
Tabla 21. Resumen de resultados para el diseño de experimentos de biooxidación (Combinación de bacteria y pH inicial)	91
Tabla 22. Porcentajes de disolución de hierro para las pruebas del diseño de experimentos de la oxidación química	105
Tabla 23. Cinética disolución hierro para prueba de oxidación química a mayor escala	106

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Formulación medio de cultivo T&K	118
Anexo B. Micrografías MOLPP de secciones pulidas del mineral 2	119
Anexo C. Perfiles de biooxidación tamizaje 21 cepas acidófilas de referencia	121
Anexo D. Difractogramas y espectros para el mineral biooxidado a las diferentes combinaciones bacterianas	123

## RESUMEN

**TÍTULO:** EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA BIOOXIDACIÓN COMO PRETRATAMIENTO A LA CIANURACIÓN DE UN MINERAL REFRACTARIO DEL DISTRITO MINERO VETAS CALIFORNIA SANTANDER<sup>1</sup>

**AUTOR:** JIMY ALEXANDER GAMBOA RUEDA<sup>2</sup>

**PALABRAS CLAVE:** Biooxidación, Mineral aurífero refractario de bajo grado, Consorcios bacterias acidófila-mesófilas

La disminución significativa de los depósitos auríferos de alto grado ha generado la necesidad de explorar nuevos procesos hidrometalúrgicos en procura de maximizar el recobro de oro. En este trabajo se estudió el uso de la biooxidación como pretratamiento a la cianuración para un mineral aurífero refractario de bajo grado (1.50 g t<sup>-1</sup> de oro) proveniente del distrito minero de Vetas-California a partir del que se obtuvo una disolución de oro inicial del 75%. El carácter refractario del mineral seleccionado puede atribuirse a la presencia de pirita, como se determinó mediante DRX, SEM-EDS, FTIR y lixiviación diagnóstica, así como por la posible presencia de partículas submicroscópicas de oro.

Las bacterias *A. ferrooxidans* DSMZ 14882, *A. thiooxidans* DSMZ 504 y *L. ferrooxidans* DSMZ 2705, fueron adaptadas al mineral como fuente de energía y se usaron para estudiar el efecto del pH inicial y de todas las posibles combinaciones bacterianas en la biooxidación. Las tres bacterias en consorcio mostraron los mejores resultados biooxidativos, representados en altos valores de porcentajes de disolución de hierro (> 80%), velocidad específica de crecimiento (0,2 h<sup>-1</sup>) y productividad volumétrica de hierro y sulfato (1,4 y 9,5 (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)\*10<sup>-2</sup>, respectivamente). El efecto del tamaño de partícula y la concentración de mineral para el consorcio seleccionado permitió identificar mejores resultados a tamaños de partícula menores y concentraciones de mineral más baja, sin embargo los comportamientos obtenidos a d<sub>80</sub> < 74 μm y 150 g L<sup>-1</sup> no mostraron inhibición en el proceso, de hecho altos valores de productividades volumétricas de hierro y sulfato se alcanzaron. Finalmente, una prueba en bioreactor de 5 L se desarrolló usando una muestra d<sub>80</sub> < 75 μm y 150 g L<sup>-1</sup> de concentración. El producto biooxidado de 12 días en el bioreactor permitió un recobro superior de oro por cianuración (93%).

---

<sup>1</sup>Tesis de Maestría en Ingeniería Química

<sup>2</sup>Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química, Maestría en Ingeniería Química. Directora: Viviana Sánchez Torres, Ph.D.

## ABSTRACT

**TITLE:** EVALUATION OF THE APPLICATION OF BIOOXIDATION AS A CYANIDATION PRETREATMENT FOR A REFRACTORY MINERAL FROM VETAS-CALIFORNIA MINING DISTRICT<sup>1</sup>

**AUTHOR:** JIMY ALEXANDER GAMBOA RUEDA<sup>2</sup>

**KEYWORDS:** Biooxidation, low-grade refractory gold ore, acidophilic-mesophilic bacteria consortia

The significant decrease of high-grade gold deposits has promoted the need to explore new hydrometallurgical processes to maximize the recovery of gold. In this work we studied the use of the biooxidation as a cyanidation pretreatment for a refractory low-grade gold ore (75% initial gold dissolution and 1.50 g t<sup>-1</sup>) from Vetás-California mining district. The refractoriness character of the selected ore can be attributed to the presence of pyrite and possibly submicroscopic gold particles, as was shown by X-Ray Diffraction, SEM-XEDS, FTIR and diagnostic leaching.

Mesophilic bacteria *A. ferrooxidans* DSMZ 14882, *A. thiooxidans* DSMZ 504 and *L. ferrooxidans* DSMZ 2705 were adapted to use the mineral as energy, they were used to study the effect of the initial pH and all possible combinations between the three strains on the biooxidation afterwards. The consortium formed by the three strains showed the best biooxidative results, represented in high values in iron dissolution (> 80%), maximum specific growth rate ( $\approx 0,2 \text{ h}^{-1}$ ) and iron and sulphate volumetric productivity (1,4 and 9,5 (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)\*10<sup>-2</sup>). The effect of particle size and mineral concentration for the consortium selected allowed to identify that better results were obtained at smaller particle size and lower mineral concentrations, however the patterns obtained at d80 < 74  $\mu\text{m}$  and 150 g L<sup>-1</sup> did not represent process inhibition, in fact high sulfate and iron volumetric productivities values were reached. Finally, a 5 L bioreactor test was performed using a D80-200 Ty sample (< 75  $\mu\text{m}$ ) and a 150 g L<sup>-1</sup> mineral concentration. The biooxidized product of 12 days in the bioreactor allowed a higher gold recovery by cyanidation (93%).

---

<sup>1</sup> Thesis

<sup>2</sup> Physical-chemistry Engineering Faculty. Chemical Engineering Department, Chemical Engineering Master Program. Advisor: Viviana Sánchez Torres, Ph.D.

## INTRODUCCIÓN

El oro es un metal noble con múltiples aplicaciones en campos diversos como la joyería, la odontología, la electrónica, la economía (método de inversión), entre otros [1]. Considerando esta diversificación en el mercado, la demanda del oro ha aumentado en los últimos 10 años con una demanda de 4220 t/año para el 2014 [2]. Sin embargo, la continua explotación de este recurso no renovable ha generado una marcada disminución de la cantidad y calidad de los depósitos auríferos disponibles, limitando la capacidad de la industria minera extractiva para suplir la demanda.

Este panorama representa importantes retos para la industria minera, como lo es la implementación de procesos para la extracción de oro a partir de minerales que no son económicamente rentables bajo los métodos tradicionales de operación. Este es el caso de los minerales refractarios de bajo grado, en los cuales la presencia de fases minerales sulfuradas, telúricas o carbonáceas dispuestas en matrices o encapsulamientos alrededor del oro impiden que el agente lixivante, usado bajo condiciones normales de operación, tenga una superficie de contacto suficiente para realizar una extracción efectiva [3,4].

Ante esta problemática de recobro en la minería de oro, se han desarrollado diferentes tecnologías de pretratamiento al mineral refractario, cuya finalidad es la oxidación y disolución de la matriz refractaria para permitir que el oro esté expuesto al posterior ataque de un agente lixivante como el cianuro. Industrialmente se han aplicado la tostación, la cianuración intensiva, la oxidación a presión y la biooxidación para tratar minerales auríferos refractarios (sulfurados), destacándose la biooxidación por su eficiencia, bajo costo y mínimo impacto ambiental al ser un proceso en el que las matrices sulfuradas son oxidadas por la acción de procesos metabólicos naturales de bacterias quimiolitotróficas [4, 5, 6].

En Colombia, la región Santandereana se ha distinguido por ser una zona tradicionalmente minera con diversos e importante depósitos auríferos [7], caracterizados por tener un amplio rango de tenores de oro y refractariedad

asociada esencialmente a la presencia de partículas submicroscópicas de oro diseminadas en matrices de minerales sulfurados (principalmente pirita) [8-14]. El potencial reflejado en las reservas existentes, contrasta con los procesos de extracción empleados actualmente, en los cuales no se consideran factores fisicoquímicos y mineralógicos como el grado de refractariedad del material procesado, lo que provoca que la tecnología aplicada para la extracción de dicho metal no sea la más conveniente desde un punto de vista económico y operativo, al no garantizar una extracción eficiente. En otras palabras el proceso de beneficio actual no garantiza un aprovechamiento eficiente de la totalidad de recursos al ser efectivo únicamente cuando el mineral procesado no tiene naturaleza refractaria.

Se han realizado algunos estudios a escala laboratorio para el pretratamiento de minerales del distrito minero Vetas-California [10-14]. Sin embargo, ningún estudio está relacionado con una aplicación biohidrometalúrgica como la biooxidación. Este proceso bioquímico es una de las opciones más empleadas para tratar minerales refractarios de diferentes tenores a nivel mundial [15,16]. Para implementar esta tecnología en una nueva matriz mineral se debe partir de estudios a escala laboratorio que demuestran la factibilidad de su aplicación. En este trabajo se buscó evaluar el efecto del tipo de bacteria, pH inicial, tamaño de partícula y concentración de mineral en la biooxidación de un mineral aurífero refractario del distrito minero Vetas-California, Santander y determinar el efecto de la biooxidación como pretratamiento a la cianuración en la recuperación de oro, usando además la oxidación química con peróxido de hidrógeno con fines comparativos.

## **1. FUNDAMENTO TEÓRICO**

### **1.1 MINERALES AUROARGENTÍFEROS**

El oro además de presentarse como oro libre (nativo) puede formar aleaciones con la plata (electrum) y compuestos como telururos, antimonuros y selenuros, así como hacer parte de soluciones sólidas cuando presentan tamaños de partícula submicroscópicos “oro invisible”. En la naturaleza el oro y la plata se encuentra en depósitos en formaciones continuas de mineralizaciones en forma de vetas extendidas en diferentes direcciones; o en disposiciones diseminadas en las que microvenillas impregnan la roca huésped en ranuras irregulares [17].

Los depósitos pueden clasificarse de una manera general como minerales sulfurados o minerales oxidados. Además de oro nativo los minerales sulfurados (pirita, arsenopirita, galena, esfalerita, calcopirita) presentan también sulfosales y cuarzo, mientras que los minerales oxidados contienen principalmente cuarzo, limonita, calcita, minerales arcillosos y óxidos de hierro en asociación al oro [17, 18].

En Colombia, el distrito minero colombiano de Vetas-California, Santander es considerado por su potencial uno de los yacimientos de minerales auroargentíferos más importante en Latinoamérica [7, 19]. Sin embargo, el rango de concentraciones de oro que se presenta es amplio y la presencia de refractariedad se ha reportado por asociación del oro con fases sulfuradas (principalmente pirita), así como por su diseminación dentro de la matriz mineral como partículas submicroscópicas [20, 8, 9]. También se han confirmado pérdidas de metales preciosos en las corrientes de descarte de los procesos extractivos actuales, que pueden deberse a la refractariedad del mineral.

### **1.2 PROCESO EXTRACTIVO DE ORO**

La minería puede desarrollarse superficialmente mediante técnicas de explotación a tajo abierto y minería aluvial, así como mediante explotaciones subterráneas cuando los valores minerales de interés no son de fácil acceso y además representan un alto potencial económico.

Los procesos metalúrgicos extractivos son necesarios dada la imposibilidad de obtener un producto de valor agregado a partir de los yacimientos minerales sin ningún tipo de procesamiento. De manera general todo proceso extractivo se basa en la reducción de tamaño, la separación y el manejo de sólidos como las operaciones principales [21].

En el caso de la minería extractiva de oro, tanto para las explotaciones superficiales como para las subterráneas, el minado (perforación, minado y limpieza) y el ajuste del tamaño de partícula (trituración y molienda) constituyen la primera etapa del proceso. La separación como segunda etapa es la parte central del proceso global ya que de su correcta selección y operación depende el éxito de la extracción del metal precioso. Esta última a su vez puede presentarse como una combinación entre una concentración inicial que permite obtener el metal valioso de más fácil extracción a partir de un proceso físico (mesa Wilfley, cribado, equipo jig, etc.) y operaciones unitarias fisicoquímicas que permiten maximizar la extracción (concentración por flotación, lixiviación por percolación, lixiviación por agitación, etc.). Finalmente, para la tercera etapa, correspondiente al manejo de sólidos, se desarrollan funciones como el transporte del mineral dentro del circuito de extracción y su disposición después del procesamiento [21].

**1.2.1 Concentración.** La concentración permite la separación de los minerales de interés de los minerales ganga aprovechando diferencias de propiedades como susceptibilidad magnética, conductividad eléctrica, densidad, entre otras. Múltiples opciones se han utilizado en la industria minera aurífera, sin embargo la concentración de tipo gravimétrico se destaca por ser un proceso mecánico que permite separaciones eficientes sin la adición de ningún tipo de reactivo químico.

La concentración gravimétrica se basa en la diferencia de densidades existente entre los minerales que hacen parte de la matriz de los depósitos a explotar; equipos como el hidrociclón, equipos jig, espirales Humphrey, mesas de sacudimiento entre otros generan la separación del oro en las corrientes más

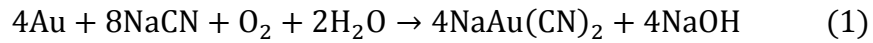
pesadas mediante diferentes principios de funcionamiento, aprovechando la acción de la gravedad.

La mesa Wilfley hace parte de las mesas de sacudimiento y basa su funcionamiento en la generación de una distribución diferencial de los minerales en toda la longitud del equipo a partir de una leve inclinación y la aplicación de un flujo laminar, generando tres tipos de corrientes, concentrados, medios y relaves o colas. Las variables operacionales más importantes son ángulo de inclinación, granulometría, longitud, frecuencia de golpes, flujo de agua y porcentaje de sólidos en la pulpa de entrada [21].

En ocasiones los concentradores netamente gravitacionales no generan el gradiente de separación requerido cuando se tienen tamaños de partícula muy finos o el oro está diseminado como partículas submicroscópicas, siendo necesaria la aplicación de fuerzas adicionales de tipo centrífugo. El concentrador Knelson es un equipo centrífugo consistente en un cono truncado, perforado que rota a altas frecuencias, generando fuerzas centrífugas que permiten la separación de las partículas de mineral más pesada que quedan en los rifles internos del cono, mientras que las partículas más livianas superan el cono y son expulsadas. Las variables operacionales más importantes de este tipo de concentrador son el flujo, la granulometría y el porcentaje de sólidos en la pulpa [22].

Usualmente se aplica la concentración gravimétrica en combinación con operaciones unitarias fisicoquímicas complementarias seleccionadas en función de la mineralogía propia del depósito. La amalgamación y la lixiviación han sido las operaciones unitarias normalmente utilizadas, sin embargo la primera se considera como obsoleta por factores técnicos y ambientales, lo que ha conllevado el uso preponderante de la lixiviación [17]. Aunque se han realizado múltiples esfuerzos en sustituir el cianuro como agente lixivante principal, este ha sido y sigue siendo un reactivo con ventajas asociadas a la alta eficiencia que puede generar en la disolución de oro y el bajo costo que presenta en comparación a otros agentes lixiviantes [17].

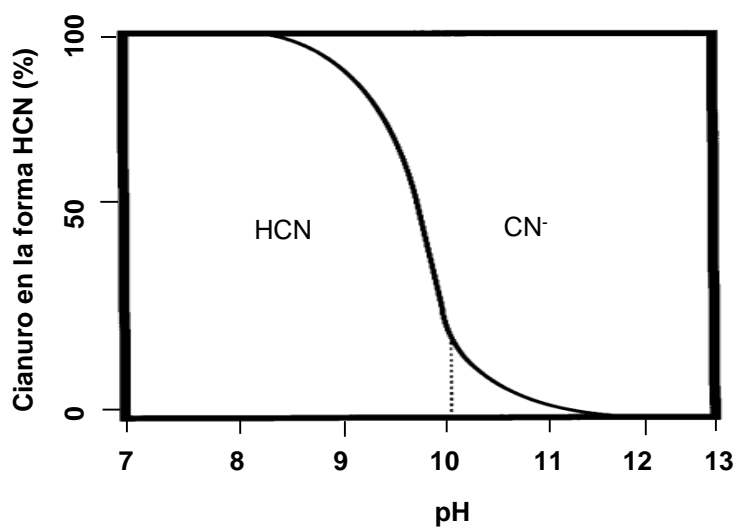
**1.2.2 Cianuración.** La cianuración consiste en la disolución de oro y plata por la acción de soluciones alcalinas de cianuro de sodio, de magnesio o de potasio, siguiendo la estequiometría planteada en la ecuación de Elsner (ecuación 1).



La cianuración se basa en la formación de complejos estables de aurocianuro mediante enlaces de coordinación entre el ion cianuro  $\text{CN}^-$  (ligante) y el oro en su estado de oxidación  $\text{Au}^{+1}$  (auroso). Este acomplejamiento se destaca por tener una constante de equilibrio muy superior a la generada por otros tipos de ligantes del oro y la plata (del orden de  $10^{38}$ ), lo cual resulta en la obtención de altos porcentajes de lixiviación a partir de un bajo consumo de reactivo, razón por la que industrialmente es ampliamente utilizado.

El rango de operación al cual se da una cianuración efectiva está definido por un intervalo restringido de pH con valores superiores a 9,34 como parámetro de seguridad (industrialmente se prefiere usar un valor de 10), en procura de prevenir la formación del ácido cianhídrico (HCN) (Figura 1), un líquido tóxico con alta presión de vapor, indeseado en el proceso [23].

**Figura 1. Disociación HCN,  $\text{CN}^-$  en función del pH a 26°C.**



Fuente: [23].

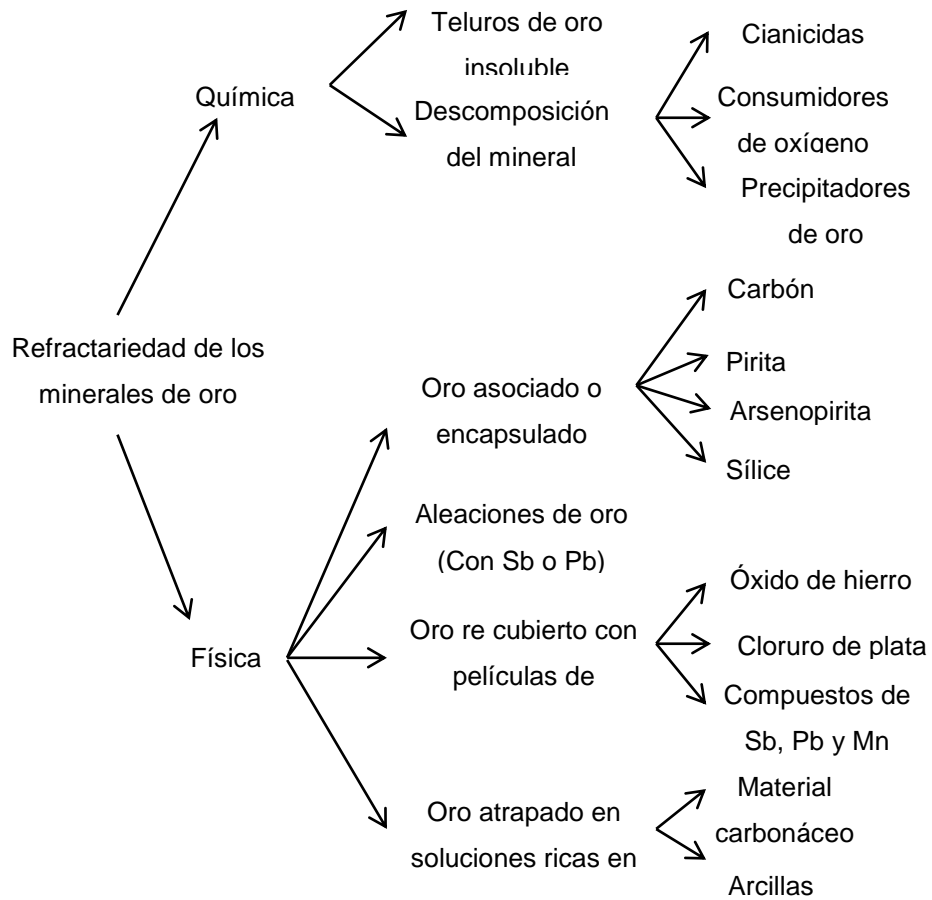
El mecanismo de cianuración puede describirse como un proceso electroquímico que requiere de la oxidación del oro y la reducción correspondiente del oxígeno. El proceso global inicia con la disolución del oxígeno en el seno de la solución cianurada, luego se da el transporte del oxígeno y cianuro hacia la interfase líquido-sólido donde se da la adsorción en la matriz mineral y las reacciones electroquímicas que permiten la formación de complejos estables. Finalmente se da la desorción del complejo de aurocianuro formado y su transporte al seno de la solución [23].

### **1.3 MINERALES REFRACTARIOS A LA CIANURACIÓN**

La presencia de minerales auroargentíferos refractarios hace que se obtengan bajos porcentajes de disolución de oro y plata por medio de procesos tradicionales de cianuración, siendo menores de 80% en todos los casos [3, 24, 25]. La refractariedad es la condición propia de minerales no oxidados o parcialmente oxidados que afecta la efectividad de la cianuración a partir del consumo competitivo de cianuro y/o oxígeno y la formación de encapsulamientos o capas superficiales que inhiben el mecanismo electroquímico de la lixiviación [23]. La refractariedad a la cianuración puede clasificarse en términos del grado de pérdida de eficiencia que genera en la recuperación de oro [26], así como en función de las causas físicas o químicas que la puedan generar como se describe en la Figura 2.

La refractariedad física causada por minerales sulfurados es común y representa una problemática cuyo tratamiento en los procesos metalúrgicos extractivos puede representar múltiples ventajas. En depósitos donde hay este tipo de refractariedad se identifica la presencia de partículas submicroscópicas de oro y plata diseminadas o atrapadas como microinclusiones en matrices de minerales sulfurados que generan encapsulamientos inertes a la acción del agente lixivante, impidiendo una disolución eficiente incluso después de una molienda exhaustiva [28, 24].

**Figura 2. Clasificación de minerales auríferos según la refractariedad.**



Fuente: [27],

Los minerales sulfurados metálicos más comunes se resumen en la Tabla 1, entre ellos existen diferencias asociadas a la dificultad intrínseca que tiene cada sulfuro a la oxidación, característica que es función principalmente de tres propiedades típicas de los minerales sulfurados: el potencial de electrodo, la capacidad para formar celdas de corrosión y la generación de pares galvánicos [29].

**Tabla 1. Potenciales de electrodo para diferentes sulfuros metálicos**

<b>Sulfuro Metálico</b>	<b>Formula química</b>	<b>Potencial de electrodo a Circuito abierto vs. SHE* (mV)</b>
Galena	PbS	300
Calcocita	Cu <sub>2</sub> S	350
Esfalerita	Zn,FeS	350
Calcopirita	CuFeS <sub>2</sub>	400
Bismutina	BiS <sub>3</sub>	400
Estañita	Cu <sub>2</sub> FeSnS <sub>4</sub>	450
Pirrotita	FeS	450
Tetrahedrita	Cu <sub>3</sub> SbS <sub>3</sub>	450
Arsenopirita	FeAsS	500
Pentlandita	(Fe, Ni)S	550
Pirita	FeS <sub>2</sub>	550-600

\* Electrodo estándar de hidrógeno

El potencial de electrodo de un sulfuro hace referencia al potencial alcanzado en equilibrio por un electrodo compuesto de este mineral. Es una magnitud directamente proporcional al trabajo necesario para generar la salida de electrones desde la red cristalina del mineral, por tanto es una medida de la susceptibilidad a la oxidación; a menor valor del potencial de electrodo mayor tendencia a actuar como ánodo, permitiendo la oxidación de la estructura mineral [30]. Es así que al poner en contacto el mineral con una solución que tenga un potencial de óxido-reducción mayor al potencial de electrodo del sulfuro metálico por la presencia de un oxidante catiónico, se da la formación de una celda de

corrosión. A su vez cuando se tienen mezclas de dos o más minerales, la formación de pares galvánicos es posible dada la diferencia de potenciales de electrodo, así los minerales con menor potencial de electrodo serán oxidados a expensas de la reducción de oxígeno, mientras que los minerales sulfurados de mayor potencial permanecerán inertes. En resumen, usando el potencial de electrodo los sulfuros se pueden clasificar en función de su susceptibilidad a la oxidación, destacando la pirita por ser uno de los sulfuros más estables al requerir de los potenciales oxido reducción más altos en solución para ser oxidada (Tabla 1).

La pirita es un mineral normalmente asociado al oro y la plata, estructuralmente está formado por enlaces fuertes entre el catión de hierro Fe y dos aniones de sulfuro S<sup>-2</sup> lo que en su estructura genera altas fuerzas de atracción y remarcable resistencia a la oxidación. Aunque estequiométricamente se tiene que la pirita responde a la formula FeS<sub>2</sub>, la presencia de diferencias en la proporción Fe/S es bastante común, generando múltiples variaciones de la pirita prácticamente propias a cada depósito a explotar [30]. Una de las diferencias principales que puede generar las variaciones en la composición del hierro y el azufre en la pirita es el tipo de conductividad del mineral, cuando se presenta exceso del metal se da un defecto de donador (semiconductor tipo-n), mientras que el exceso del azufre genera un defecto de aceptor (semiconductor tipo-p) algo que en últimas afecta la susceptibilidad a la oxidación de la siguiente manera: los semiconductores tipo-n presentan el nivel de Fermi cerca o dentro de la zona de conducción, mientras que en los semiconductores tipo-p el nivel de Fermi está ubicada en la banda de valencia lo cual aumenta el trabajo requerido para liberar los electrones al tener que superar adicionalmente el ancho de la zona prohibida [30].

#### **1.4 MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO A LA CIANURACIÓN**

Los pretratamientos que se han desarrollado para procesar minerales sulfurados, buscan disolver los encapsulamientos presentes alrededor del metal precioso para su exposición a una posterior lixiviación. La tostación, la molienda

de alta energía, la oxidación a presión, la oxidación química y la biooxidación se destacan como pretratamientos que bajo ciertas condiciones pueden ser rentables y por tanto desarrollarse a escala industrial.

La tostación (roasting) es un proceso pirometalúrgico en el cual los minerales sulfurados y algunas veces carbonáceos son oxidados y convertidos en  $\text{SO}_2$  y  $\text{CO}_2$  a partir de tratamientos térmicos a temperaturas que oscilan entre los  $500^\circ\text{C}$  y  $900^\circ\text{C}$  usando hornos rotatorios o hornos de flujo circulante principalmente. Es un proceso eficiente que requiere de cortos tiempos de operación lo que permitió que fuera implementado como única alternativa en los minerales primarios de oro antes de 1970. Sin embargo, los altos costos económicos y ambientales asociados al proceso han generado que sea una tecnología cada vez más en desuso por el complejo proceso requerido para cumplir los estándares ambientales en cuanto a generación de efluentes contaminantes [31, 32,25].

En la molienda de alta energía se generan fuerzas de impacto muy superiores a la de la molienda tradicional. Esta es una opción positiva en cuanto a que no hay ningún tipo de reacción química y por tanto no existen problemáticas asociadas a la disposición o manejo de efluentes. Sin embargo, es una opción energéticamente costosa y su operación a escalas industriales es prácticamente inviable, considerando que los tamaños de partícula a los que se debe llegar son inclusive nanométricos [32].

La oxidación a presión se realiza en autoclaves en condiciones de alta temperatura y presión que permiten una alta eficiencia en el rompimiento de las oclusiones de sulfuro formando soluciones con alto contenido de sulfatos y ácido sulfúrico. Este proceso se ha implementado durante más de 20 años y tiene diferentes variaciones como el proceso Sherrit-Gordon que requiere temperaturas entre  $170^\circ\text{C}$  y  $190^\circ\text{C}$  y presiones cercanas a los 2000 kPa [33]; en el proceso ARSENO se usa nitratos como catalizadores disminuyendo en cierta medida las extremas condiciones de operación a  $100^\circ\text{C}$  y 700 kPa, el uso de soluciones alcalinas también se ha reportado como catalizador de las reacciones de oxidación [31]. Aunque el proceso en general permite alcanzar altos

porcentajes de recuperación, tiene limitantes operacionales relacionadas con los cumplimientos de reglamentación ambiental en efluentes, así como la dificultad que representa procesar depósitos con altos contenidos de plata, puesto que en las condiciones generadas se da la formación de sulfatos de plata como la argentojarosita que puede ser resistente a la cianuración, generando de nuevo problemas de refractariedad [32].

La oxidación química permite la disolución de los sulfuros, formando sulfato y azufre elemental principalmente a partir de reacciones químicas reportadas con el uso de diferentes agentes oxidantes, tanto en medio básico como en medio ácido. Algunos de los reactivos químicos oxidantes usados son permanganato, cloro, iones férricos, ácido peroximonosulfúrico, ácido nítrico, peróxido de hidrógeno, ozono e hidróxido de sodio.

El peróxido de hidrógeno se destaca por ser un reactivo económico con una cinética de oxidación rápida y un alto potencial de óxido-reducción (inclusive superior al del  $O_2$ ; 1,8 V y 1.2 V respectivamente). Además de ser usado efectivamente en la oxidación química como pretratamiento de minerales sulfurados refractarios, se usa en el tratamiento de aguas residuales industriales, neutralización de colas procesadas y en la oxidación dentro de procesos de cianuración intensiva [34].

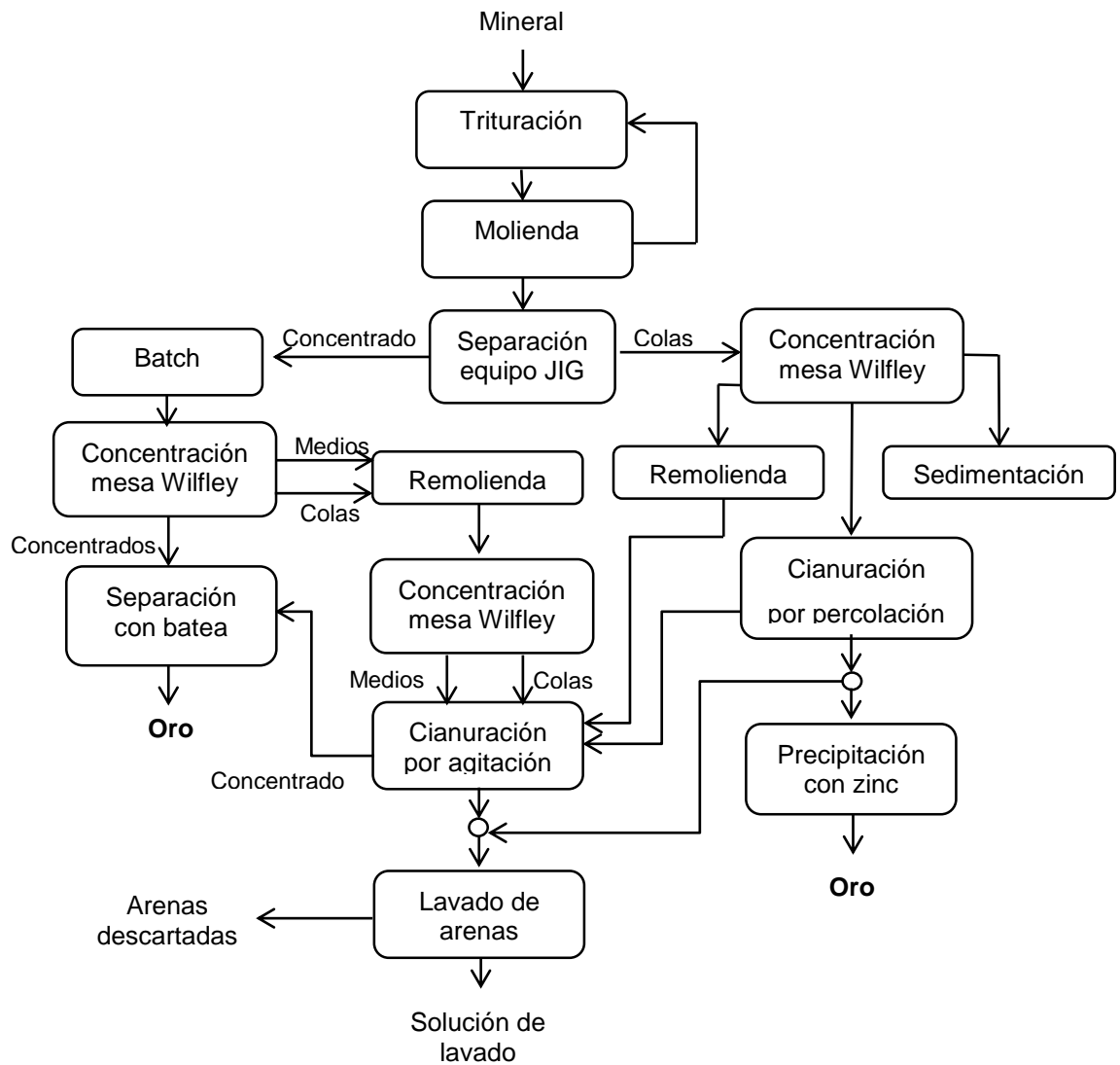
La biooxidación es un proceso bioquímico gobernado por la acción enzimática de bacterias quimiolitótrofas que tienen la capacidad de oxidar y disolver las matrices sulfuradas, usando los minerales como fuente de energía. El proceso se destaca por tener ventajas económicas y ambientales relacionadas con la simplicidad de los equipos requeridos, así como con las condiciones no extremas a las que se opera (normalmente temperatura y presión ambiente), obteniendo porcentajes de recuperación de oro incluso superiores al 95% [35,31].

## **1.5 ESTUDIOS Y MEJORAS DEL PROCESO EXTRACTIVO EN EL DISTRITO MINERO VETAS-CALIFORNIA**

En el distrito minero de Vetas-California, Santander la minería de oro se ha implementado desde épocas coloniales, no obstante, el largo periodo durante el que se ha desarrollado esta actividad económica no ha ido a la par de un avance tecnológico coherente en los procesos usados. En la Figura 3 se presenta el proceso extractivo utilizado actualmente. La intervención de la minería en el distrito por parte del proyecto del Rio Surata (1998-2005) permitió el incremento de los porcentajes promedio de extracción de oro desde 45% hasta 76% a partir de la sustitución de procesos de amalgamación con mercurio y cianuración por percolación por métodos eficientes de cianuración en tanques de agitación [36]; sin embargo, las limitaciones técnicas y el hecho de que la presencia de minerales refractarios a la cianuración no es tomada en cuenta como factor decisivo en la selección de las operaciones unitarias empleadas (Figura 3), indican la existencia de un amplio margen de mejora.

Para el caso del mineral auroargentífero del distrito minero Vetas-California se han estudiado diferentes opciones relacionadas con el tratamiento de la refractariedad [10-14], la interferencia del ión sulfuro en el comportamiento electroquímico de la disolución de oro y plata con cianuro fue evaluada, demostrando que bajo condiciones convencionales de cianuración (1000 ppm [CN<sup>-</sup>], 5.2 ppm [O<sub>2</sub>]) la corriente de oxidación de oro y por tanto su disolución se ve afectada negativamente por el efecto pasivante de los sulfuros disueltos provenientes de la matriz refractaria. Es así que en este estudio se propuso el uso tanto de catalizadores, como de una cianuración intensiva (25000 ppm [CN<sup>-</sup>], 24.1 ppm [O<sub>2</sub>]), encontrando que el efecto del catalizador usado (LeachWell 60X<sup>®</sup>) puede neutralizar el efecto pasivante del ión sulfuro bajo condiciones de cianuración intensiva [11].

**Figura 3. Diagrama de flujo de la planta de beneficio de la empresa Reina de Oro Ltda.**



Fuente: empresa Minera Reina De Oro Ltda.

El efecto del uso de un agente lixiviante diferente al cianuro se estudió empleando el tiosulfato de sodio, obteniendo una mejora el comportamiento de la lixiviación en minerales tanto oxidados como refractarios [13], sin embargo, dado el alto consumo y costo del agente lixiviante, se puede inferir que esta es

una opción inviable desde el punto de vista económico. Otra opción explorada para procesar el mineral refractario de la región es la molienda de alta energía, con la que se obtuvieron cambios en la morfología del mineral y la liberación de parte del oro atrapado, generando así porcentajes de extracción de hasta el 69% del oro total, respecto al 40% alcanzado sin ningún tipo de pretratamiento [10]. Sin embargo, los altos costos energéticos y las limitaciones en el tamaño del equipo para un posterior escalamiento hacen de esta una alternativa poco atractiva.

Por otra parte con miras de usar una modificación de la tostación convencional, capaz de disminuir las cargas contaminantes generadas, relacionadas principalmente con el dióxido de azufre gaseoso, un arreglo de tostación clorurante permitió el aumento del porcentaje de disolución de oro de hasta 50%, llegando a valores de extracción del 65%, con una disminución no muy importante en el dióxido de azufre generado [14].

## **1.6 BIOOXIDACIÓN**

Aunque la refractariedad es una problemática que ha sido estudiada a escala laboratorio para los minerales del distrito minero California-Vetas mediante la aplicación de diferentes metodologías de pretratamiento a la cianuración, no se han realizado estudios en los que la biooxidación sea aplicada. Una investigación pionera en este campo específico para el mineral de la región Vetas-California puede aportar la información y procedimientos necesarios para garantizar la adaptación de microorganismos quimiolitotróficos y el desarrollo de su actividad biooxidativa en el sustrato mineral específico.

