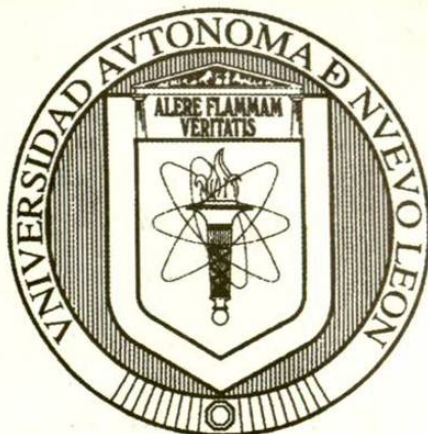


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**Aislamiento y caracterización de cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* con alta resistencia a arsénico y su utilización en la recuperación de oro a partir de concentrados de pirita y arsenopirita.**

**TESIS**

**Que como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología presenta**

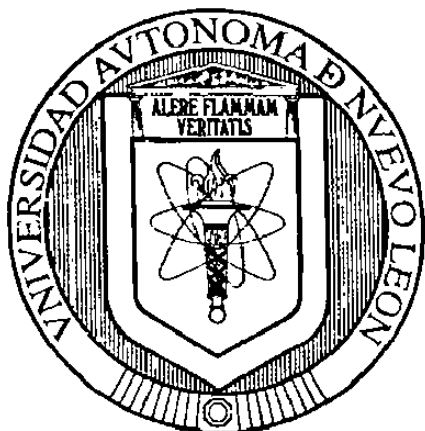
**Q.B.P. Erasmo Orrantia Borunda**

TD  
TN  
07  
c.1



1080080858

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**Aislamiento y caracterización de cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* con alta resistencia a arsénico y su utilización en la recuperación de oro a partir de concentrados de piritita y arsenopiritita.**

**TESIS**

**Que como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología presenta**

**Q.B.P. Erasmo Orrantia Borunda**

BUR  
R  
N  
G  
I  
E  
S

UANL  
FONDO  
TESIS  
(80858)

BUR  
F  
TESIS



4550

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**Aislamiento y caracterización de cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* con alta resistencia a arsénico y su utilización en la recuperación de oro a partir de concentrados de pirita y arsenopirita.**

**TESIS**

**Que como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología presenta**

**Q.B.P. Erasmo Orrantia Borunda**

**Comisión de Tesis Aprobada**

**Dr. Benito Pereyra Alferez**  
Director de Interno

**Dr. Sigifredo Arévalo Gallegos**  
Director Externo

**Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna**

**Dr. Hiram Medrano Roldán**

Asesor

**Dr. Luis Jesús Galán Wong**  
Asesor

**Dr. José Santos García Alvarado**  
Asesor

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Microorganismos. Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Biológicas/UANL y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas/UACH, bajo la dirección del Dr. Benito Pereyra Alférez y Dr. Sigifredo Arévalo Gallegos.

*A mi familia por su apoyo moral*



## AGRADECIMIENTOS

Un gran número de personas e instituciones han contribuido, en diferentes formas, al desarrollo de este trabajo, por lo cual deseo expresar mi agradecimiento:

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, por permitirme desarrollar mi trabajo experimental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para realizar este trabajo.

Al Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S. C., al Consejo de Recursos Minerales y al Departamento de Minería del Estado de Chihuahua, por su apoyo técnico.

A la Q.B.P. Aracely Dávila Sánchez y al M.C. Armando Quintero Ramos por su confianza.

Al Dr. Benito Pereyra Alférez y al Dr. Sigifredo Arévalo Galiegos por su guía y enseñanza.

Al Dr. Luis J. Galán Wong, por su confianza y apoyo,

A todos los miembros de mi Comité Doctoral y a los Revisores de este trabajo, por sus aportaciones y comentarios, que lo enriquecieron de manera importante.

## INDICE GENERAL

|                             | Página |
|-----------------------------|--------|
| Resumen.....                | 1      |
| Abstract.....               | 2      |
| Introducción.....           | 3      |
| Hipótesis.....              | 5      |
| Objetivos.....              | 5      |
| Antecedentes.....           | 6      |
| Materiales y Métodos.....   | 13     |
| Resultados y Discusión..... | 17     |
| Conclusiones.....           | 31     |
| Literatura citada.....      | 32     |

## Indice de Tablas y Figuras.

### Tablas

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| 1. Comparación de pretratamientos de minerales  | 7           |
| 2. Obtención y caracterización de las muestras  | 17          |
| 3. Medios selectivos utilizados para el aislamiento de microorganismos nativos  | 18          |
| 4. Patrones de resistencia a metales pesados  | 22          |
| 5. Análisis cuantitativo de cribas y de cabeza del mineral utilizado en este estudio de los principales elementos presentes | 23          |
| 6. Distribución porcentual de los principales elementos presentes en el mineral de acuerdo al tamaño de partícula           | 24          |

### Figuras

|   |    |
|---|----|
| 1. Cinéticas de oxidación del ión ferroso a férrico, y crecimiento de las cepas nativas y mejoradas de <i>T. ferrooxidans</i> | 20 |
| 2. Identificación por difracción de rayos X del concentrado refractario   | 23 |
| 3. Distribución de oro, arsénico y hierro de acuerdo al tamaño de partícula   | 25 |
| 4. Cinética de oxidación del Fe ferroso en minerales tratados y no tratados con microorganismos                               | 26 |
| 5. Cinética de solubilización del arsénico total en minerales biolixiviados y no lixiviados                                   | 28 |
| 6. Recuperación de oro a partir de concentrados de pirita y arsenopirita.   | 29 |

## Abreviaturas

|   |  |
|---|--|
| <i>Ac.</i>  | <i>Acidiphilium</i>                              |
| Ag  | Plata  |
| AgNO <sub>3</sub>   | Nitrato de plata                                 |
| As  | Arsénico   |
| AsIII   | Arsénico trivalente                              |
| Au  | Oro  |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                 | Nitrato de calcio                                |
| Cd  | Cadmio   |
| CdCl <sub>2</sub>   | Cloruro de cadmio                                |
| Cu  | Cobre  |
| CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O                             | Sulfato de cobre pentahidratado                  |
| EDTA 2Na  | Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético |
| Fe  | Fierro   |
| FeII  | Fierro ferroso                                   |
| FeIII   | Fierro férrico                                   |
| Fet   | Fierro total                                     |
| FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                             | Sulfato ferroso heptahidratado                   |
| g   | gramos   |
| g/l   | gramos por litro                                 |
| h   | horas  |
| Hg  | Mercurio   |
| HgCl <sub>2</sub>   | Cloruro de mercurio                              |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                    | Acido sulfúrico                                  |
| KCl   | Cloruro de potasio                               |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                   | Fosfato ácido de dipotasio                       |
| kg  | kilogramo  |
| KMnO <sub>4</sub>   | Permanganato de potasio                          |
| MgSO <sub>4</sub>   | Sulfato de magnesio                              |
| m-NaAsO <sub>2</sub>  | Meta-arsenito de sodio                           |
| Min.  | Mineral  |
| Min./T1   | Mineral biolixiviado con la cepa T1              |
| Min./T18  | Mineral biolixiviado con la cepa T18             |
| ml  | mililitro  |
| ml <sup>-1</sup>  | mililitros <sup>-1</sup>                         |
| mM  | milimolar  |
| Mn  | Manganeso  |
| Mo  | Molibdeno  |
| N   | Normalidad                                       |
| NaCN  | Cianuro de sodio                                 |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O              | Molibdato de sodio dihidratado                   |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | Tiosulfato de sodio dihidratado                  |

|   |   |
|---|---|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Sulfato de amonio   |
| Ni  | Niquel  |
| pH  | Potencial hidrógeno   |
| ppm   | partes por millón   |
| rpm   | revoluciones por minuto   |
| Sb  | Antimonio   |
| sp.   | Especie   |
| t   | tonelada  |
| <i>T.f.</i>                                     | <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>                                |
| <i>T. ferrooxidans</i>                          | <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>                                |
| <i>T.t.</i>                                     | <i>Thiobacillus thiooxidans</i>                                 |
| <i>T. thiooxidans</i>                           | <i>Thiobacillus thiooxidans</i>                                 |
| T1  | Cepa nativa resistente a 200 ppm de arsénico                    |
| T18   | Cepa obtenida a partir de T1 resistente a 1,800 ppm de arsénico |
| UFC   | Unidades formadoras de colonias                                 |
| Zn  | Zinc  |
| °C  | Grados centígrados  |
| %   | Porcentaje  |
| >   | Menor que   |
| μm  | Micrometros   |

## RESUMEN

El beneficio del oro a partir de minerales refractarios con alto contenido de pirita y arsenopirita, representa un grave problema por la baja recuperación de oro y la generación de contaminación por el proceso de cianuración; sin embargo, la utilización de microorganismos como *Thiobacillus ferrooxidans* para lixiviar este tipo de minerales como un pretratamiento previo al proceso de cianuración, incrementa la recuperación del metal y disminuye en casi 10 veces la concentración de cianuro. El objetivo de este trabajo fue el de aislar cepas nativas de *T. ferrooxidans* y obtener clonas con una mayor resistencia a arsénico y con mayor actividad oxidativa de hierro para recuperar oro a partir de minerales con alto contenido de pirita y arsenopirita. De 29 cepas nativas y caracterizadas de *T. ferrooxidans*, seleccionamos una cepa denominada T1 y ésta se sometió a presión selectiva con cantidades crecientes de AsIII (0 a 2,000 ppm de AsIII), logrando obtener una cepa capaz de crecer en 1,800 ppm de AsIII, denominada T18. Las cepas T1 y T18 fueron evaluadas en base a la velocidad de crecimiento en medio 9K suplementado con FeII y algunos iones metálicos. Con respecto al FeII se observó una mayor capacidad oxidativa para T18, siendo ésta de un 9%. Ambas cepas toleraron Cu, 100 ppm; Cd, 200 ppm y Mo, 200 ppm, pero fueron inhibidas por Ag a 5 ppm. Sorprendentemente, solo la cepa T18 resistió Hg a 15 ppm. Ambas cepas fueron sometidas a un proceso de biolixiviación para recuperar oro a partir de un concentrado de pirita y arsenopirita con leyes de As, 2.1 %; Fe, 28.4 % y Au, 9.8 g/t. El análisis mineralógico y químico del mineral demostró la presencia de pirita y arsenopirita y que la mayor cantidad de oro está asociada a arsenopirita. Aunque ambas cepas mostraron actividad metabólica en el proceso de biolixiviación, ésta fue mas alta con la cepa T18, encontrándose un incremento del ion férrico y del arsénico total en solución, concomitantemente con una disminución del ion ferroso. La recuperación de oro con la cepa T18 se incrementó 1.7 y 10 veces, con respecto a la cepa T1 y al mineral no biolixiviado, respectivamente. Nuestros resultados, indican que una etapa previa de presión selectiva para la obtención de una cepa resistente a arsénico, con mayor capacidad oxidativa de FeII y la utilización de ésta en un proceso de biolixiviación, incrementan significativamente la recuperación de oro a partir minerales refractarios, en los cuales éste se encuentre asociado principalmente a nivel de cristales de arsenopirita

## ABSTRACT

Gold recovery from refractory ores with high contents of pyrite and arsenopyrite, represents a biggest problem by the low gold recovery and the waste water caused by cyanide process; however, a pretreatment using microorganisms like *Thiobacillus ferrooxidans* for leaching these minerals, before cyanide process, it increase the metal recovery and decrease about 10-fold the use of cyanide. The goal of this work was to isolate native *T. ferrooxidans* strains from acid mine drainages and obtain high arsenic-resistance derivatives for gold recovery from ores with high contents of pyrite and arsenopyrite. We be able to isolate 29 *T. ferrooxidans* strains, we selected one strain called T1. It was subjected to selective pressure increasing AsIII (from 0 to 2,000 ppm of AsIII) concentrations. So, we obtained an strain with 1,800 ppm of AsIII resistance, and it was identified as T18. T1 y T18 strains were tested according with their growth rate in 9K medium supplemented with FeII and other metallic ions. The T18 strain displayed an increased oxidative action on FeII, being it 9%. Both strains resisted Cu, 100 ppm; Cd, 200 ppm and Mo, 200 ppm, but Ag at 5 ppm caused growth inhibition. Surprisingly, only T18 strain resisted Hg at 15 ppm. Both strains were subjected to a bioleaching process for recovery of gold from a pyrite-arsenopyrite concentrate with concentrations of As, 2.1 %; Fe, 28.4 % and Au, 9.8 g/t. Chemistry and mineralogical analysis of the mineral showed the pyrite and arsenopyrite presence and that the gold is associated mainly to a level of arsenopyrite. Notwithstanding, both strains displayed metabolic activity during bioleaching process, T18 strain had a better behavior, find an increasing of ferric iron and total arsenic in the liquor leaching, concomitantly with a ferrous iron decrease. Recovery of gold with T18 strain was increased about 1.7 and 10-fold, compared with T1 strain and non-bioleached ore, respectively. Our results, indicate that a previous step using selective pressure for obtain an arsenic-resistant strain and its use in a bioleaching process, significantly increased the gold recovery from refractory ores, where the gold is associated mainly to level of arsenopyrite lattice.

## INTRODUCCION

El oro es uno de los metales preciosos de mayor importancia a nivel mundial por su amplia utilización en joyería e industria. A nivel industrial, una de las actividades de mayor demanda de oro es la electrónica, donde por sus características de ductilidad, resistencia a la corrosión y conductividad térmica y eléctrica, convierten al oro en el mejor de los materiales (Reese, 1994).

Actualmente, la producción de oro a nivel industrial se ve afectada por el agotamiento de minerales que pueden beneficiarse por métodos metalúrgicos tradicionales. En la naturaleza, el oro se encuentra en una amplia variedad de minerales, tales como calaverita, telururos, rocas ígneas y sedimentarias, en combinación con minerales como cuarzo, plata (electrum) y diseminado o incluido en minerales de sulfuro y selenuros (Dana y Ford, 1984; Dud'a *et al.*, 1989; Reese, 1994). Metalúrgicamente, el oro se encuentra presente en tres grandes categorías de minerales: con oro libre; metálicos; y refractarios; lo anterior trae como consecuencia muchas opciones de tratamiento y recuperación, desde métodos sencillos hasta métodos altamente sofisticados y rutas de obtención relativamente complejas (Henley, 1975).

Los minerales con oro libre son aquellos en los cuales utilizando métodos metalúrgicos tradicionales, el metal puede ser liberado bajo una molienda adecuada, su recuperación es alta y los costos de operación son relativamente bajos. Los minerales metálicos contienen principalmente cobre (Cu), zinc (Zn), plomo (Pb), níquel (Ni) y cantidades considerables de oro (Au) y plata (Ag), y éstos pueden recuperarse, mediante procesos minero-metalúrgicos como la fundición y la refinación, en virtud de que todos tienen valor comercial. Los minerales refractarios son aquellos en los cuales el oro y la plata se encuentran finamente diseminados o incluidos, principalmente en cristales de pirita y arsenopirita, y el oro no puede ser beneficiado satisfactoriamente utilizando métodos metalúrgicos tradicionales (McPheat, *et al.*, 1969; Addison, 1980).

Usualmente la recuperación de oro se realiza mediante un proceso de cianuración directa, utilizando cianuro de sodio (McArthur, *et al.*, 1887), y normalmente requiere de 1 a 2 kg de cianuro por tonelada de mineral tratado (Habashi, 1967). Este proceso funciona adecuadamente en minerales no refractarios (cuarzo o silicoaluminatos principalmente), siempre y cuando no haya presencia de otros metales o metaloides que actúen como cianicidas, esto es, que reaccionen y



compitan con los metales preciosos por el cianuro (Habashi, 1967; Pehlke, 1979), lo cual ocasiona bajas recuperaciones de oro y considerables consumos de cianuro, con el consiguiente incremento en los costos de beneficio y la dificultad para disponer de los residuos tóxicos.

La recuperación del oro incluido en minerales refractarios, requiere de un pretratamiento para liberar el metal del mineral huésped, debido a que cuando se utilizan métodos para beneficiarlo como la gravimetría o la cianuración directa, las recuperaciones son usualmente bajas. Los pretratamientos mas utilizados para incrementar la recuperación son: 1) tostado, el cual remueve el arsénico y “abre” los minerales refractarios, haciéndolos susceptibles a la cianuración (Connel y Cross, 1981); 2) presión y temperaturas altas en autoclaves seguidas de cianuración (Berezowsky y Weir, 1983; Guinivire, 1984; Beattie y Raudsepp, 1985). Estos pretratamientos requieren de equipo altamente sofisticado y personal especializado para el manejo del mismo, así como minerales con leyes altas de oro, lo cual ocasiona limitaciones en su empleo (Marchant, 1985).

Una alternativa para disminuir los costos de pretratamiento, es la utilización de sistemas biológicos conocido como biolixiviación. En este proceso, los microorganismos oxidan el fierro y azufre de los minerales refractarios exponiendo el oro a la acción directa del cianuro (Lawrence y Bruynesteyn, 1983; Bosecker, 1997).