El éxito en la aplicación de un consorcio bacteriano a una mena determinada, no garantiza que el consorcio podrá efectuar la biooxidación eficazmente en un mineral diferente, dadas las diferencias en composición química y mineralógica que pueden existir. Esto se puede reflejar al comparar dos estudios en los que para un mismo tipo de consorcio, se usaron minerales de calcopirita con diferente composición química en cada caso, obteniendo máximos de biooxidación diferentes en cada caso (40% y 54% respectivamente) [37,29]. Así mismo, las

condiciones óptimas de cultivo no fueron las mismas en ambos casos; caso 1 (pH 2.1, 41 días), caso 2 (pH 3.75, 10 días), comprobándose que la interacción microorganismos-mineral obedece a mecanismos bioquímicos complejos que evidencian la necesidad de realizar estudios de viabilidad particulares al caso de estudio, con miras de verificar la adaptación de las cepas bacterianas al nuevo mineral o fuente de energía, así como las condiciones más adecuadas para la biooxidación [38,39].

**1.6.1 Mecanismo de la biooxidación.** Dada la diversidad de minerales sulfurosos, la oxidación puede darse por dos mecanismos químicos diferentes [40]; por una parte minerales como: pirita, molibdenita y tungstenita, caracterizados por no ser solubles en ácidos, gobiernan su proceso oxidativo por el mecanismo del tiosulfato, denominado así por ser este el principal intermedio de la reacción ( $S_2O_3^{2-}(aq)$ ); por otra parte minerales como: calcopirita, covelita, calcocita, entre otros, caracterizados por ser parcialmente solubles en ácidos no oxidantes, gobiernan su proceso oxidativo por la ruta de los polisulfuros, llamada así porque esta especie es el principal intermediario de la reacción  $Sn^{2-}(aq)$  (Tabla 2) [41].

Desde un punto de vista físico, los microorganismos pueden ejercer su función oxidativa utilizando un mecanismo de contacto o un mecanismo de no contacto en el cual las cepas están distribuidas en el medio y generan la oxidación con un grado de efectividad un poco menor [42].

**Tabla 2. Mecanismos de la biooxidación**

Ruta del tiosulfato	Ruta de los polisulfuros
$FeS_2 + 6Fe^{3+} + 3H_2O \rightarrow S_2O_3^{2-} + 7Fe^{2+} + 6H^+$	$MS + Fe^{3+} + H^+ \rightarrow M^{2+} + 0,5H_2S_n + Fe^{2+}$
$4Fe^{2+} + O_2 + 4H^+ \rightarrow 4Fe^{3+} + 2H_2O$	$n \geq 2$
$S_2O_3^{2-} + 8Fe^{3+} + 5H_2O \rightarrow 2SO_4^{2-} + 8Fe^{2+} + 10H^+$	$0,5H_2S_n + Fe^{3+} \rightarrow 0,125S_8 + Fe^{2+} + H^+$
	$0,125S_8 + 1,5O_2 + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$

Fuente: [40].

**1.6.2 Bacterias empleadas en la biooxidación.** Los principales microorganismos empleados para la biooxidación son las bacterias mesófilas, destacándose las especies *Acidithobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* que se usan por ser cepas ampliamente estudiadas que tienen la capacidad de oxidar compuestos tanto de azufre como de hierro en el mineral, demostrar efectividad con múltiples tipos de matrices minerales y por ser las bacterias con el rango de temperatura óptimo de crecimiento más bajo, lo cual puede favorecer su operación en climas fríos [43, 44, 45, 46, 37].

**1.6.2.1 *Acidithiobacillus ferrooxidans*.** Bacterias Gram negativas, bacilares no esporuladas que deben su movilidad a un único flagelo polar, fue la primera especie bacteriana descubierta con la capacidad de oxidar minerales [47].

Al ser un microorganismo mesófilo opera dentro del rango de temperatura de 20°C - 35 °C, sin embargo, es de destacar que *A. ferrooxidans* puede oxidar la pirita a temperaturas tan bajas como 10 °C [48], haciéndola una cepa versátil para trabajar en zonas de clima frío, en las cuales un aumento de temperatura a escala industrial representa un mayor consumo energético.

Su pH óptimo está en el rango 1,8 - 2,0, aunque es posible adaptarla a un pH fuera de su rango óptimo [49]. En comparación con muchas bacterias de biominería tiene la capacidad de crecer más rápido, siendo notablemente tolerante a una amplia gama de iones metálicos solubles [50].

Nutricionalmente se considera quimiolitótrofa obligada, por lo que asimila el carbono en forma de dióxido de carbono a través del ciclo de Calvin-Benson, y utiliza como donador de electrones el hierro ferroso, así como una gran variedad de compuestos de azufre inorgánicos reducidos [39]. En cuanto al requerimiento de oxígeno, se considera una cepa preferentemente aeróbica que en casos excepcionales puede adaptarse a condiciones anaeróbicas, utilizando el hierro

férrico como aceptor de electrones, siempre que no tenga un compuesto de azufre inorgánico reducido como donante de electrones [51].

No obstante sus requisitos nutricionales son muy modestos, por ejemplo la aireación de una muestra de pirita de hierro en agua acidificada es suficiente para apoyar el crecimiento a expensas de la pirita [37].

**1.6.2.2 *Acidithiobacillus thiooxidans*.** Es una especie bacilar móvil por medio de un flagelo polar, quimiolitótrofa y autótrofa obligada, estrictamente aerobia, morfológica y nutricionalmente es muy parecida a *A. ferrooxidans*, excepto que *Acidithiobacillus thiooxidans* no es capaz de oxidar el hierro ferroso y por lo tanto se limita a la utilización de compuestos de azufre reducidos como fuente de energía [37], aunque en consorcio puede darse su crecimiento en minerales como la pirita. Es una cepa de vital importancia en los procesos de biolixiviación de compuestos sulfurosos procedentes de minas, pues su capacidad de oxidar el azufre elemental y generar ácido sulfúrico como producto permite que en el medio se garanticen las condiciones acidófilas de crecimiento. Además *A. thiooxidans* es capaz de producir y tolerar mayores concentraciones de ácido sulfúrico, siendo capaz de crecer en ambientes con alta acidez. Sus límites de pH para su crecimiento son 0,5 a 5,5, con un pH óptimo en el rango de 2,0 a 3,0 [43]. Su temperatura óptima se encuentra entre 28°C y 30°C, sin embargo puede desarrollarse en un rango de temperatura entre 10°C y 37°C.

**1.6.2.3 *Leptospirillum ferrooxidans*.** Especie quimiolitótrofa, Gram negativa, aerobia y altamente tolerante a ambientes ácidos. Esta bacteria es capaz de utilizar al hierro ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) exclusivamente como donante de electrones, capacidad que no es inhibida por el hierro férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) [37]. Crece a temperatura óptima en el intervalo de 32 a 35 °C y a un pH óptimo entre 1,5 y 3,0, con el límite del rango de pH 1,3 a 4,0 [43].

Partiendo de su selectividad hacia el ión ferroso, para los procesos de biooxidación se suele emplear en consorcio, combinándose con una bacteria azufre – oxidante. Un ejemplo de ello es la planta BIOX<sup>®</sup>, en la cual se utiliza un

cultivo mixto de *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* para oxidar concentrados refractarios de oro [35].

En resumen *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* son las especies bacterianas más usadas en estudios relacionados con técnicas de biooxidación y biolixiviación [15]. En la Tabla 3 se presenta un resumen de diversos estudios desarrollados en el campo de la biooxidación, siendo sobresaliente el uso de las bacterias mesófilas mencionadas.

Las tres cepas usadas como consorcio generan comportamientos biooxidativos efectivos, evidenciados y reportados en disoluciones de oro inclusive cercanas al 100 % [55, 56, 5, 43], sin embargo, también se han reportado aplicaciones biohidrometaúrgicas donde se prefiere usar cepas individuales o combinaciones entre dos de las tres bacterias [52, 53, 44, 46, 57]. Es por tanto necesario identificar cual combinación es la que representa los mejores resultados en la biooxidación de un mineral determinado. Por ejemplo, el uso de *A. thiooxidans* no siempre genera una mejora en los resultados, de hecho los bajos niveles de pH que genera en el medio pueden llegar a inhibir el proceso o simplemente no mejorarlo [58, 59].

**Tabla 3. Estudios de biooxidación usando cepas *A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* y *A. thiooxidans***

Combinación bacterias	Principales fases mineralógicas	Unidad de reacción	Resultados principales	Cita
<i>A. ferrooxidans</i>	Pirita y cuarzo	Cultivo batch reactor 1,5 L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La mayor velocidad de disolución de hierro fue 0,087 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup></li> <li>• La tasa de disolución de hierro aumenta proporcionalmente con la concentraciones de oxígeno disuelto</li> <li>• En promedio las densidades celulares alcanzadas fueron 1,6*10<sup>8</sup>Células mL<sup>-1</sup></li> </ul>	[52]
<i>A. ferrooxidans</i>	Pirita y cuarzo	Cultivo batch reactor 1,5 L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La disolución de hierro y la densidad celular disminuyeron con valores más altos de intensidad de agitación t</li> <li>• La mayor velocidad de disolución de hierro fue 0,1 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup></li> </ul>	[53]
Consortio compatible con <i>A. ferrooxidans</i>	Mineral arcilloso con pirita y arsenopirita	Cultivo batch reactor 1,0 L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El porcentaje de disolución de arsénico máximo fue 95%</li> <li>• El porcentaje de disolución de oro sin pretratamiento fue 40% y con biooxidación como pretratamiento fue 76%</li> </ul>	[44]
Consortio <i>A. ferrooxidans</i> , <i>A. thiooxidans</i> <i>L. ferrooxidans</i>	Galena, esfalerita, pirita, arsenopirita, calcopirita	Cultivo batch erlenmeyer 1 L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>A. ferrooxidans</i> fue la cepa dominante</li> <li>• El porcentaje de disolución de oro sin pretratamiento fue 56% y para la plata 18%</li> <li>• El porcentaje de disolución de oro después de la biooxidación fue 97% y 50% para la plata</li> </ul>	[54]
<i>A. ferrooxidans</i> y <i>L. ferrooxidans</i>	Arsenopirita y pirita	Cultivo batch erlenmeyer 0,5 L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La densidad celular máxima fue 4,2*10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup></li> <li>• Las tasas de disolución de hierro y arsénico disminuyeron con el aumento de la concentración de mineral</li> <li>• El pH en un rango (1,5 - 2,0) mostró la mayor tasa de oxidación</li> </ul>	[46]
Consortio mesófilo, termófilo y extremo termófilo	Pirita, calcopirita y calcocita	batch erlenmeyer 0,1 L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El porcentaje de disolución de cobre fue 54% para el consorcio mesófilo; 64% para el consorcio termófilo y 78% para el consorcio termófilo extremo</li> </ul>	[55]

**Tabla 3 (continuación)**

<b>Combinación bacterias</b>	<b>Principales fases mineralógicas</b>	<b>Unidad de reacción</b>	<b>Resultados principales</b>	<b>Cita</b>
Consortio mesófilo, termófilo y extremo termófilo	Pirita con trazas de calcopirita y arsenopirita	batch erlenmeyer 0,5 L y reactor 5 L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para altos porcentajes de sólidos se obtuvieron mejores resultados con el consorcio mesófilo y a bajos % con el consorcio termófilo</li> <li>• Se obtuvieron porcentajes de oxidación de mineral superiores al 85% asociadas a disoluciones de oro superiores al 90%</li> </ul>	[56]
Consortio mesófilo, termófilo y extremo termófilo	Pirita y calcopirita	batch erlenmeyer 0,5 L y reactor 5 L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La velocidad de disolución de hierro y arsénico fue mayor en el bioreactor respecto a los ensayos en erlenmeyer</li> <li>• El porcentaje de disolución de oro aumento desde 42% sin pretratamiento hasta 97%, 87% y 82% a (5, 10, 20) % m v<sup>-1</sup> de mineral, respectivamente</li> </ul>	[5]
Consortio <i>A. ferrooxidans</i> (BioX®)	Pirrotita, arsenopirita y pirita	Bioreactor proceso BIOX®	<ul style="list-style-type: none"> <li>• oxidación total de la pirrotita, parcial de la arsenopirita y mínima de la pirita</li> </ul>	[43]
<i>A. ferrooxidans</i> -LR y <i>A. thiooxidans</i>	Calcopirita grado de investigación	batch erlenmeyer 0,25 L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>A. thiooxidans</i> en cultivo puro no oxidó calcopirita, pero externamente oxidó S en la presencia de CuFes<sup>2</sup></li> <li>• <i>A ferrooxidans</i> oxidó calcopirita</li> </ul>	[57]
Cepas compatibles con <i>L.</i> y <i>A. ferrooxidans</i>	pirita, pirrotita, galena, esfalerita y calcopirita	batch erlenmeyer 0,25 L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La mejor condición aumentó el porcentaje de disolución de oro hasta 96,4% y el de zinc hasta 86% en un proceso controlado difusionalmente por la formación de capas de jarosita</li> </ul>	[58]
Cepas compatibles con <i>A. ferrooxidans</i>	Calcopirita, esfalerita y galena	batch erlenmeyer 0,25 L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El Eh puede relacionarse con el crecimiento y la actividad bacteriana</li> <li>• La disminución gradual de fuente de energía y aumento del mineral resultó ser un método eficaz de adaptación</li> </ul>	[59]

**1.6.3 Factores que afectan la biooxidación.** Algunos factores que pueden afectar el proceso de biooxidación tanto a escala industrial como de laboratorio son: el tipo de bacteria, la temperatura, el pH, el potencial redox (Eh), la cantidad de oxígeno disuelto (DO), los requerimientos nutricionales, así como las características del diseño del reactor, el tamaño de partícula del mineral, la concentración de mineral en el medio y su mineralogía [47]. Al garantizar que estas variables sean fijadas dentro de un rango apropiado para la operación, así como para el crecimiento de los microorganismos, se podrá tener un alta probabilidad del avance de la oxidación y por ende la posterior mejora en el porcentaje de extracción del mineral valioso.

**1.6.3.1 Temperatura.** Para el caso de los microorganismos mesófilos la temperatura óptima se encuentra alrededor 30 a 35 °C [39]. La cinética de la disolución de los sulfuros, es directamente proporcional a la temperatura [43], lo cual se evidenció en el estudio del efecto de la temperatura en la disolución de cobre con la biooxidación de calcopirita, puesto que el proceso fue favorecido cuando en el sistema se alcanzaron los valores de temperatura más altos (32° C aproximadamente) [60]. El efecto positivo del aumento de la temperatura en el proceso está limitado por la posible inhibición que pueden generar valores por encima del rango óptimo de crecimiento de las poblaciones bacterianas, resultando en un efecto selectivo sobre poblaciones de microorganismos específicas, así como cambios en variables críticas del proceso tales como la cantidad de oxígeno disuelto y la solubilidad del ión férrico en la solución [4].

**1.6.3.2 pH.** El pH afecta intensamente al crecimiento microbiano, pues cada especie tiene un rango definido de pH para su crecimiento y un pH óptimo. En general las bacterias acidófilas mesófilas crecen bien en medios ácidos mostrando un crecimiento asociado a la disminución del pH [61, 62], y su capacidad de obtener energía a partir de la oxidación del ión ferroso se ve inhibida en un importante grado en valores de pH mayores a 3,0.

También se ha reportado que en pH mayores a 3,5 y con suficiente oxígeno en solución, el ión férrico se oxida espontáneamente y precipita como jarosita u otros tipos de hidróxido que pueden pasivar el bioproceso parcial o totalmente [4, 63, 43].

**1.6.3.3 Tamaño de partícula del mineral y su mineralogía.** Las tasas de lixiviación de sulfuros metálicos presentes en matrices minerales aumentan conforme el tamaño de partícula se reduce, efecto que es favorecido cuando los valores de pH en solución representan una mayor acidez [64]. Sin embargo, esta tendencia no es del todo clara para aplicaciones de biooxidación y biolixiviación, pues se ha reportado que la presencia de menores tamaños de partícula puede acelerar la desactivación celular [61].

**1.6.3.4 Concentración del mineral en el medio.** Mayores concentraciones de mineral pueden afectar negativamente la actividad bacteriana por cuenta del mayor esfuerzo de corte que las partículas de mineral generan sobre la pared celular de las bacterias, las limitaciones difusionales en el mecanismo de transporte de oxígeno y dióxido de carbono hacia la célula y por la presencia de mayores cantidades de elementos tóxicos inhibitorios [61]. Sin embargo, es posible utilizar altas concentraciones de mineral manteniendo buenos rendimientos en la biooxidación si se realiza una adaptación de las bacterias al mineral de estudio.

**1.6.2.5 Potencial redox (Eh).** El Eh de la solución lixivante afecta la cinética de la biooxidación, altos valores indican condiciones oxidantes fuertes que están asociados con tasas efectivas de disolución del mineral, generadas principalmente por la presencia de  $Fe^{+3}$  como agente oxidante [61,62]. El rango de Eh que se debe generar en el medio de cultivo para generar una oxidación efectiva depende del tipo de sulfuro presente en el mineral, siendo la pirita el sulfuro más difícil de oxidar y la galena el más sensible a la oxidación. Por ejemplo en la lixiviación de un mineral con contenido principal de calcopirita se encontró que altos grados de disolución se dieron con valores de potencial de

óxido reducción inclusive menores a 450 mV vs. SHE [65, 66], un valor que hubiese sido insuficiente para oxidar la pirita, al ser el mineral con el valor de potencial de electrodo más alto (550 mV- 600 mV,Tabla 1).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del tipo de bacteria, pH inicial, tamaño de partícula y concentración de mineral en la biooxidación de un mineral aurífero refractario del distrito minero Vetas-California, Santander y determinar el efecto de la biooxidación como pretratamiento a la cianuración en la recuperación de oro.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**2.2.1** Seleccionar y caracterizar química y mineralógicamente el mineral aurífero refractario de estudio

**2.2.2** Identificar la cepa de referencia con el mejor comportamiento en el proceso de biooxidación (mejor respuesta a la adición del mineral como fuente de energía) para cada una de las especies bacterianas evaluadas: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*

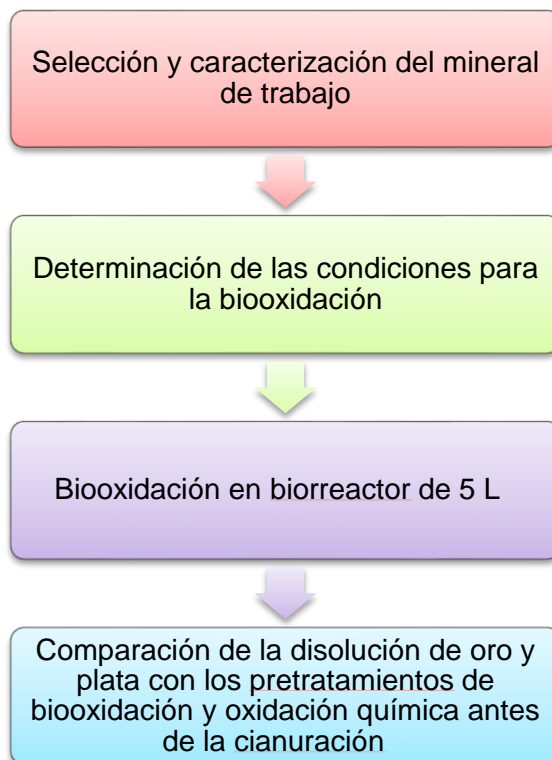
**2.2.3** Evaluar el efecto del tipo de bacteria, pH inicial, tamaño de partícula y la concentración de mineral, mediante la cuantificación de la cantidad de hierro férrico y sulfato formados y disueltos durante el proceso

**2.2.4** Comparar el porcentaje de oro extraído usando la metodología tradicional de cianuración en relación a la que utiliza la biooxidación como pretratamiento

### 3. METODOLOGÍA

La metodología empleada se divide en cuatro etapas principales como se describe en la Figura 4.

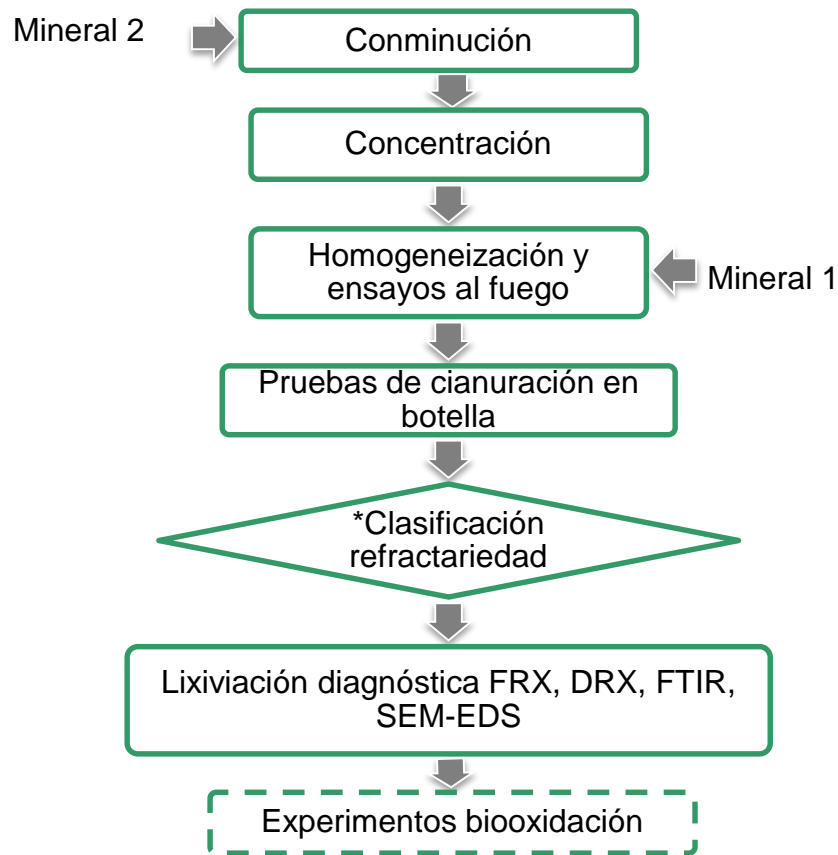
**Figura 4. Metodología empleada durante la investigación.**



#### 3.1 SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MINERAL DE ESTUDIO

Las etapas que comprenden esta sección (Figura 5) permiten la selección de un mineral caracterizado con condición refractaria, ajustado en tamaño de partícula y homogeneizado para su posterior uso en los ensayos de biooxidación.

**Figura 5. Selección y caracterización del mineral.**



**3.1.1 Selección del mineral.** Dos muestras provenientes de dos minas diferentes fueron utilizadas. El mineral 1, con un tamaño de partícula promedio  $d_{50} \approx 300 \mu\text{m}$ , se obtuvo de la corriente de concentrados de mesa Wilfley dentro de una corrida de proceso Cleaner en una empresa minera activa, ubicada en Vetas, Santander [21]. El mineral 2 corresponde a mineral caja, tomado directamente de una mina en California, Santander con tamaño de partícula inferior a  $18''$  sin ningún tipo de tratamiento previo.

**3.1.1.1 Ajuste del tamaño de partícula.** El mineral 2 fue sometido a trituración usando una trituradora de mandíbulas BB 200 (Retsch, Alemania) que permitió alcanzar un tamaño de partícula promedio de  $0,5''$ . A continuación cada mineral se procesó en un molino de bolas (Denver, Canadá) con 100 bolas de acero de diferentes tamaños hasta obtener un tamaño de partícula  $d_{80} < 74 \mu\text{m}$ . Con el objetivo de verificar el tamaño de partícula, se realizaron análisis granulométricos

siguiendo la norma ASTM C-136-06 [67,68]. Para usar muestras representativas para los posteriores análisis se usó la técnica de cono y cuarteo siguiendo la norma ASTM C-702 [69].

**3.1.1.2 Concentración del mineral 2.** Dado que el mineral 2 no tenía ningún tipo de tratamiento de beneficio previo, se le realizó un proceso de concentración gravimétrica con el fin de incrementar el tenor de oro y plata. Se realizaron pruebas preliminares tanto en mesa Wilfley tamaño 13 (MSI industries Inc., Estados Unidos) como en concentrador centrífugo Knelson KC DM3 (FLSmidth, Dinamarca) que permitieron seleccionar las condiciones de operación descritas en la Tabla 4. Para seleccionar el equipo de concentración para el mineral 2 se decidió utilizar como parámetros de decisión el porcentaje de recuperación y la razón de enriquecimiento, descritos en las ecuaciones 2 y 3 respectivamente.

**Tabla 4. Condiciones de operación de la Mesa Wilfley y del concentrador Knelson**

<b>Mesa Wilfley</b>	<b>Concentrador Knelson</b>
30° de ángulo de inclinación	600 rpm
20% sólidos	20% sólidos
90 Lh <sup>-1</sup> agua de lavado	40Lh <sup>-1</sup> flujo de alimentación
	600 rpm

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\textit{masa}_{concentrado} (g) * \textit{ley}_{concentrado} (g * \textit{ton}^{-1})}{\textit{masa}_{total} (g) * \textit{ley}_{inicial} (g * \textit{ton}^{-1})} \quad (2)$$

$$\textit{Razón de enriquecimiento} = \frac{\textit{ley}_{concentrado}}{\textit{ley}_{inicial}} \quad (3)$$

**3.1.1.3 Determinación del tenor de oro y plata.** Para determinar la concentración de oro y plata se realizaron ensayos al fuego acoplados a espectrometría de absorción atómica en flama usando un espectrómetro modelo

210 VGP (Buck Scientific, Estados Unidos), siguiendo la norma ASTM E 400-71 [70], determinando el valor como el promedio de ensayos realizados por duplicado.

**3.1.1.4 Cianuración en botella.** Este ensayo se realizó para determinar el grado de lixiviabilidad de cada uno de los minerales usando condiciones de operación que favorecieran un alto grado de disolución sin ningún tipo de pretratamiento [71]. Como unidades de lixiviación se usaron botellas ámbar con volumen de operación de 1 L,  $1 \text{ g L}^{-1}$  de NaCN, 500 g de mineral y un tamaño de partícula  $d_{80} < 74 \mu\text{m}$ . Este tamaño fue seleccionado para garantizar que los resultados de disolución de los metales preciosos no fueran afectados significativamente por el tamaño promedio del mineral. Empleando un equipo de rodillos se garantizó la agitación de las pulpas cianuradas durante 96 h a una velocidad de agitación constante de 51 rpm. El oro y plata disueltos se cuantificaron por medio de espectrometría de absorción atómica a diferentes tiempos. La concentración de cianuro libre se monitoreó por titulación con  $\text{AgNO}_3$  [72], y se realizaron ajustes con el propósito de mantener constante la concentración de NaCN.

Los resultados de la cianuración en botella se usaron para identificar y seleccionar como mineral de estudio, la matriz mineral con el mayor grado de refractariedad, dada la posibilidad de tener un margen de mejora más amplio en la lixiviabilidad del oro utilizando la biooxidación como pretratamiento.

### **3.1.2 Caracterización del mineral seleccionado**

**3.1.2.1 Técnicas analíticas.** La composición química de elementos diferentes a la plata o el oro fue determinada por medio de espectrometría de fluorescencia de rayos X (FRX) usando un espectrómetro S8 Tiger (Bruker, Estados Unidos). Para identificar las fases minerales presentes en el mineral seleccionado se realizaron análisis de difracción de rayos X en polvo en un equipo Rigaku Miniflex II, usando un rango de  $2\theta$  entre  $3^\circ$ -  $80^\circ$ , en una configuración Bragg-Brentano modo continuo y con una velocidad de escaneo de  $1^\circ \text{ min}^{-1}$ . Los difractogramas

obtenidos fueron analizados usando el algoritmo Search-Match del software X'pert High Score plus. Con el propósito de corroborar la información obtenida mediante análisis DRX, se desarrollaron análisis de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (IRFT) en un equipo 8400S (Shimadzu, Japón) usando pastillas de KBr (modo transmitancia) en una proporción 1:100 respecto al mineral. Finalmente la caracterización mineralógica fue complementada por análisis de microscopía electrónica de barrido con sonda de energía dispersiva de rayos X (SEM-EDS) con un equipo Quanta FEG 650 (FEI, Estados Unidos). La cantidad de hierro fue cuantificada a partir de disoluciones ácidas del mineral y posterior lectura de absorción atómica, siguiendo el método de cuantificación de hierro total [72].

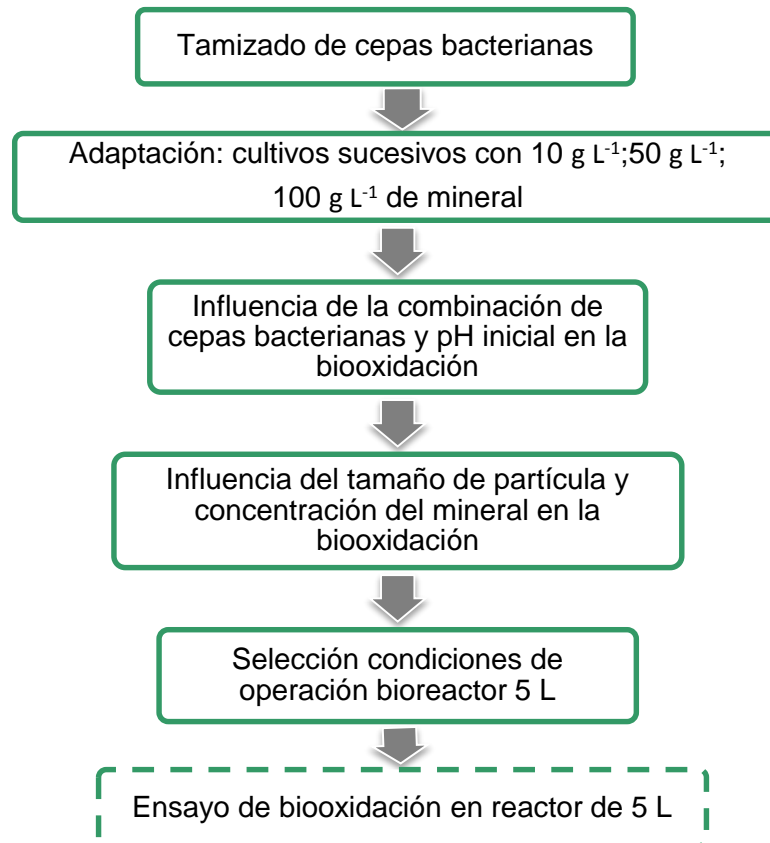
**3.1.2.2 Lixiviación diagnóstica.** Teniendo en cuenta las diferentes fases mineralógicas detectadas mediante la caracterización previa (sección 3.1.2.1) se propuso una serie de lixiviaciones específicas para disolver secuencial y puntualmente cada una de las fases identificadas y así determinar las asociaciones de oro y plata correspondientes. Las etapas resultantes fueron cianuración- oxidación con ácido sulfúrico, cianuración- oxidación con ácido nítrico, cianuración y ensayo al fuego final [73].

**3.1.2.3 Ajuste del tamaño de partícula para la biooxidación.** Teniendo en cuenta que para los ensayos de biooxidación posteriores se requiere de dos tamaños de partícula; una fracción del mineral se sometió a una etapa de molienda adicional, partiendo del tamaño  $d_{80} < 74 \mu\text{m}$  se monitoreó mediante análisis granulométrico que el tamaño de partícula alcanzara  $d_{80} < 44 \mu\text{m}$ . Las dos fracciones obtenidas de mineral se homogeneizaron mediante cono y cuarteo con el fin de garantizar condiciones representativas para las siguientes etapas de la investigación.

### 3.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA BIOOXIDACIÓN

Las etapas secuenciales desarrolladas para esta sección se presentan en la Figura 6.

**Figura 6. Determinación de las condiciones para la biooxidación.**



En todos los experimentos se usó medio de cultivo T&K [74] (Anexo A), manteniendo invariable la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en  $0.4 \text{ g L}^{-1}$  y modificando la concentración de la fuente de energía en función del tipo de prueba realizada. El medio de cultivo fue esterilizado utilizando ciclos de 20 minutos en autoclave a  $120^\circ\text{C}$  y 20 psi. Los cultivos se realizaron por duplicado con un inóculo del  $10\% \text{ v v}^{-1}$  a  $30^\circ\text{C}$  y 180 rpm. Las pérdidas de agua por evaporación se repusieron a la misma frecuencia que las muestras se tomaron para los diferentes análisis realizados. Adicionalmente controles abióticos fueron usados a las mismas condiciones.

**3.2.1 Tamizado de las cepas de trabajo.** El tamizado consistió en la selección de una cepa bacteriana de cada especie, del cepario de 21 cepas quimiolitotróficas de referencia de las especies *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* propiedad del Grupo de Mineralogía Aplicada y Bioprocesos, adscrito a la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (Tabla 5).

**Tabla 5 Listado de las cepas de referencia utilizadas en el tamizado**

<i>A. Ferrooxidans</i>	<i>L. ferrooxidans</i>	<i>A. thiooxidans</i>
ATCC 2880	DSMZ 2391	ATCC 15494
ATCC 2380	DSMZ 2705	ATCC 19377
DSMZ 9464	DSMZ 1929	DSMZ 504
DSMZ 9465	DSMZ 1931	DSMZ 9463
DSMZ 583		DSMZ 11478
DSMZ 584		
DSMZ 585		
DSMZ 24419		
DSMZ 11477		
DSMZ 14882		
DSMZ 17398		
DSMZ 1927		

Inicialmente se realizó la activación de las cepas de referencia, realizando cultivos en 100 mL de medio T&K sin adición de mineral que permitieran obtener células viables para los ensayos subsecuentes ( $10^7$ - $10^8$  células mL<sup>-1</sup>). El tamizado se desarrolló con ensayos biooxidativos para cada una de las cepas en erlenmeyer de 250 mL con 100mL de volumen de operación, durante 12 días, adicionando mineral en una concentración de 100 g L<sup>-1</sup> como condición

estresante y 10% v v<sup>-1</sup> de inóculo. En el caso de las pruebas con *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* se garantizó una concentración de 33 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, para los ensayos de las cepas de *A. thiooxidans* que es una especie con notable y reportada predilección por el azufre como fuente de energía [40], se adicionó azufre elemental en una concentración 10 g L<sup>-1</sup> en lugar del FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. El pH inicial en el medio se ajustó a 1,8 y periódicamente se tomaron alícuotas para mediciones de pH, Eh y densidad celular.

A partir de la comparación de los perfiles de biooxidación (curvas de Eh, pH y densidad celular vs tiempo) obtenidos para las 21 cepas se seleccionó una cepa de trabajo de cada especie, buscando tener las bacterias con la menor inhibición y por ende la mejor respuesta a la adición del mineral de estudio al medio de cultivo. En general se buscaron valores estables de densidad celular como indicativo directo de crecimiento microbiano, a la vez que se usaron criterios específicos para cada especie en función de sus características principales. Para las especies oxidantes del hierro (*A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans*) el criterio principal de selección fue el comportamiento en términos de potencial de óxido reducción (Eh), buscando los valores más altos durante los intervalos de tiempo más largos [61,62]. Por otra parte para la especie *A. thiooxidans* se buscó obtener una tendencia decreciente constante de pH con valores estables de Eh durante el tiempo de cultivo.

**3.2.2 Adaptación.** Usando erlenmeyers de 500 mL con 200 mL de volumen de trabajo, las tres cepas seleccionadas en la etapa de tamizado se adaptaron al uso del mineral como fuente de energía a partir de cultivos sucesivos de 9 días. Las cepas *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* se cultivaron inicialmente con 20 g L<sup>-1</sup> mineral y 26,66 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; para el segundo cultivo se adicionó 50 g L<sup>-1</sup> mineral y 16,67 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y para un último cultivo se suministró 100 g L<sup>-1</sup> mineral, sin adición de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. En el caso de los cultivos con *A. thiooxidans* la adición progresiva de mineral (20, 50, 100) g L<sup>-1</sup> se realizó junto a la adición constante de azufre elemental a una concentración de 10 g L<sup>-1</sup>. Cada tres días se tomaron muestras para monitorear la biooxidación mediante mediciones de pH, Eh, hierro total, hierro ferroso y sulfato disueltos.

**3.2.3 Influencia de la combinación de bacterias y del pH inicial en la biooxidación.** El efecto de la combinación entre las diferentes especies bacterianas y la comprensión del rol que desarrolla cada una de éstas en la biooxidación del mineral fue estudiado con los experimentos indicados en la Tabla 6. Los ensayos de biooxidación se realizaron en erlenmeyer de 500 mL con 200 mL como volumen de operación, usando dos pH iniciales para cada combinación (1,6 y 2,0). Los cultivos fueron monitoreados durante 21 días, tomando muestras cada 3 días para hacer mediciones de pH, Eh, hierro total, hierro ferroso y sulfato disueltos. Adicionalmente las muestras biooxidadas después de 21 días de proceso fueron sometidas a análisis de DRX (sección 3.1.2.1), así mismo análisis FTIR se realizaron al mineral biooxidado.

**Tabla 6 Diseño de experimentos de combinación de bacterias**

<b>Especie de bacteria</b>			
<b>Código</b>	<b><i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 14882 (F)</b>	<b><i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM 504 (T)</b>	<b><i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSMZ 2705 (L)</b>
F	X		
T		X	
L			X
FT	X	X	
FL	X		X
TL		X	X
FTL	X	X	X

Se realizó un análisis comparativo de los perfiles de Eh, pH, densidad celular, concentración de hierro total, concentración de hierro ferroso y concentración de sulfato. Se estimaron los valores de velocidad específica de crecimiento máxima (ecuación 4) y se realizó un análisis estadístico ANOVA usando el software Statgraphics Centurion (trial versión). Las variables de respuesta usadas fueron el porcentaje de disolución de hierro, la cantidad de sulfato formado y las

productividades volumétricas de hierro férrico ( $Fe^{+3}$ ) y de sulfato (ecuaciones 5, 6 y 7). El mejor comportamiento combinado (valores altos para las diferentes variables de respuestas) se usó como criterio de selección de la condición más favorable para la biooxidación del mineral.

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{\ln(x/x_0)}{t} \quad (4)$$

$$\%Fe = \frac{([Fe]_{t_i} - [Fe]_{t_0}) * Volumen}{[Fe]_{mineral} * m_{mineral}} * 100\% \quad (5)$$

$$Q_v = \frac{([Fe^{+3}]_{t_j} - [Fe^{+3}]_{t_i})}{(t_j - t_i)} \quad (6)$$

$$Q_v = \frac{([SO_4^{-2}]_{t_j} - [SO_4^{-2}]_{t_i})}{(t_j - t_i)} \quad (7)$$

$\mu_{m\acute{a}x}$  corresponde a la velocidad específica de crecimiento máxima en la fase exponencial de crecimiento, donde  $x_0$  y  $x$  son las densidades celulares inicial y a un tiempo  $t$  dado, respectivamente, en (células  $mL^{-1}$ ).  $[Fe]_{t_i}$  y  $[Fe]_{t_j}$  corresponden a la concentración de hierro ( $g L^{-1}$ ) en tiempos sucesivos de medición  $t_i$  y  $t_j$ ;  $[Fe]_{mineral}$  es la concentración de hierro en el mineral y  $m_{mineral}$  es la cantidad de mineral agregada al test específico.  $[Fe]_{t_0}$  es la concentración inicial de hierro; a su vez  $[SO_4^{-2}]_{t_i}$  y  $[SO_4^{-2}]_{t_j}$ ;  $[Fe^{+3}]_{t_i}$  y  $[Fe^{+3}]_{t_j}$  son las concentraciones de sulfato y hierro férrico ( $g L^{-1}$ ) en tiempos sucesivos de medición  $t_i$  and  $t_j$ .

**3.2.4 Influencia del tamaño de partícula y la concentración de mineral en la biooxidación.** En esta etapa se usó el consorcio con el mejor comportamiento biooxidativo en la etapa anterior. Se aplicó un diseño factorial con dos niveles en la concentración de mineral y dos niveles en el tamaño de partícula como se describe en la Tabla 7. Se hicieron cultivos durante 15 días en erlenmeyer de 500 mL y 200 mL de volumen de trabajo,  $10 g L^{-1}$  de azufre elemental ya que el

consorcio tenía presencia de *A. thiooxidans* y pH inicial de 1,8. Las muestras se tomaron cada 3 días para mediciones de pH, Eh, hierro total, hierro ferroso y sulfato.

**Tabla 7. Diseño de experimentos factorial para la concentración de mineral y el tamaño de partícula**

Experimento	Concentración de mineral (g L <sup>-1</sup> )	Tamaño de partícula (µm)
1	100	d <sub>80</sub> < 74
2	100	d <sub>80</sub> < 74
3	150	d <sub>80</sub> < 74
4	150	d <sub>80</sub> < 74

### 3.3 BIOOXIDACIÓN EN BIOREACTOR DE 5 L

Se realizó un experimento de biooxidación a una mayor escala con el consorcio seleccionado en la etapa anterior, en un bioreactor de acrílico de 8 L con 5 L como volumen de trabajo, un flujo continuo de aireación 0,5 L min<sup>-1</sup>, a 30 °C, 660 rpm, 10% v v<sup>-1</sup> inóculo, 150 g L<sup>-1</sup> de mineral, d<sub>80</sub> < 74 µm, y pH inicial de 1,6 durante 12 días. Periódicamente se hicieron mediciones de Eh, pH, densidad celular, concentración de hierro total, hierro ferroso y sulfato tanto al ensayo inoculado como a un control abiótico con las mismas condiciones de cultivo. El mineral biooxidado se lavó, secó y dispuso para su uso en la etapa posterior de comparación de la disolución de oro con los pretratamientos de biooxidación y oxidación química antes de la cianuración (sección 3.4).

Las mediciones de pH y Eh se hicieron usando un multímetro pH/ORP HQ 40d (Hach, Alemania) con electrólito de KCl y electrodo de referencia Ag<sup>0</sup>/AgCl para el Eh. La densidad celular se determinó mediante conteo directo sobre cámara de Neubauer usando un microscopio óptico CX31 (Olimpus, Japón). La concentración de sulfato fue determinada mediante método turbidimétrico siguiendo los procedimientos del estándar 4500-SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> E [72]. Las especies de

hierro se cuantificaron usando el método estándar 3500-Fe de la 1.10-fenantrolina [72]. Tanto el análisis turbidimétrico como el colorimétrico se desarrollaron usando un espectrofotómetro GENESYS UV 10 (Thermo Scientific, Estados Unidos).

### 3.4 COMPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE ORO CON LOS PRETRATAMIENTOS DE BIOOXIDACIÓN Y OXIDACIÓN QUÍMICA ANTES DE LA CIANURACIÓN

**3.4.1 Experimentos de oxidación química.** En procura de realizar una prueba comparativa a la biooxidación, se desarrollaron experimentos de oxidación química del mineral con peróxido de hidrógeno utilizando erlenmeyer con agitación magnética y condiciones ambientales de temperatura y presión. Se desarrollaron ensayos preliminares (Tabla 8) que permitieron definir los factores a evaluar en la oxidación química con un diseño factorial ( $2^4$ ) especificado en la Tabla 9.

**Tabla 8. Pruebas preliminares de oxidación química con peróxido de hidrógeno**

Prueba	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]	Agitación	pH	%pulpa
1	2 M	No	4	20%
2	2 M	Si	4	20%
3	2 M	No	2	20%
4	3 M	No	4	20%

**Tabla 9. Diseño de experimentos de oxidación química con peróxido de hidrógeno**

Prueba	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] M	Agitación	[Fe <sup>+3</sup> ] M	% m v <sup>-1</sup>
1	1	No	0	20
2	2	No	0	20
3	1	Si	0	20
4	2	Si	0	20
5	1	No	0,01	20
6	2	No	0,01	20
7	1	Si	0,01	20
8	2	Si	0,01	20
9	1	No	0	33
10	2	No	0	33
11	1	Si	0	33
12	2	Si	0	33
13	1	No	0,01	33
14	2	No	0,01	33
15	1	Si	0,01	33
16	2	Si	0,01	33

Como variable de respuesta se seleccionó el porcentaje de hierro disuelto (ecuación 4), calculado a partir de las concentraciones de hierro determinadas mediante aplicación de espectroscopia de absorción atómica en flama, usando un equipo modelo 210 VGP (Buck Scientific, Estados Unidos). A partir de los resultados se seleccionó la prueba con mayor porcentaje de disolución de hierro con la cual se desarrolló un experimento a mayor escala guardando el mineral oxidado para la prueba de cianuración.

**3.4.2 Cianuración del mineral biooxidado y oxidado químicamente.** El mineral biooxidado en el biorreactor, el mineral del control abiótico y el mineral oxidado químicamente fueron sometidos a una cianuración en botella (sección 3.1.1.4) para evaluar el efecto de cada uno de los pretratamientos en la disolución de oro.

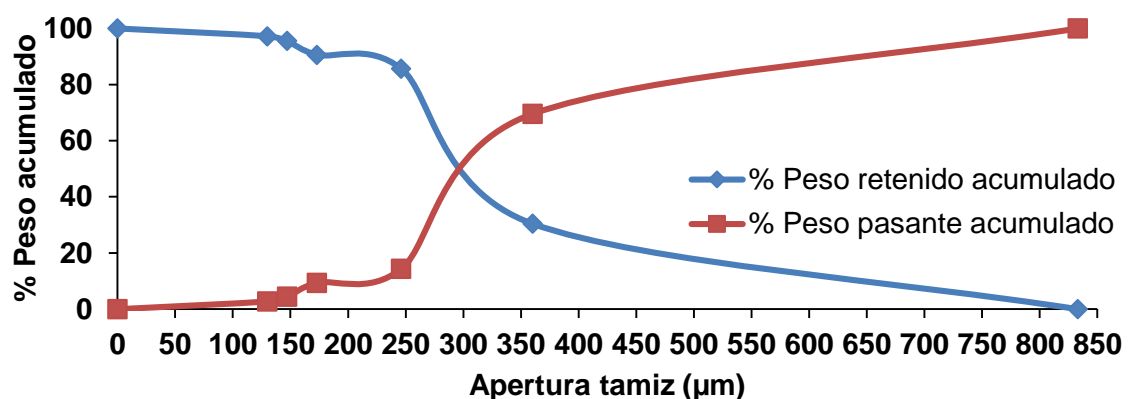
## 4 RESULTADOS

### 4.1 SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MINERAL DE ESTUDIO

**4.1.1 Selección del mineral.** Con esta etapa se buscó escoger el mineral con las características más adecuadas para la aplicación de un tratamiento de biooxidación, es decir, un mineral auroargentífero con refractariedad física asociada a la presencia de minerales sulfurados. Se seleccionaron dos muestras minerales pertenecientes a cada uno de los municipios que hacen parte del distrito minero de Vetas-California. El mineral de Vetas (mineral 1) correspondió a la corriente de concentrados de mesa Wilfley, mientras que el mineral de California (mineral 2) fue tomado directamente del socavón de una mina inactiva.

**4.1.1.1 Ajuste del tamaño de partícula.** El mineral 1 presentó un tamaño de partícula inicial ( $d_{50} \approx 300 \mu\text{m}$ ) como se muestra en la distribución granulométrica obtenida (Figura 7), por tanto fue necesaria una etapa de molienda adicional para generar las condiciones requeridas para la subsecuente cianuración en botella. El tamaño de partícula del mineral 2 se ajustó a  $d_{80} < 74 \mu\text{m}$  a partir del circuito de trituración y molienda descrito en la sección 3.1.1 (Ajuste del tamaño de partícula).

Figura 7. Distribución granulométrica inicial para el mineral 1.



**4.1.1.2 Concentración del mineral 2.** Para el mineral 2 en adición a la molienda inicial fue necesaria una subsecuente concentración. La razón de enriquecimiento y porcentaje de recuperación (ecuaciones 2 y 3) fueron mayores utilizando el concentrador Knelson que con la mesa Wilfley (Tabla 10). Estas diferencias podrían asociarse a la presencia del oro en partículas de tamaños muy finos cuya precipitación es favorecida por la fuerza centrífuga del concentrador Knelson. Por lo tanto se decidió concentrar todo el mineral bajo las condiciones de operación del equipo Knelson descritas en la sección 3.1.1.2, alcanzando un aumento en el tonelaje de oro desde 1,5 g t<sup>-1</sup> hasta 5,7 g t<sup>-1</sup>.

**Tabla 10. Concentración del mineral 2**

Variable	Mesa Wilfley	Concentrador Knelson
Porcentaje de recuperación (%)	23,00	83,56
Razón de enriquecimiento	1,6	3,8

**4.1.1.3 Determinación del tenor de oro y plata.** Los tenores promedio de oro y plata para los concentrados de ambos minerales se presentan en la Tabla 11 y se puede evidenciar el bajo tonelaje del mineral 2 en relación al tonelaje del mineral 1.

**Tabla 11. Tonelajes de oro y plata para los minerales de estudio**

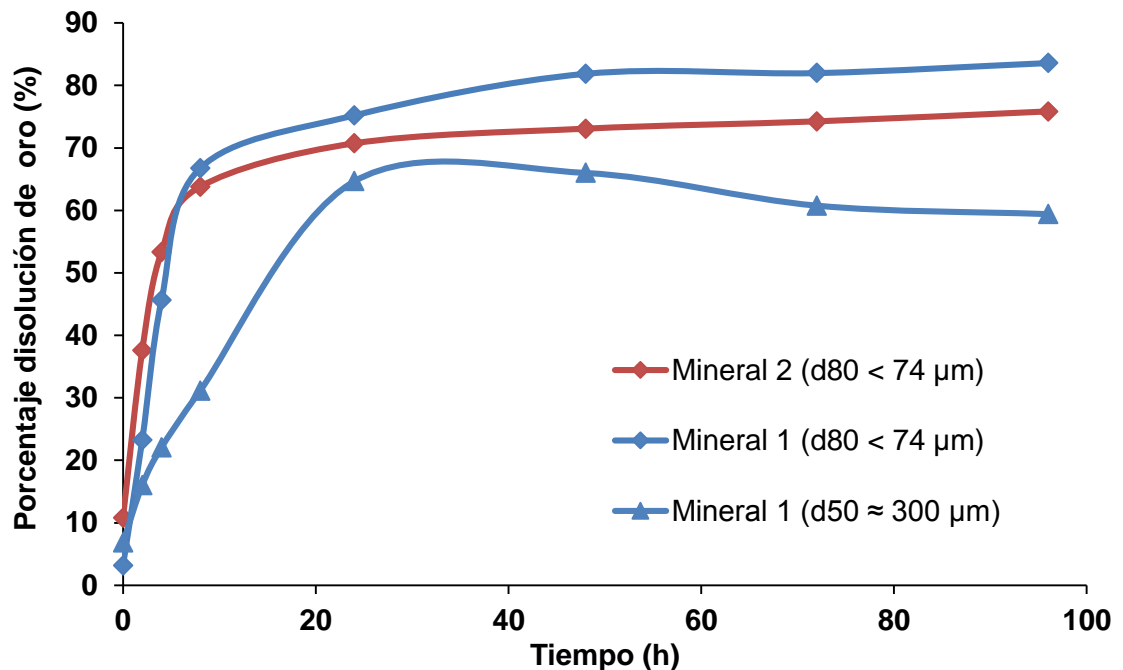
Mineral	Tonelaje oro (g t <sup>-1</sup> )	Tonelaje plata (g t <sup>-1</sup> )
Mineral 1	26,3 ± 0,8	73,8 ± 0,5
Mineral 2	5,7 ± 0,5	12,4 ± 1,1

Los resultados de la cianuración en botella, utilizando condiciones de operación que garantizarán la máxima disolución posible de oro, sin ningún tipo de pretratamiento en el mineral, se usaron como principal criterio de selección del

mineral de estudio. Se escogió el mineral a partir de la cual se podría generar un mayor margen de mejora en los porcentajes de disolución del oro al aplicar la biooxidación como pretratamiento a la cianuración [25]. Las cinéticas de la disolución de oro para ambos minerales se muestran en la Figura 8. La cianuración del mineral 1 con las condiciones de tamaño de partícula inicial ( $d_{50} \approx 300 \mu\text{m}$ ) generó un porcentaje de disolución de 66%, sin embargo esta condición de alta refractariedad no se mantuvo al disminuir el tamaño de partícula a  $d_{80} < 74 \mu\text{m}$  pues la disolución de oro aumentó hasta el 83% de extracción a las 96 h, evidenciando que el tratamiento de este mineral podría darse a partir de una molienda eficiente. Entre tanto la cianuración del mineral 2 permitió la disolución de aproximadamente el 75% del oro. Por consiguiente, para todos los ensayos subsecuentes se usará el mineral 2, el cual es de baja ley ( $5,74 \text{ g t}^{-1} \text{ Au}$  y  $12,40 \text{ g t}^{-1} \text{ Ag}$ ) y moderadamente refractario. El hecho de que el mineral de 2 sea de bajo grado (menor tonelaje de oro) es otro criterio para seleccionarlo como mineral de estudio, considerando el potencial que puede representar el uso de procesos oxidativos para convertir depósitos minerales de este tipo en una opción de explotación económicamente rentable.

Las diferencias en los porcentajes de disolución alcanzados para ambos minerales pueden obedecer al hecho de que dentro del complejo minero haya diferencias significativas en el tipo de mineralogía, ya que se ha reportado un mayor grado de sulfurización en los depósitos de California que en los depósitos existentes en Vetas, Santander [8,9].

Figura 8. Porcentaje de disolución de oro para ambos minerales.



**4.1.2 Caracterización del mineral seleccionado.** En adición a los análisis ya efectuados que permitieron determinar el contenido de oro y plata, y definir la refractariedad del mineral; se emplearon técnicas analíticas para identificar las fases minerales presentes, la composición elemental, y la asociación del oro y la plata a las fases mineralógicas identificadas.

**4.1.2.1 Caracterización química y mineralógica.** El análisis de fluorescencia de rayos X (FRX) permitió identificar la presencia de diferentes elementos (Tabla 12), siendo el silicio y el aluminio los que se encontraron presentes en una mayor cantidad. La presencia de elementos como el cromo, el plomo o el cobre podrían inhibir la actividad microbiana en un proceso biooxidativo [30], sin embargo la presencia de estos elementos a niveles de trazas, sugiere que es posible el desarrollo de un proceso satisfactorio a partir de una adaptación adecuada. Adicionalmente es importante resaltar la presencia de cantidades considerables de hierro y azufre algo que podría favorecer los procesos biooxidativos, teniendo en cuenta que el rol de las bacterias quimiolitotróficas se

basa en la oxidación y disolución de fases reducidas de hierro y azufre como fuente de energía [40,75].

**Tabla 12. Composición elemental del mineral (Análisis FRX)**

<b>Elemento</b>	<b>% p p<sup>-1</sup></b>
Si	29,19
Al	6,73
Fe*	5,77
S	4,58
K	2,51
Ti	0,73
Mg	0,38
P	0,12
Ba	0,07
Cu	0,05
Se	0,02
Cr	0,02
V**	0,02

\* Composición de Fe corresponde al promedio entre resultados de FRX y el resultado de máxima cantidad de hierro lixiviable de acuerdo a protocolo de medición [72]

\*\* Zn, Zr, Mn, Rb, As se detectaron en una composición menor que 0.02% p p<sup>-1</sup>

Análisis mineralógicos de DRX indicaron la presencia de cuarzo, pirita, alunita, rutilo y moscovita como las principales fases mineralógicas (Figura 9a). La pirita ha sido ampliamente reportada como un mineral refractario que puede generar el encapsulamiento de oro y la correspondiente disolución ineficiente al usar agentes lixiviantes como el cianuro [76,77, 78]. Se puede enunciar que la refractariedad en el mineral puede deberse principalmente a la pirita considerado que mediante el análisis DRX la pirita fue el único mineral sulfurado identificado y el hecho de que mediante análisis petrográficos usando secciones pulidas y

microscopia de luz plana polarizada (MOLPP) (Anexo B), se identificó una alta proporción de este mineral y pequeñas cantidades de sulfuros como la galena, calcopirita o esfalerita.

El espectro de FTIR permitió confirmar la presencia de algunos de los minerales detectados por medio del análisis DRX, así de acuerdo a [79], la pirita presenta bandas características asociadas a diferentes modos de vibración generados por la radiación el campo de infrarrojo en la estructura del sulfuro en los números de onda (422, 432, 462, 533, 606, 627, 667, 825, 1014, 1083, 1140, 1175, 1390, 1625)  $\text{cm}^{-1}$  lo que concuerda con algunas de las bandas detectadas en el análisis. Adicionalmente para el rutilo se detectaron las bandas 510  $\text{cm}^{-1}$  y 602  $\text{cm}^{-1}$ ; (3508, 3480, 1630 and 1080)  $\text{cm}^{-1}$  para alunita/jarosita. Bandas típicas del cuarzo también se detectaron (798, 778, 694)  $\text{cm}^{-1}$ , así mismo la moscovita se relaciona con las bandas 1028  $\text{cm}^{-1}$  y 3624  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento enlace OH–Al) [24, 43,8], (Figura 9b). Adicionalmente la Figura 10 presenta resultados SEM-EDS que confirman la presencia de pirita y alunita.

Figura 9. Caracterización mineralógica. (a) Difractograma DRX. (b) espectro FTIR. M: Moscovita; A: Alunita (jarosita); Q: cuarzo; P: Pirita; R: Rutilo; W: Agua; C: CO<sub>2</sub>.

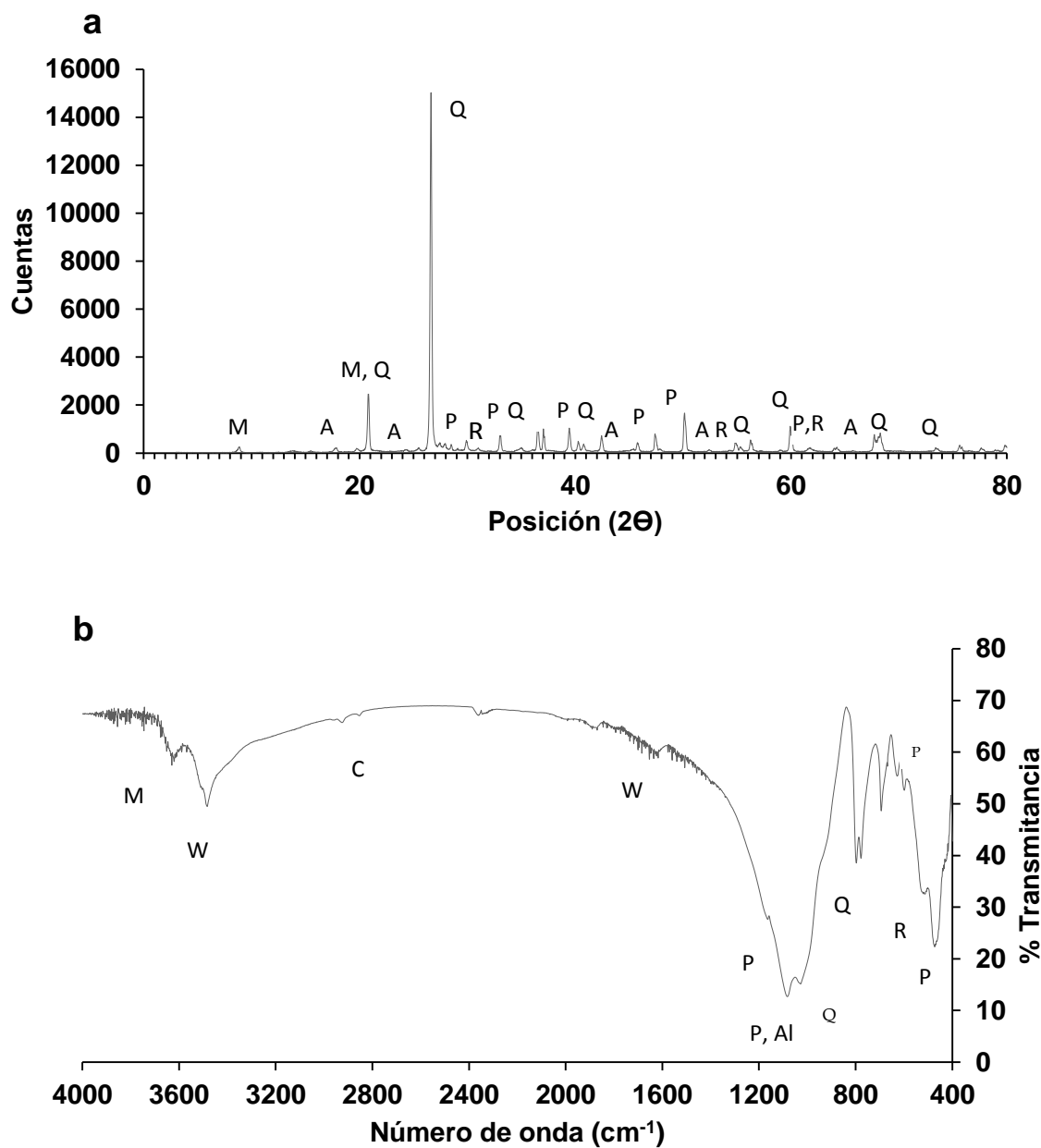
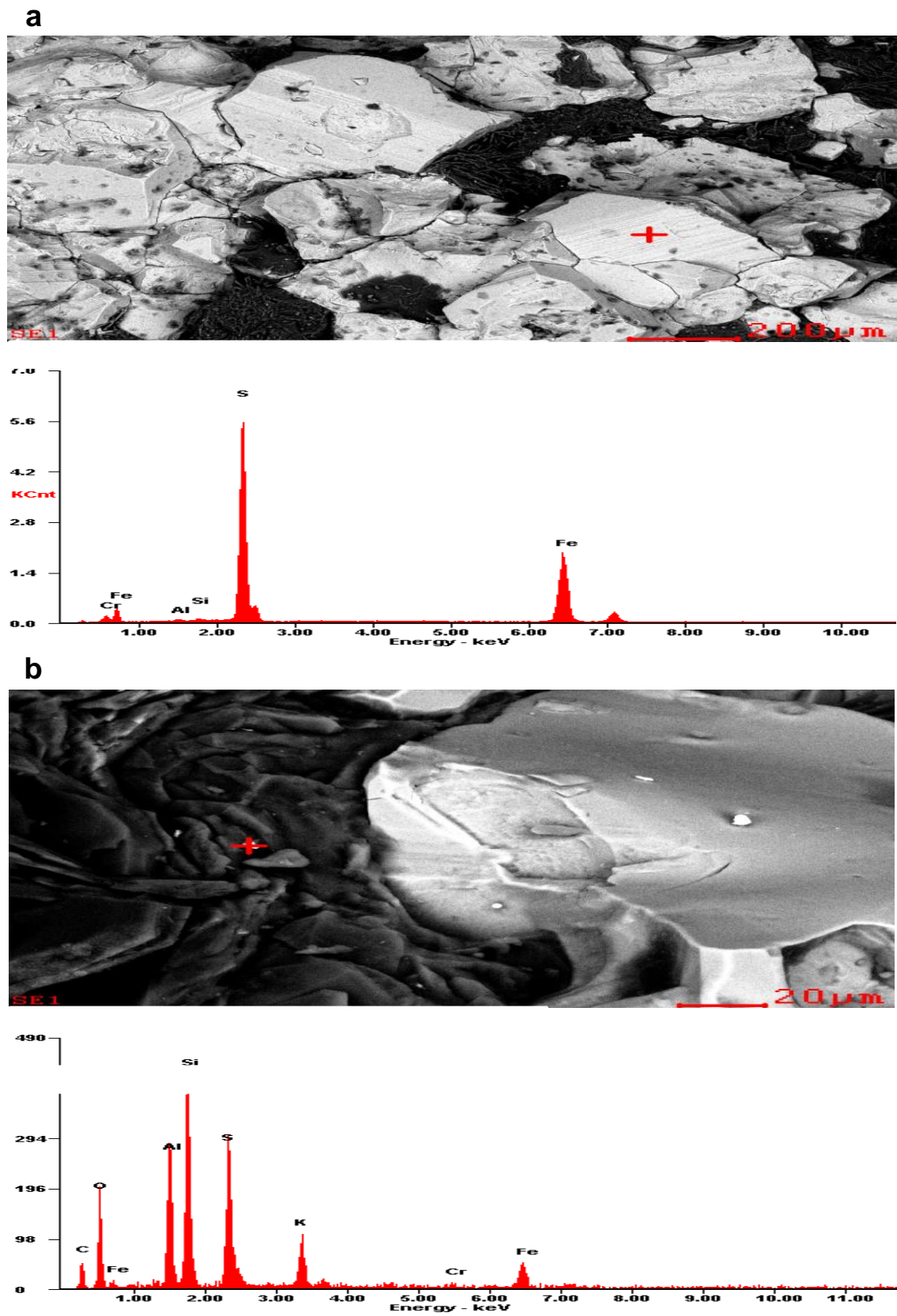
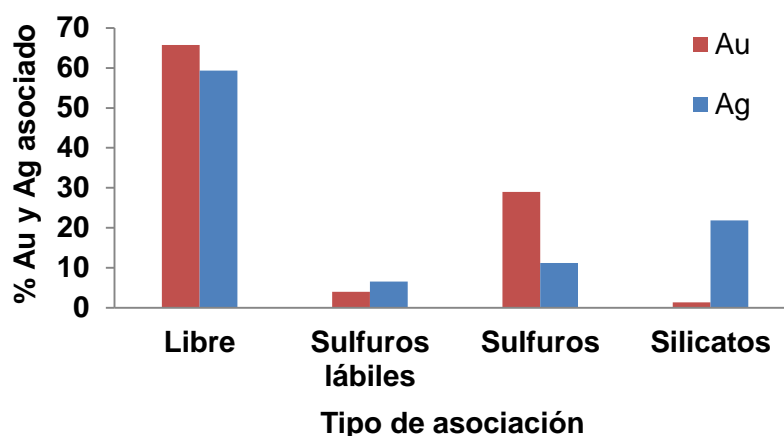


Figura 10. Análisis SEM-EDS para el mineral. (a) Micrografía grano de pirita. (b) Micrografía grano de alunita.



**4.1.2.2 Lixiviación diagnóstica.** La lixiviación diagnóstica utilizada se diseñó teniendo en cuenta que en el mineral no se detectaron minerales oxidados o arcillosos, por tanto se buscó estudiar las asociaciones del oro en las fases sulfuradas y en los silicatos considerando que estos fueron los minerales detectados. Los resultados se muestran en la Figura 11 y confirman que después del oro libre, un gran porcentaje se encuentra asociado a sulfuros y sulfuros lábiles, comprobando que la refractariedad debe estar asociada en una mayor medida a la pirita presente en el mineral.

**Figura 11. Asociaciones de oro y plata de acuerdo a la lixiviación diagnóstica.**

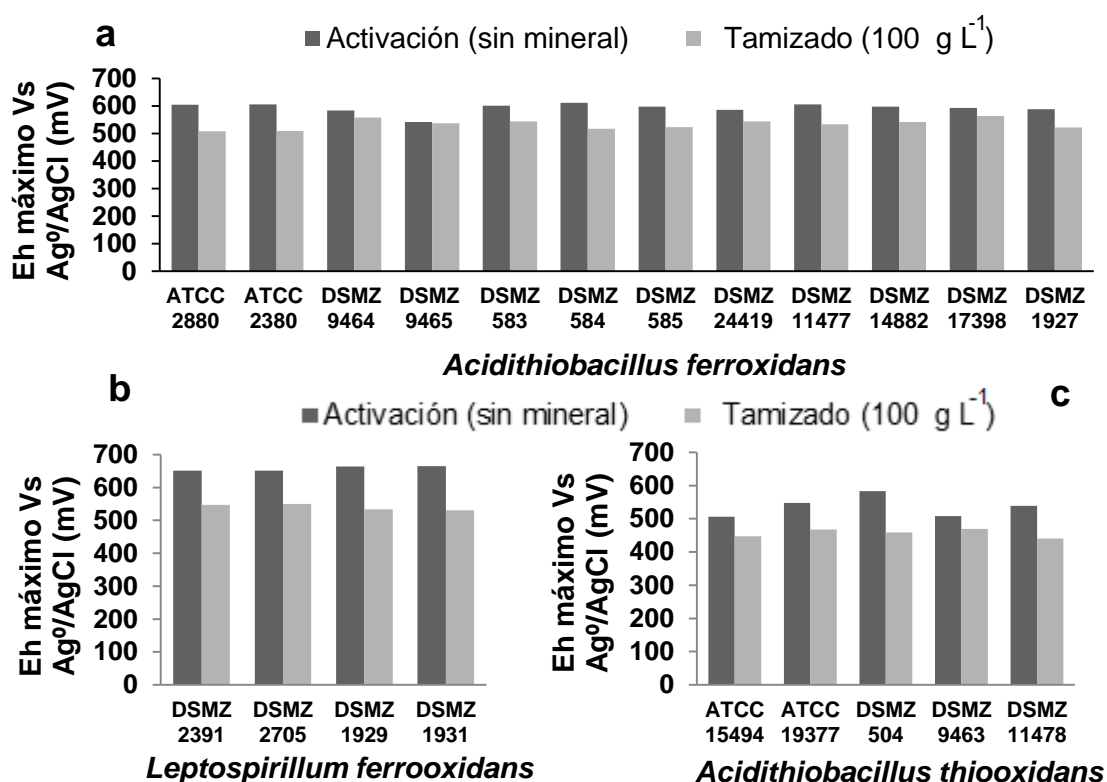


## 4.2 ENSAYOS DE BIOOXIDACIÓN

**4.2.1 Tamizado de las cepas de trabajo.** La selección de una cepa adecuada para un proceso biooxidativo en un nuevo mineral puede darse a partir de pruebas en las cepas sin previa adaptación con concentraciones altas de mineral como condición estresante para las células [80]. La adición del mineral generó un efecto inhibitorio en cada una de las 21 cepas estudiadas como se evidencia en los valores de Eh menores que se obtuvieron para cada una de las cepas en comparación a los ensayos de activación en los cuales no se había adicionado el mineral (Figura 12). Un valor de Eh alto indica la presencia de cantidades considerables de  $Fe^{+3}$  que es uno de los agentes oxidantes principales generados en el medio por las bacterias quimiolitotróficas [40, 75].

La presencia en el mineral de trabajo de pequeñas trazas de plomo, cobre, cromo, zinc, arsénico, entre otros pueden producir inhibición de los proceso metabólicos de las cepas acidófilas [81, 59], evidenciando la necesidad de la adaptación de las bacterias a las condiciones generadas por los diferentes elementos presentes en el mineral.

**Figura 12. Comparación valores de Eh y pH obtenidos para la activación y tamizado de las 21 cepas de referencia. (a) *A. ferrooxidans*. (b) *L. ferrooxidans*. (c) *A. thiooxidans*.**



Los perfiles completos para cada una de las bacterias estudiadas durante el tamizado se pueden observar en el Anexo C. Las observaciones principales de su comportamiento cinético se encuentran resumidas en la Tabla 13. Dentro del grupo de 12 cepas de referencia de *A. ferrooxidans*, la bacteria DSMZ 14882 fue seleccionada como la cepa de trabajo dada la capacidad mostrada de mantener altos valores de Eh durante largos intervalos de tiempo (12 a 15 días de cultivo).

Adicionalmente la bacteria DSMZ 14882 alcanzó altos valores de densidad celular a una tendencia de pH decreciente, indicando la biooxidación de la piritita presente en el mineral cuya disolución es una reacción productora de ácido [40, 75].