Entre los microorganismos mas utilizados en la biolixiviación se encuentran miembros del género *Thiobacillus*, *Sulfolobus* y *Acidiphilium* (Kelly *et al.*, 1979; Norris y Parrot., 1986, Wiegel y Ljungdahl, 1986; Rawlings y Kusano, 1994). La biotecnología para la obtención de oro a partir de minerales refractarios se ha basado en *Thiobacillus ferrooxidans* (Baldi *et al.*, 1992). *T. ferrooxidans* es una bacteria gram negativa, quimiolitautotrófica acidófila, que obtiene su energía a partir de la oxidación del fierro ferroso, azufre y compuestos de azufre reducidos y que fija bióxido de carbono atmosférico, el cual utiliza como única fuente de carbono (Hutchins *et al.*, 1986; Kelly y Harrison, 1989). Sin embargo, el crecimiento de *T. ferrooxidans*, al igual que otros microorganismos, puede ser inhibido por la presencia de arsénico (As) y otros iones metálicos como Cd, Cu, Mo, Ag, Sb y Hg, presentes normalmente en minerales de piritita y arsenopiritita y cuyas concentraciones particulares dependen de la ubicación geográfica y formación geológica del yacimiento de la cual se obtiene. Este hecho puede ser una limitante para el microorganismo durante el proceso de biolixiviación.

Las alternativas biotecnológicas de este proceso se han basado en dos grandes estrategias: 1) aislamiento de cepas nativas adaptadas a las diversas zonas geológicas y 2) la modificación genética de *T. ferrooxidans* (Shiratori, 1991). En nuestro país, existen fundos mineros con alto contenido de oro en materiales refractarios, mismos que no han sido explotados adecuadamente. Por tal motivo, nos preguntamos; ¿el proceso de biolixiviación con cepas nativas incrementará la obtención de oro?, ¿la manipulación genética de alguna de las cepas nativas aumentará la biolixiviación?, ¿la obtención de cepas con alta resistencia a arsénico y con mayor actividad oxidativa de hierro, mejorará la recuperación de oro a partir de piritita y arsenopiritita?. En base a esta preguntas, planteamos la siguiente hipótesis:

**Hipótesis:** El proceso de biolixiviación para la recuperación de oro a partir de piritita y arsenopiritita se podría incrementar, usando cepas nativas y modificadas de *Thiobacillus ferrooxidans* con alta resistencia a arsénico y con mayor actividad oxidativa de FeII.

Para demostrar nuestra hipótesis, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

#### **Objetivo General:**

Incrementar los niveles de corrosión de los minerales refractarios para mejorar la obtención de oro, utilizando cepas de *T. ferrooxidans* con diferentes grados de resistencia a arsénico y con mayor actividad oxidativa de hierro ferroso.

#### **Objetivos particulares:**

- 1.- Aislamiento de cepas nativas de *T. ferrooxidans* a partir de diferentes aguas de mina.
- 2.- Determinación de la resistencia natural a As, Mo, Cu, Cd, Hg y Ag.
- 3.- Obtención de cepas con alta resistencia a arsénico.
- 4.- Biolixiviación de minerales refractarios, a nivel de laboratorio, con cepas nativas y modificadas.

## ANTECEDENTES

Durante siglos el oro ha sido utilizado en joyería y orfebrería; sin embargo en años recientes, se le han dado otros usos industriales, principalmente en la industria electrónica. Este hecho ha motivado una creciente demanda mundial de este metal, lo que ha provocado la sobreexplotación de la vetas susceptibles a tratamientos convencionales (Reese, 1994). La gran demanda de este metal ha ocasionado que la recuperación de oro se realice, cada vez con mayor frecuencia, a partir de minerales refractarios para los cuales los procesos tradicionales son menos rentables, requiriéndose de pretratamientos de tipo oxidativo que incrementan los costos de beneficio.

Desde el punto de vista metalúrgico, el oro se encuentra presente en tres grandes categorías de minerales: con oro libre, metálicos y refractarios. Naturalmente, el oro se encuentra en una amplia variedad de minerales, tales como calaverita, telururos, rocas ígneas y sedimentarias, en combinación con minerales como plata (*electrum*), selenuros, y *diseminado* o incluido en minerales de cuarzo y silicoaluminatos, y en minerales de sulfuro (Dana y Ford, 1984; Reese, 1994). Lo anterior trae como consecuencia muchas opciones de tratamiento y recuperación, desde métodos sencillos hasta métodos altamente sofisticados y rutas de obtención relativamente complejas (Henley, 1975).

Los minerales refractarios que contienen piritita y arsenopiritita, requieren de un pretratamiento previo a la recuperación del metal. Los pretratamientos mas comunes son el tostado, oxidación por presión y biolixiviación. Los dos primeros involucran altos costos de operación e infraestructura especializada, además de consumo de combustibles provenientes del petróleo.

Una comparación de los métodos de pretratamiento de minerales refractarios previos a la cianuración (Tabla 1), que comprenden a los factores más importantes operacionales y económicos para la recuperación de oro a nivel industrial, indican que la biolixiviación representa el pretratamiento mas viable.

El proceso de biolixiviación es un evento natural que se ha aprovechado por décadas para la recuperación de metales (Brierley, 1982; Merson, 1992), principalmente cobre (Brierley, 1978),

uranio (McCready y Gould, 1990) y oro (Livesey-Goldblatt *et al.*, 1983). Los procesos de lixiviaciones biológicas han sido evaluadas sobre diferentes tipos y minerales de diversas zonas geográficas. Literalmente, podría decirse que no existen dos minerales exactamente iguales; por tal motivo, cada depósito de mineral deberá ser evaluado previamente a la lixiviación ya que todos poseen diferencias cualitativas y cuantitativas en su composición mineralógica.

Tabla 1. Comparación de pretratamientos de minerales refractarios.

| Factor de costos:                                      | Biológico | Presión | Tostado |
|--|-----------|---------|---------|
| 1.- Minerales con alta ley de oro (>5 g/ton)           | Si        | Si      | Si      |
| 2. Oxidación selectiva de sulfuros                     | Si        | No      | No      |
| 3. Datos históricos y diseños disponible               | Si        | Si      | Si      |
| 4. Adecuado para concentrados con baja ley de sulfuros | No        | Si      | Si      |
| 5. Equipo minero de procesamiento convencional         | Si        | No      | No      |
| 6. Alto costo de mantenimiento por uso de equipo       | No        | Si      | Si      |
| 7. Control de temperatura para los depósitos           | Si        | Si      | No      |
| 8. Planta de vapor y/o oxígeno requerida               | No        | Si      | No      |
| 9. Adecuado para minerales alcalinos o carbonatados    | No        | Si      | Si      |
| 10. Acido producido disponible para la venta           | No        | No      | Si      |
| 11. Arsénico producido como $As^{-5}$                  | Si        | Si      | No      |

Adaptada de Marchant, 1985.

La biolixiviación es una oxidación biológica del azufre y hierro presentes en los minerales refractarios, calcopirita ( $CuFeS_2$ ), pirita ( $FeS_2$ ) y arsenopirita ( $AsFeS$ ) principalmente, que resulta en la solubilización en el licor de lixiviación en el caso de cobre y uranio, y en la exposición del oro, contenidos en estos minerales. En el caso del oro, cuando no se emplea la biolixiviación, el método convencional de beneficio involucra cianuración directa, en donde la recuperación del metal es pobre y alto el consumo de cianuro, lo cual provoca problemas para la disposición de los residuos tóxicos.

Las operaciones de biolixiviación a nivel industrial (Marchant, 1986a), se llevan a cabo utilizando consorcios de microorganismos altamente acidofílicos que pueden incluir, *Thiobacillus*

*ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y bacterias del género *Acidiphilium* (Harrison, 1984; Kelly, 1988), aunque se ha demostrado que *T. ferrooxidans* es el miembro más activo en estos consorcios de bacterias mesofílicas (Rawlings y Kusano, 1994).

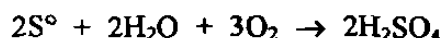
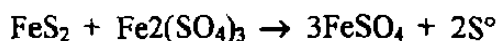
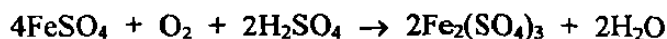
Lo anterior confirma la importancia de conocer cual(es) son los microorganismos realmente involucrados en los procesos de lixiviación, lo que facilitaría el tener procesos más controlados biológica y técnicamente a todos los niveles, desde el laboratorio hasta el tratamiento industrial.

A temperaturas superiores a 45 °C, se han utilizado bacterias del género *Sulfobacillus* (Norris, 1990), y en condiciones extremas de temperatura, mayores a 65°C, las archaeobacterias termófilas que se han caracterizado en laboratorio son del género *Sulfolobus* y *Acidians*, pero aún no se aplican a nivel industrial (Rawlings y Kusano, 1994).

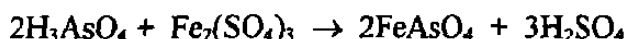
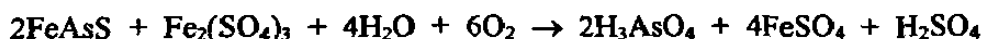
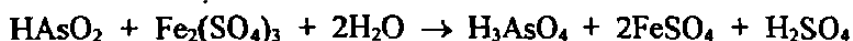
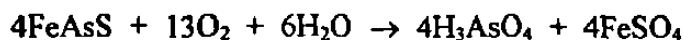
Las especies de *Thiobacillus* son responsables de la solubilización y lixiviación de metales pesados y preciosos, como el oro, a partir de minerales de pirita y arsenopirita. Para su crecimiento utilizan CO<sub>2</sub> atmosférico como fuente de carbono, obteniendo su energía a partir de la oxidación del Fe ferroso (FeII) a férrico (FeIII), con producción de ácido sulfúrico y FeIII como subproductos de su metabolismo (Ingledew, 1982; MacFadden y Denend, 1972).

El mecanismo que se ha propuesto (Ehrlich, 1964; Pinches, 1975; Karavaiko *et al.*, 1986) para la oxidación de la pirita y la arsenopirita con la subsecuente producción de ácido sulfúrico, hierro férrico y arsénico pentavalente, ocurre de acuerdo a las siguientes reacciones:

**Pirita:**



### Arsenopirita:



Los requerimientos nutricionales de *T. ferrooxidans*, son bastante modestos, en ambientes naturales, aereación y agua ácida son suficientes para que crezca a expensas del hierro presente en la pirita, arsenopirita y/o calcopirita; y puede aislarse con relativa facilidad a partir de drenajes ácidos de minas asociadas con minerales refractarios o depósitos carboníferos (Rawlings y Kusano, 1994).

Una de las características más importantes de las cepas nativas de *T. ferrooxidans*, es su resistencia inherente a altas concentraciones de iones metálicos (Torma, 1977; Touvinen *et al.*, 1971) y su adaptabilidad en el laboratorio, a altas concentraciones de iones generalmente inhibitorios del crecimiento bacteriano (Holmes y Ul Haq, 1989).

Numerosos trabajos de investigación han sido publicados y/o presentados en diferentes foros, los cuales muestran un incremento significativo en la recuperación de oro, utilizando *T. ferrooxidans*, en una oxidación previa de los minerales refractarios seguida de una cianuración directa, haciendo énfasis también, en las velocidades prácticas de obtención y en lo económico del proceso (Lawrence y Bruynesteyn, 1983; Livesey-Goldblatt *et al.*, 1983, Lawrence y Gunn, 1985; Marchant, 1986a,b; Lawrence y Marchant, 1988; van Aswegen y Haines, 1988).

El crecimiento de *T. ferrooxidans* sobre los minerales refractarios es facilitado por una estrecha interacción bacteria-mineral (Bennet y Tributsch, 1978) y usualmente se asume que la

bacteria está íntimamente asociada con la superficie del mineral (Southam y Beveridge, 1992). Las proteínas responsables de la adhesión no son liberadas al medio, sino que están asociadas con la envoltura celular de *Thiobacillus* (Harrison, 1984). Aún no se conoce el mecanismo de adhesión de *T. ferrooxidans*, y su papel de cómo altera la superficie química del mineral; aparentemente, la adhesión depende de propiedades bioquímicas inherentes al microorganismo, así como de propiedades interfaciales que se presentan durante la biolixiviación (Devasia *et al.*, 1993).

Las propiedades de superficie que afectan la adhesión son la hidrofobicidad de la superficie celular y el potencial electrocinético (Van Loosdrecht *et al.*, 1987; Van Loosdrecht *et al.*, 1990). *T. ferrooxidans* tiene preferencia para adherirse a minerales tales como la pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y la arsenopirita ( $\text{AsFeS}$ ); la acumulación de Fe férrico inhibe esta adhesión, no así la presencia de FeII (Ohmura *et al.*, 1993).

Monroy y colaboradores (1995), han demostrado mediante estudios de microscopia electrónica que *T. ferrooxidans*, abre "poros de corrosión" a través de la superficie expuesta del mineral hacia el interior del mismo, lo cual permite suponer que de esta manera alguna cantidad de oro es liberado y el resto, que no alcanza a liberarse, está lo suficientemente expuesto para ser lixiviado por el cianuro, obteniendo incrementos sustanciales en la recuperación del oro.

En la naturaleza, existe un grupo de iones que ejerce un efecto tóxico sobre el crecimiento de los microorganismos, entre ellos se encuentran el arsénico, el cadmio, el mercurio, el antimonio, el cromo, la plata y otros. Por lo general, los minerales de pirita y arsenopirita pueden contener, a nivel traza o de ppm, este tipo de iones, en proporciones variables, dependiendo de la ubicación geográfica del yacimiento. La presencia de metales pesados en el ambiente ejerce un efecto inhibitorio sobre la mayoría de los microorganismos, pero por otro lado, puede seleccionar variantes naturales resistentes al efecto tóxico del ion metálico.

En la literatura existen reportes sobre la caracterización de los genes bacterianos y mecanismos responsables que confieren resistencia para algunos metales pesados, entre los cuales destacan el Cromo (Cervantes y Ohtake, 1988; Cervantes y Vaca, 1991; Ishibashi *et al.*, 1990; Nies *et al.*, 1990; Ohtake *et al.*, 1987), el Cobre (Cha y Cooksey, 1991; Venkateswerlu *et al.*, 1989); el Cadmio (Nucifora *et al.*, 1989; Silver, 1991); el Molibdeno (Sugio *et al.*, 1988); la Plata (Goddard y Bull, 1989; Goddard y Bull, 1989a; Haefel *et al.*, 1984); el Antimonio (Cervantes y Chávez, 1992; Kaur y Rosen, 1992); así como el Arsénico y el Mercurio; todos estos iones pueden estar

presentes en los minerales refractarios como la pirita y la arsenopirita a nivel traza o de partes por millón (ppm) (Dana y Ford, 1984); por lo cual deben ser tomados en cuenta al momento de utilizar a *T. ferrooxidans* en el proceso de biolixiviación.

Para el caso particular del mercurio, en *T. ferrooxidans* se ha caracterizado molecularmente un operón denominado *mer*, que confiere resistencia a este metal, este operón se localiza a nivel cromosomal y ha sido clonado y determinada la secuencia nucleotídica en su totalidad (Inoue *et al.*, 1989; Inoue *et al.*, 1990; Shiratori *et al.*, 1989).

La resistencia al arsénico se debe principalmente a la presencia de genes localizados en plásmidos encontrados en bacterias Gram positivas y Gram negativas, tanto de origen clínico como natural. El espectro de resistencia conferido por plásmidos incluye a los iones arseniato, arsenito y antimonio (Silver *et al.*, 1981). En *E. coli* y *S. aureus*, la resistencia está determinada por un grupo de genes asociados con un operón denominado *ars*, cuyo funcionamiento es inducido por cualesquiera de los iones anteriores (Silver y Misra, 1988). El arseniato es tóxico para las bacterias porque actúa como un análogo de fosfatos; es canalizado por el sistema de transporte de la bacteria e interfiere intracelularmente con la formación de intermediarios fosforilados (Willsky y Malamy, 1981); o sea, la toxicidad por arseniato es funcionalmente equivalente al ayuno de fosfatos. El arsenito es aun considerablemente más tóxico que el arseniato, ya que reacciona con los grupos sulfhidrilo de las proteínas inactivando una gran cantidad de enzimas de diferentes rutas metabólicas (Knowles y Benson, 1983).

Con respecto a uno de los iones más importantes para el presente trabajo, en *E. coli* se han reportado la identificación y caracterización de un grupo de genes que confieren resistencia al arsénico, dichos genes forman parte del operón *ars*, localizado en el plásmido conjugativo R773 (Hedges y Baumberg, 1973). Por hibridación con sondas específicas, se ha mostrado que el determinante genético está ampliamente distribuido en bacterias Gram negativas (Moblely *et al.*, 1983). A partir del plásmido R773, se ha subclonado un fragmento *Hind*III de 4.3 kpb que contiene la mayoría de los genes del operón *ars*, este fragmento ha sido secuenciado. El análisis de la secuencia nucleotídica, indica 3 marcos abiertos de lectura para los genes *arsA*, *arsB* y *arsC*. El gen *arsA*, se encuentra en la región 5' terminal del fragmento y comprende aproximadamente 1.8 kpb, el gen *arsB* se encuentra en la región intermedia (1.5 kpb) y el gen *arsC* (1.0 kpb) se localiza en la región 3' terminal (Chen *et al.*, 1986a). También se ha identificado otro gen que forma parte



del operón *ars*, denominado *arsR*, y se localiza en el extremo 5' del operón (San Francisco *et al.*, 1990). El operón *ars* se transcribe formando un solo RNAm de 4,400 nucleótidos (Owolabi y Rosen, 1990).

Las proteínas ArsA y ArsC se encuentran asociadas a la membrana celular formando una bomba de iones; ArsA es una proteína hidrofílica de 63.169 kDa con actividad de ATPasa (Rosen *et al.*, 1988), y comprende la subunidad catalítica que genera la energía para expulsar de la célula al ion tóxico a través del canal iónico; ArsB es una proteína hidrofóbica de 45.577 kDa, y corresponde a la subunidad que conduce los aniones, se localiza en la membrana interna y también sirve de anclaje para ArsA (Chen *et al.*, 1986a); ArsC es una proteína hidrofílica de 15.811 kDa y funciona como reguladora del operón (Rosen *et al.*, 1991); y por último, ArsR es una proteína represora que regula la expresión del operón *ars* (Wu y Rosen, 1991). Los productos de los genes *arsA* y *arsB* son suficientes para la resistencia a arsenito, el gen *arsC* se requiere para la resistencia a arseniato (Chen *et al.*, 1985).