**Tabla 13. Resumen resultados del tamizado para las 21 cepas de referencia**

Cepa	Eh Vs Ag/AgCl		pH		Densidad celular
	Valor más alto (mV)	Periodos con tendencia creciente (días)	Valor más bajo	Periodos con tendencia decreciente (días)	Valor más alto *10 <sup>7</sup> (células mL <sup>-1</sup> )
<i>A. ferrooxidans</i>					
ATCC 2880	508	[0-3];[ 9-15]	1,35	[0-15]	9
ATCC 2380	508,9	[0-6]	1,39	[0-6]; [9-15]	10
DSMZ 9464	557,6	[0-15]	1,58	[0-15]	7
DSMZ 9465	536,9	[0-12]	1,51	[0-6]; [9-15]	11
DSMZ 583	544,2	[0-3];[6-12]	1,51	[0-6];[9-15]	14
DSMZ 584	516,6	[0-3];[6-12]	1,34	[0-15]	6
DSMZ 585	523	[0-3];[9-12]	1,43	[0-15]	10
DSMZ 24419	543,7	[0-15]	1,59	[0-6];[9-15]	10
DSMZ 11477	533,1	[0-3];[6-12]	1,53	[0-15]	26
DSMZ 14882	541,5	[0-15]	1,52	[0-15]	17
DSMZ 17398	563,8	[0-3];[6-12]	1,59	[0-15]	10
DSMZ 1927	522	[0-15]	1,49	[0-6];[9-15]	11,5
<i>L. ferrooxidans</i>					
DSMZ 2391	546,8	[0-9];[12-15]	1,53	[0-15]	20
DSMZ 2705	549,8	[0-15]	1,50	[0-15]	23
DSMZ 1929	533	[0-9]	1,58	[0-15]	14
DSMZ 1931	530,8	[0-3]; [12-15]	1,45	[0-15]	9

Tabla 13. (Continuación)

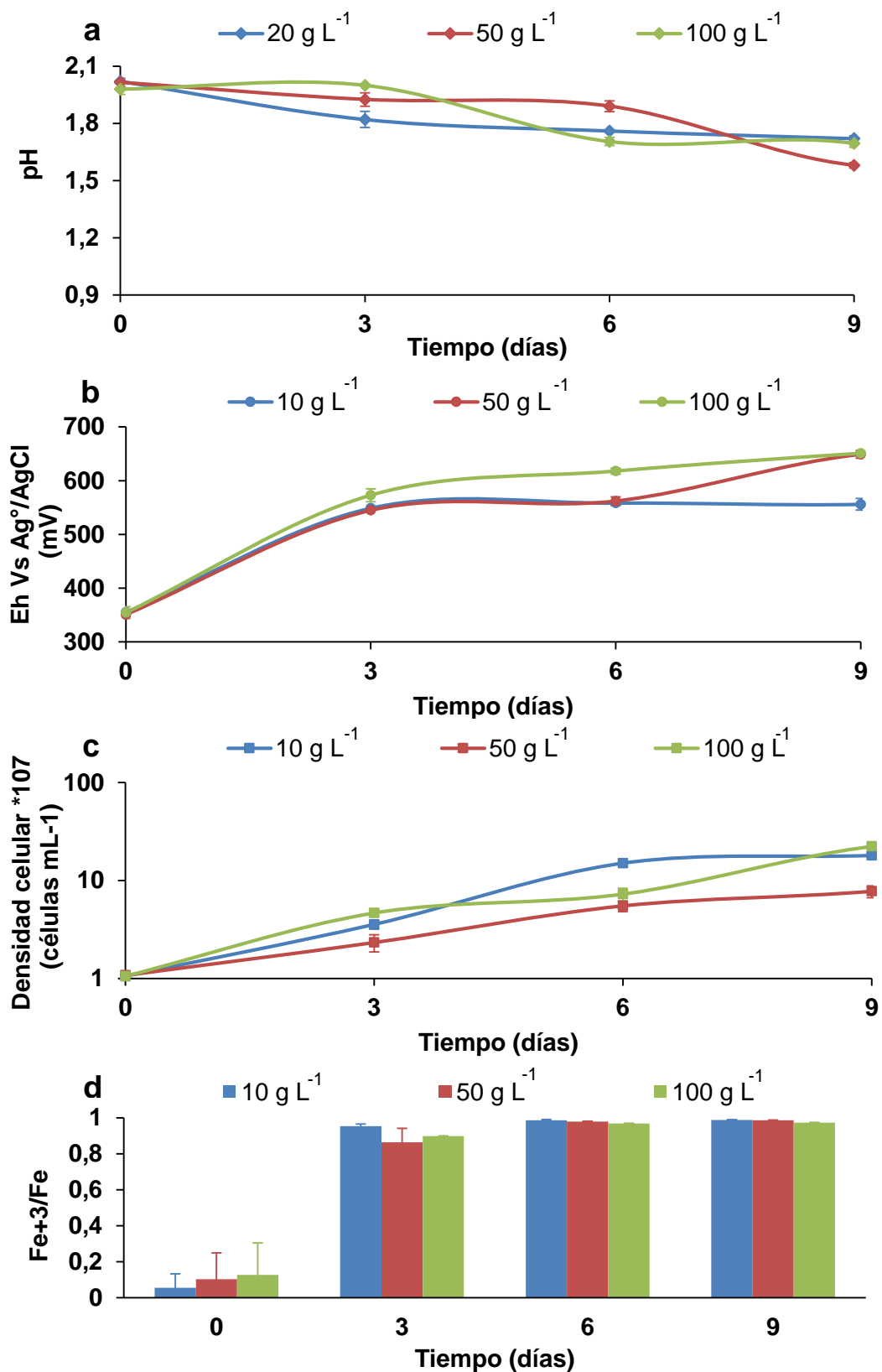
<i>A. thiooxidans</i>					
ATCC 15494	447	[0-15]	1,18	[3-15]	0,85
ATCC 19377	467,5	[0-15]	1,22	[3-15]	2,0
DSMZ 504	458,5	[0-15]	1,20	[0-15]	1,5
DSMZ 9463	469,1	[0-15]	1,22	[0-15]	1,2
DSMZ 11478	440,2	[0-15]	1,20	[0-15]	3,2

Las filas sombreadas corresponden a las tres cepas de referencia seleccionadas (DSMZ 14882, DSMZ 2705 y DSMZ 504) a partir del tamizado bacteriano

**4.2.2 Adaptación.** La adaptación se desarrolló con el propósito principal de generar en las bacterias tolerancia al mineral. *A. ferrooxidans* DSMZ 14882 mostró una buena respuesta a la adaptación. La adición de mineral permitió aumentar la acidez del medio de cultivo (Figura 13a), lo cual en principio pudo estar asociado con el desarrollo del proceso biooxidativo de la pirita, cuya disolución es una reacción productora de ácido [40, 75]. Así mismo, al comparar los valores de Eh máximo obtenidos con el aumento progresivo de la concentración de mineral en el medio, en relación al ensayo de tamizado 667,3 mV para el último cultivo de adaptación (Figura 13a) y 541,5 mV para el tamizado (Tabla 13) se puede observar el efecto positivo de la adaptación en la actividad biooxidativa.

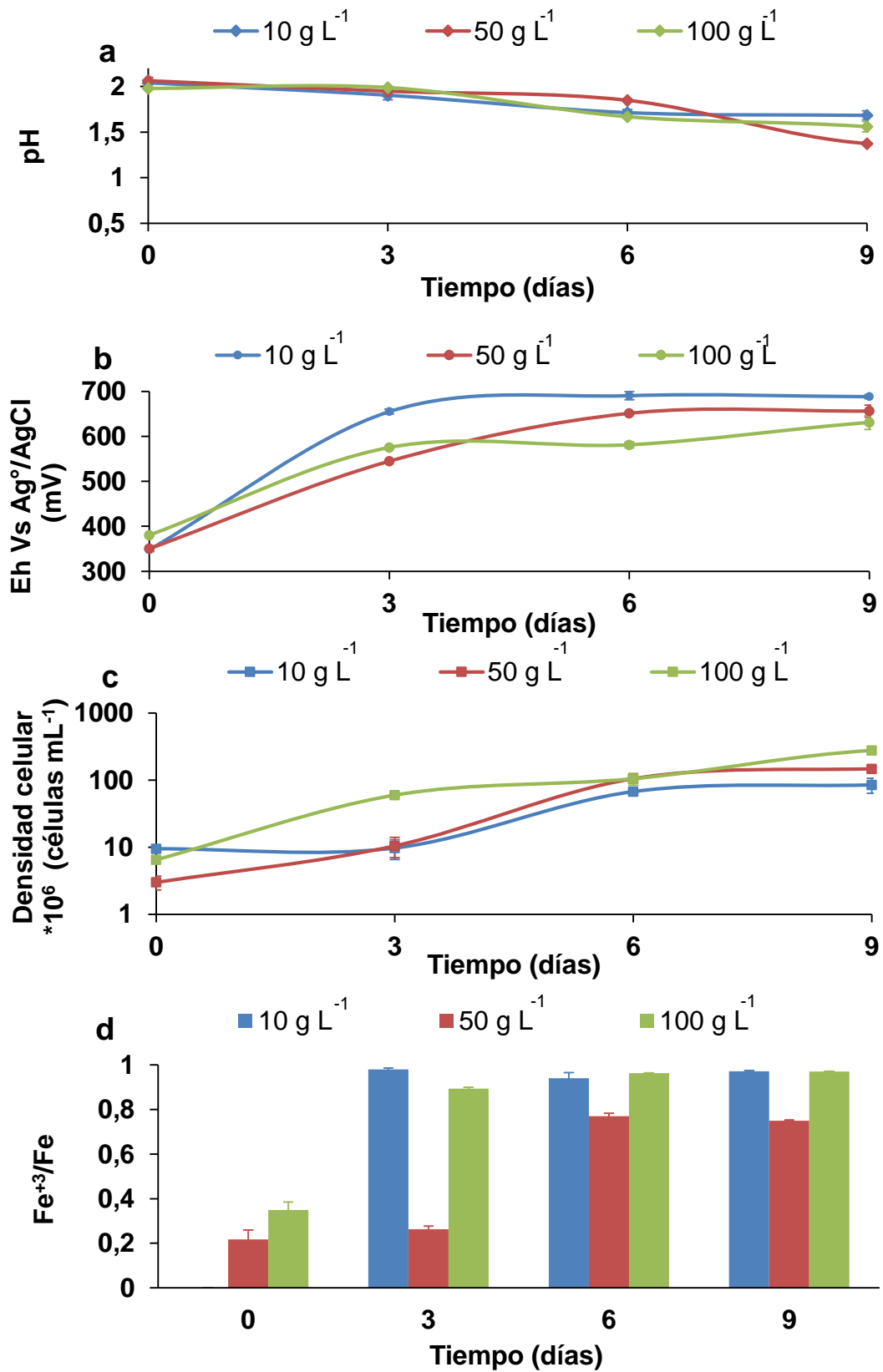
Con concentraciones mayores de mineral se obtuvieron los valores más altos de Eh (Figura 13b), siendo notorio el efecto positivo de la adaptación al alcanzar en el medio de cultivo valores máximos cercanos a los 700 mV, densidades celulares superiores a las alcanzadas en el tamizado  $31,5 \cdot 10^7$  células mL<sup>-1</sup> en el caso del último cultivo de adaptación (Figura 13c) y  $17 \cdot 10^7$  células mL<sup>-1</sup> para el tamizado (Tabla 13) y radios Fe<sup>+3</sup>/Fe cercanos a la unidad durante gran parte del tiempo (Figura 13d). Valores de Fe<sup>+3</sup>/Fe próximos a la unidad corresponden a condiciones oxidantes favorables en el medio de cultivo, indicando que del hierro total disuelto, conformado por la suma de Fe<sup>+3</sup> y Fe<sup>+2</sup>, la mayor proporción corresponde al agente oxidante generado por el metabolismo bacteriano (Fe<sup>+3</sup>).

Figura 13. Perfiles de adaptación para *A. ferrooxidans* DSMZ 14882. (a) pH. (b) Eh. (c) densidad celular. (d) Radio Fe<sup>+3</sup>/Fe.



En el caso de *L. ferrooxidans* DSMZ 2705, la adaptación mejoró sustancialmente el comportamiento biooxidativo respecto a los resultados obtenidos con el tamizado bacteriano, considerando que: condiciones más ácidas se generaron en el medio de cultivo; pH igual a 1,50 en el caso del tamizado bacteriano (Tabla 12) y pH igual a 1,29 para el último cultivo de adaptación (Figura 14a); los valores de Eh máximo aumentaron desde 555 mV, correspondiente al tamizado, hasta 660 mV alcanzados con el último cultivo de adaptación (Figura 14b), a la vez que los valores máximos de densidad celular se mantuvieron estables en un valor de  $23 \cdot 10^7$  células mL<sup>-1</sup> para ambos casos (Tabla 13 y Figura 14c) y los radios Fe<sup>+3</sup>/Fe, desde el día 6 estuvieron cerca a la unidad (Figura 14d).

Figura 14. Perfiles de adaptación para *L. ferrooxidans* DSMZ 2705. (a) pH. (b) Eh. (c) densidad celular. (d) Radio Fe<sup>+3</sup>/Fe.

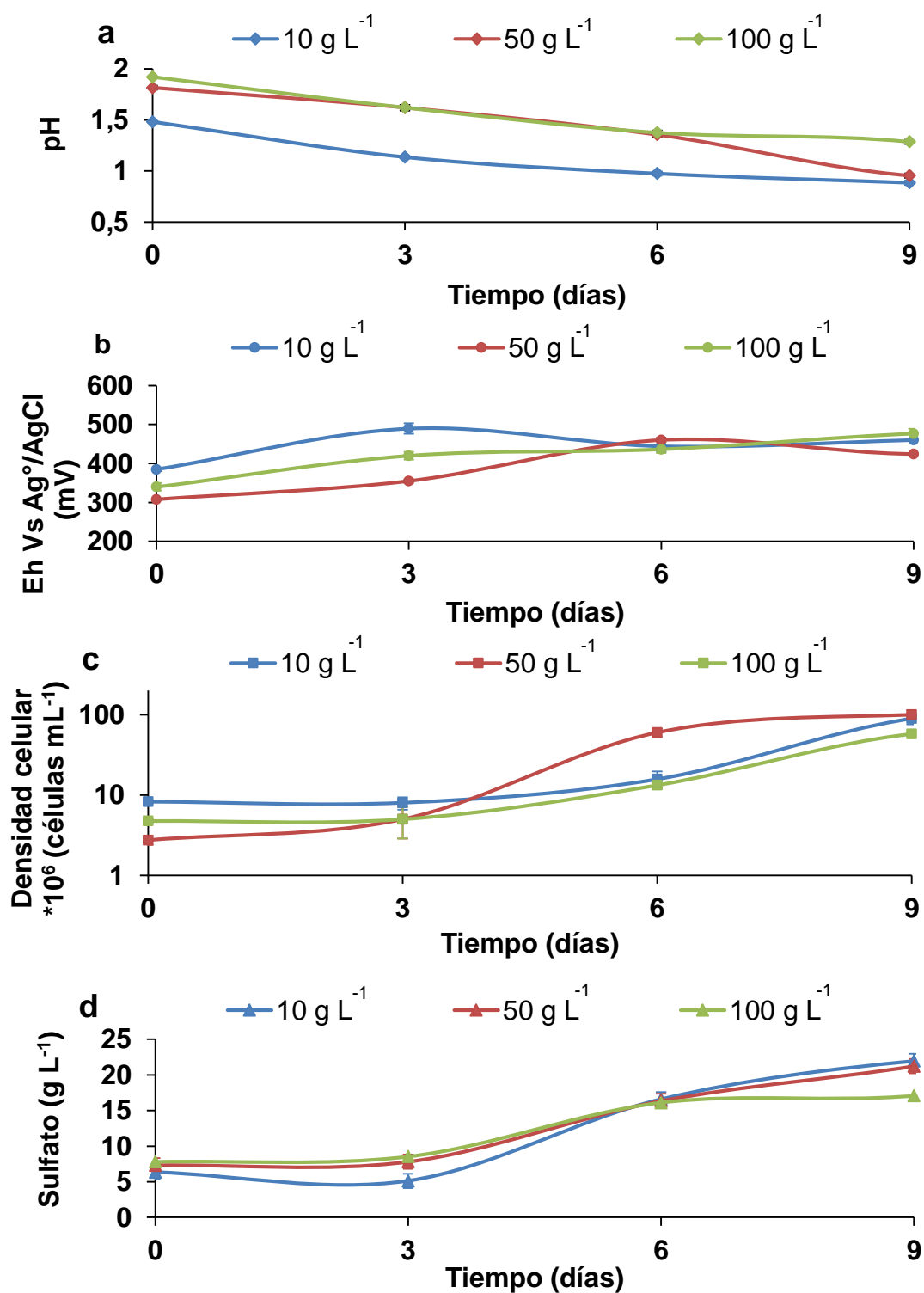


Por último, la comparación entre los valores del ensayo final de adaptación y el tamizado bacteriano permitió identificar que la cepa *A. thiooxidans* aumentó su capacidad oxidativa al generar valores de pH final más bajos (1,20 para el tamizado bacteriano (Tabla 13) y 0,89 para el cultivo final de adaptación (Figura 15a), Eh levemente superiores (458,5 mV para el tamizado bacteriano y 491,3 mV para el cultivo final de adaptación (Figura 15b) y densidades celulares mayores ( $1,5 \cdot 10^7$  células mL<sup>-1</sup> para el tamizado bacteriano y  $6,8 \cdot 10^7$  células mL<sup>-1</sup> para el cultivo final de adaptación (Figura 15c)).

El avance de la adaptación de la cepa *A. thiooxidans* DSMZ 504 debe analizarse con base en la capacidad de esta cepa para generar sulfato y altos niveles de acidez en el medio como bacteria oxidante del azufre elemental y de fases sulfurada que puedan hacer parte del mineral [80]. Al observar la Figura 15a se puede distinguir una disminución de los valores de pH a una velocidad mucho mayor que la de las dos cepas anteriores con valores inclusive inferiores 1,0, lo cual también se expresó en concentraciones altas de sulfato en solución en los tres cultivos de adaptación (Figura 15d). Las tendencias mostradas están fuertemente asociadas con la curva de crecimiento con relaciones proporcionales entre las densidades celulares detectadas y la concentración de sulfato e hidrogeniones en el medio, indicando el desarrollo de la actividad microbiana.

Considerando los resultados de las tres cepas es posible afirmar que la metodología de adaptación permitió la mejora en la actividad biooxidativa de cada una de las bacterias de referencia, representada en los altos valores de Eh alcanzados, los ratios Fe<sup>+3</sup>/Fe cercanos a 1, la presencia de sulfato en solución, la disminución del pH y el aumento de la densidad celular.

Figura 15. Perfiles de adaptación para *A. thiooxidans* DSMZ 504. (a) pH. (b) Eh. (c) densidad celular. (d) sulfato.



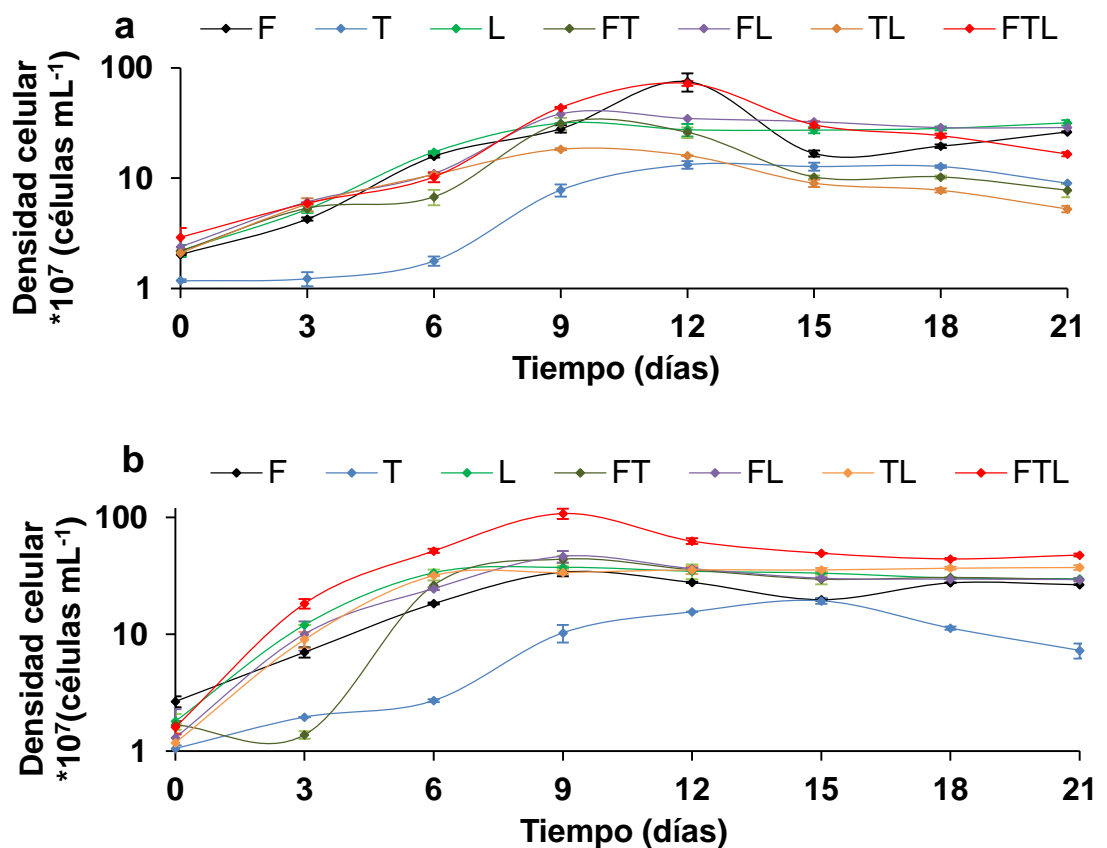
**4.2.3 Influencia de la combinación de especies bacterianas y pH inicial en la biooxidación.** *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* son tres de las bacterias más reportadas en estudios relacionados con la biooxidación [82]. En consorcio cada una de las cepas tiene la capacidad de desarrollar un rol y complementar el proceso bioquímico. No obstante, también se han reportado múltiples ejemplos donde se proponen diferentes arreglos a partir de las tres bacterias, usándolas como cepas individuales o en combinaciones entre dos de ellas (Tabla 3).

No hay plena certeza de que el consorcio conformado por las tres bacterias sea la combinación con mejor comportamiento para una nueva matriz mineral y es necesario probar diferentes combinaciones de las cepas disponibles buscando encontrar la mejor interacción sistema biológico-nuevo mineral [83]. Por lo tanto, se evaluaron todas las combinaciones posibles de las cepas *A. ferrooxidans* DSMZ 14882 (F), *L. ferrooxidans* DMZ 2705 (L) y *A. thiooxidans* DSMZ 504 (T) seleccionadas y adaptadas previamente al mineral de estudio como fuente de energía principal (sección 4.2.2). La respuesta biooxidativa se comparó para las combinaciones de bacterias (Tabla 6) a dos pH iniciales (1,6 y 2,0), teniendo en cuenta que este es un parámetro de operación que puede influir en el desarrollo o inhibición de alguna cepa específica dentro de los ensayos evaluados. Los niveles de pH se seleccionaron teniendo en cuenta el rango estrecho de funcionamiento óptimo para los procesos bioquímicos de las tres bacterias; en el cual por una parte valores cercanos a 0,8 generan una inhibición ácida [84], y por otra parte pH superiores a 2,0 pueden generar la oclusión del mineral por la precipitación de fases como la jarosita [85].

**4.2.3.1 Densidad celular.** La etapa de adaptación permitió que la mayor parte de combinaciones de bacterias no presentara fases de latencia durante el crecimiento (Figura 16). En la Tabla 14 se presentan los valores de  $\mu_{\text{máx}}$  y densidad celular máxima alcanzada para cada combinación bacteriana. Los valores de  $\mu_{\text{máx}}$  fueron similares en todos los casos, siendo las combinaciones FT a pH inicial 1,6 y L, TL y FTL a pH inicial 2,0 las condiciones con los valores superiores, mayores a  $0,02 \text{ h}^{-1}$  en todos los casos. Sin embargo las mayores

densidades celulares se alcanzaron únicamente con la condición FTL a pH inicial 2,0 ( $107 \pm 11$ ) $\cdot 10^7$  (células mL<sup>-1</sup>), lo que indica que valores de viabilidad celular superiores sólo se alcanzan cuando además de tener una  $\mu_{\text{máx}}$  alta, la fases exponenciales se extendieron durante un mayor tiempo. Por ejemplo, T a pH inicial 1,6 a pesar de tener la fase exponencial más larga (15 días) no presentó valores de densidad celular remarcables por tener valores bajos de  $\mu_{\text{máx}}$ , mientras que TL a pH inicial 2,0 a pesar de tener el valor más alto de  $\mu_{\text{máx}}$  presentó densidades celulares bajas por desarrollar la fase exponencial durante 6 días solamente.

**Figura 16. Perfiles de densidad celular para cada una de las combinaciones de bacterias. (a) pH inicial 1,6. (b) pH inicial 2,0.**



**Tabla 14. Velocidades específicas de crecimiento y densidades celulares máximas**

Combinación de bacterias	pH inicial 1,6		pH inicial 2,0	
	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Densidad celular máxima (células mL <sup>-1</sup> )*10 <sup>7</sup>	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Densidad celular máxima (células mL <sup>-1</sup> )*10 <sup>7</sup>
F	0,013 ± 0,001	75 ± 14	0,012 ± 0,001	34 ± 3
T	0,014 ± 0,001	13 ± 1	0,012 ± 0,001	19 ± 1
L	0,012 ± 0,001	31 ± 2	0,020 ± 0,002	37 ± 1
FT	0,021 ± 0,001	31 ± 4	0,015 ± 0,002	44 ± 3
FL	0,013 ± 0,001	38 ± 3	0,017 ± 0,003	46 ± 5
TL	0,010 ± 0,001	18 ± 1	0,023 ± 0,001	37 ± 2
FTL	0,011 ± 0,001	72 ± 14	0,020 ± 0,001	108 ± 11

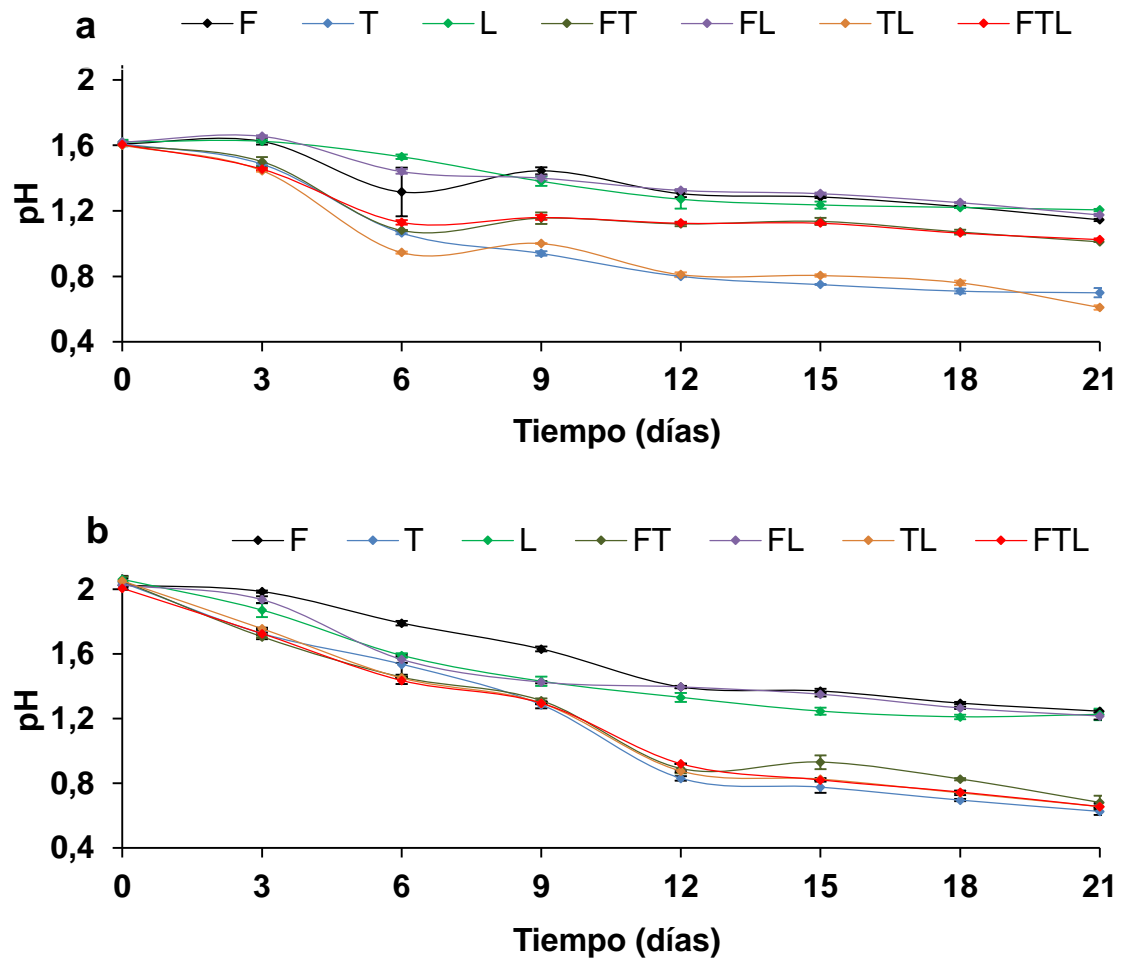
Comparativamente la menor densidad celular se obtuvo con la bacteria T a ambas condiciones de pH inicial, mientras que las máximas densidades celulares correspondieron al consorcio FTL indicando una sinergia favorable entre las tres cepas. En la Tabla 15 se presentan los valores-P del análisis ANOVA correspondiente a la influencia del pH inicial en la densidad celular de cada combinación bacteriana. Los valores-P menores que 0,05 corresponden a efectos estadísticamente significativos en un intervalo de confianza del 95%, por tanto, el pH inicial tuvo un efecto positivo estadísticamente significativo para las condiciones L, FT, TL, FTL.

**Tabla 15. Valores-P para el efecto del pH inicial sobre la densidad celular**

Combinación	Valores-P	Efecto
F	0,554	
T	0,3356	
L	0,0059	positivo
FT	0,0001	positivo
FL	0,2054	
TL	< 0,0001	Positivo
FTL	0,0023	positivo

**4.2.3.2 pH.** Para todas las combinaciones bacterianas se observó una tendencia de pH decreciente (Figura 17), lo que es una prueba del avance del proceso bioquímico, teniendo en cuenta que los iones  $H^+$  son producto principal del mecanismo indirecto de la biooxidación [40]. La presencia de *A. thiooxidans* estuvo asociada con las mayores tasas de decremento de pH y los consecuentes valores finales más bajos. A pH inicial 2,0 la cepa T y todos los consorcios que la contenían disminuyeron el pH 1,4 unidades, mientras que a pH inicial 1,6 la disminución del pH para estas combinaciones fue entre 0,6 y 0,9 unidades. Los resultados obtenidos están en concordancia con lo reportado en la literatura ya que *A. thiooxidans* puede generar mayores niveles de acidez al tener la capacidad de producir ácido sulfúrico a partir de la oxidación de las fases sulfuradas del mineral como principal fuente de energía, mientras que las cepas de especie *ferrooxidans* (F y L) tienen como fuente principal de energía las fases minerales ferrosas presentes en el medio [80, 51].

Figura 17. Perfiles de pH para cada una de las combinaciones de bacterias. (a) pH inicial 1,6. (b) pH inicial 2,0.



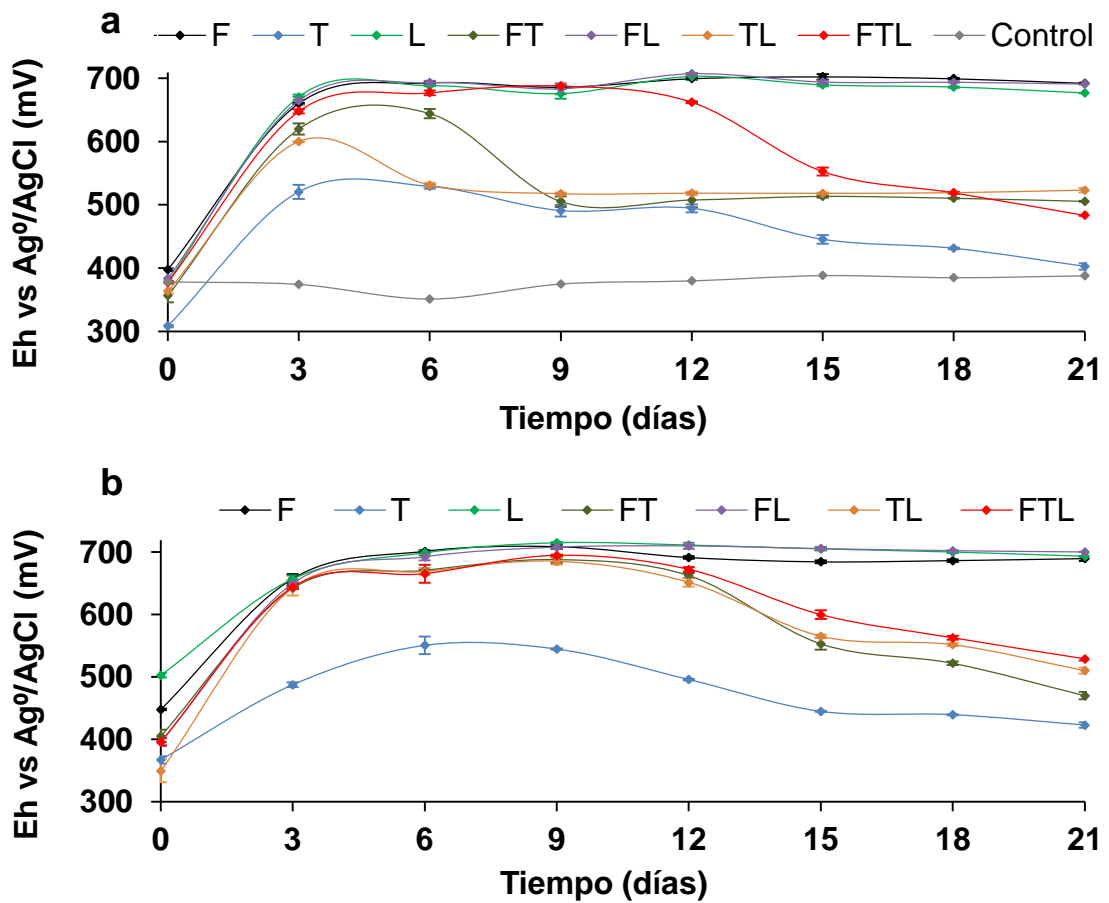
Los valores-P asociados al pH inicial sobre el pH como variable de respuesta se presentan en la Tabla 16. Es de esperar que un pH inicial menor genere los valores finales de pH más bajos en el medio, de hecho este comportamiento únicamente no se dio para la condición FTL.

**Tabla 16. Valores-P para el efecto del pH inicial sobre el pH**

<b>Combinación</b>	<b>pH inicial</b>	<b>Efecto</b>
F	< 0,0001	Positivo
T	< 0,0001	Positivo
L	< 0,0001	Positivo
FT	0,4781	Positivo
FL	< 0,0001	Positivo
TL	< 0,0001	Positivo
FTL	0,6143	

**4.2.3.3 Eh.** Los resultados mostrados en la Figura 18 indican que con todas las combinaciones de bacterias se generaron condiciones oxidantes observándose el aumento en los valores de Eh respecto al control abiótico (370 mV). Las cepas oxidantes de hierro tuvieron una respuesta superior (F, L y el consorcio FL) a ambos niveles de pH inicial, alcanzando valores de potencial de óxido-reducción de 700 mV por hasta 18 días, algo que indica claramente la capacidad de estas combinaciones de generar condiciones altamente oxidantes. Entre tanto, FTL mostró un comportamiento similar hasta el día 12, posteriormente se presentó una reducción en los valores que puede asociarse a la fase de muerte celular presentada en el mismo periodo de tiempo (Figura 16), a pesar de este tramo final decreciente en la actividad oxidativa se puede enunciar que FTL fue la única combinación con la presencia de T en alguna proporción en el inóculo que alcanzó valores redox altos a ambos pH iniciales.

Figura 18. Perfiles de Eh para cada una de las combinaciones de bacterias. (a) pH inicial 1,6. (b) pH inicial 2,0.



Los valores-P del análisis ANOVA indican que el pH inicial tiene un efecto positivo estadísticamente significativo para los ensayos FT y TL (Tabla 17). Los valores más altos de Eh para los consorcios FT y TL a pH inicial 2,0 se pueden asociar a las densidades celulares superiores y los pH más altos que se obtuvieron en comparación a la condición de pH inicial 1,6, favoreciendo el desarrollo de las cepas oxidantes de hierro F Y L en una mayor proporción a la cepa oxidante de azufre T.

**Tabla 17. Valores-P para el efecto del pH inicial sobre el Eh**

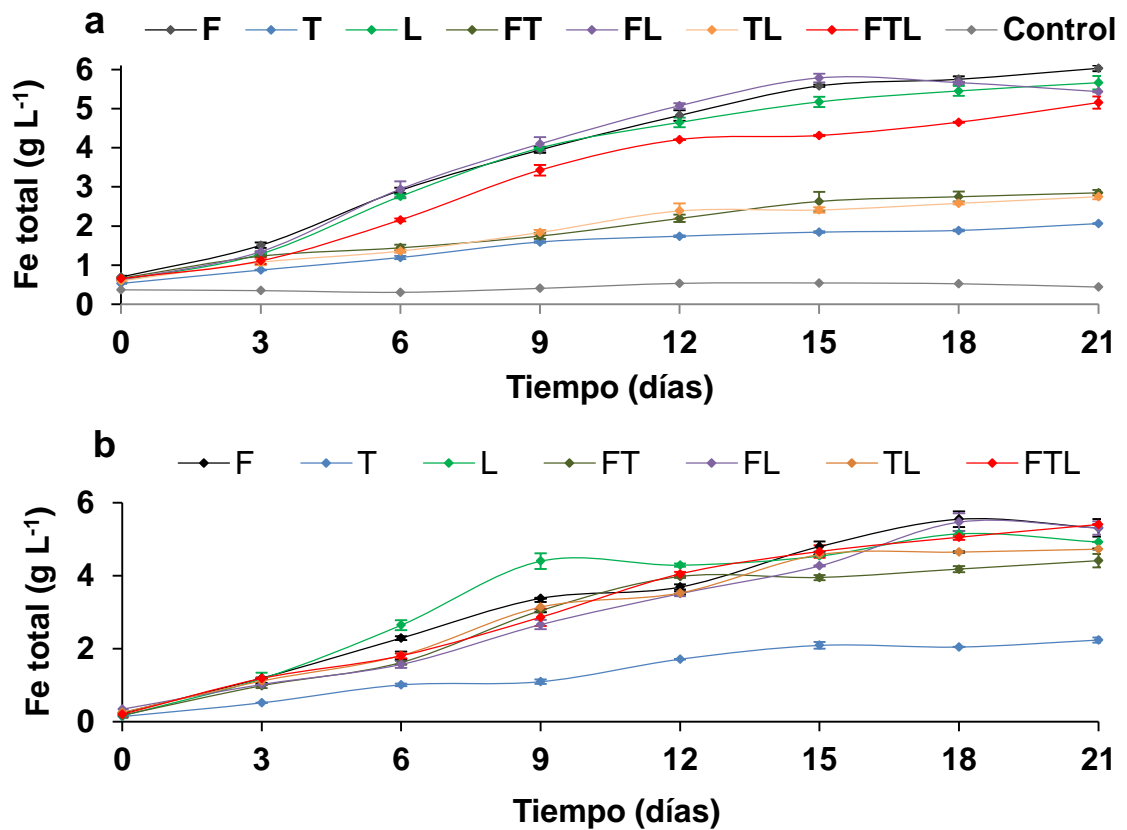
Combinación	pH inicial	Efecto
F	0,7802	
T	0,303	
L	0,1186	
FT	0,036	Positivo
FL	0,7151	
TL	0,0113	Positivo
FTL	0.3283	

**4.2.3.4 Concentraciones Fe y Fe<sup>+2</sup>** .Todas las combinaciones bacterianas a pH inicial 1,6 generaron una tasa de incremento en el hierro total disuelto, sin embargo es posible identificar dos grupos distintivos: TL, FT y T como un primer grupo alcanzó valores mucho menores que el segundo grupo conformado por F, L, FL, FTL lo cual indica que el consorcio conformado por las tres cepas fue el único consorcio con presencia de T que no mostró inhibición de las cepas hierro-oxidantes L y F (Figura 19a). Al comparar los perfiles de hierro ferroso (Figura 20a) y los perfiles de hierro total (la sustracción corresponde a la especie férrica) es posible identificar que la gran parte del hierro estuvo presente como Fe<sup>+3</sup>, solamente T y FTL parecieron ser inhibidos después del día 6 y 15 respectivamente al tener aumento en la concentración de Fe<sup>+2</sup> para los tiempos posteriores.