Otro mecanismo de resistencia a arsenito, no conferido por plásmidos, se encontró en bacterias del tipo *Alcaligenes*, y consiste en la oxidación del arsenito (AsIII), a la forma menos tóxica de arseniato (AsV) (Williams y Silver, 1984), no se conoce si en *T. ferrooxidans* se presenta un mecanismo similar.

Como puede observarse, el conocimiento actual sobre los mecanismos de resistencia de *T. ferrooxidans* a metales pesados, es aún limitado por lo que se vuelve indispensable estudiar estos eventos, así como los mecanismos involucrados en los procesos de replicación, transcripción y traducción, para tener la capacidad de producir cepas mejoradas y ejercer un mayor control en los procesos a nivel industrial.

## MATERIALES Y METODOS

**I. Obtención de agua de mina y enriquecimiento bacteriano.** El agua de mina conteniendo las muestras biológicas, provino de 3 fondos mineros domésticos, “Nochebuena” (Saltillo, Coah.), “Los Halcones” (Parral, Chih.) y Minera “Cananea” (Cananea, Son.), constituidos por minerales de pirita, arsenopirita y calcopirita. Las muestras se recolectaron en frascos estériles de 100 ml. Una alícuota de 10 ml fue transferida a un matraz de 250 ml conteniendo 90 ml de medio líquido 9K suplementado con  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Silverman y Lundgren, 1959), ajustando el pH= 3.0 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Las muestras se incubaron a 30°C en agitación constante (175 rpm) en una incubadora con agitación (New Brunswick Innova 4000).

**II. Aislamiento de cepas de *T. ferrooxidans*.** A partir del cultivo de pre-enriquecimiento, se tomó una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  y se distribuyó homogéneamente sobre cajas de Petri, conteniendo diferentes medios selectivos (Harrison, 1989; Kelly y Harrison 1989) para la identificación de cepas de *T. ferrooxidans* y de otro tipo de microorganismos presentes en estos consorcios. Las cepas puras de *T. ferrooxidans* fueron crecidas en medio líquido 9K suplementado con sulfato ferroso, para su caracterización posterior, y unas alícuotas fueron almacenadas en presencia de glicerol al 50% en un congelador REVCO a -70°C.

**II. Obtención de cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* resistentes al arsénico.** Aguas de mina provenientes de depósitos de minerales refractarios de pirita y arsenopirita y calcopirita fueron inoculadas en medio líquido 9K conteniendo sales básicas como se describe a continuación: (g/L)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5;  $\text{MgSO}_4$ , 0.5; KCl, 0.1 y  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.01, suplementado con  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a una concentración final de 40 g/L de acuerdo al método descrito por Silverman y Lundgren (1959) La identificación de *Thiobacillus ferrooxidans* se hizo de acuerdo al Manual de Bergey (1989): La identificación de colonias en medio sólido se hizo usando el método descrito por Shiratori, et al., (1989), modificando el uso de sílica coloidal por agar-agar como base sólida. Se picaron colonias y se sembraron en medio líquido, para tener cepas aisladas.

El método utilizado para obtener cepas resistentes al arsénico, fue una presión selectiva, en la cual se añadieron a cultivos bacterianos en medios líquidos 9K, cantidades crecientes de AsIII como m-arsenito de sodio ( $m\text{-NaAsO}_2$ ), en etapas sucesivas de 200 en 200 ppm, hasta lograr tener crecimiento de bacterias a la concentración mayor de 1,800 ppm.

**III. Caracterización de resistencia a otros metales pesados.** Las cepas de *T. ferrooxidans* se caracterizaron en su resistencia a otros iones inhibitorios del crecimiento bacteriano como cobre, mercurio, cadmio, molibdeno y plata. Para llevar a cabo esta prueba, se preparó medio líquido 9K adicionado con  $\text{FeSO}_4$ , y se añadieron sales de cada elemento a diferentes concentraciones para establecer las condiciones de crecimiento de acuerdo a su resistencia para cada uno de ellos por separado; las sales añadidas fueron  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{AgNO}_3$ , en el caso de la plata, se omitió el KCl en el medio de cultivo, y el crecimiento en cada caso fue registrado.

**IV. Preparación y análisis del concentrado de pirita y arsenopirita.** Una muestra de mineral de pirita y arsenopirita de aproximadamente 50 kg fue homogeneizada utilizando el método de cuarteo hasta llegar a una muestra representativa de aproximadamente 10 kg. Posteriormente se secó a 70 °C, se volvió a homogeneizar utilizando un muestreador automático Sepor Precision Sampler y se pulverizó en un Disc/Plate Pulverizer Bico-Braun. Se prepararon porciones de 500 g cada una y se hicieron análisis de cribas; después se determinaron los porcentajes y leyes de los principales elementos presentes. La determinación de la ley de oro se llevó a cabo por medio del ensaye por fuego; el plomo por complejometría con EDTA; el arsénico, el cobre, el zinc, el manganeso, el antimonio y el cadmio por absorción atómica; y el mercurio por generador de hidruros en un equipo de absorción atómica Perkin-Elmer Mod. 3110; el fierro por dicromatometría; y el azufre por gravimetría precipitando como sulfato de bario. Para la identificación de la pirita y la arsenopirita se tomó una muestra ya homogeneizada y se analizó cualitativamente por difracción de rayos X utilizando un Difractómetro de Rayos X PHILIPS X'PERT con monocromador secundario.

**IV. Lixiviación del concentrado de pirita y arsenopirita.** Los concentrados de pirita y arsenopirita (-400 mallas al 50 % aproximadamente), fueron lixiviados en matraces Erlenmeyer de 1,000 ml, con una relación de 10% peso a volumen, 250 ml de agua, inoculándose al 10% con células metabólicamente activas ( $10^7$  células.  $\text{ml}^{-1}$ ). El número de células en la mezcla fue determinado utilizando una cámara Petroff-Hausser en un microscopio de contraste de fases Zeiss con objetivo 100x. Un matraz sin inóculo fue utilizado como control estéril. El pH inicial para todos los matraces fue de 2.3, y se midió como es usual. Los matraces se incubaron a 30°C y agitación constante de 175 rpm (New Brunswick modelo 4000). Después de un breve período de equilibrio -2 horas- una muestra inicial de 5 ml fue tomada, se sedimentó por centrifugación y se analizó para fierro total, ion férrico, ion ferroso, arsénico total y pH, como se describe en una próxima sección. Las cinéticas de lixiviación se continuaron con un muestreo periódico cada 24 horas durante 21 días.

**V. Determinación de arsénico total y oxidación de fierro.** Para determinar los niveles de arsénico total y fierro total, un muestreo periódico de los licores lixiviados y no lixiviados se llevó a cabo; 3 ml de cada licor se disolvieron en 3 ml de HCl 3N, y se analizaron por absorción atómica de flama en un equipo Perkin-Elmer Mod. 3110. Para analizar FeII, 1 ml de licor se disolvió en 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1:1, llevándose a un volumen final de 80 ml con agua destilada y se tituló con una solución de  $\text{KMnO}_4$  5.0 mM. El FeIII, se determinó adicionando 1 ml de licor a 1 ml de HCl 6N, 1 ml de acetato de sodio trihidratado al 50 %, completando hasta un volumen de 80 ml con agua destilada, y calentando a 70 °C, posteriormente se tituló con una solución de ácido ascórbico disuelta en EDTA-2Na 0.01N a una concentración final de 0.01N, usando "Bindschedler's green leuco base" como indicador. Las determinaciones de pH se hicieron de manera rutinaria.

**VI. Proceso de cianuración.** Después del proceso de biolixiviación, cada mineral fue filtrado, para remover el fierro y el arsénico presentes en el licor de lixiviación, lavado y secado a 60 °C. Diez gramos se diluyeron con 150 ml de una solución de NaCN al 0.5 %, con un pH final de 10.5 ajustado con una solución de NaOH, (modificado de Habashi, 1967), durante 16 h a 175 rpm, siguiendo el mismo procedimiento para el mineral no biolixiviado que se utilizó como control.

En todos los casos, el oro solubilizado se determinó por absorción atómica de flama en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Modelo 3110. Para confirmar la recuperación de oro, el metal no solubilizado de cada residuo se analizó utilizando el método de ensaye por fuego.