En la condición de pH inicial 2,0, la tendencia de aumento fue similar para todos los casos con la excepción de T que de nuevo no mostró altas tasas de disolución de hierro (Figura 19b). FTL a pH inicial 2,0 tuvo una tasa de incremento del hierro Fe<sup>+2</sup> después del día 15, pero en un menor grado en comparación al ensayo FTL a pH inicial 1,6. La comparación entre los resultados obtenidos permitió encontrar que para el pH inicial de 1,6, en términos generales, se encontraron porcentajes de disolución de hierro más altos para la mayoría de los consorcios.

El control abiótico no disolvió hierro, mientras que la presencia de bacterias en el medio favoreció el proceso de disolución (Figura 19). Inclusive *A. thiooxidans* (T) que en principio no tiene la capacidad de disolver la pirita [40], produjo disolución y oxidación de hierro en pequeñas proporciones, cantidades que pudieron generarse a partir del ataque protónico y la consecuente lixiviación por ácido sulfúrico de fuentes alternativas de hierro [86].

**Figura 19. Perfiles de Fe total para cada una de las combinaciones de bacterias. (a) pH inicial 1,6. (b) pH inicial 2,0.**



Las fuentes de hierro alternativas en el mineral de estudio, según su caracterización (Sección 5.1.2) son moscovita (especie de hierro), pirita lábil identificada a partir del ensayo de lixiviación diagnóstica (Figura 12) y la posible presencia de jarosita dada la posible sustitución hierro-aluminio en la posición G del supergrupo de alunita identificado ( $DG_3(TX_4)_2X'_6$  [87]). Otra posible fuente de hierro en el mineral es la esfalerita (Zn,Fe)S que es un sulfuro fácilmente oxidable por la acción de *A. thiooxidans* [40], identificado en proporciones menores a partir

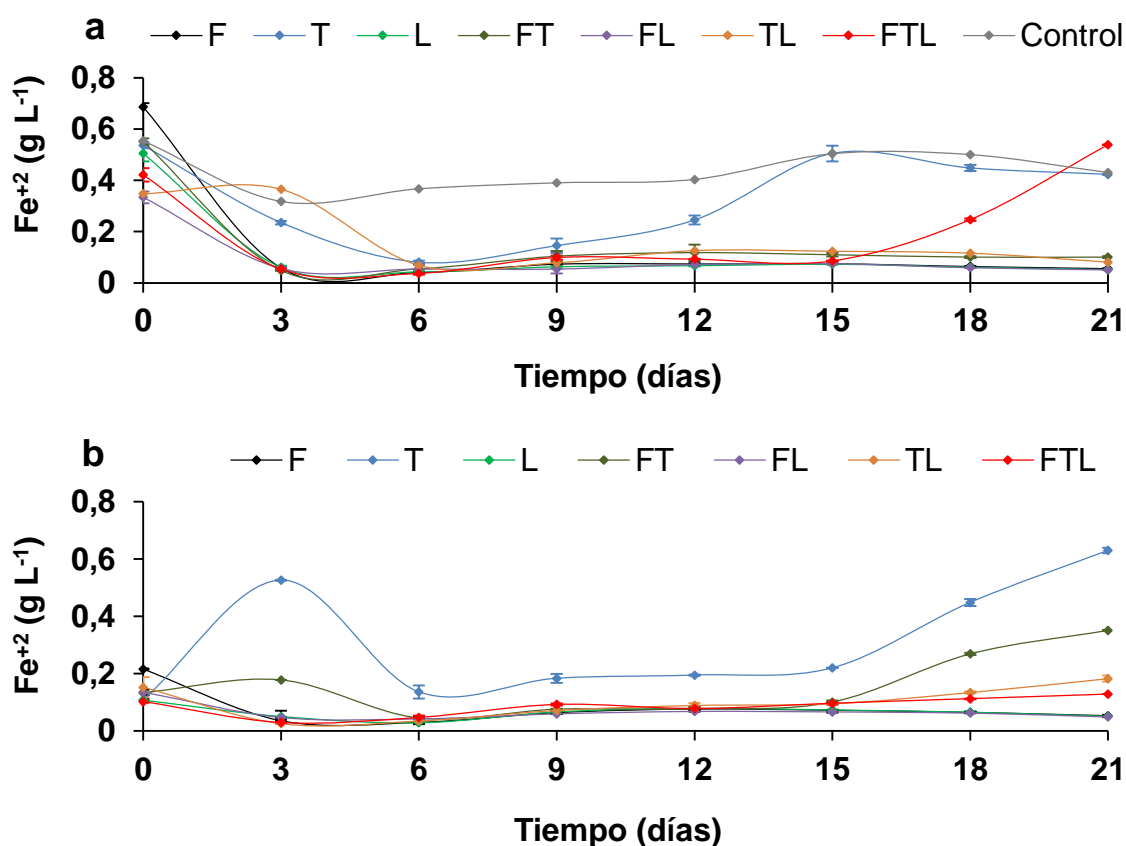
de análisis petrográficos complementarios (Anexo B). Finalmente la contribución de la oxidación química también puede ser un factor aportante considerando las condiciones Eh-pH generadas en el medio.

Los valores-P para la concentración de Fe en el medio (Tabla 18) indican un efecto significativo positivo para los ensayos FT y TL, lo cual concuerda con lo ya señalado para el comportamiento de Eh (sección 4.2.3.3). Para las condiciones restantes, a excepción de FTL, el efecto fue significativo y negativo, indicando que la disolución de hierro se favorece cuando el pH inicial es 1,6. De acuerdo a la sección 4.2.3.3 para F, T, L, FL a ambas condiciones de pH inicial no hubieron diferencias significativas en los valores de Eh obtenidos, por tanto las diferencias en la disolución de hierro estuvieron asociada principalmente a los valores pH alcanzado en el medio. Considerando que el pH ácido favorece la disolución de hierro, teniendo como límite los valores que puedan inhibir la bacterias, se puede inferir que el pH inicial 1,6 favoreció a las condiciones citadas por generar rangos de pH ligeramente más bajos sin generar inhibición aparente para F y L.

**Tabla 18. Valores-P para el efecto del pH inicial sobre el hierro**

<b>Combinación</b>	<b>pH inicial</b>	<b>Efecto</b>
F	< 0,0001	Negativo
T	< 0,0001	Negativo
L	0,0147	Negativo
FT	< 0,0001	Positivo
FL	< 0,0001	Negativo
TL	< 0,0001	Positivo
FTL	0,5208	

Figura 20. Perfiles de  $\text{Fe}^{+2}$  para cada una de las combinaciones de bacterias. (a) pH inicial 1,6. (b) pH inicial 2,0.



Los valores-P correspondientes a la concentración de  $\text{Fe}^{+2}$  (Tabla 19) indican que el pH inicial alto favorece la presencia de concentraciones menores de  $\text{Fe}^{+2}$  y por tanto mayores de  $\text{Fe}^{+3}$ . Aunque la tendencia fue común para todas las condiciones, estadísticamente únicamente fue significativa para las condiciones L, TL y FTL, lo cual se puede explicar en las fases de muerte celular que presentaron estas combinaciones a pH inicial 1,6. De hecho la relación es notoria al observar que periodos de aumento de la concentración de  $\text{Fe}^{+2}$  (Figura 20) concordaron con intervalos a los que se dieron fases de muerte celular (Figura 16).

**Tabla 19. Valores-P para el efecto del pH inicial sobre el Fe<sup>+2</sup>**

Combinación	pH inicial	Efecto
F	0,1244	
T	0,6719	
L	0,0061	Negativo
FT	0,8686	
FL	0,1436	
TL	0,0026	Negativo
FTL	0,0029	negativo

**4.2.3.5. Concentración de sulfato.** Mientas que el control abiótico no generó la formación de sulfato, T y todos los consorcios que la contenían tuvieron un comportamiento muy superior en términos de producción de sulfato en solución, de nuevo esto está en concordancia con las características específicas de esta especie bacteriana (Figura 21). FTL después de T fue la mejor combinación de bacterias en términos de concentración de sulfato como variable de respuesta, el pH inicial bajo permitió mejores respuestas, FTL a pH inicial 1,6 disolvió hasta 35 g L<sup>-1</sup> de sulfato en el día 15 mientras que en el mismo tiempo la condición FTL a pH inicial 2,0 solo alcanzó 23 g L<sup>-1</sup>.

Los valores-P para la concentración de sulfato (Tabla 20) indican que el pH inicial tuvo un efecto significativo para todas las condiciones a excepción de F y L.

Figura 21. Perfiles de sulfato para cada una de las combinaciones de bacterias. (a) pH inicial 1,6. (b) pH inicial 2,0.

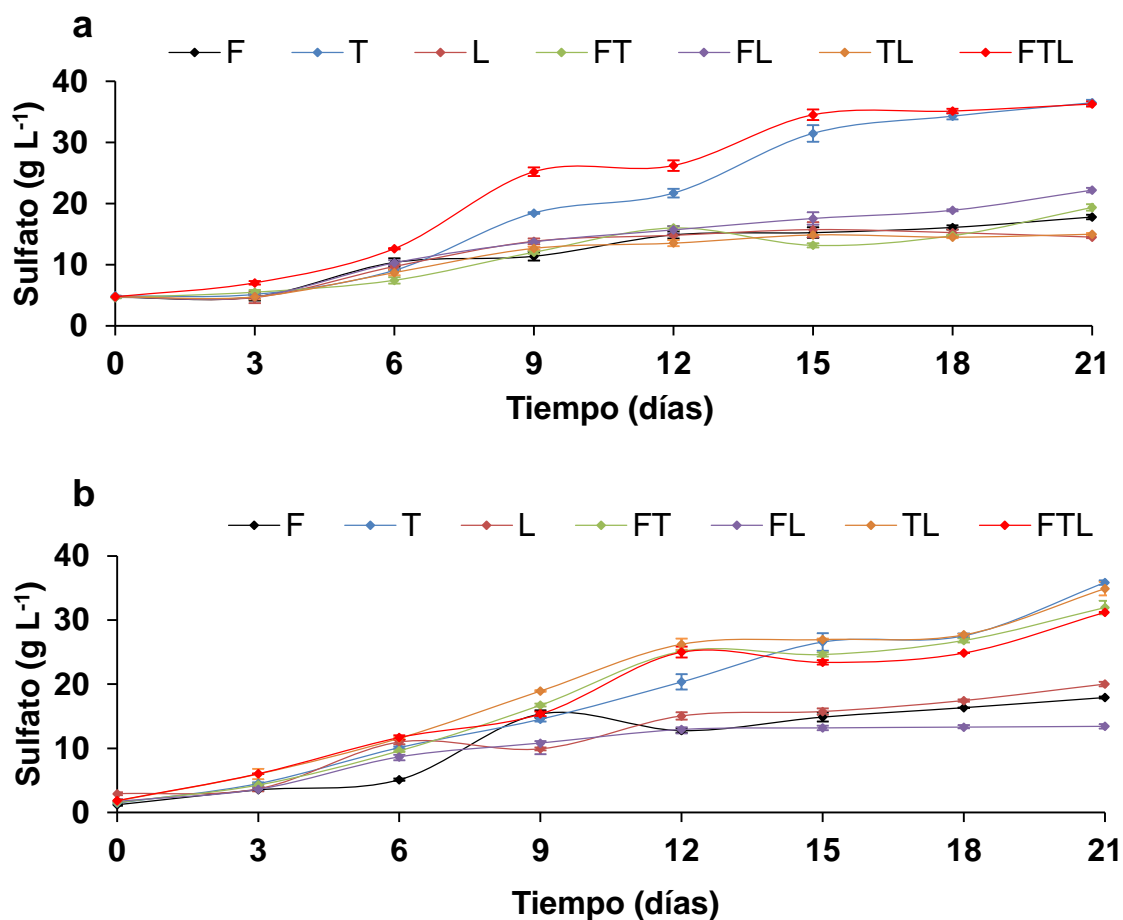


Tabla 20. Valores-P para el efecto del pH inicial sobre el sulfato

Combinación	pH inicial	Efecto
F	0,1195	
T	0,0018	Negativo
L	0,5713	
FT	< 0,0001	Positivo
FL	< 0,0001	Positivo
TL	< 0,0001	Positivo
FTL	< 0,0001	negativo

#### 4.2.3.6 Selección del consorcio de trabajo para pruebas posteriores.

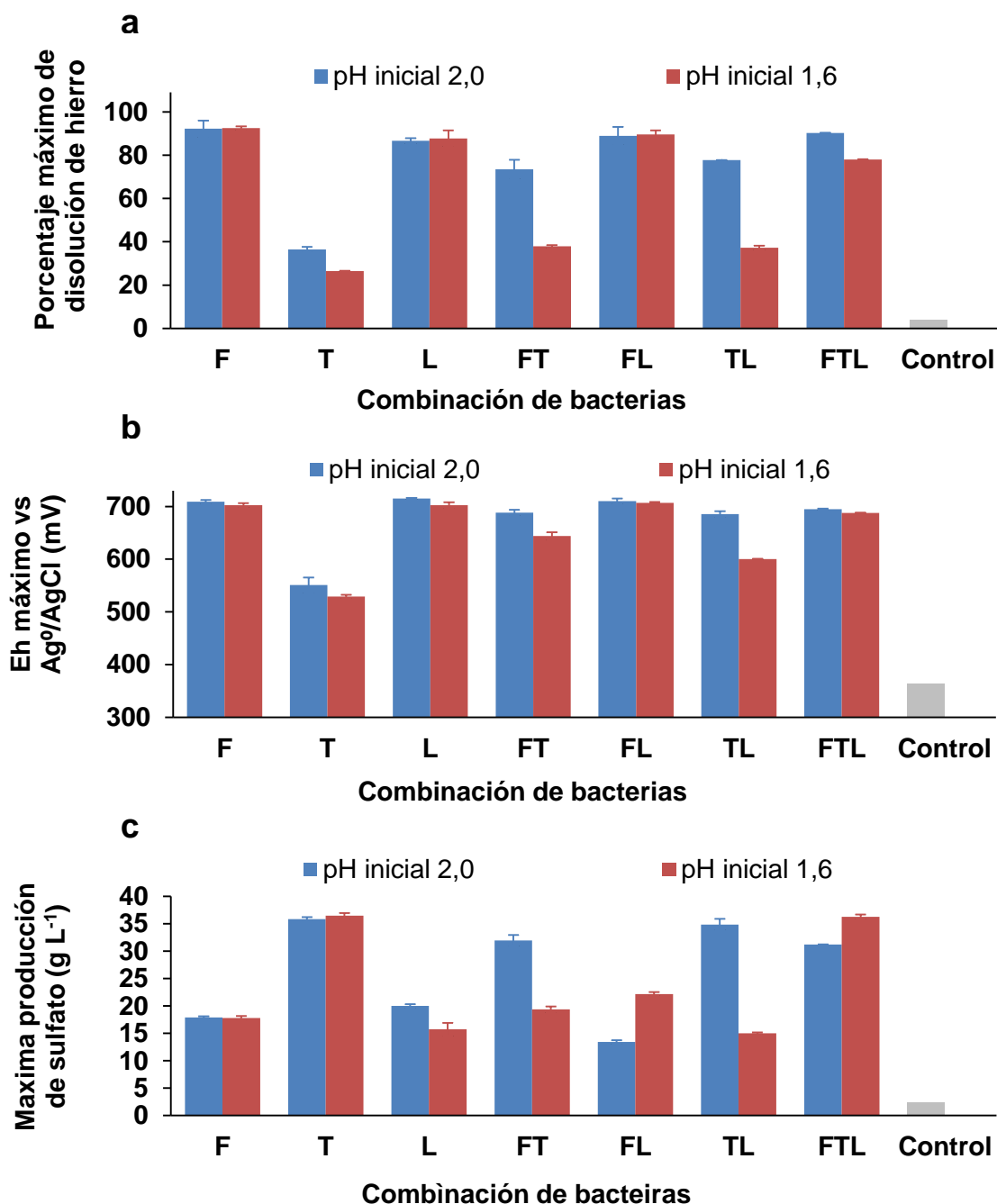
Considerando que la pirita ( $\text{FeS}_2$ ) se detectó como sulfuro principal en el mineral y que su biooxidación se evidencia con la producción de hierro en estado férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) y del sulfato en solución (ecuaciones 7-9) [40], el análisis comparativo entre los 14 ensayos se debe enfocar en identificar las condiciones que permitieron el avance de estos dos productos principales tanto en términos de cantidad (concentraciones en el medio) como en términos de evolución en el tiempo (productividad volumétrica).

Los valores máximos de Eh y el máximo porcentaje de hierro disuelto por cada ensayo bacteriano (%Fe; ecuación 4) se resumen en la Figura 22a y 22b. Los resultados indican el avance de la biooxidación del mineral para todas las combinaciones bacterianas con porcentajes de disolución y Eh notablemente superiores a los obtenidos con el control abiótico (4% y 360 mV). Las condiciones F, L, FL y FTL mostraron los mejores resultados con diferencias no significativas entre ellos.

Grandes cantidades de sulfato disuelto estuvieron relacionadas directamente con bajos niveles de pH alcanzados, siendo así los consorcios con presencia de la bacteria oxidante del azufre T los que alcanzaron mayores valores finales. Los resultados de sulfato (Figura 22c) indican claramente que FTL a ambos pH iniciales tiene un comportamiento sobresaliente con valores más altos a los obtenidos por las cepas F y L y el consorcio FL.

La disolución de la pirita puede generar azufre elemental como producto en adición al sulfato y el ión férrico; elemento insoluble que se puede formar y depositar como capas alrededor de la superficie del mineral que inhiben la interacción medio biooxidativo-mineral [85]; por tanto la presencia de la cepa *A. thiooxidans*, es clave en la oxidación de este elemento insoluble. La presencia de valores superiores de sulfato en solución para el consorcio FTL indica la disolución directa del mineral o del azufre depositado.

Figura 22. Resultados de biooxidación para la combinación bacteriana y el pH inicial. (a) Porcentaje máximo de disolución de hierro. (b) Eh máximo. (c) Máxima producción de sulfato.



El estudio de la relación entre las especies de hierro (férrica y ferrosa) es crucial porque  $\text{Fe}^{+3}$  es ampliamente conocido como un agente oxidante fuerte, normalmente producido por la oxidación química de  $\text{Fe}^{+2}$ , pero en una cantidad mucho mayor por la acción de bacterias biooxidativas [82]. Altas fracciones de

Fe<sup>3</sup>/Fe<sup>2</sup> y productividades volumétricas de Fe<sup>3</sup> altas son esperadas en un proceso biooxidativo efectivo. Los resultados listados en la Tabla 21 indican que los valores máximos de Fe<sup>3</sup>/Fe<sup>2</sup> fueron superiores para F, L y FL, indicando el desarrollo satisfactorio del rol de las cepas oxidantes del hierro ferroso. La presencia de T, en cambio, supuso fracciones Fe<sup>3</sup>/Fe<sup>2</sup> bajas para la mayoría de las combinaciones, siendo FTL el único consorcio con T capaz de sostener productividades volumétricas de hierro y fracciones Fe<sup>3</sup>/Fe<sup>2</sup> similares a los obtenidos por F, L y FL a ambos pH.

**Tabla 21. Resumen de resultados para el diseño de experimentos de biooxidación (Combinación de bacteria y pH inicial)**

Combinación de bacteria	Fe <sup>3</sup> /Fe <sup>2</sup> Promedio	Productividad volumétrica máxima de Fe <sup>3</sup>		Productividad volumétrica máxima de sulfato	
		Valor g(Lh) <sup>-1</sup> *10 <sup>-2</sup>	Tiempo al que se logró (h)	valor (gLh) <sup>-1</sup> *10 <sup>-2</sup>	Tiempo al que se logró (h)
<b>pH inicial 2,0</b>					
F	107 ± 1	1,6 ± 0,1	3	3,9 ± 0,5	6
T	14 ± 1	0,5 ± 0,1	6	7,0 ± 0,4	15
L	94 ± 5	1,8 ± 0,1	6	5,6 ± 0,4	6
FT	51 ± 1	1,4 ± 0,1	9	8,1 ± 0,1	9
FL	107 ± 1	1,8 ± 0,2	6	4,8 ± 0,4	6
TL	51 ± 3	1,4 ± 0,1	9	8,4 ± 0,2	12
FTL	51 ± 1	1,5 ± 0,1	3	8,0 ± 0,3	12
<b>pH inicial 1,6</b>					
F	98 ± 1	2,0 ± 0,1	3	3,9 ± 0,5	9
T	9 ± 1	0,9 ± 0,1	3	7,4 ± 0,3	9
L	109 ± 3	2,0 ± 0,1	9	4,2 ± 0,3	9
FT	27 ± 2	1,5 ± 0,1	3	4,0 ± 0,12	9
FL	106 ± 3	1,2 ± 0,1	18	4,2 ± 0,1	12
TL	33 ± 2	0,7 ± 0,1	6	3,7 ± 0,1	15
FTL	49 ± 1	1,4 ± 0,1	9	9,5 ± 0,3	6
Control	0,1	1,1*10 <sup>-3</sup>		0,4	

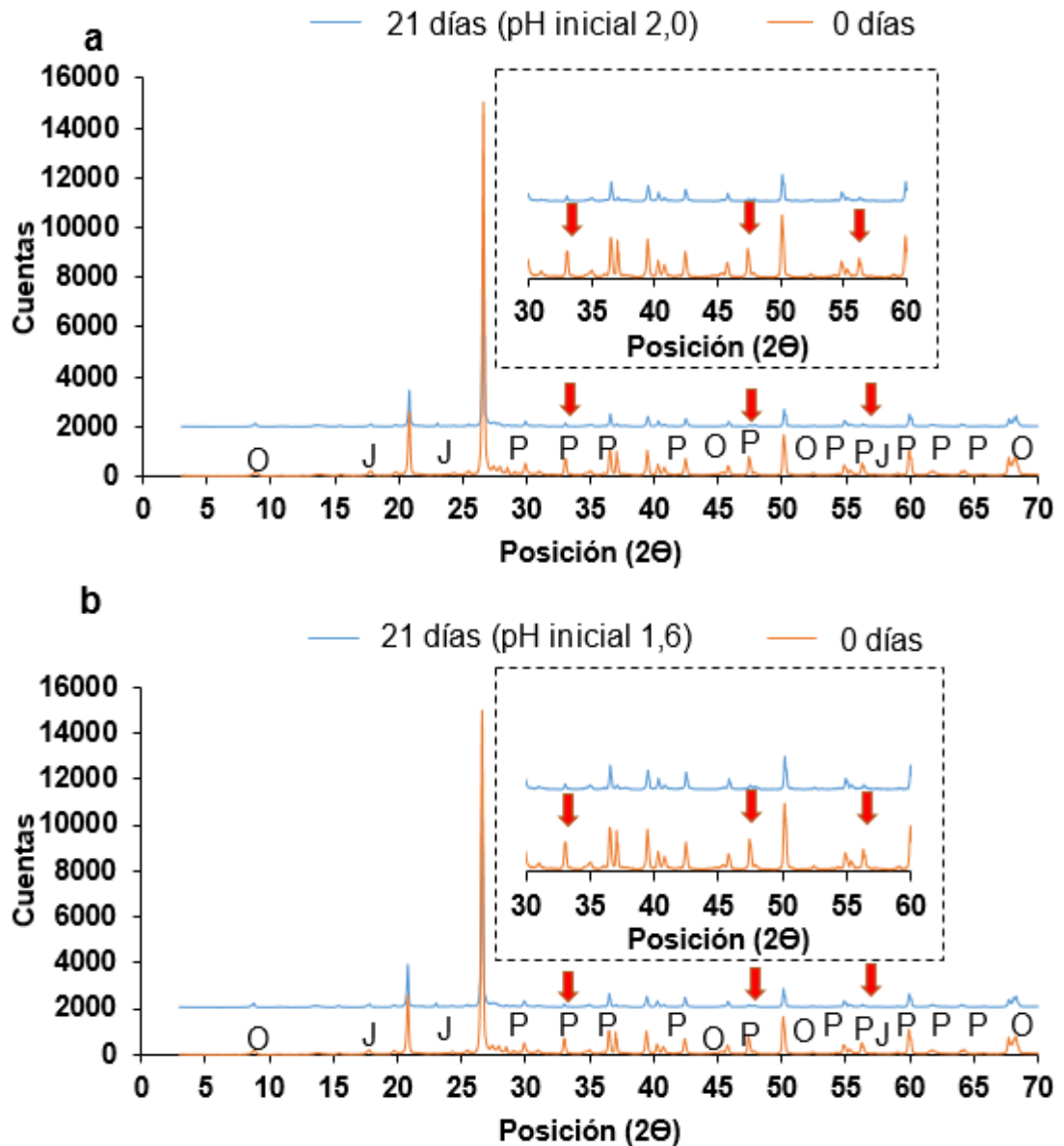
Considerando los resultados previos, las funciones o roles específicos para cada bacteria pudieron distinguirse claramente al observar la capacidad de las cepas *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* para disolver y oxidar hierro, mientras que para la cepa *A. thiooxidans* la producción de sulfato y los niveles de acidez fueron superiores [40,88]. En consideración de que el avance es demostrado cuando hay evidencia de disolución y oxidación de hierro, aumentos en los valores de Eh producción de sulfato, y crecimiento celular, es posible establecer que el mejor comportamiento fue obtenido con el consorcio conformado por las tres bacterias con resultados de hierro similares a los obtenidos con F, L y FL y producciones de sulfato superiores, alcanzando altas densidades celulares y velocidades específicas de crecimiento.

Los resultados generales indican la posible viabilidad de la biooxidación como pretratamiento del mineral refractario usando las cepas mesófilas seleccionadas, ya que los valores obtenidos son similares a estudios donde la biooxidación se aplicó satisfactoriamente en el pretratamiento de minerales refractarios. Por ejemplo, el valor de  $\mu_{\text{máx}}$  para FTL a pH inicial 2,0, cercano a 0,020 ( $\text{h}^{-1}$ ) está en el rango de valores reportados para una cepa *A. ferrooxidans* adaptada con éxito a concentrados de esfalerita de alto grado [90]. Las densidades celulares alcanzadas (hasta  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$  para FTL a pH inicial 2,0) están en niveles similares a las obtenidas por diferentes consorcios probados a escala laboratorio [90] y superior al reportado para una aplicación industrial de biooxidación [91]. El crecimiento bacteriano se reflejó directamente en la disolución de hierro, valores superiores al 75% fueron comunes para las mejores combinaciones, indicando el éxito del proceso bioquímico con valores similares o inclusive superiores a los reportados por diferentes autores [90, 46].

En principio los resultados obtenidos indican fuertemente el efecto de la biooxidación en la disolución de la pirita como principal fase sulfurada y mineral causante de la refractariedad. Se efectuaron análisis DRX con el propósito de evaluar las variaciones de las fases cristalinas de las muestras minerales biooxidadas para cada una de las combinaciones bacterianas. En la Figura 23

se presentan los difractogramas correspondientes al mineral antes y después de la biooxidación para el consorcio FTL a ambos pH iniciales.

**Figura 23. Difractogramas DRX antes y después de la biooxidación usando el consorcio FTL. (a) pH inicial 2,0. (b) pH inicial 1,6. O: otros (Moscovita; cuarzo y rutilo); J: Jarosita; P: Pirita.**



En la Figura 23 se pueden observar los picos correspondientes a los fases principales detectados en el mineral de acuerdo a la caracterización inicial (Sección 5.1.2), al comparar el difractograma inicial respecto al final, no se identifican variaciones significativas en los picos correspondientes al cuarzo la muscovita y el rutilo (letra O en la Figura 23), indicando su carácter inerte a la biooxidación, de hecho los difractogramas para las demás combinaciones tienen comportamientos similares en todos los casos (Anexo D).

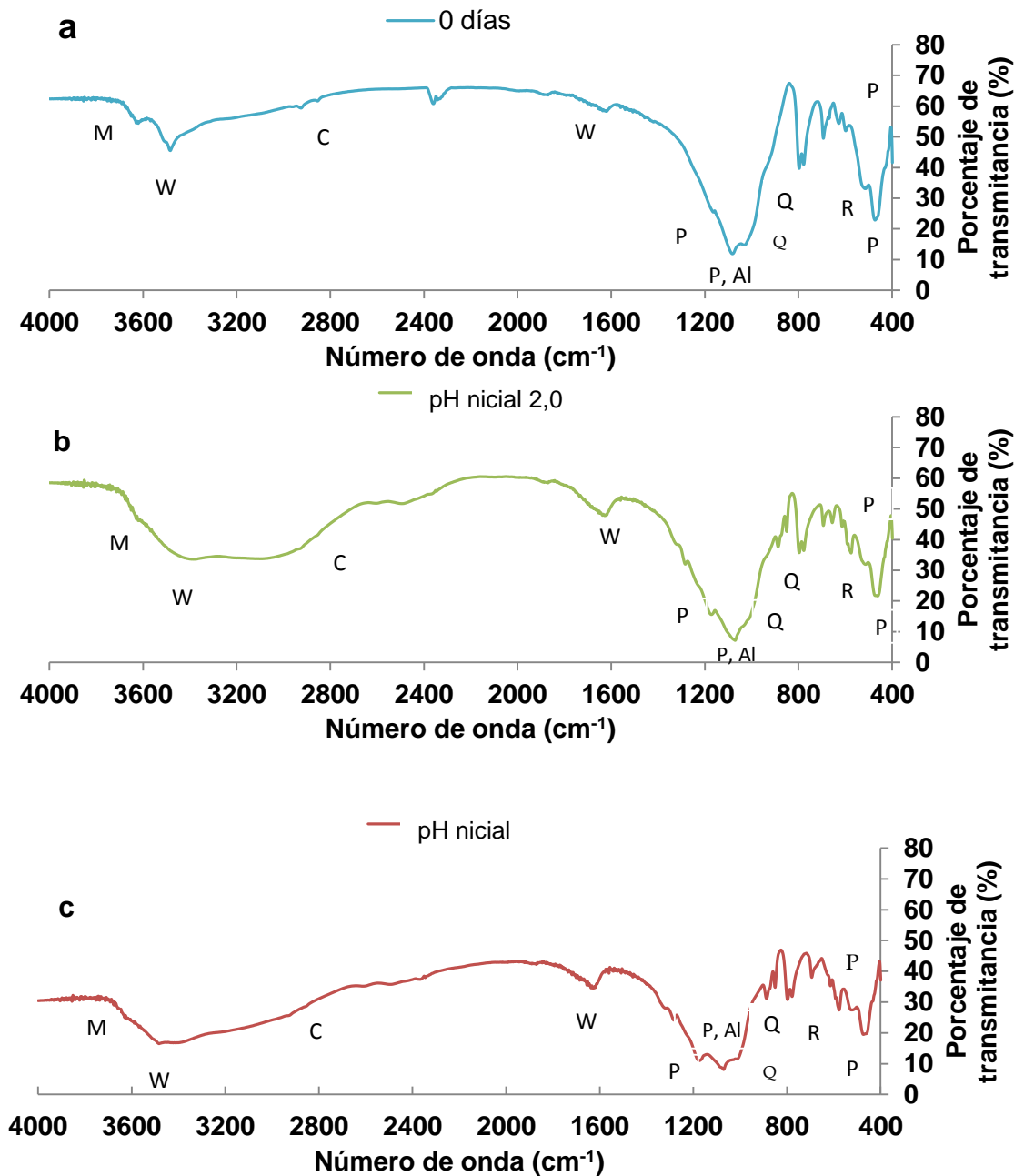
Por otra parte la variación de la pirita fue evidente (sección punteada del difractograma correspondiente a un rango maximizado del mismo) considerando que gran parte de los picos representativos de este mineral desaparecieron total o parcialmente después de la biooxidación, indicando de nuevo como el consorcio FTL desarrolló un rol efectivo en la biooxidación de la fase sulfurada principal en el mineral, en la Figura 23 se señalan 3 de los picos con variaciones más notorias. Espectros FTIR del mineral biooxidado por el consorcio FTL a ambas condiciones de pH inicial (Figura 24) también indican disminuciones en algunas de las bandas asociados a la pirita, soportando de esta manera la capacidad de las cepas acidófilas de usar la pirita presente en el mineral como fuente de energía.

Los difractogramas DRX y los espectros FTIR para las combinaciones bacterianas diferentes a FTL representan lo previamente descrito con los análisis de la dinámica de biooxidación ya que las condiciones T y FT a ambos pH iniciales y el consorcio TL a pH inicial 1,6, no mostraron variaciones significativas ni en los picos típicos de DRX ni en las bandas asociadas a la pirita, mostrando que los bajos porcentajes de disolución de hierro efectivamente son consecuencia de la oxidación ineficiente del mineral (datos no mostrados).

En cuanto al supergrupo alunita que puede ser como mineral alunita o jarosita en función del metal que este en la estructura cristalina (aluminio o hierro); no se pudieron evidenciar diferencias claras, puesto que en los picos detectados no hubo variaciones notorias en la intensidades esto puede indicar que no hubo formación de jarosita adicional durante el proceso bioquímico o posiblemente hubo formación de fases poco cristalinas no detectables mediante la técnica de

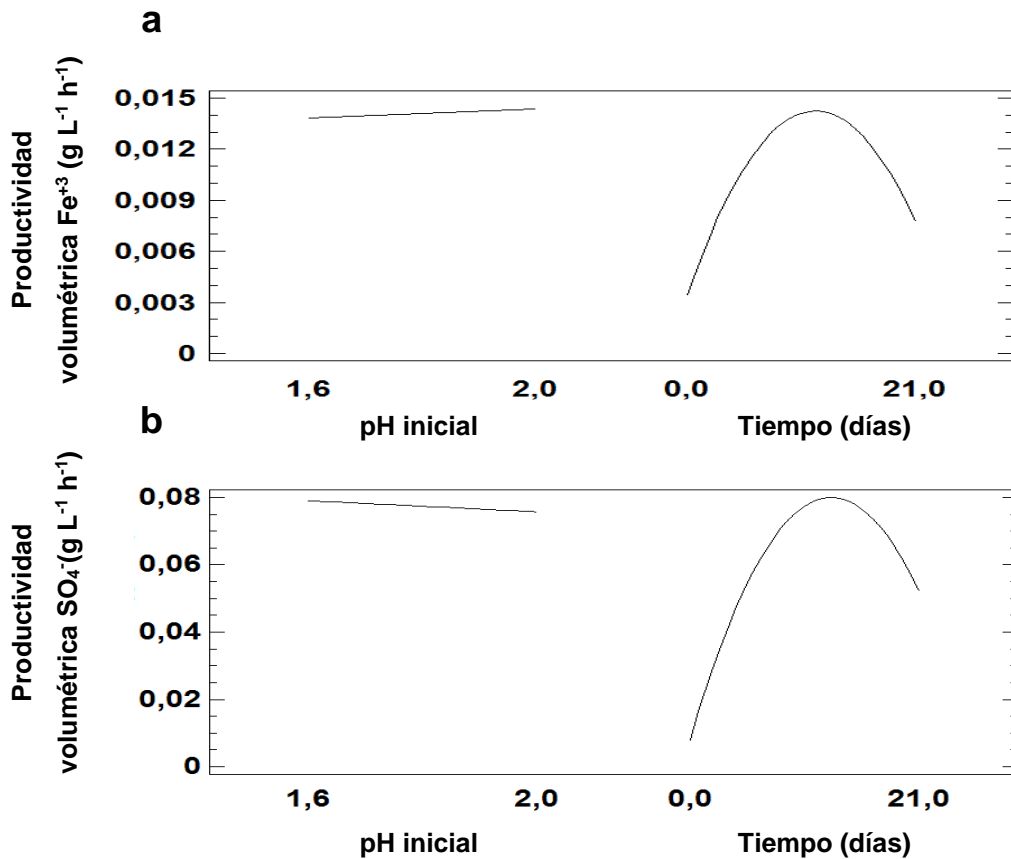
difracción de rayos X [63]. Los espectros FTIR permitieron identificar variaciones no detectadas con los análisis DRX, en el caso de los ensayos con el consorcio FTL, la mayoría de bandas propias de la jarosita mantuvieron constantes o disminuyeron con el paso del tiempo lo que sugiere que no se dio su formación como agente pasivante, caso contrario de lo que se encontró para las condiciones T a ambos pH iniciales (Anexo D).

Figura 24. Espectros FTIR antes y después de la biooxidación usando el consorcio FTL. (a) control. (b) 21 días pH inicial 2,0. (c) 21 días pH inicial 1,6.



En procura de identificar las condiciones de pH inicial y tiempo de cultivo a usar para las pruebas en biorreactor, en la Figura 25 se presentan los diagramas de Pareto y el diagrama de efectos principales, usando la productividad volumétrica de hierro férrico y sulfato como variables de respuesta.

Figura 25. Análisis estadístico del efecto del pH inicial y el tiempo sobre la biooxidación del consorcio FTL. (a) Gráfico de efectos principales para la productividad volumétrica de  $\text{Fe}^{+3}$ . (b) Gráfico de efectos principales para la productividad volumétrica de sulfato.