## RESULTADOS Y DISCUSION

**Obtención de agua de mina y enriquecimiento bacteriano.** Para la obtención de muestras biológicas, se seleccionaron tres minas domésticas del norte del país, con yacimientos de minerales refractarios en los cuales se beneficiaban principalmente oro, plata, plomo y cobre, utilizando los métodos metalúrgicos tradicionales de recuperación, y cuyas leyes de metales de interés industrial, les permitía un costo beneficio aceptable, pero en algunas de ellas los rendimientos eran pobres.

Las principales características de los sitios de donde se tomaron las muestras de agua para el aislamiento de microorganismos nativos se enlistan en la Tabla 2. Estos resultados indican que la distribución de *T. ferrooxidans*, es mayor que la de otros microorganismos. En este estudio no encontramos otros microorganismos como *Thiobacillus thiooxidans* y *Acidiphilium* sp., en minerales que contenían plata. Además, aun y cuando el pH óptimo para el crecimiento de *T. ferrooxidans* en medio sintético es menor de 3.0, nuestro hallazgo indica que el pH de los sitios de muestreo no es una limitante para la presencia y aislamiento de este tipo de microorganismos. La presencia de *T. ferrooxidans* en minerales en sitios donde el pH es mayor al óptimo, podría explicarse, debido a la presencia de minerales como la calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) y algunas de sus isoformas cristalinas, que podrían neutralizar el ácido sulfúrico.

Tabla 2. Obtención y caracterización de las muestras.

| Mina                          | Minerales                | Producción <sup>a</sup> | Muestras | <i>T.f.</i> | <i>T.t.</i> | <i>Ac.</i> | pH <sup>b</sup> | T <sup>c</sup> |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|----------|-------------|-------------|------------|-----------------|----------------|
| Nochebuena<br>Saltillo, Coah. | Pirita y<br>Arsenopirita | Au y Ag                 | 14       | +           | -           | -          | 6               | 33             |
| Cananea<br>Cananea, Son.      | Calcopirita              | Cobre                   | 7        | +           | +           | +          | 5               | 35             |
| Los Halcones<br>Parral, Chih. | Pirita                   | Pb y Ag                 | 8        | +           | -           | -          | 2               | 37             |

Clave: + = presencia de microorganismos; - = ausencia de microorganismos; *T.f.* = *T. ferrooxidans*; *T.t.* = *T. thiooxidans*; *Ac.* = *Acidiphilium* sp.; a = metal beneficiado; b = valor promedio del grado de acidez de las muestras de agua; c = temperatura del agua en grados Celsius al momento del muestreo.

**Aislamiento y obtención de cepas nativas de *T. ferrooxidans*.** Aunque muchos de los procesos de biolixiviación se llevan a cabo utilizando consorcios bacterianos, existe la posibilidad de que uno solo de los microorganismos sea el responsable de la mayor actividad oxidativa, y que la presencia del resto pueda disminuir su capacidad. Esto hace importante el identificar cual o cuales son realmente los microorganismos involucrados en el proceso de lixiviación. Debido a lo anterior, en este trabajo nosotros procedimos al aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en los tres yacimientos, utilizando medios de cultivo sólidos para tener cepas aisladas de *T. ferrooxidans* y otras, para posteriormente determinar sus actividades oxidativas de manera independiente. En la Tabla 3 se muestran los medios selectivos utilizados para la identificación de las bacterias nativas.

Tabla 3. Medios selectivos utilizados para el aislamiento de microorganismos nativos.

| <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>   | <i>Thiobacillus thiooxidans</i> <sup>1</sup>                             | <i>Acidiphilium sp</i> <sup>2</sup> |
|------------------------------------|--|-------------------------------------|
| Medio 9K                           | Medio 9K   | Medio 9K                            |
| Sol. saturada de FeSO <sub>4</sub> | sol. 5% Na <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·2H <sub>2</sub> O | Glucosa al 1%                       |
| agar-agar al 2%                    | Goma gellan al 0.8%  | Extracto de levadura al 0.01%       |
|                                    |  | agar-agar al 2%                     |

<sup>1</sup> Kelly y Harrison, 1989; <sup>2</sup> Harrison, 1989.

**Aislamiento y caracterización de una cepa nativa y una cepa resistente al arsénico de *T. ferrooxidans*.** Logramos aislar 29 cepas independientes de *T. ferrooxidans* derivadas de tres minas diferentes. De un total de 10 cepas nativas analizadas en su resistencia al arsénico, 3 fueron sensibles a 50 ppm, y 7 toleraron hasta 200 ppm. Aunque las cepas de *T. ferrooxidans* fueron aisladas del drenaje ácido de minas conteniendo depósitos de minerales de pirita, arsenopirita y calcopirita, principalmente, fue interesante encontrar, que en las condiciones probadas en nuestro laboratorio, 30% de ellas fueron incapaces de crecer a concentraciones mayores de 50 ppm de arsénico. Nosotros no encontramos ningún microorganismo nativo capaz de crecer a concentraciones mayores a 200 ppm. De las 7 tolerantes a 200 ppm seleccionamos una, y denominamos T1. La cepa T1 se sometió a presión selectiva usando cantidades crecientes de

AsIII, logramos seleccionar cepas resistentes aún a concentraciones de 1,800 ppm, la cual denominamos T18. Las cepas T1 y T18 fueron caracterizadas con mayor detalle, y se utilizaron a lo largo del presente trabajo.

Una de las principales características de *T. ferrooxidans*, que lo hacen el microorganismo más factible para ser utilizado en la oxidación biológica de minerales de hierro y azufre, para recuperar metales de interés económico, es su capacidad para oxidar selectivamente al FeII presente en los minerales refractarios del tipo de la pirita y la arsenopirita, y cuya acción otros microorganismos como *T. thiooxidans* y *Acidiphilium* sp. son incapaces de realizar.

El primer parámetro para analizar la actividad biológica y oxidativa de las cepas nativa y mejorada, fue determinar las velocidades de oxidación de FeII a FeIII en medios de cultivo líquidos sintéticos, y en base a esta actividad metabólica, determinar los tiempos de duplicación. Como se puede observar en la Figura 1, los valores de oxidación de FeII a FeIII en ambas cepas muestra un comportamiento típico de crecimiento bacteriano, observándose con claridad la fase de latencia, la exponencial y la estacionaria. Los tiempos de duplicación que se obtuvieron, fueron de 12 h para la cepa nativa T1, un tiempo muy grande para una bacteria típica, pero que es característico de una bacteria quimiolitotrófica como *T. ferrooxidans*; para la cepa mejorada T18 los valores fueron semejantes. También se puede observar que la presencia del FeII es el nutriente fundamental que determina el crecimiento bacteriano, y que cuando este se agota, debido a la acción oxidativa de los microorganismos, el cultivo entra en fase estacionaria.

En la literatura se ha reportado que el hierro férrico en solución es un ion inhibitorio de la adsorción de *T. ferrooxidans* al mineral, nuestros resultados indican que el elemento fundamental para el crecimiento de *Thiobacillus* es el ion ferroso, y por lo menos a las concentraciones del ion férrico que se obtuvieron en este experimento, no se observó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano. De haberse presentado este efecto, podríamos esperar que la velocidad de crecimiento tendiera a disminuir conforme se incrementaba el ion férrico en solución; sin embargo nuestros resultados fueron claros, la velocidad del crecimiento exponencial es constante, independientemente de las concentraciones de hierro, y únicamente se detiene al agotarse el ion ferroso.



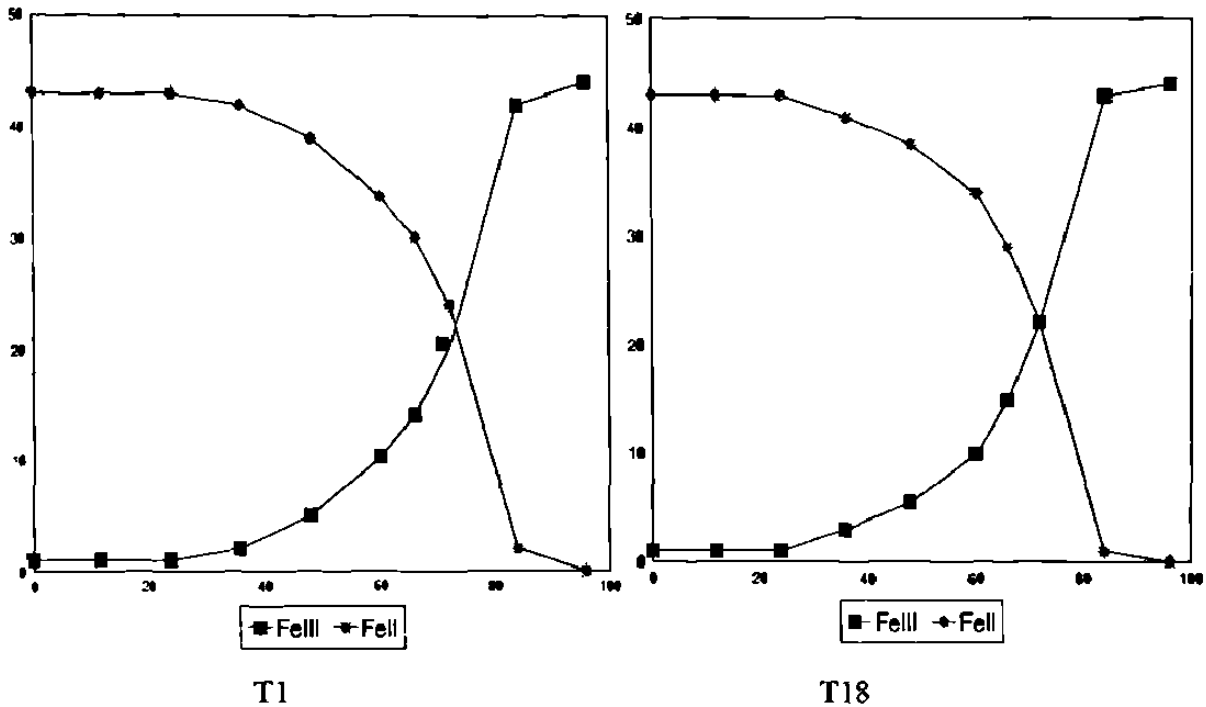


Figura 1. Cinéticas de oxidación del ion ferroso al ion férrico, y crecimiento de las cepas nativas y mejoradas de *T. ferrooxidans*.