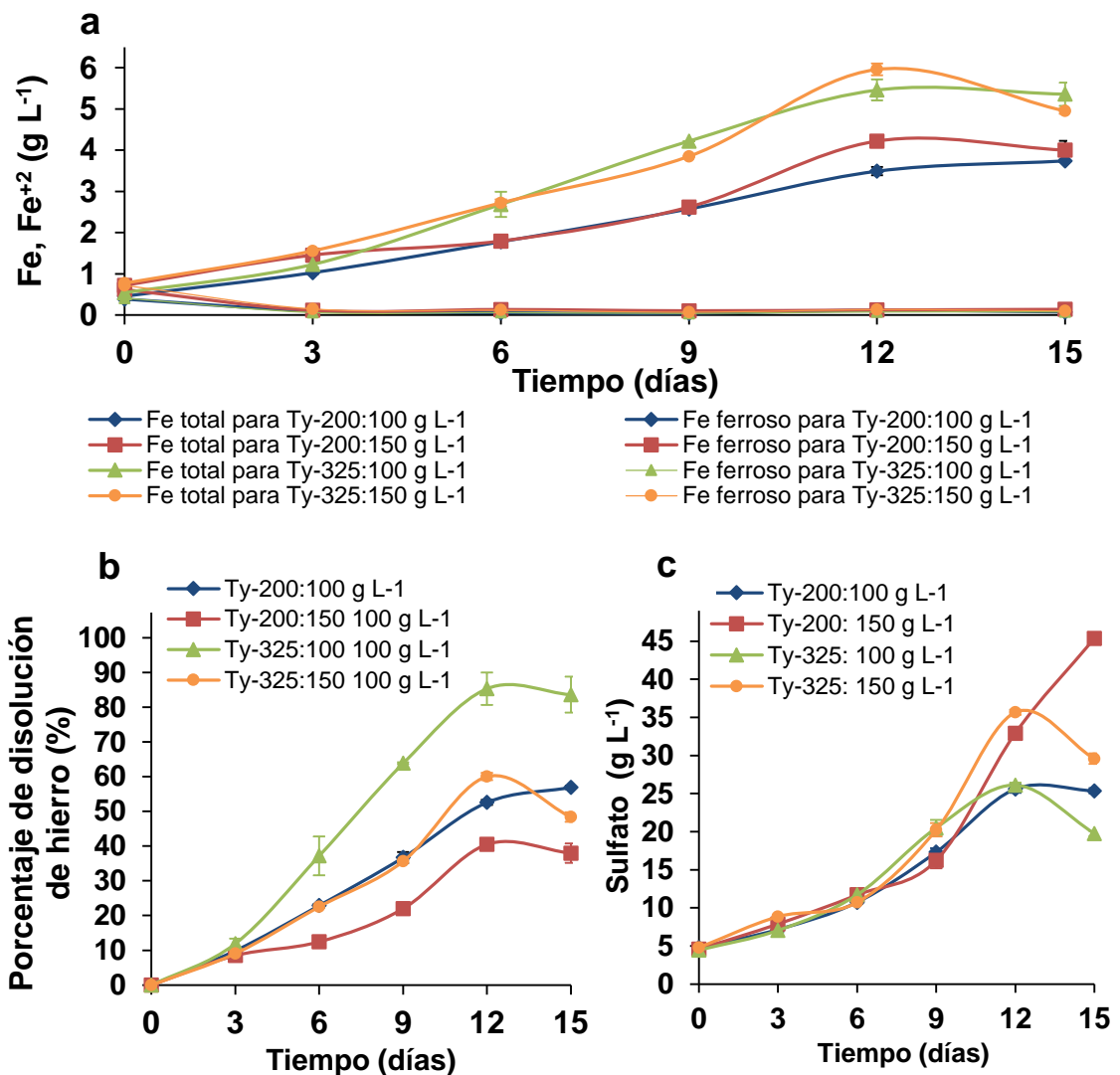
De acuerdo a la Figura 25 el pH inicial no afecta significativamente a la productividad volumétrica de hierro ni a la productividad volumétrica de sulfato. En el caso del tiempo se encontró un efecto estadístico significativo no lineal para ambos perfiles de productividad volumétrica con un punto de inflexión que representa muy bien la inhibición que se da en el proceso después del día 15. Teniendo en cuenta lo anterior para las pruebas posteriores se seleccionó un pH intermedio (1,8) y un periodo de cultivo menor (15 días) como variables de operación.

**4.2.4 Influencia del tamaño de partícula y concentración mineral.** El tamaño de partícula y la concentración de mineral son variables de gran interés en la industria minera dado que están asociadas a factores como el consumo de

energía y la capacidad requerida en los equipos de una planta industrial de beneficio [29].

La Figura 26 describe el avance de la biooxidación con disolución efectiva de hierro, oxidación constante de especies ferrosas y la producción de sulfato en el medio para todas las condiciones probadas. En general todas las variables medidas, incluyendo la densidad celular y el potencial Redox (datos no mostrados) tienden a una meseta que indica la estabilización o disminución de la actividad biooxidativa en la etapa final del proceso, una tendencia ya encontrada para tiempos posteriores a los 15 días (Figura 25).

**Figura 26. Influencia del tamaño de partícula y la concentración de mineral en la biooxidación. (a) Concentraciones de hierro total y hierro ferroso. (b) porcentaje de disolución de hierro. (c) Concentración de sulfato.**



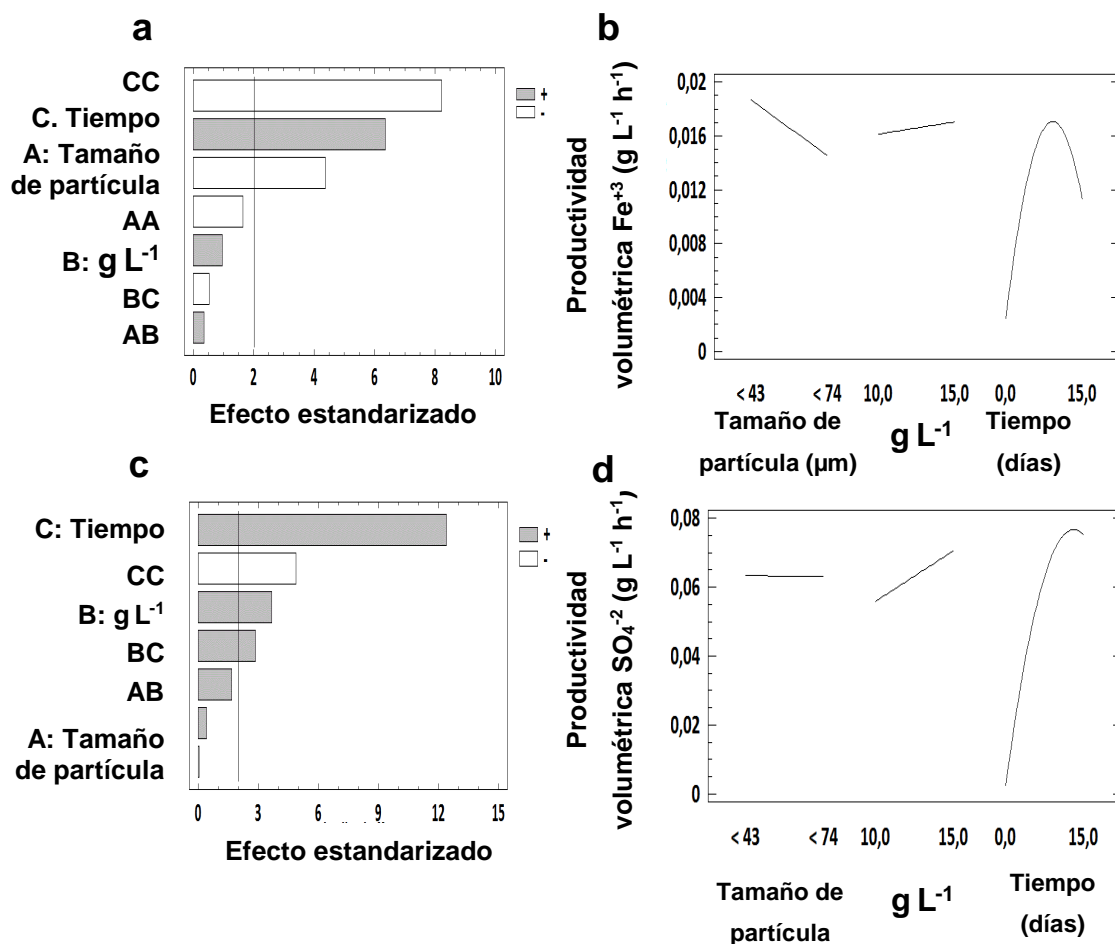
Los resultados del análisis estadístico ANOVA presentado en la Figura 27 indican que las variables analizadas tuvieron un efecto significativo sobre las variables de respuesta (estadístico  $P < 0,05$ ). El tiempo tuvo un efecto positivo con un efecto no lineal para ambas variables de respuesta con un punto de inflexión ubicado entre los días 12 y 15 que de nuevo indica el proceso tiende a inhibirse a largos periodos de tiempo bajo las condiciones probadas. La concentración de mineral afectó positivamente la producción de sulfato y no tuvo efecto sobre el hierro y el tamaño de partícula afectó positivamente la disolución de hierro sin afectar la formación de sulfato (Figura 27a y 27c).

La gráfica de efectos principales para las productividades volumétricas de estos ensayos de biooxidación (Figura 28b y 28d) muestra una relación no lineal entre el tiempo y las variables de respuesta, indicando claramente un punto de inflexión a partir del cual las bacterias y el proceso en general se inhibe, este tipo de comportamiento puede deberse a la fase de muerte celular debida a factores como deficiencia de sustrato u oxígeno, exceso de productos o metabolitos contaminantes y estrés celular [92,93].

Pese a que altas concentraciones de mineral pueden ralentizar al proceso dada la presencia de mayores concentraciones de metales traza o compuestos inhibitorios, así como el mayor esfuerzo de corte que pueden sufrir las bacterias al haber un mayor número de partículas de mineral en solución [53], la Figura 27a y 27c indican que el porcentaje de mineral en el medio tuvo un efecto positivo en la productividad de sulfato sin afectar la de hierro. Todo lo cual indica que las bacterias a la concentración  $150 \text{ g L}^{-1}$  tuvieron la capacidad de disolver y oxidar la matriz mineral a tasas considerables sin inhibición fuerte aparente.

Por último el efecto del tamaño de partícula en la disolución de hierro y en la productividad volumétrica fue negativo (Figura 27c y 27d), es decir a menores tamaños de partícula la disolución de hierro se favoreció al haber una mayor área de contacto entre la bacteria y el sustrato [94]. A su vez no se pudo visualizar un efecto significativo en la productividad volumétrica de sulfato y en la producción de sulfato.

Figura 27. Análisis estadístico del efecto tamaño de partícula, la concentración del mineral y el tiempo en la biooxidación del consorcio FTL. (a), (b) Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para la productividad volumétrica de  $\text{Fe}^{+3}$ . (c), (d) Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para la productividad volumétrica de sulfato.



### 4.3 ENSAYO DE OXIDACIÓN EN BIOREACTOR

Las condiciones usadas en el ensayo de biooxidación del bioreactor fueron seleccionadas teniendo en cuenta los resultados encontrados en los diferentes diseños experimentales, en primer lugar el tiempo de biooxidación correspondió a un valor menor a los usados en los anteriores experimentos, siendo 12 días el valor escogido por ser el punto de inflexión que se encontró para la biooxidación del consorcio FTL, esta selección se justifica en la necesidad de garantizar el uso de las cepas en una fase en la que no sé de muerte celular para garantizar una catálisis eficiente de la oxidación del mineral.

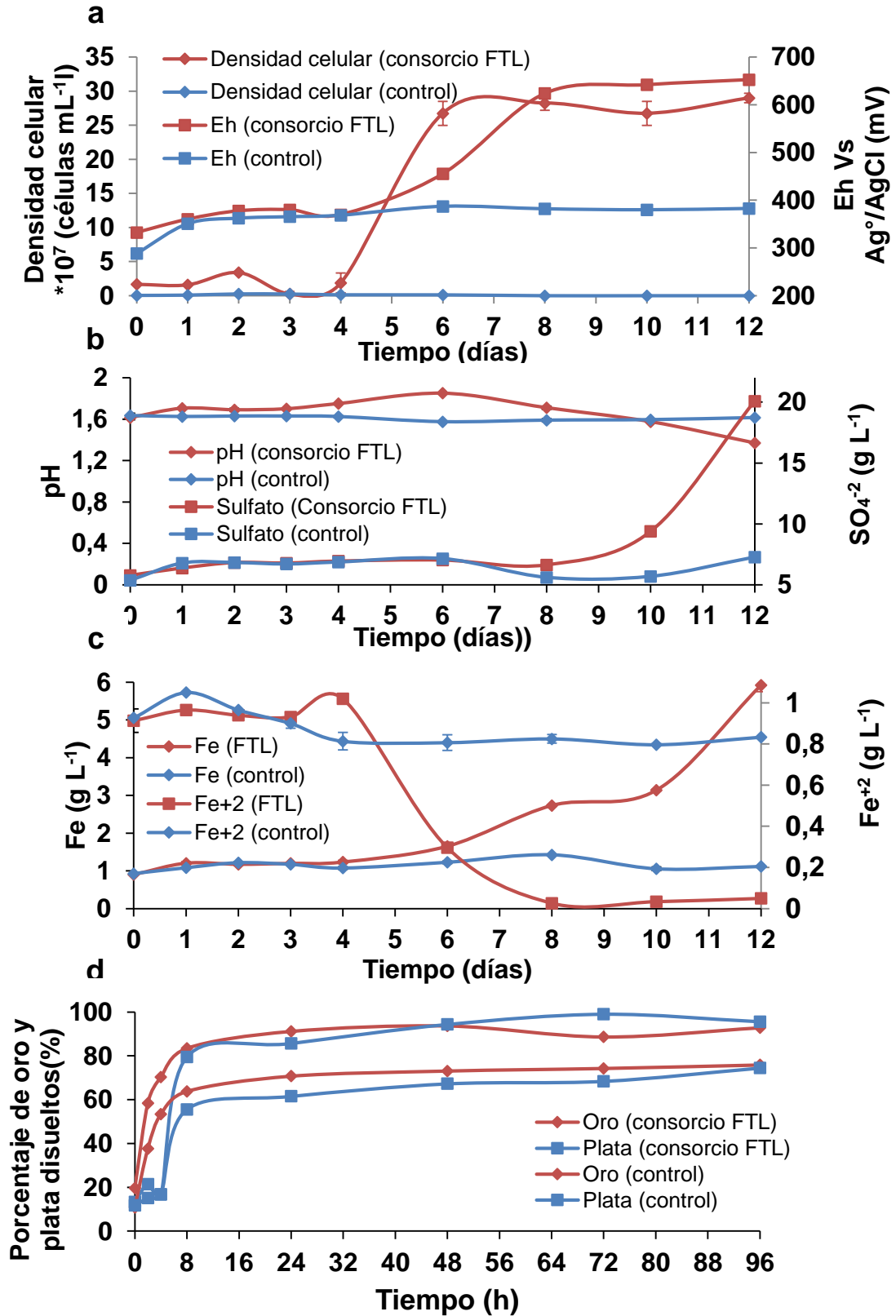
A pesar de que las mejores condiciones de biooxidación encontradas estuvieron asociadas a un tamaño de partícula menor y un contenido de mineral bajo, también fue posible identificar en los ensayos de Erlenmeyer avance en la biooxidación cuando se usó un tamaño de partícula y concentración de mineral mayores. Por tanto, con el propósito de evaluar el efecto de la biooxidación en la recuperación de oro y plata a partir del mineral refractario de baja ley de California Santander se decidió desarrollar una única prueba usando mineral en una concentración de  $150 \text{ g L}^{-1}$  y un  $d_{80} < 74 \text{ (}\mu\text{m)}$ , condiciones que si bien no fueron las óptimas, si podrían visualizarse como niveles de operación favorables para una posible aplicación a gran escala de la biooxidación.

Los resultados mostrados en la Figura 28 resumen los perfiles obtenidos en el bioreactor. Aunque se visualizó una fase de latencia inicial (3 días), la concentración de hierro en solución alcanzada y por ende el porcentaje de disolución fueron mayores en comparación al obtenido en el ensayo correspondiente ( $5,92 \text{ g L}^{-1}$  y 67% respectivamente), mostrando un avance satisfactorio del proceso pese al cambio de escala [56]. Por tanto se consideró que el mineral biooxidado en el bioreactor bajo las condiciones descritas podría someterse a una cianuración comparativa que vislumbre el potencial de la aplicación del pretratamiento bioquímico.

La cinética de la cianuración, Figura 28d, muestra los resultados comparativos tanto para el oro como para la plata. En ambos casos es visible la efectividad del pretratamiento bioquímico en el mineral refractario de estudio, permitiendo un

aumento en la disolución del oro desde 75% inicial hasta un 93% y desde un 68% inicial hasta 99% en el caso de la plata.

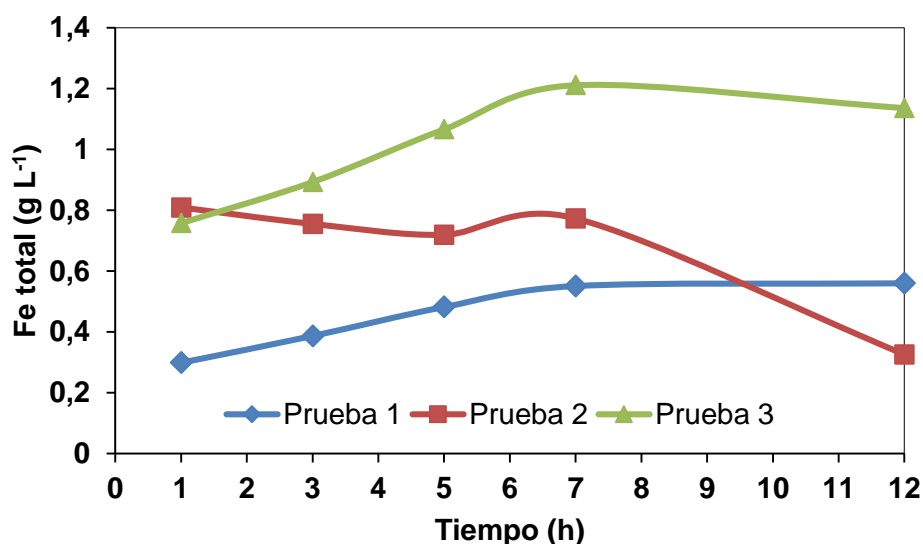
Figura 28. Perfiles biooxidación prueba reactor 5L. (a) Densidad celular y Eh. (b) pH y sulfato. (c) Hierro total y hierro ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ). (d) Porcentaje de oro y plata disuelto.



#### 4.4 COMPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE ORO CON LOS PRETRATAMIENTOS DE BIOOXIDACIÓN Y OXIDACIÓN QUÍMICA ANTES DE LA CIANURACIÓN

**4.4.1 Experimentos de oxidación química.** Los resultados de las pruebas preliminares para la oxidación química presentados en la Figura 29 permiten identificar en primer lugar que el proceso tiende a una meseta de disolución de hierro que indica que después de un tiempo de 5 a 7 horas no hay aumentos significativas en la disolución de hierro, comportamiento que está asociado a la rápida cinética de reacción reportada para este reactivo que tiende a descomponerse en tiempos cortos de reacción en agua y oxígeno [34]. Así mismo es importante resaltar que el pH ácido, en el rango de los valores usados para la biooxidación, fue el que mostró la mejor cinética.

**Figura 29. Disolución de hierro para pruebas preliminares de oxidación química.**



Tomando los resultados de las pruebas preliminares se selecciona el pH ácido como constante para el diseño de experimentos descrito en la Tabla 8. Los resultados obtenidos para cada una de las condiciones del diseño experimental en términos de porcentaje de disolución de hierro se presentan en la Tabla 22.

La oxidación química se favoreció en condición de agitación moderada, mayor concentración de peróxido de hidrógeno y la menor concentración de mineral. Es importante anotar que la concentración de mineral en la oxidación química no tiene las limitaciones que en la biooxidación puede representar la inhibición por concentraciones iguales o superiores al 200 g L<sup>-1</sup> en las bacterias, razón por la que los niveles estudiados están por encima de los valores usados con los experimentos bioquímicos.

**Tabla 22. Porcentajes de disolución de hierro para las pruebas del diseño de experimentos de la oxidación química**

<b>Número experimento</b>	<b>Porcentaje disolución hierro (%)</b>
1	5,88 ± 0,20
2	9,20 ± 0,17
3	7,62 ± 0,20
4	9,22 ± 0,31
5	3,45 ± 0,28
6	5,07 ± 0,17
7	4,64 ± 0,07
8	8,69 ± 0,06
9	6,49 ± 0,05
10	6,57 ± 0,36
11	3,93 ± 0,10
12	4,18 ± 0,13
13	6,36 ± 0,17
14	7,11 ± 0,32
15	4,66 ± 0,27
16	7,91 ± 0,68

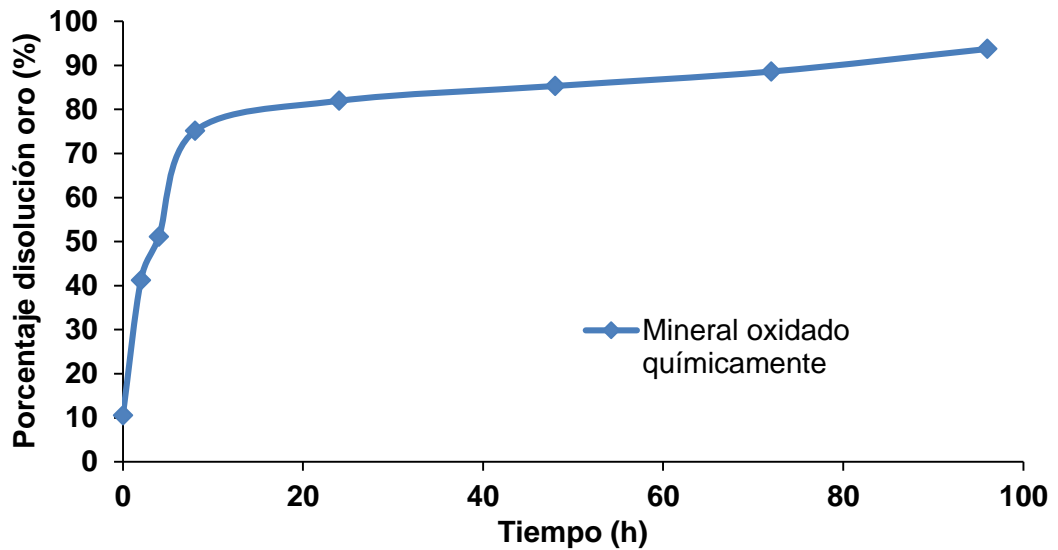
Tomando la condición que generó los mayores niveles de disolución se realizó una prueba a mayor escala en procura de obtener la cantidad de mineral necesaria para un ensayo final de cianuración comparativo. Los resultados de disolución de hierro (Tabla 23) de nuevo presentaron valores de disolución bajos en comparación a los obtenidos con la biooxidación, lo cual fue una constante para todas las pruebas de oxidación química y puede explicarse por la rápida velocidad de descomposición que tiene el peróxido de hidrógeno, así como por la marcada diferencia en la cinética de los dos procesos.

La cianuración del mineral oxidado químicamente fue evaluada únicamente en términos de la disolución de oro. El efecto respecto a la cianuración inicial sin pretratamiento es bastante favorable con un aumento en el porcentaje de disolución similar a la obtenida en el caso de la cianuración del mineral biooxidado (93% para la biooxidación y 93,75%) (Figura 30). Es claro que el peróxido de hidrógeno genera una oxidación, si bien no masiva como en el caso de la oxidación biológica, si eficiente que puede asociarse a puntos de corrosión específico y localizados a lo largo de la superficie del mineral que pudieron generar la superficie de contacto necesario entre el agente lixivante y el metal precioso para la generación de una disolución efectiva.

**Tabla 23. Cinética disolución hierro para prueba de oxidación química a mayor escala**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Porcentaje disolución hierro (%)</b>
1	6,66 ± 0,30
2	6,94 ± 0,18
3	6,69 ± 1,02
4	7,13 ± 0,56
5	7,24 ± 0,71

Figura 30. Porcentaje disolución oro mineral oxidado químicamente.



Si bien el proceso de oxidación química muestra ventajas importantes en términos cinéticos sobre la biooxidación, esta última mostró potencial de ser un proceso eficaz en el pretratamiento al mineral aurífero refractario de estudio, teniendo como resultados la posibilidad de usar cepas de referencia con la capacidad de adaptarse al mineral en un proceso eficaz y ambientalmente favorable. Las desventajas asociadas a los largos tiempos de residencia pueden compensarse a partir de diferentes estrategias ingenieriles a gran escala, como lo pueden ser circuitos de arreglos en serie o en paralelo como se ha demostrado en aplicaciones reales que ha mostrado tiempos de residencia inferiores a los 7 días [78].

## 5. CONCLUSIONES

El mineral 2 se seleccionó sobre el mineral 1 como mineral aurífero de estudio al presentar un mayor grado de refractariedad a la cianuración (75% y 84% de disolución máxima de oro, respectivamente). La refractariedad en la muestra seleccionada se asoció a la presencia de pirita como principal fase sulfurada y la posible existencia de partículas submicroscópicas de oro.

Dentro de un grupo de 21 cepas acidófilas, *A. ferrooxidans* DSMZ 14882, *L. ferrooxidans* DSMZ 2705 y *A. thiooxidans* DSMZ 504 tuvieron la mejor respuesta a la adición del mineral 2 al medio de cultivo, La adaptación permitió una mayor tolerancia de las cepas al mineral, representada en densidades celulares similares o superiores a las obtenidas con el medio T&K sin modificar, así como con valores más altos en hierro, sulfato y acidez en el medio.

El consorcio conformado por las tres bacterias fue la condición que generó el mayor grado de biooxidación en el mineral, presentando valores superiores tanto en términos de disolución y oxidación de hierro como también en formación de sulfato. Las demás condiciones generaron valores menores en alguno de los dos productos de la biooxidación; en el caso de F, L y FL la oxidación y disolución de hierro fue superior, pero con valores de sulfato muy inferiores a los logrados por T, TL y FT que a su vez no tuvieron tasas de disolución y oxidación de hierro remarcables.

El efecto del pH inicial no tuvo una tendencia general para todas las combinaciones bacterianas probadas. Para las combinaciones TL y FT tuvo un efecto positivo teniendo en cuenta que el pH inicial 2,0 favoreció la disolución-oxidación de hierro y formación de sulfato. En el caso de las combinaciones F y T el efecto fue negativo, mientras que tuvo signos opuestos para ambas variables en el caso de L, FL y FTL.

La biooxidación del mineral de estudio no mostró inhibiciones con las concentraciones y tamaños de partícula usados, sin embargo un menor tamaño de partícula favoreció el desarrollo de la biooxidación, indicando la existencia de una mayor área superficial disponible para la acción de los microorganismos. Aunque a 150 g L<sup>-1</sup> de mineral no se alcanzaron los mismo porcentajes de disolución que a 100 g L<sup>-1</sup>, sí se obtuvieron productividades volumétricas similares, indicando que esta concentración en una aplicación real permitiría procesar una mayor cantidad de mineral con similares velocidades de biooxidación.

La biooxidación del mineral como pretratamiento a la cianuración favoreció la disolución de oro y plata, aumentando los valores desde 75% a 93% y desde 68% hasta 99% respectivamente, indicando de esta manera que la refractariedad de este mineral está fuertemente relacionada con la presencia de las fases sulfuradas disueltas. Así mismo se identificó que el tratamiento oxidativo bacteriano a pesar de tener una cinética más lenta que la obtenida con la oxidación fuerte con peróxido de hidrógeno, puede representar valores de disolución de oro similares ~93% en ambos casos.

## 6. RECOMENDACIONES

Evaluar el uso de la biooxidación mediante arreglos de percolación, en procura de identificar las diferencias en los tiempos requeridos respecto a ensayos en tanques agitados para alcanzar tasas de biooxidación similares

Desarrollar estudios económicos que permita determinar la viabilidad económica de un proceso que vincule la biooxidación como pretratamiento a la cianuración

Aplicar un tamizado bacteriano a drenajes ácidos u otras fuentes potenciales de bacterias acidófilas con el propósito de aislar cepas nativas en las que se pueda estudiar el potencial de aplicación en la biooxidación

Implementar estudios a mayor escala que aporten en la búsqueda de generar una aplicación industrial de la biooxidación como pretratamiento a la cianuración con minerales propios de la región Vetas California Santander.

## REFERENCIAS

- [1] Shedbalkar, U., Singh, R., Wadhvani, S., Gaidhani, S., & Chopade, B. A. (2014). Microbial synthesis of gold nanoparticles : Current status and future prospects. *Advances in Colloid and Interface Science*. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.011>
- [2] Street, L., & Grubb, M. (2014). Gold Demand Trends Second quarter 2014.
- [3] Amankwah, R. K. (2005). A two-stage bacterial pretreatment process for double refractory gold ores, 18, 103–108. <http://doi.org/10.1016/j.mineng.2004.05.009>
- [4] Watling, H. R. (2006). The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides — A review. *Hydrometallurgy*, 84(1-2), 81–108. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.05.001>
- [5] Ciftci, H., & Akcil, a. (2013). Biohydrometallurgy in Turkish gold mining: First shake flask and bioreactor studies. *Minerals Engineering*, 46-47, 25–33. <http://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.03.020>
- [6] Lee, J., Acar, S., Doerr, D. L., & Brierley, J. a. (2011). Comparative bioleaching and mineralogy of composited sulfide ores containing enargite, covellite and chalcocite by mesophilic and thermophilic microorganisms. *Hydrometallurgy*, 105(3-4), 213–221. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.10.001>
- [7] Godoy, M., Farr, G., McKittrick, R., & Engels, J. (2012). Updated Preliminary Economic Assesment on the Angostura Gold-Silver Underground Project, Santander Department, Colombia.
- [8] Diaz Salazar, L. A., & Guerrero Arias, M. (2006). Asociaciones mineralógicas de las menas auroargentíferas y su distribución espacial en el yacimiento Angostura (California, Santander). Universidad Industrial de Santander.
- [9] Mathur, R., Ruiz, J., Herb, P., Hahn, L., & Burgath, K. P. (2003). Re-Os isotopes applied to the epithermal gold deposits near Bucaramanga, northeastern Colombia. *Journal of South American Earth Sciences*, 15, 815–821. [http://doi.org/10.1016/S0895-9811\(02\)00126-8](http://doi.org/10.1016/S0895-9811(02)00126-8)

[10]Delgado, O., & Mendoza, A. (2006). *Activación con molienda mecánica como pretratamiento en la cianuración de minerales refractarios de oro*. Universidad Industrial de Santander.

[11]Mendoza, O. (2005). Evaluación voltamétrica de la disolución de oro y de plata en la cianuración intensiva de concentrados auroargentíferos refractarios, en presencia de catalizadores e inhibidores. Universidad Industrial de Santander.

[12]Carrillo, M. (2013). Estudio comparativo de la lixiviación de dos minerales auroargentíferos (oxidado y sulfurado) con cianuro y tiourea. Universidad Industrial de Santander.

[13]Serrano, J. D., & Cruz, A. F. (2013). Lixiviación con tiosulfato de minerales auroargentíferos santandereanos como método alternativo a la cianuración. Universidad Industrial de Santander.

[14]Bueno, Y., & Duran, M. (2011). Estudio cinético de la tostación clorurante de un mineral aurífero refractario de California (santander). Universidad Industrial de Santander.

[15]Kaksonen, A. H., Madhu, B., & Hackl, R. (2014). Hydrometallurgy The role of microorganisms in gold processing and recovery — A review. *Hydrometallurgy*, 142, 70–83. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2013.11.008>

[16]Syed, S. (2012). Hydrometallurgy Recovery of gold from secondary sources — A review. *Hydrometallurgy*, 115-116, 30–51. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2011.12.012>

[17]U.S. Environmental Protection Agency. (1994). Extraction and beneficiation of ores and minerals (Gold). Washington.

[18]Hurlbut, C.S., & Klein, C. (after James D. Dana) (1997). *Manual of mineralogy* John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., 19th ed.

[19]Lavigne, J. G., & McMonnies, E. E. (2012). Technical report on the Vetas Gold Project, Department of Santander (Vol. 1). Toronto.

[20]Ardila, J. D. (2013). Mejoramiento de la recuperación metalúrgica de concentrado aurífero en la sociedad minera La Elsy Ltda., del municipio de Vetas, Departamento de Santander. Universidad Industrial de Santander.

[21]Kelly, E. G., & Spottiswood, D. J. (1990). Introducción al procesamiento de minerales. Limusa, México

[22]Valderrama, L., Santander, M., & Ossandon, J. (2012). Recuperación de oro grueso en concentrador centrífugo knelson, 28, 35–41.

[23]Domic, M., & Esteban, M. (2001). Hidrometalurgia: fundamentos procesos y aplicaciones (1st ed.). Chile: Andos Impresos.

[24]Márquez, M.A. (1995). Caracterização mineralógica do minério, concentrados de flotação e rejeitos da mina de ouro São Bento (Minas Gerais, Brasil). Tesis de maestría, Universidade de Brasília. 232

[25]Robinson, J. (1988). The extraction of gold from sulphidic concentrates by roasting and cyanidation. JS Afr. Inst. Min. Metall., 88(4), 117–130. Retrieved from <http://www.saimm.co.za/Journal/v088n04p117.pdf>

[26]La Brooy, S. R., Linge, H. G., & Walker, G. S. (1994). Review of gold extraction from ores. Minerals Engineering, 7(10), 1213–1241. [http://doi.org/10.1016/0892-6875\(94\)90114-7](http://doi.org/10.1016/0892-6875(94)90114-7)

[27]López, Marla Esperanza. La mineralogía de procesos y su aplicación en la cianuración de minerales auroargentíferos (1999). Universidad Industrial de Santander.

[28]Yannopolis, J.C (1990). Extractive Metallurgy of Gold, New York, VNR.

[29]Rossi, G. (1990). Biohydrometallurgy (McGraw Hil). Hamburg.

[30]G, I, Karavaikote., G, Rossi., A, D, Agate., S, N, Groudev., Z, A, A. (1988). Biogeotechnonology of metals. Moscow: Centre for international Projects of the USSR.

[31]Iglesias, N., & Carranza, F. (1994). Refractory gold-bearing ores: a review of treatment methods and recent advances in biotechnological techniques.

Hydrometallurgy, 34(3), 383–395. [http://doi.org/10.1016/0304-386X\(94\)90074-4](http://doi.org/10.1016/0304-386X(94)90074-4)

[32]SGS. (2012). Recovering refractory resources. Mining Magazine, 204(6), 148–160.

[33]Kontopoulos, A. and Stefanakis, M. ( 1988 ), Process selection for the Olympias refractory gold concentrate. In: M.C. Jha and S.D. Hill (Eds.), Precious Metals'89. TMS pp. 179-209.

[34]Nunan, T., Viana, I., Peixoto, G., Ernesto, H., & Verster, M. (2015). Improvements in Gold-Ore Cyanidation through Pre- Oxidation with Hydrogen Peroxide. In Hydroprocesses (pp. 1–11).

[35]VanAswegen PC, vanNiekerk J, Olivier W. (2007). The BIOX process for the treatment of refractory gold concentrates. Biomining. 1-33.

[36]Wolff, E. (2005). Beneficiar Minerales Auríferos En La Pequeña Minería De Vetas Y California ( Santander ) Buscando Reducir Vertimientos De Mercurio Y Cianuro . Bucaramanga.

[37]Hosseiniabadi D. A (2009). Studies on evaluation and improvement in the bioleaching capabilities of bacterias isolates from mines. Pune: University of Pune.

[38]Olson G. J., Harvey J. Bio-oxidation amenability tests In: Santos LG, Monteiro D, Gomes CE, editors. Biohydrometallurgical processes: A practical approach (2008). Rio de Janeiro: CETEM/MCT; 103-124.

[39]Jonglertjunya, W. (2003). Bioleaching of chalcopyrite. University of Birmingham.

[40]Schippers, A., & Sand, W. (1999). Bacterial Leaching of Metal Sulfides Proceeds by Two Indirect Mechanisms via Thiosulfate or via Polysulfides and Sulfur, 65(1), 319–321.

[41]Sand W, Gehrke T, Jozsa P-G, Schippers A. (2001). (Bio)chemistry of bacterial leaching direct vs. indirect bioleaching. Hydrometallurgy. 2001; 59:159-75.

- [42] Li, B., Lin, J., Mi, S., Lin, J (2010). Arsenic Resistance operon structure in *Leptospirillum ferriphilum* and proteomic response to arsenic stress. *Bioresour Technol.* 101:98-114.
- [43] Márquez, M., Gaspar, J., Bessler, K. E., & Magela, G. (2006). Process mineralogy of bacterial oxidized gold ore in São Bento Mine ( Brasil ), 83, 114–123. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.03.045>
- [44] Wei, Y., Zhongs, K., Adamovt, E. V, & Smith, R. W. (1997). SEMI-CONTINUOUS BIOOXIDATION OF THE CHONGYANG REFRACTORY GOLD ORE, 10(6), 577–583.
- [45] Climo, M., Watling, H. R., & Van Bronswuk, W. (2000). Biooxidation as pre-treatment for a telluride-rich refractory gold concentrate. *Minerals Engineering*, 13(12), 1219–1229.
- [46] Deng, T., & Liao, M. (2002). Gold recovery enhancement from a refractory flotation concentrate by sequential bioleaching and thiourea leach, 63, 249–255.
- [47] Colmer, A. R., & Hinkel, M. E. (1947). The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. *Science*. 1947; 106:253–56.
- [48] Norris, P. R. (1990). Acidophilic Bacteria and their activity in mineral sulfide oxidation, in Ehrlich, H. L. and Brierley, C. L. (eds.) *Microbial Mineral Recovery*. New York: Mc Graw-Hill.
- [49] Vian, M., Creo, C., Dalmastrri, C., Gionni, A., Palazzolo, P. & Levi, G. (1986). *Thiobacillus ferrooxidans* selection in continuous culture. In *Fundamental and Applied Biohydrometallurgy*. ed. RW Lawrence, RMR Branion, HGEbner, pp. 395–406.
- [50] Leduce, L.G., Ferroni, G.D. (1994). The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMSMicrobiol. Rev.* 14:103– 20.
- [51] Pronk, J. T., Liem, K., Bos, P., & Kuenen, J. G. (1991). Energy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(7), 2063–2068.
- [52] Sun, L.-X., Zhang, X., Tan, W.-S., & Zhu, M.-L. (2012). Effects of dissolved oxygen on the biooxidation process of refractory gold ores. *Journal of*

Bioscience and Bioengineering, 114(5), 531–6.  
<http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.06.004>

[53] Sun, L.-X., Zhang, X., Tan, W.-S., & Zhu, M.-L. (2012a). Effect of agitation intensity on the biooxidation process of refractory gold ores by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 127-128(3), 99–103.  
<http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2012.07.007>

[54] Schippers, A., Nagy, A. a., Kock, D., Melcher, F., & Gock, E.-D. (2008). The use of FISH and real-time PCR to monitor the biooxidation and cyanidation for gold and silver recovery from a mine tailings concentrate (Ticapampa, Peru). *Hydrometallurgy*, 94(1-4), 77–81.  
<http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.05.022>

[55] Petersen, J., & Dixon, D. G. (2006). Competitive bioleaching of pyrite and chalcopyrite. *Hydrometallurgy*, 83(1-4), 40–49.  
<http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.03.036>

[56] Ciftci, H., & Akcil, a. (2010). Effect of biooxidation conditions on cyanide consumption and gold recovery from a refractory gold concentrate. *Hydrometallurgy*, 104(2), 142–149.  
<http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.05.010>

[57] Bevilaqua, D., Leite, A. L. L. C., Garcia, O., & Tuovinen, O. H. (2002). Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks, 38, 587–592.

[58] Marchevsky, N., Urbietta, M. S., Bernardelli, C., Mas, M., & Donati, E. R. (2015). Zinc recovery during refractory ore biooxidation by an indigenous consortium. *International Journal of Mineral Processing*, 138, 30–37.  
<http://doi.org/10.1016/j.minpro.2015.03.009>

[59] Mejía, E., Ospina, J. D., Osorno, B. L., Márquez, M. A., & Morales, A. L. (2011). Adaptación de una cepa compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre concentrados de calcopirita (  $\text{CuFeS}_2$  ), esfalerita (  $\text{ZnS}$  ) y galena (  $\text{PbS}$  ) Adaptation of a strain *Acidithiobacillus ferrooxidans* compatible on concentrates of chalcopyrite (  $\text{CuFeS}_2$  ), XIII(1).

[60] Soto, P. E., Galleguillos, P. a., Serón, M. a., Zepeda, V. J., Demergasso, C. S., & Pinilla, C. (2013). Parameters influencing the microbial oxidation activity in the industrial bioleaching heap at Escondida mine, Chile. *Hydrometallurgy*, 133, 51–57. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2012.11.011>

- [61] 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(3-4), 385–396. [http://doi.org/10.1016/S0304-386X\(03\)00112-9](http://doi.org/10.1016/S0304-386X(03)00112-9)
- [62] Sun, L.-X., Zhang, X., Tan, W.-S., & Zhu, M.-L. (2012b). Effects of dissolved oxygen on the biooxidation process of refractory gold ores. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(5), 531–6. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.06.004>
- [63] Márquez, M. A., Ospina, J. D., & Morales, A. L. (2012). New insights about the bacterial oxidation of arsenopyrite: A mineralogical scope, 39, 248–254. <http://doi.org/10.1016/j.mineng.2012.06.012>
- [64] Ahonen, L., Tuovinen, O.H. (1995) Bacterial leaching of complex sulfide ore samples in -scale column reactors. *Hydrometallurgy*. 37, 1-21.
- [65] Hiroyoshi, N., Miki, H., Hirajima, T., Tsunekawa, M. (2001). Enhancement of chalcopyrite leaching by ferrous ions in acidic ferric sulfate solutions. *Hydrometallurgy*. 60: 185-197.
- [66] Hiroyoshi, N., Huroiwi, S., Miki, H., Hirajima, T., Tsunekawa, M. (2007). Effects of coexisting metal ions on the redox potential dependence of chalcopyrite leaching in sulfuric acid solutions. *Hydrometallurgy*. 87: 1-10.
- [67] ASTM C136 - 06 (2006). Standard Test Method for Sieve Analysis of Fine and Coarse Aggregates
- [68] ASTM C1117 - 13 (2013). Standard Test Method for Materials Finer than 75- $\mu\text{m}$  (No. 200) Sieve in Mineral Aggregates by Washing
- [69] ASTM C702/C702M – 11 (2011). Standard Practice for Reducing Samples of Aggregate to Testing Size
- [70] ASTM E 400- 71 (1988). Standard Test Method for spectrographic analysis of ores, minerals and rocks by the fire assay perconcentration technique
- [71] Patiño Pallares, C. A. (2003). Mejoramiento del control químico analítico en la extracción metalúrgica del oro y de la plata en los laboratorios del grupo de investigación en minerales biohidrometalurgia y ambiente UIS. Universidad Industrial de Santander UIS.

[72] Clesceri, L., Greenberg, A., & Eaton, A. (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (American P). Washington.

[73] Lorenzen, L. (1995). Some guidelines to the design of a diagnostic leaching experiment. *Minerals Engineering*, 8(3), 247–256. [http://doi.org/10.1016/0892-6875\(94\)00122-S](http://doi.org/10.1016/0892-6875(94)00122-S)

[74] Tuovinen, O. H., & Kelly, D. P. (1973). Studies on the Growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch Microbiol*, 88, 285–298.

[75] Tributsch, H. (2001). Direct versus indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, 59, 177–185. [http://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00181-X](http://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00181-X)

[76] Yen, W., Amankway, R., & Choi, Y. (2009). *Microbial Pre-Treatment of Double Refractory Gold Ores*. Queen's University. Retrieved from <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2009069005>

[77] Gonzalez, R., Gentina, J. C., & 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. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2003.09.007>

[78] Miller, P., & Brown, A. (2005). Bacterial oxidation of refractory gold concentrates, 15(ii). [http://doi.org/10.1016/S0167-4528\(05\)15016-9](http://doi.org/10.1016/S0167-4528(05)15016-9)

[79] H. W. van der Marcel and H. Beutelspacher. (1976). *Atlas of infrared spectroscopy of clay minerals and their admixtures*. Amsterdam: Elsevier scientific publishing company.

[80] Mansoor, F. N. (2009). Study of ability and role of native bacteria on the bioleaching of zing and optimization growth conditions. University of Pune.

[81] Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P. R., & Bond, P. L. (2003). Growth in sulfidic mineral environments: Metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology*, 149(8), 1959–1970. <http://doi.org/10.1099/mic.0.26296-0>

[82] Kaksonen, A. H., Perrot, F., Morris, C., Rea, S., Benvie, B., Austin, P., & Hackl, R. (2014). Evaluation of submerged bio-oxidation concept for refractory gold ores. *Hydrometallurgy*, 141, 117–125. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2013.10.012>

[83] Battaglia-Brunet, F., D'Hugues, P., Cabral, T., Cezac, P., Garcia, J. L., & Morin, D. (1998). The mutual effect of mixed thiobacilli and leptospirilli populations on pyrite bioleaching. *Battaglia-brunet°, p. D'hugues°, t. Cabral°, p. Cezac~, j. L. Gar.* Minerals Engineering, 11(2), 195–205.

[84] Plumb, J. J., Muddle, R., & Franzmann, P. D. (2008). Effect of pH on rates of iron and sulfur oxidation by bioleaching organisms, 21, 76–82. <http://doi.org/10.1016/j.mineng.2007.08.018>

[85] Liu, H., Gu, G., & Xu, Y. (2011). Hydrometallurgy Surface properties of pyrite in the course of bioleaching by pure culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and a mixed culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Hydrometallurgy*, 108(1-2), 143–148. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2011.03.010>

[86] McDonald, R. G., & Whittington, B. I. (2008). Atmospheric acid leaching of nickel laterites review. Part II. Chloride and bio-technologies. *Hydrometallurgy*, 91, 56–69. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2007.11.010>

[87] Bayliss, P., Kolitsch, U., Nickel, E. H., & Pring, a. (2010). Alunite supergroup: recommended nomenclature. *Mineralogical Magazine*, 74(October), 919–927. <http://doi.org/10.1180/minmag.2010.074.5.919>

[88] Oliveira, D., M. & Santos-Sobral L., G. (2010). *Biolixiviação: Utilização de Micro-organismos na Extração de Metais.* – Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 40p. (Série Tecnologia Ambiental, n.53)

[89] Haghshenas, D. F., Alamdari, E. K., Torkmahalleh, M. A., Bonakdarpour, B., & Nasernejad, B. (2009). Adaptation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to high grade sphalerite concentrate. *Minerals Engineering*, 22(15), 1299–1306. <http://doi.org/10.1016/j.mineng.2009.07.011>

[90] Akcil, A. (2007). Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcopyrite concentrate, 20, 310–318. <http://doi.org/10.1016/j.mineng.2006.10.016>

[91] Loayza, C., Yupanqui, R., & Roman, G. (1999). Laboratory Biooxidation Tests of Arsenopyrite Concentrate for the Tamboraque Industrial Plant. In *International biohydrometallurgy Symposium* (pp. 405–410).

[92]Doran, P. M. (1995). Bioprocess engineering principles Pauline. Elsevirer science & Technology Books (Vol. 9). [http://doi.org/10.1016/S0892-6875\(96\)90075-8](http://doi.org/10.1016/S0892-6875(96)90075-8)

[93]Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). Brock Biología de los Microorganismos. México: Person Prentice Hall.

[94]Rossi, G. (2001). The design of bioreactors. Hydrometallurgy, 59(2-3), 217–231. [http://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00161-4](http://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00161-4)

[95]Craig, J., Vaughan, D. (1994). Ore microscopy & ore petrography (2nd ed).

## BIBLIOGRAFÍA

**Ahonen, L., Tuovinen, O.H.** (1995) Bacterial leaching of complex sulfide ore samples in -scale column reactors. *Hydrometallurgy*. 37, 1-21.

**Akcil, A.** (2007). Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcopyrite concentrate, 20, 310–318. <http://doi.org/10.1016/j.mineng.2006.10.016>

**Amankwah, R. K.** (2005). A two-stage bacterial pretreatment process for double refractory gold ores, 18, 103–108. <http://doi.org/10.1016/j.mineng.2004.05.009>

**Ardila, J. D.** (2013). Mejoramiento de la recuperación metalúrgica de concentrado aurífero en la sociedad minera La Elsy Ltda., del municipio de Vetas, Departamento de Santander. Universidad Industrial de Santander.

**ASTM C1117** - 13 Standard Test Method for Materials Finer than 75- $\mu\text{m}$  (No. 200) Sieve in Mineral Aggregates by Washing. 2013

**ASTM C136** - 06 Standard Test Method for Sieve Analysis of Fine and Coarse Aggregates. 2006

**ASTM C702/C702M** – 11 Standard Practice for Reducing Samples of Aggregate to Testing Size. 2011

**ASTM E 400**-71 Standard Test Method for spectrographic analysis of ores, minerals and rocks by the fire assay perconcentration technique. 1988

**Battaglia-Brunet, F., D'Hugues, P., Cabral, T., Cezac, P., Garcia, J. L., & Morin, D.** (1998). The mutual effect of mixed thiobacilli and leptospirilli populations on pyrite bioleaching f . B a t r a g l i a - b r u n e t ° , p . D ' h u g u e s ° , t . C a b r a l ° , p . C e z a c ~ , j . L . G a r . *Minerals Engineering*, 11(2), 195–205.

**Bayliss, P., Kolitsch, U., Nickel, E. H., & Pring, a.** (2010). Alunite supergroup: recommended nomenclature. *Mineralogical Magazine*, 74(October), 919–927. <http://doi.org/10.1180/minmag.2010.074.5.919>

**Bevilaqua**, D., Leite, A. L. L. C., Garcia, O., & Tuovinen, O. H. (2002). Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks, 38, 587–592.

**Bueno**, Y., & Duran, M. (2011). Estudio cinético de la tostación clorurante de un mineral aurífero refractario de California (santander). Universidad Industrial de Santander.

**Carrillo**, M. (2013). Estudio comparativo de la lixiviación de dos minerales auroargentíferos (oxidado y sulfurado) con cianuro y tiourea. Universidad industrial de Santander

**Ciftci**, H., & Akcil, a. (2010). Effect of biooxidation conditions on cyanide consumption and gold recovery from a refractory gold concentrate. *Hydrometallurgy*, 104(2), 142–149. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.05.010>

**Ciftci**, H., & Akcil, a. (2013). Biohydrometallurgy in Turkish gold mining: First shake flask and bioreactor studies. *Minerals Engineering*, 46-47, 25–33. <http://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.03.020>

**Clesceri**, L., Greenberg, A., & Eaton, A. (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (American P). Washington.

**Climo**, M., Watling, H. R., & Van Bronswuk, W. (2000). Biooxidation as pre-treatment for a telluride-rich refractory gold concentrate. *Minerals Engineering*, 13(12), 1219–1229.

**Colmer**, A. R., & Hinkel, M. E. (1947). The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. *Science*. 1947; 106:253–56.

**Craig**, J., Vaughan, D. (1994) *Ore microscopy & ore petrography* (2nd ed)

**Delgado**, O., & Mendoza, A. (2006). Activación con molienda mecánica como pretratamiento en la cianuración de minerales refractarios de oro. Universidad Industrial de Santander.

**Deng**, T., & Liao, M. (2002). Gold recovery enhancement from a refractory flotation concentrate by sequential bioleaching and thiourea leach, 63, 249–255.

**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(3-4), 385–396. [http://doi.org/10.1016/S0304-386X\(03\)00112-9](http://doi.org/10.1016/S0304-386X(03)00112-9)

**Diaz Salazar, L. A., & Guerrero Arias, M.** (2006). Asociaciones mineralógicas de las menas auroargentíferas y su distribución espacial en el yacimiento Angostura (California, Santander). Universidad Industrial de Santander.

**Domic, M., & Esteban, M.** (2001). *Hidrometalurgia: fundamentos procesos y aplicaciones* (1st ed.). Chile: Andos Impresos.

**Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P. R., & Bond, P. L.** (2003). Growth in sulfidic mineral environments: Metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology*, 149(8), 1959–1970. <http://doi.org/10.1099/mic.0.26296-0>

**Doran, P. M.** (1995). *Bioprocess engineering principles* Pauline. Elsevier science & Technology Books (Vol. 9). [http://doi.org/10.1016/S0892-6875\(96\)90075-8](http://doi.org/10.1016/S0892-6875(96)90075-8)

**G, I, Karavaikote., G, Rossi., A, D, Agate., S, N, Groudev., Z, A, A.** (1988). *Biogeotechnonology of metals*. Moscow: Centre for international Projects of the USSR.

**Godoy, M., Farr, G., McKittrick, R., & Engels, J.** (2012). Updated Preliminary Economic Assesment on the Angostura Gold-Silver Underground Project, Santander Department, Colombia.

**Gonzalez, R., Gentina, J. C., & 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. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2003.09.007>

**H. W. van der Marcel and H. Beutelspacher.** (1976). *Atlas of infrared spectroscopy of clay minerals and their admixtures*. Amsterdam: Elsevier scientific publishing company.

**Haghshenas, D. F., Alamdari, E. K., Torkmahalleh, M. A., Bonakdarpour, B., & Nasernejad, B.** (2009). Adaptation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to high grade sphalerite concentrate. *Minerals Engineering*, 22(15), 1299–1306. <http://doi.org/10.1016/j.mineng.2009.07.011>

**Hiroyoshi**, N., Huroiwi, S., Miki, H., Hirajima, T., Tsunekawa, M. (2007). Effects of coexisting metal ions on the redox potential dependence of chalcopryrite leaching in sulfuric acid solutions. *Hydrometallurgy*. 87: 1-10.

**Hiroyoshi**, N., Miki, H., Hirajima, T., Tsunekawa, M. (2001). Enhancement of chalcopryrite leaching by ferrous ions in acidic ferric sulfate solutions. *Hydrometallurgy*. 60: 185-197.

**Hosseinabadi** DA. Studies on evaluation and improvement in the bioleaching capabilities of bacterias isolates from mines. Pune: University of Pune; 2009.

**Hurlbut**, C.S., & Klein, C. (after James D. Dana) (1997). *Manual of mineralogy* John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., 19th ed.

**Iglesias**, N., & Carranza, F. (1994). Refractory gold-bearing ores: a review of treatment methods and recent advances in biotechnological techniques. *Hydrometallurgy*, 34(3), 383–395. [http://doi.org/10.1016/0304-386X\(94\)90074-4](http://doi.org/10.1016/0304-386X(94)90074-4)

**Jonglertjunya**, W. (2003). *Bioleaching of chalcopryrite*. University of Birmingham.

**Kaksonen**, A. H., Madhu, B., & Hackl, R. (2014). Hydrometallurgy The role of microorganisms in gold processing and recovery — A review. *Hydrometallurgy*, 142, 70–83. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2013.11.008>

**Kaksonen**, A. H., Perrot, F., Morris, C., Rea, S., Benvie, B., Austin, P., & Hackl, R. (2014). Evaluation of submerged bio-oxidation concept for refractory gold ores. *Hydrometallurgy*, 141, 117–125. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2013.10.012>

**Kelly**, E. G., & Spottiswood, D. J. (1990). *Introducción al procesamiento de minerales*. Limusa, México

**Kontopoulos**, A. and Stefanakis, M., Process selection for the Olympias refractory gold concentrate. In: M.C. Jha and S.D. Hill (Eds.), *Precious Metals'89*. TMS ( 1988 ), pp. 179- 209.

**La Brooy**, S. R., Linge, H. G., & Walker, G. S. (1994). Review of gold extraction from ores. *Minerals Engineering*,7(10), 1213–1241.[http://doi.org/10.1016/0892-6875\(94\)90114-7](http://doi.org/10.1016/0892-6875(94)90114-7)

**Lavigne**, J. G., & McMonnies, E. E. (2012). Technical report on the Vetas Gold Project, Department of Santander (Vol. 1). Toronto.

**Leduce**, L.G., Ferroni, G.D. (1994). The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMSMicrobiol. Rev.* 14:103– 20.

**Lee**, J., Acar, S., Doerr, D. L., & Brierley, J. a. (2011). Comparative bioleaching and mineralogy of composited sulfide ores containing enargite, covellite and chalcocite by mesophilic and thermophilic microorganisms. *Hydrometallurgy*, 105(3-4), 213–221. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.10.001>

**Li**, B., Lin, J., Mi, S., Lin, J (2010). Arsenic Resistance operon structure in *Leptospirillum ferriphilum* and proteomic response to arsenic stress. *Bioresour Technol.* 101:98-114.

**Liu**, H., Gu, G., & Xu, Y. (2011). *Hydrometallurgy* Surface properties of pyrite in the course of bioleaching by pure culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and a mixed culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Hydrometallurgy*, 108(1-2), 143–148. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2011.03.010>

**Loayza**, C., Yupanqui, R., & Roman, G. (1999). Laboratory Biooxidation Tests of Arsenopyrite Concentrate for the Tamboraque Industrial Plant. In *International biohydrometallurgy Symposium* (pp. 405–410).

**López**, Marla Esperanza. *La mineralogía de procesos y su aplicación en la cianuración de minerales auroargentíferos* (1999). Universidad Industrial de Santander.

**Lorenzen**, L. (1995). Some guidelines to the design of a diagnostic leaching experiment. *Minerals Engineering*, 8(3), 247–256. [http://doi.org/10.1016/0892-6875\(94\)00122-S](http://doi.org/10.1016/0892-6875(94)00122-S)

**Madigan**, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). *Brock Biología de los Microorganismos*. México: Person Prentice Hall.

**Mansoor**, F. N. (2009). Study of ability and role of native bacteria on the bioleaching of zing and optimization growth conditions. University of Pune.

**Marchevsky**, N., Urbieta, M. S., Bernardelli, C., Mas, M., & Donati, E. R. (2015). Zinc recovery during refractory ore biooxidation by an indigenous

consortium. *International Journal of Mineral Processing*, 138, 30–37. <http://doi.org/10.1016/j.minpro.2015.03.009>

**Márquez**, M. A., Ospina, J. D., & Morales, A. L. (2012). New insights about the bacterial oxidation of arsenopyrite: A mineralogical scope, 39, 248–254. <http://doi.org/10.1016/j.mineng.2012.06.012>

**Márquez**, M., Gaspar, J., Bessler, K. E., & Magela, G. (2006). Process mineralogy of bacterial oxidized gold ore in São Bento Mine ( Brasil ), 83, 114–123. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.03.045>

**Márquez**, M.A., 1995. Caracterização mineralógica do minério, concentrados de flotação e rejeitos da mina de ouro São Bento (Minas Gerais, Brasil). Tesis de maestría, Universidade de Brasilia. 232

**Mathur**, R., Ruiz, J., Herb, P., Hahn, L., & Burgath, K. P. (2003). Re-Os isotopes applied to the epithermal gold deposits near Bucaramanga, northeastern Colombia. *Journal of South American Earth Sciences*, 15, 815–821. [http://doi.org/10.1016/S0895-9811\(02\)00126-8](http://doi.org/10.1016/S0895-9811(02)00126-8)

**McDonald**, R. G., & Whittington, B. I. (2008). Atmospheric acid leaching of nickel laterites review. Part II. Chloride and bio-technologies. *Hydrometallurgy*, 91, 56–69. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2007.11.010>

**Mejía**, E., Ospina, J. D., Osorno, B. L., Márquez, M. A., & Morales, A. L. (2011). Adaptación de una cepa compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre concentrados de calcopirita (  $\text{CuFeS}_2$  ), esfalerita (  $\text{ZnS}$  ) y galena (  $\text{PbS}$  ) Adaptation of a strain *Acidithiobacillus ferrooxidans* compatible on concentrates of chalcopyrite (  $\text{CuFe}$ , XIII(1).

**Mendoza**, O. (2005). Evaluación voltamétrica de la disolución de oro y de plata en la cianuración intensiva de concentrados auroargentíferos refractarios, en presencia de catalizadores e inhibidores. Universidad Industrial de Santander.

**Miller**, P., & Brown, A. (2005). Bacterial oxidation of refractory gold concentrates, 15(ii). [http://doi.org/10.1016/S0167-4528\(05\)15016-9](http://doi.org/10.1016/S0167-4528(05)15016-9)

**Norris**, P. R. (1990). Acidophilic Bacteria and their activity in mineral sulfide oxidation, in Ehrlich, H. L. and Brierley, C. L. (eds.) *Microbial Mineral Recovery*. New York: Mc Graw-Hill.

**Nunan**, T., Viana, I., Peixoto, G., Ernesto, H., & Verster, M. (2015). Improvements in Gold-Ore Cyanidation through Pre- Oxidation with Hydrogen Peroxide. In *Hydroprocesses* (pp. 1–11).

**Oliveira**, D., M. & Santos-Sobral L., G. (2010). *Biolixiviação: Utilização de Micro-organismos na Extração de Metais.* – Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 40p. (Série Tecnologia Ambiental, n.53)

**Olson** GJ, Harvey J. Bio-oxidation amenability tests In: Santos LG, Monteiro D, Gomes CE, editors. *Biohydrometallurgical processes: A practical approach* (2008). Rio de Janeiro: CETEM/MCT; 103-124.

**Patiño** Pallares, C. A. (2003). Mejoramiento del control químico analítico en la extracción metalúrgica del oro y de la plata en los laboratorios del grupo de investigación en minerales biohidrometalurgia y ambiente UIS. Universidad Industrial de Santander UIS.

**Petersen**, J., & Dixon, D. G. (2006). Competitive bioleaching of pyrite and chalcopyrite. *Hydrometallurgy*, 83(1-4), 40–49. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.03.036>

**Plumb**, J. J., Muddle, R., & Franzmann, P. D. (2008). Effect of pH on rates of iron and sulfur oxidation by bioleaching organisms, 21, 76–82. <http://doi.org/10.1016/j.mineng.2007.08.018>

**Pronk**, J. T., Liem, K., Bos, P., & Kuenen, J. G. (1991). Energy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(7), 2063–2068.

**Robinson**, J. (1988). The extraction of gold from sulphidic concentrates by roasting and cyanidation. *JS Afr. Inst. Min. Metall.*, 88(4), 117–130. Retrieved from <http://www.saimm.co.za/Journal/v088n04p117.pdf>

**Rossi**, G. (1990). *Biohydrometallurgy* (McGraw Hill). Hamburg.

**Rossi**, G. (2001). The design of bioreactors. *Hydrometallurgy*, 59(2-3), 217–231. [http://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00161-4](http://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00161-4)

**Sand** W, Gehrke T, Jozsa P-G, Schippers A. (2001). (Bio)chemistry of bacterial leaching direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*. 2001; 59:159-75.

**Schippers, A., & Sand, W. (1999).** Bacterial Leaching of Metal Sulfides Proceeds by Two Indirect Mechanisms via Thiosulfate or via Polysulfides and Sulfur, 65(1), 319–321.

**Schippers, A., Nagy, A. a., Kock, D., Melcher, F., & Gock, E.-D. (2008).** The use of FISH and real-time PCR to monitor the biooxidation and cyanidation for gold and silver recovery from a mine tailings concentrate (Ticapampa, Peru). *Hydrometallurgy*, 94(1-4), 77–81. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.05.022>

**Serrano, J. D., & Cruz, A. F. (2013).** Lixiviación con tiosulfato de minerales auroargentíferos santandereanos como método alternativo a la cianuración. Universidad Industrial de Santander.

**SGS. (2012).** Recovering refractory resources. *Mining Magazine*, 204(6), 148–160.

**Shedbalkar, U., Singh, R., Wadhvani, S., Gaidhani, S., & Chopade, B. A. (2014).** Microbial synthesis of gold nanoparticles : Current status and future prospects. *Advances in Colloid and Interface Science*. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.011>

**Soto, P. E., Galleguillos, P. a., Serón, M. a., Zepeda, V. J., Demergasso, C. S., & Pinilla, C. (2013).** Parameters influencing the microbial oxidation activity in the industrial bioleaching heap at Escondida mine, Chile. *Hydrometallurgy*, 133, 51–57. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2012.11.011>

**Street, L., & Grubb, M. (2014).** Gold Demand Trends Second quarter 2014.

**Sun, L.-X., Zhang, X., Tan, W.-S., & Zhu, M.-L. (2012).** Effects of dissolved oxygen on the biooxidation process of refractory gold ores. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(5), 531–6. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.06.004>

**Sun, L.-X., Zhang, X., Tan, W.-S., & Zhu, M.-L. (2012a).** Effect of agitation intensity on the biooxidation process of refractory gold ores by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 127-128(3), 99–103. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2012.07.007>

**Sun, L.-X., Zhang, X., Tan, W.-S., & Zhu, M.-L. (2012b).** Effects of dissolved oxygen on the biooxidation process of refractory gold ores. *Journal of*

Bioscience and Bioengineering, 114(5), 531–6.  
<http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.06.004>

**Syed, S.** (2012). Hydrometallurgy Recovery of gold from secondary sources — A review. *Hydrometallurgy*, 115-116, 30–51.  
<http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2011.12.012>

**Tributsch, H.** (2001). Direct versus indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, 59, 177–185. [http://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00181-X](http://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00181-X)

**Tuovinen, O. H., & Kelly, D. P.** (1973). Studies on the Growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch Microbiol*, 88, 285–298.

**U.S.** Environmental Protection Agency. (1994). Extraction and beneficiation of ores and minerals (Gold). Washington.

**Valderrama, L., Santander, M., & Ossandon, J.** (2012). Recuperación de oro grueso en concentrador centrífugo knelson, 28, 35–41.

**Van Aswegen PC, vanNiekerk J, Olivier W.** (2007). The BIOX process for the treatment of refractory gold concentrates. *Biomining*. 1-33.

**Vian, M., Creo, C., Dalmastrì, C., Giønni, A., Palazzolo, P. & Levi, G.** (1986). *Thiobacillus ferrooxidans* selection in continuous culture. In *Fundamental and Applied Biohydrometallurgy*. ed. RW Lawrence, RMR Branion, HGEbner, pp. 395–406.

**Watling, H. R.** (2006). The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides — A review. *Hydrometallurgy*, 84(1-2), 81–108.  
<http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.05.001>

**Wei, Y., Zhongs, K., Adamovt, E. V, & Smith, R. W.** (1997). SEMI-CONTINUOUS BIOOXIDATION OF THE CHONGYANG REFRACTORY GOLD ORE, 10(6), 577–583.

**Wolff, E.** (2005). Beneficiar Minerales Auríferos En La Pequeña Minería De Vetas Y California ( Santander ) Buscando Reducir Vertimientos De Mercurio Y Cianuro . Bucaramanga.

**Yannopolis, J.C** (1990). *Extractive Metallurgy of Gold*, New York, VNR.

**Yen, W., Amankway, R., & Choi, Y. (2009).** Microbial Pre-Treatment of Double Refractory Gold Ores. Queen's University. Retrieved from <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2009069005>

## ANEXOS

### ANEXO A. Formulación medio de cultivo T&K

Tabla B1. Formulación medio de cultivo usado durante la investigación

Componente	Concentración
$K_2HPO_4$	0,44 g L <sup>-1</sup>
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,44 g L <sup>-1</sup>
$(NH_4)_2SO_4$	0,44 g L <sup>-1</sup>
$FeSO_4 \cdot 7H_2O^*$	33 g L <sup>-1</sup>
Azufre elemental (S)**	10 g L <sup>-1</sup>

\*La concentración se modificó, disminuyendo los valores has una sustitución total con mineral como fuente de energía después de la adaptación

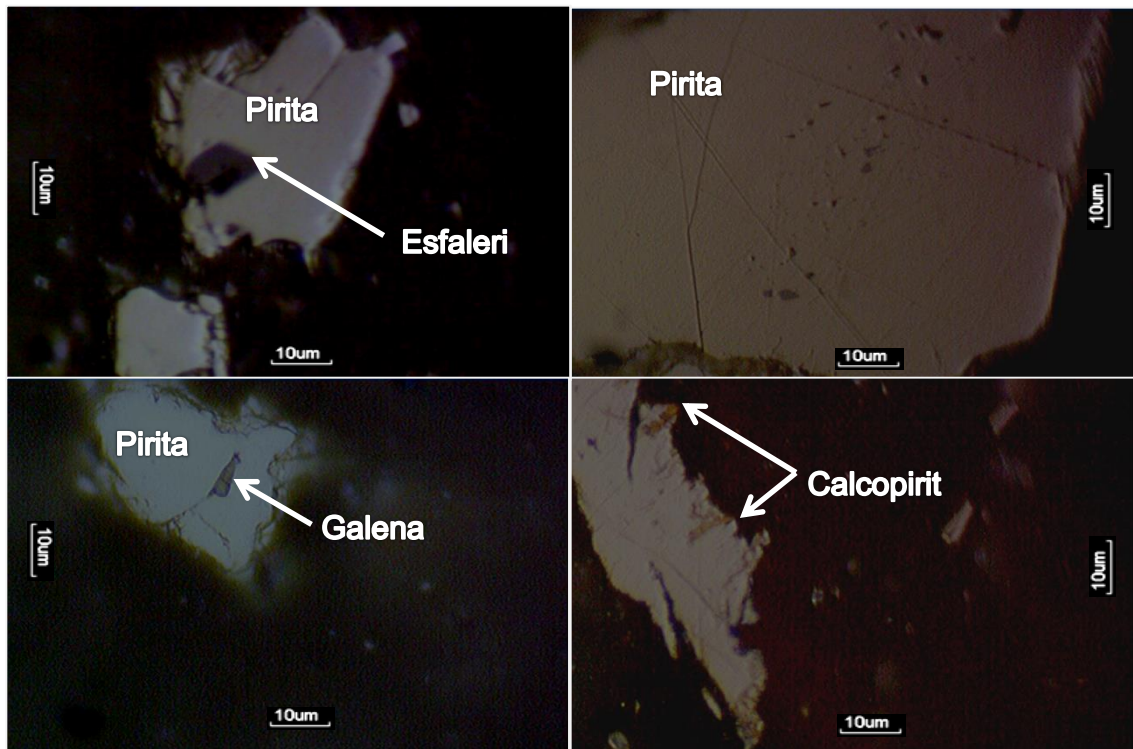
Se adicionó invariablemente para todos los ensayos con *A. thiooxidans*

## **ANEXO B. micrografías MOLPP de secciones pulidas del mineral 2**

Secciones pulidas del mineral 2 (mineral de California) se analizaron usando un microscopio óptico de luz plana polarizada MOLPP BX 41 (Olimpus, Japón), en modo luz reflejada. Las superficies se prepararon a partir de la mezcla de mineral con resina epóxica. Después de un tiempo de secado las secciones se sometieron a un proceso de desbaste con papeles de abrasión de diferente tamaño de grano y un posterior proceso de pulido con líquidos abrasivos (suspensiones de diamante) de diferente tamaño de partícula.

A partir de las observaciones se pudo identificar la pirita como mineral principal con ocurrencia en diferentes tamaños de grano y morfología. Así mismo minerales que mediante análisis de DRX y FTIR no pudieron ser detectados se encontraron con bajo grado de ocurrencia como pequeñas inclusiones o venillas asociadas a los granos de pirita o a la ganga. Las micrografías mostradas en las Figura B1 muestran la presencia de pirita, esfalerita, galena y calcopirita (estos tres últimos en mucho menor proporción), minerales que se pueden distinguir en función de las diferentes coloraciones que generan ante la reflexión de la luz plana polarizada incidente, así: pirita blanco grisáceo, galena gris, esfalerita azul grisáceo y calcopirita amarillo latón [95].

Figura B1. Micrografías sección pulida mineral 2.