Otro aspecto relevante de los tiempos de duplicación determinados por la actividad oxidativa, es la importancia que a nivel práctico este tipo de análisis puede tener, ya que en pruebas de campo y/o de aplicaciones a nivel industrial, el personal de la planta minera ya está familiarizado con este tipo de determinaciones y de hecho cuentan con la infraestructura básica para realizarlo, resultando un método mas sencillo y representativo del número de microorganismos presentes, sin necesidad de recurrir al conteo de células por observación directa al microscopio o en medios de cultivo sólidos (unidades formadoras de colonias, UFC).

Uno de los elementos importantes para el crecimiento de *T. ferrooxidans*, además del ion ferroso, es el efecto que puedan ejercer algunos metales pesados, que si bien su presencia se puede controlar en medios de cultivos sintéticos, en procesos de biolixiviación, su presencia y concentraciones van a depender del tipo y origen del mineral que vaya a ser procesado. Para cualquier microorganismo que se pretenda utilizar en procesos de biolixiviación, un requisito muy importante es el que se conozca y se tenga bien caracterizada la resistencia a otros metales que

normalmente están asociados a cualquier mineral. Para determinar los patrones de resistencia a metales pesados de las cepas T1 y T18, se procedió a determinar su capacidad de crecer en medios sintéticos líquidos que contenían de manera independiente, diferentes concentraciones de varios metales. Las concentraciones utilizadas de cada metal, se basaron en las concentraciones de estos elementos en el mineral a estudiar y los niveles esperados de éstos, en el caso de que ocurriera una solubilización total por efecto del proceso de biolixiviación, así como por el factor de dilución empleado. Los patrones de resistencia, indican que ambas cepas tienen la capacidad natural de sobrevivir y adaptarse a concentraciones considerables de metales pesados. Ambas cepas fueron capaces de crecer en presencia de 100 ppm de Cu, y 200 ppm para Cd y Mo, y en presencia de metales altamente tóxicos como Ag y Hg a <5 ppm (Tabla 4). Un resultado interesante y que no esperábamos, es que la cepa T18, fue capaz de resistir 15 ppm de Hg, el cual es extremadamente tóxico, y sin embargo T1, fue incapaz de crecer a esta concentración. A la fecha no contamos con una explicación del cómo o porqué la presión selectiva para arsénico, alteró específicamente la resistencia a Hg, y no para los otros metales probados. En la naturaleza es común el encontrar minerales en los cuales las concentraciones totales de metales pesados como los aquí analizados, excedan las cantidades en las cuales reportamos crecimientos bacterianos. Es importante mencionar, que los únicos iones que pueden inhibir la actividad metabólica bacteriana, son los que se encuentran en forma soluble (tal como se usaron en este estudio) y/o que interaccionan directamente con los microorganismos, y la cantidad de iones en minerales con estas características, está por debajo de los valores máximos en los cuales observamos crecimiento con ambas cepas de *Thiobacillus*.

**Análisis químico del concentrado refractario.** La recuperación de oro en un proceso de biolixiviación, depende básicamente de la interacción óptima entre el mineral y el microorganismo (Bennet y Tributsch, 1978). Debido a este hecho, es importante determinar, además del contenido de oro y el tipo específico de mineral que se usará, su contenido de metales pesados, así como la distribución en cribas (tamaño de partícula) de los principales elementos involucrados en el crecimiento bacteriano.

Tabla 4. Patrones de resistencia bacteriana a metales pesados <sup>a</sup>.

| Ión       | T1  | T18   |
|-----------|-----|-------|
| Arsénico  | 200 | 1,800 |
| Cobre     | 100 | 100   |
| Mercurio  | <15 | 15    |
| Cadmio    | 200 | 200   |
| Molibdeno | 200 | 200   |
| Plata     | <5  | <5    |

<sup>a</sup> = Las concentraciones están expresadas en ppm y son aquellas en las cuales los microorganismos son aun capaces de crecer.

El análisis cualitativo por difracción de rayos X de "la cabeza" del concentrado utilizado en este estudio, demuestra la presencia de los picos primarios, secundarios, terciarios, etc., correspondientes a la pirita y a la arsenopirita, como las principales formas cristalinas de este mineral, así como la presencia en proporciones menores de otros tipos de minerales, entre los cuales podemos mencionar cuarzo, sílica, kehoeita, esfalerita, wurtzita, cristobalita, cloruro de cesio-plomo-antimonio, zirconio, kutnohorita, estanoidita, silicatos de sodio y aluminio, yterbio, rubidio, neodimio, langbeinita y algunos otros (Fig. 2).

Los resultados de la caracterización del mineral de pirita y arsenopirita por difracción de rayos X, fueron confirmados mediante el análisis cuantitativo de fierro, azufre, arsénico y otros elementos presentes, así como por su distribución porcentual de acuerdo al tamaño de partícula, mediante un análisis de cribas (Tablas 5 y 6). Adicionalmente, también se determinaron las concentraciones de otros elementos presentes a nivel traza, y que son potencialmente inhibitorios del crecimiento de microorganismos; estos fueron: Sb, 0.02%; Cd, 0.03% y Hg, 0.0009%. El porcentaje de azufre fue de 32.5%.

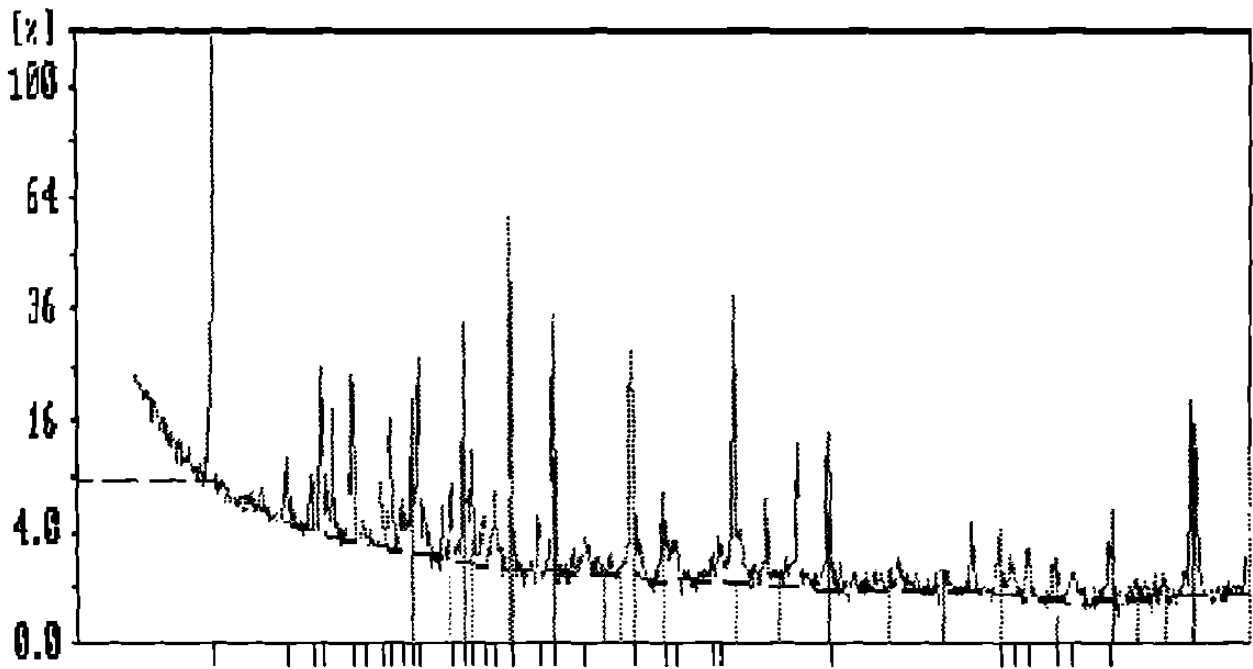


Figura 2. Identificación por difracción de rayos X del concentrado refractario utilizado en este estudio, donde se muestran los picos primarios, secundarios, terciarios y otros. Pirita (líneas moradas) y arsenopirita (líneas verdes), el eje de las "y" muestra el porcentaje relativo de cada mineral.