**ANEXO C. Perfiles de biooxidación tamizaje 21 cepas acidófilas de referencia**

**Figura C1. Perfiles de biooxidación comparativos (tamizaje bacteriano) entre cepas de la especie *Acidithiobacillus ferrooxidans*.**

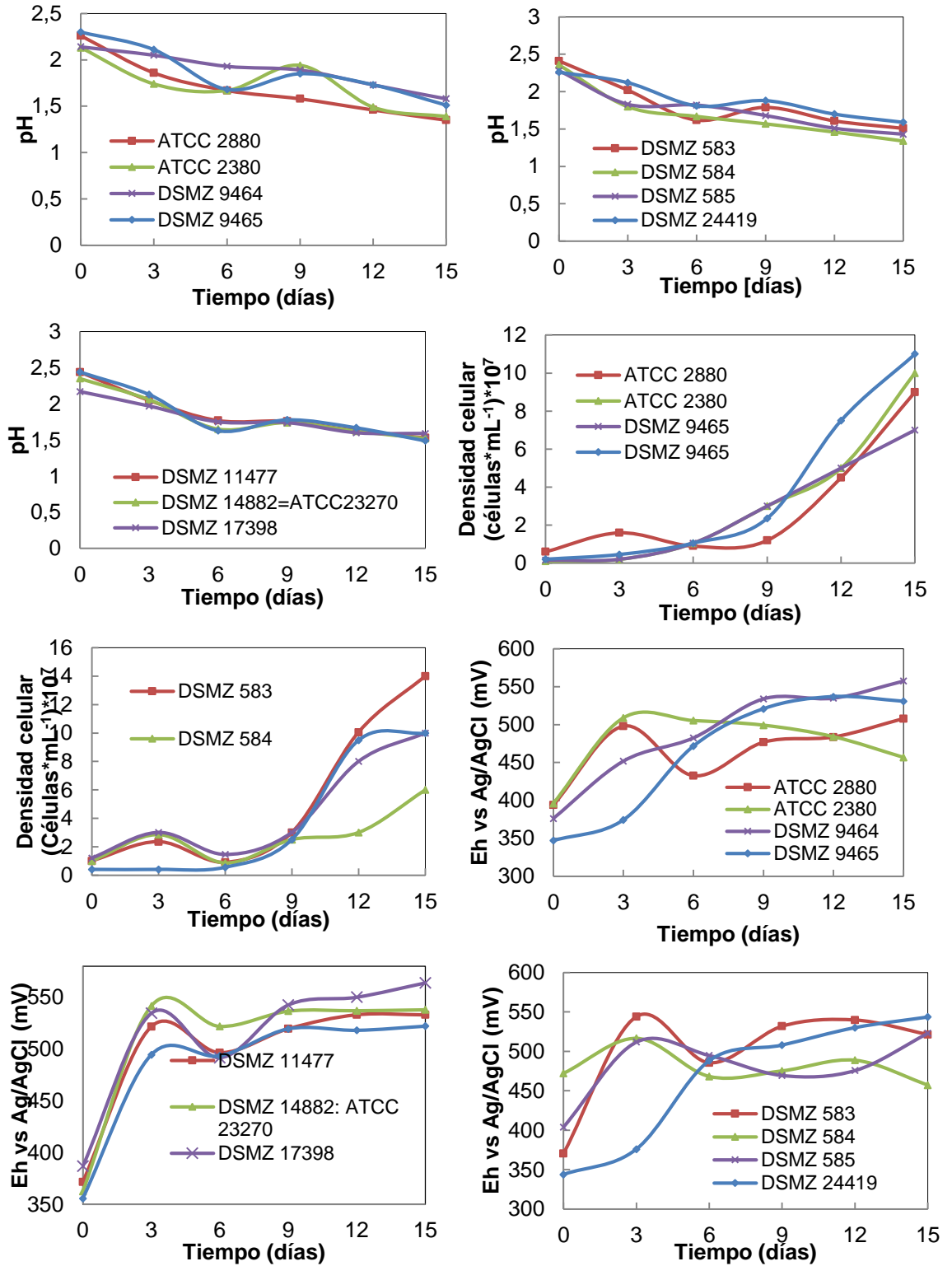
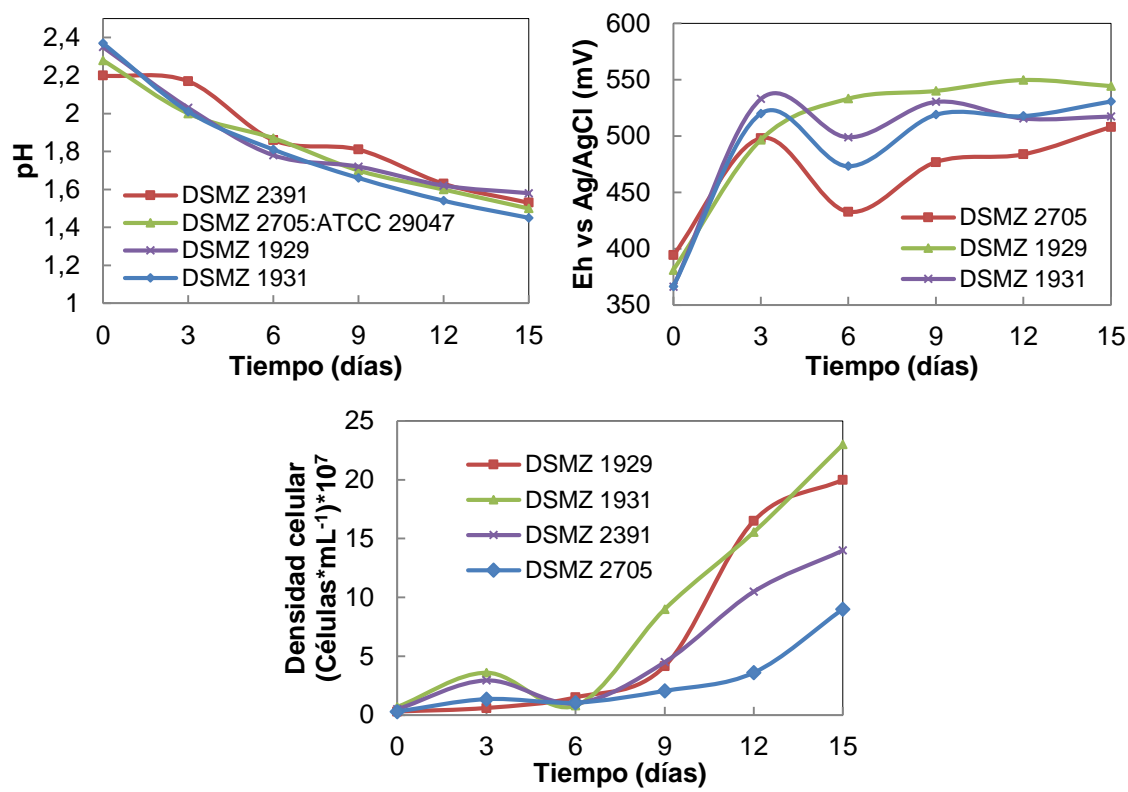
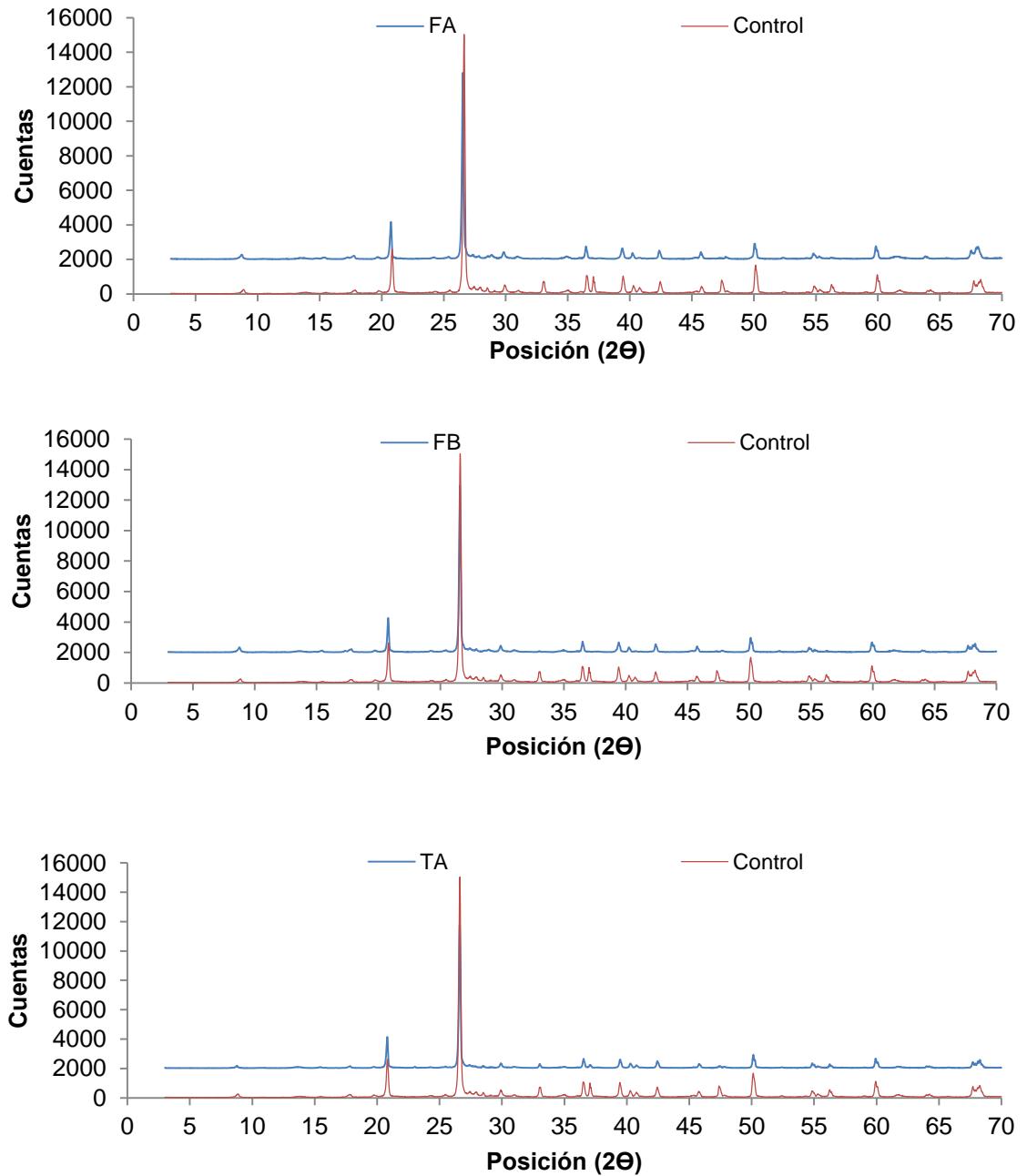


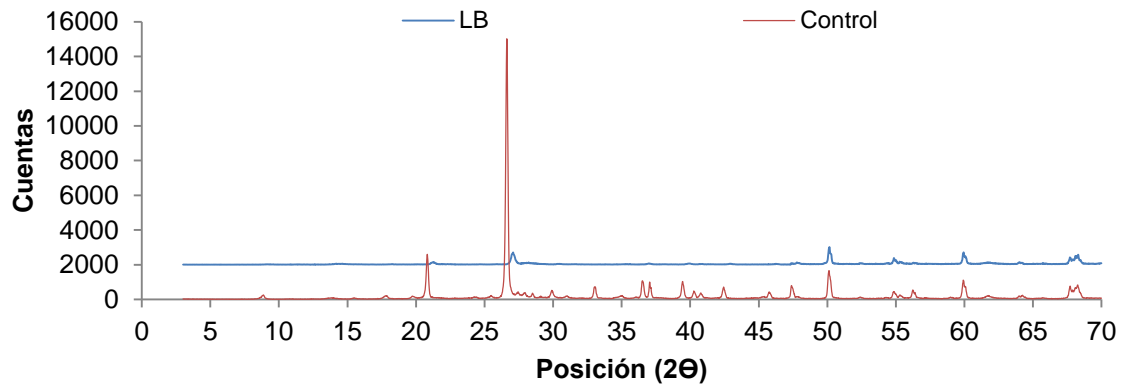
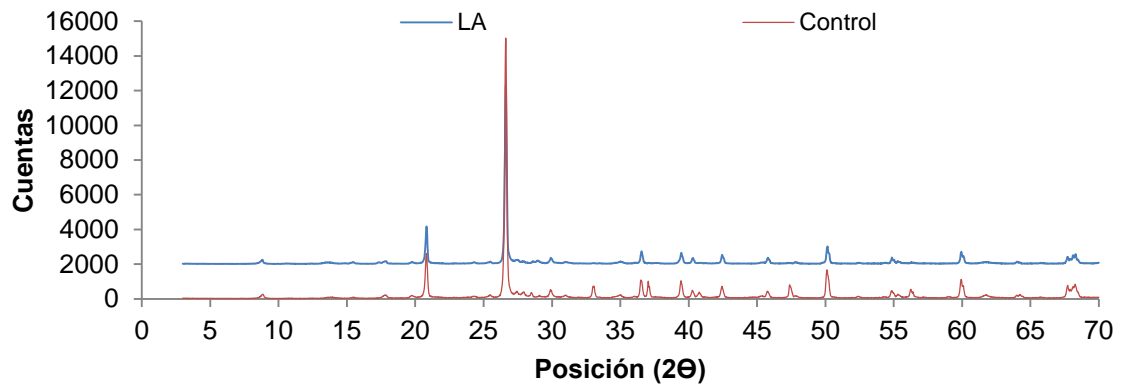
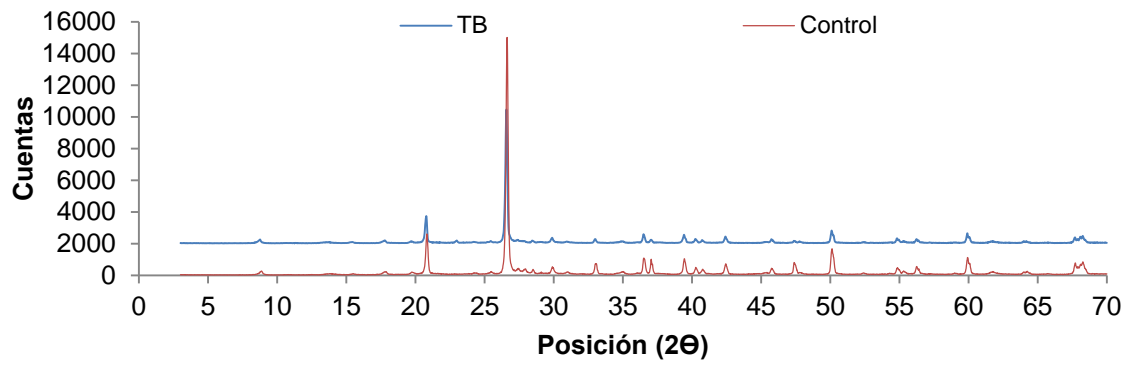
Figura C2. Perfiles comparativos entre cepas de la especie *Leptospirillum ferrooxidans*.

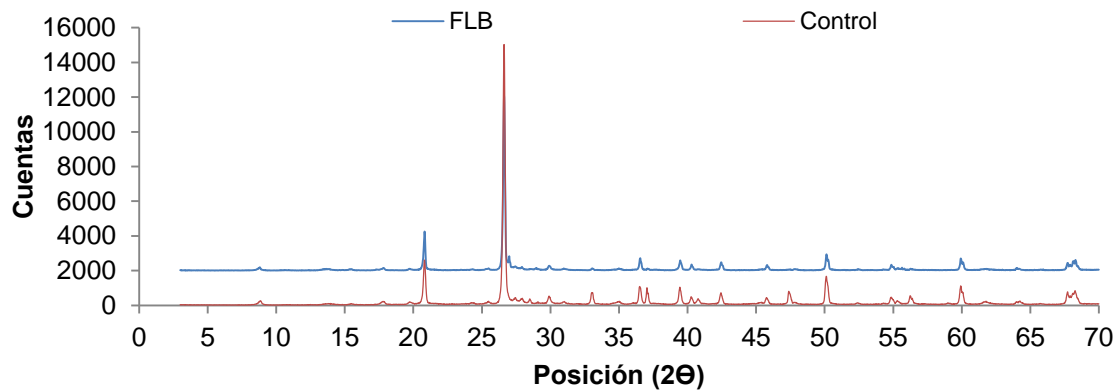
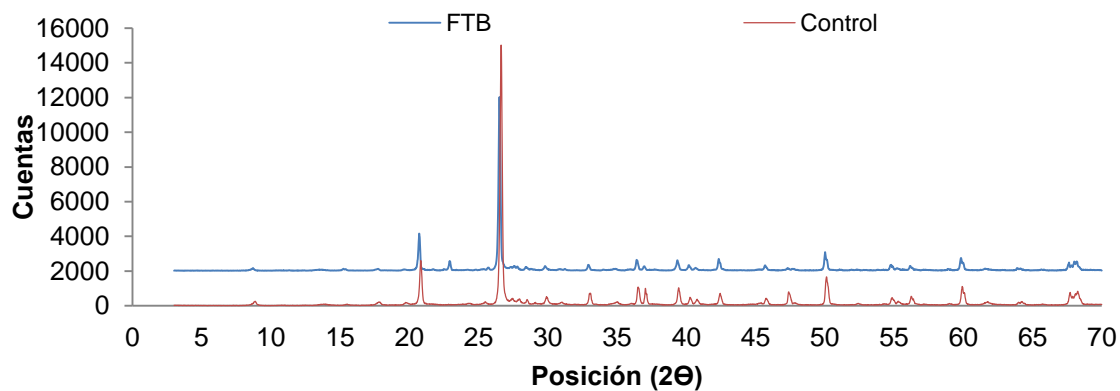
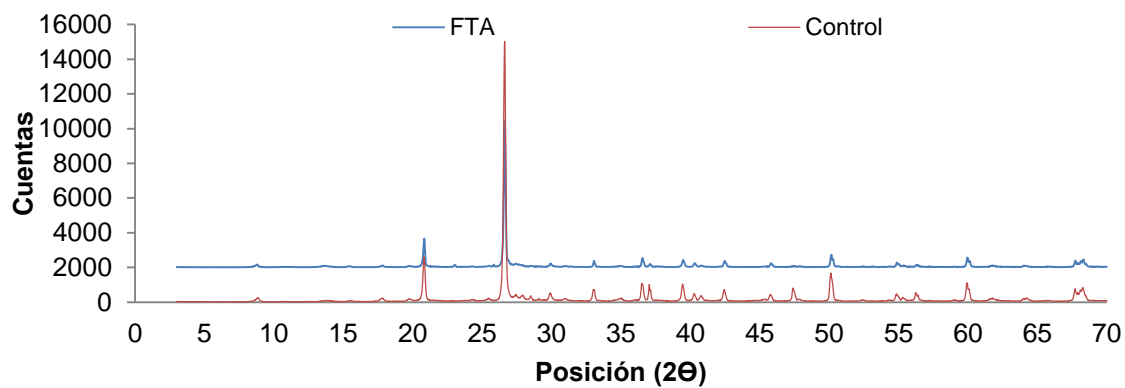


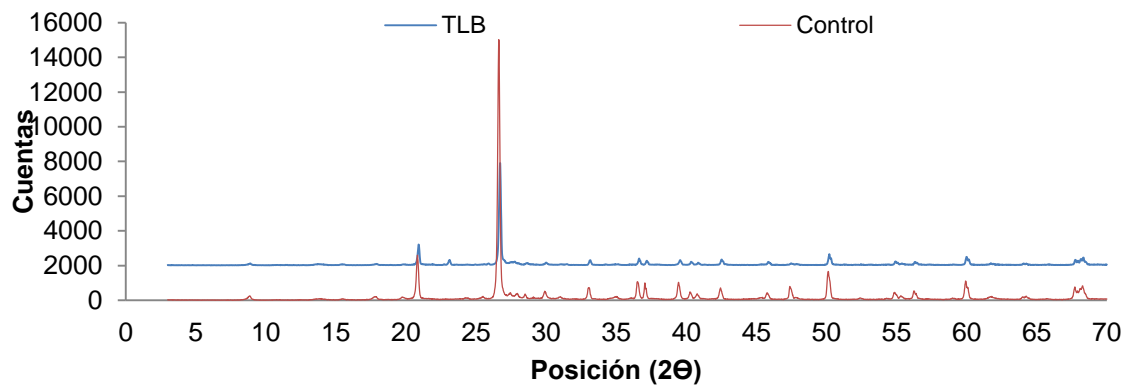
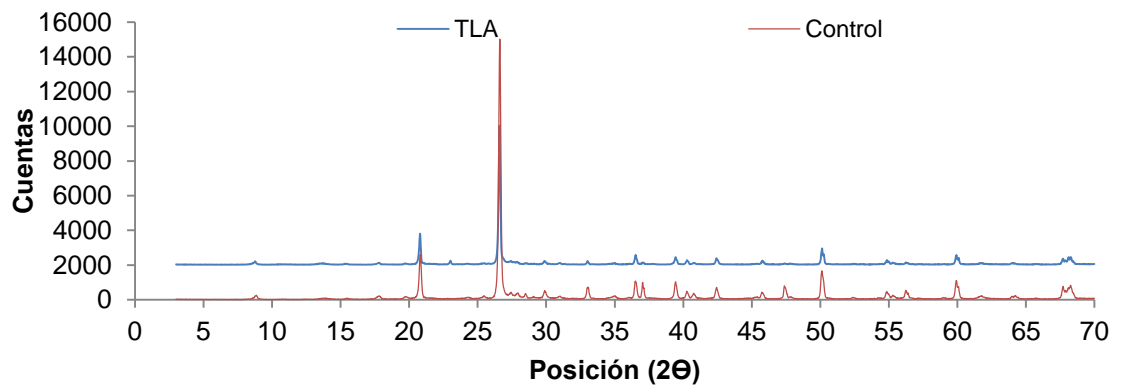
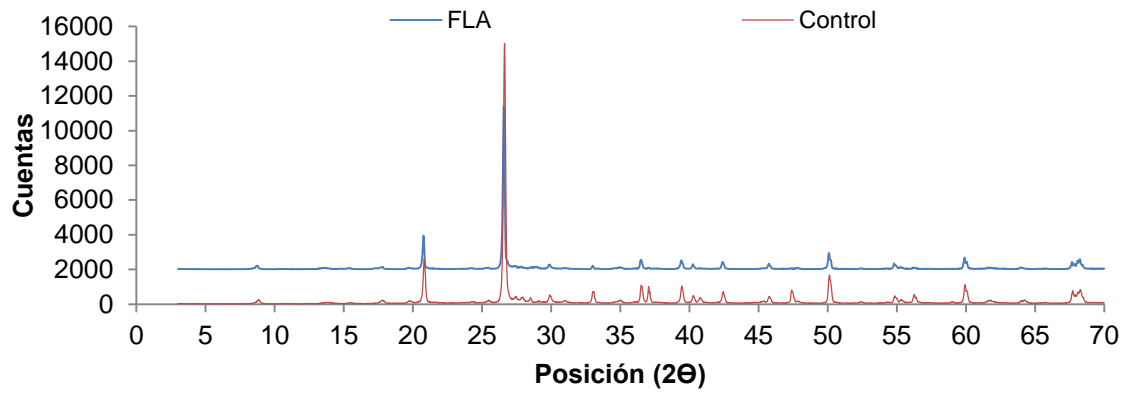
## ANEXO D. Difractogramas y espectros para el mineral biooxidado a las diferentes combinaciones bacterianas

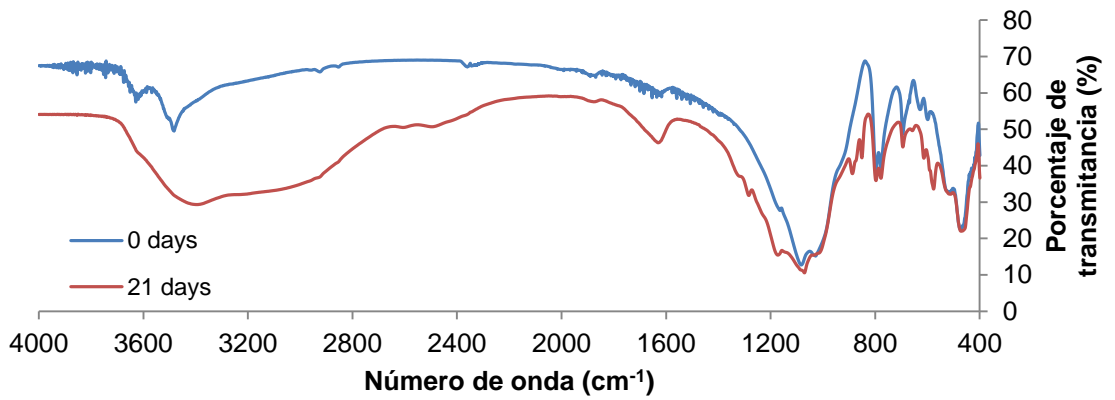
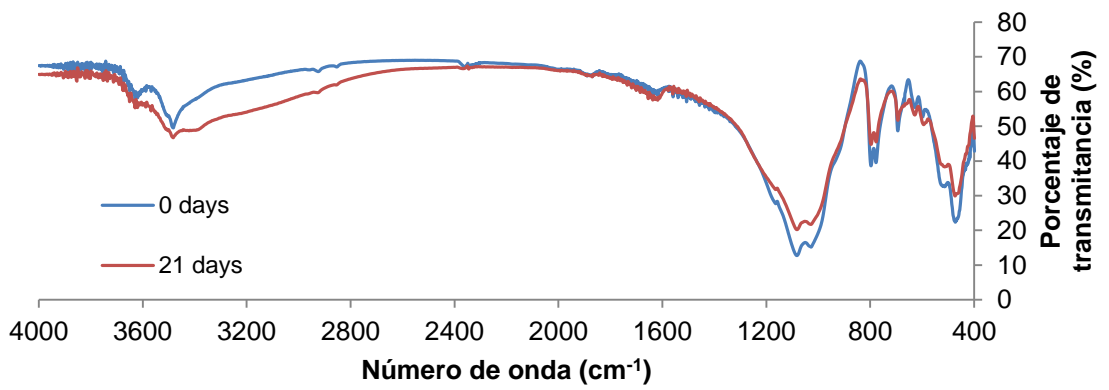
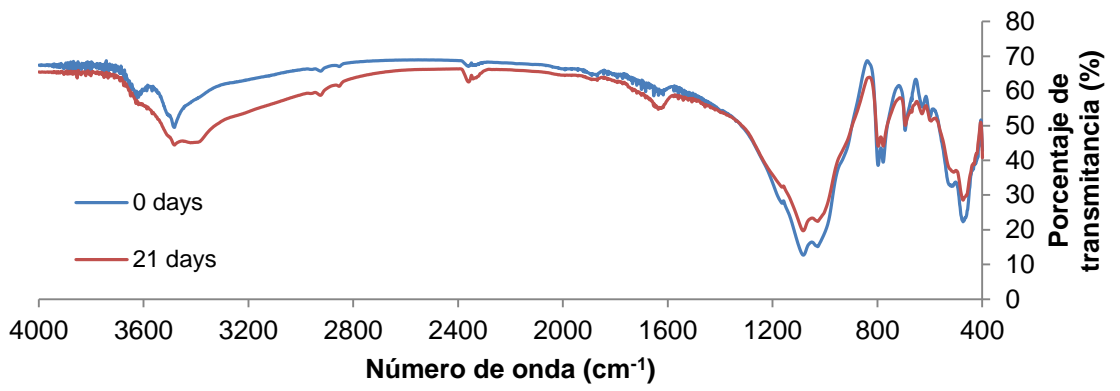
Figura D1. Difractogramas del mineral biooxidado para las diferentes combinaciones de bacterias a ambos pH iniciales.

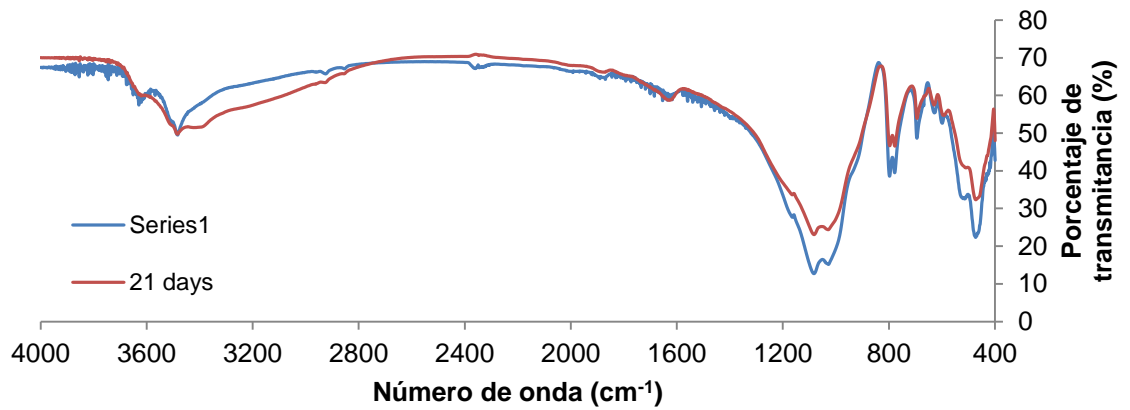
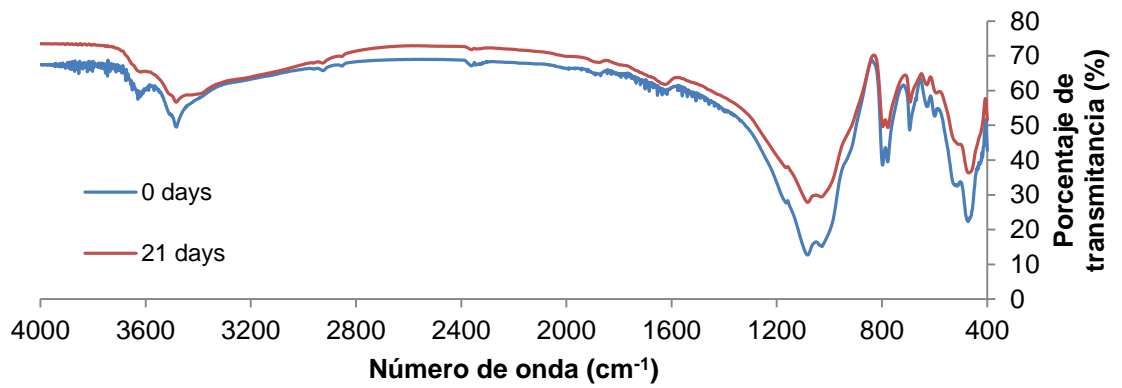
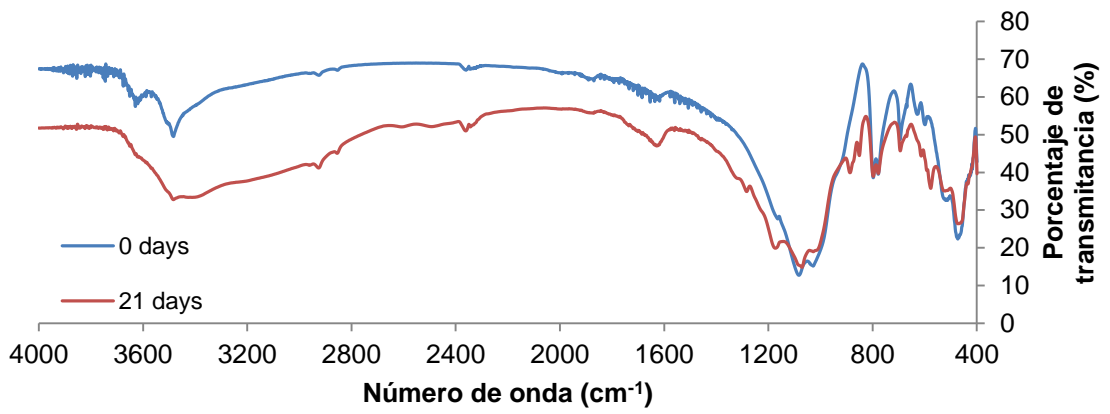


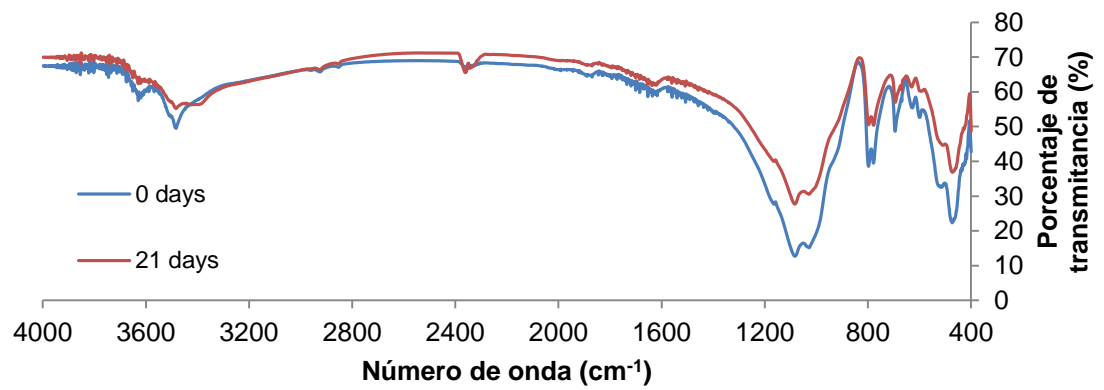
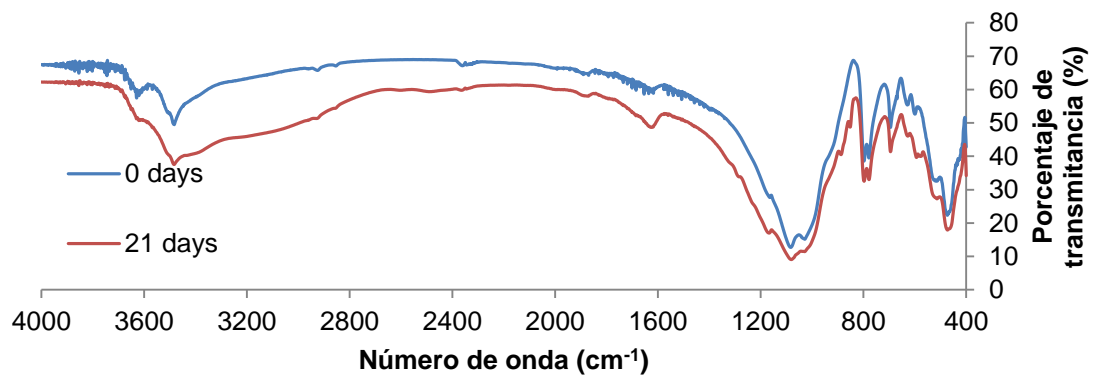
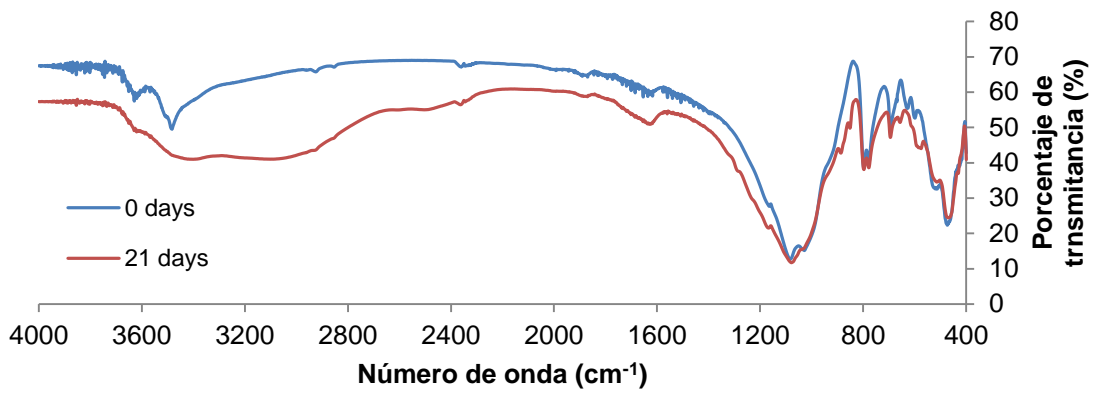












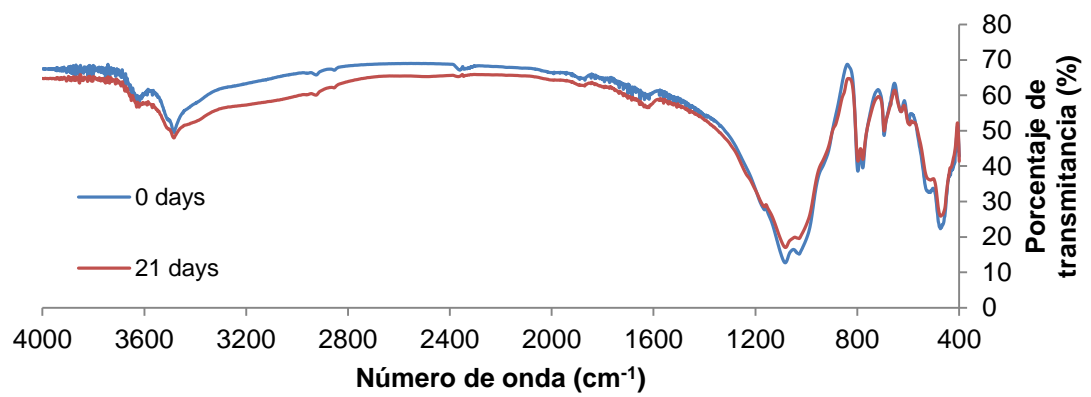
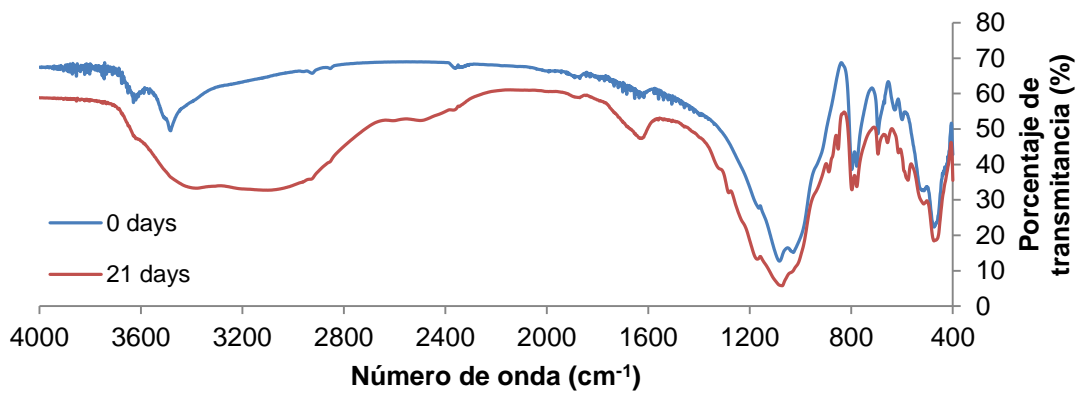
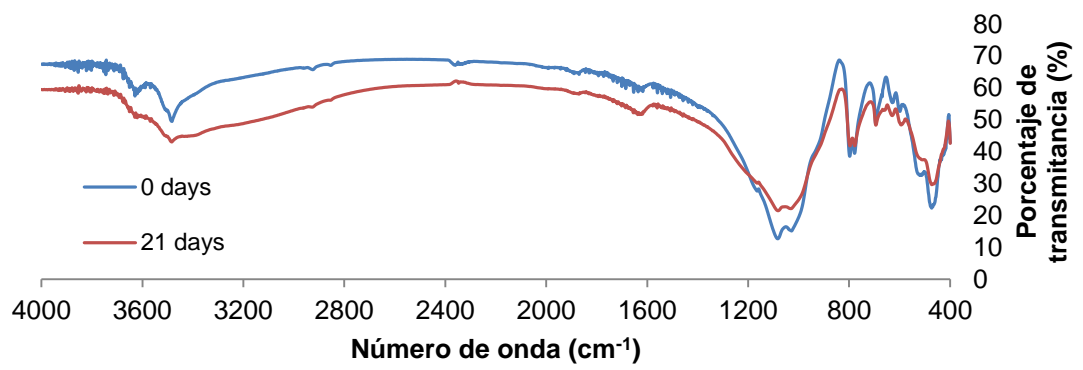


Figura C3. Perfiles comparativos entre cepas de la especie *Acidithiobacillus thiooxidans*.