Tabla 5. Análisis cuantitativo de cribas y de cabeza del mineral utilizado en este estudio de los principales elementos presentes.

**Peso acumulativo**

| Malla | Peso g | %     | +      | -     | Au g/t | Pb % | Cu % | Zn % | Fe % | As% | Mn % |
|-------|--------|-------|--------|-------|--------|------|------|------|------|-----|------|
| +65   | 3.44   | 0.83  | 0.83   | 99.17 | 3.4    | 0.78 | 0.06 | 0.78 | 19.2 | 1.3 | 0.40 |
| +100  | 17.76  | 4.27  | 5.10   | 94.90 | 5.8    | 0.43 | 0.03 | 0.81 | 38.2 | 1.9 | 0.40 |
| +150  | 78.64  | 18.91 | 24.01  | 75.99 | 7.0    | 0.34 | 0.04 | 0.37 | 41.1 | 1.1 | 0.01 |
| +200  | 2.24   | 0.54  | 24.55  | 75.46 | 6.7    | 0.18 | 0.04 | 0.28 | 41.2 | 1.0 | 0.01 |
| +250  | 91.23  | 21.94 | 46.48  | 53.52 | 9.4    | 0.20 | 0.02 | 0.18 | 42.5 | 1.5 | 0.01 |
| +400  | 20.75  | 4.99  | 51.47  | 48.53 | 9.2    | 0.25 | 0.03 | 0.20 | 40.0 | 1.5 | 0.01 |
| -400  | 201.83 | 48.53 | 100.00 | 0.00  | 16.9   | 0.16 | 0.07 | 0.27 | 23.3 | 3.1 | 0.00 |

|                  |       |      |      |      |       |      |      |
|------------------|-------|------|------|------|-------|------|------|
| Cabeza calculada | 12.36 | 0.22 | 0.05 | 0.29 | 32.41 | 2.21 | 0.01 |
| Cabeza analizada | 9.80  | 0.94 | 0.04 | 0.73 | 28.40 | 2.10 | 0.03 |

Tabla 6. Distribución porcentual de los principales elementos presentes en el mineral de acuerdo al tamaño de partícula.

| Tamaño partícula en $\mu\text{m}$ | Au    | Pb    | Cu    | Zn    | Fe    | As    | Mn    |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 212                               | 0.23  | 2.95  | 1.00  | 2.20  | 0.49  | 0.49  | 48.27 |
| 212 a 150                         | 2.00  | 0.41  | 2.59  | 11.81 | 5.03  | 3.67  | 50.13 |
| 150 a 106                         | 10.71 | 26.84 | 15.31 | 23.88 | 23.98 | 9.40  | 0.57  |
| 106 a 75                          | 0.29  | 0.44  | 0.44  | 0.51  | 0.68  | 0.24  | 0.43  |
| 75 a 63                           | 16.69 | 20.09 | 8.88  | 13.48 | 28.77 | 14.85 | 0.28  |
| 63 a 38                           | 3.71  | 5.71  | 3.03  | 3.41  | 6.16  | 3.38  | 0.31  |
| menos de 38                       | 66.37 | 35.55 | 68.75 | 44.72 | 34.89 | 67.96 | 0.00  |

Los resultados de la Figura 3, indican que para este mineral en particular, el oro y el arsénico están asociados principalmente a nivel de cristales de arsenopirita, dada su distribución homogénea a través de cada malla, independientemente del tamaño de partícula, mientras que el hierro tiene una distribución diferente. Este dato fue confirmado por microanálisis, el cual mostró que un 30% del oro estaba libre y un 70% estaba incluido a nivel de cristales de arsenopirita (Marcos Monroy, UASLP, comunicación personal). Este hecho corrobora la ventaja de utilizar una bacteria mejorada en su resistencia a arsénico, para incrementar la recuperación de oro en este tipo de minerales refractarios con alto contenido de oro.

Otros datos adicionales de utilidad práctica que aporta este tipo de análisis, es el de que nos permiten determinar el grado apropiado de molienda del concentrado refractario, para que se dé una interacción apropiada microorganismo-mineral durante el proceso de biolixiviación y que permita una exposición adecuada del metal precioso al cianuro, con lo que se obtendría una mayor recuperación de oro.

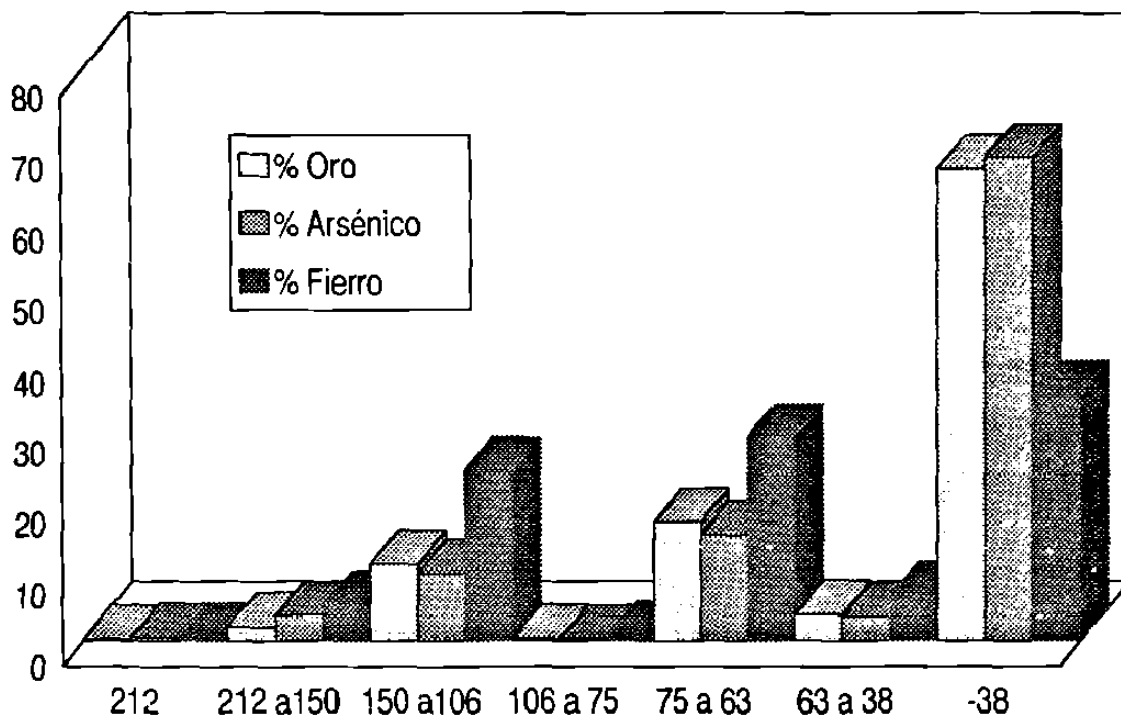


Figura 3. Distribución de oro, arsénico y hierro de acuerdo al tamaño de partícula. Esta figura muestra los tamaños de partícula en micrómetros y su distribución porcentual conforme a las mallas empleadas en este estudio.

**Proceso de Biolixiviación.** Una vez que ya se tenía una caracterización completa tanto de los microorganismos como del mineral refractario que contenía oro, se procedió a probar la capacidad tanto de la cepa nativa como de la cepa mejorada en un proceso de biolixiviación, seguido de una cianuración, para incrementar los rendimientos de recuperación de oro. Dos series de matraces se prepararon con inóculos independientes de las cepas T1 y T18, y un tercer matraz sin inóculo sirvió como control estéril. La cinética del proceso de biolixiviación fue monitoreada, determinando la concentración de hierro total, la oxidación de hierro ferroso, el incremento del hierro férrico, la solubilización del arsénico total, y el incremento del pH en el licor de lixiviación.

El pH inicial en todos los matraces fue de 2.3, en los matraces inoculados con *Thiobacillus* la acidez del medio se incrementó conforme progresaba la actividad bacteriana, alcanzando un pH=1.5 al vigésimo primer día. Esta disminución fue debida al ácido sulfúrico generado por el microorganismo, a diferencia del control sin microorganismos en el cual el pH permaneció sin cambios durante todo el proceso

Los resultados de la cinética de oxidación química (mineral control no lixiviado) y biológica (minerales lixiviados) de la Figura 4, muestran que exclusivamente en los minerales tratados con microorganismos existe una solubilización de fierro total, y un decrecimiento del  $Fe^{II}$  conjuntamente con un incremento del ión  $Fe^{III}$ , debido a la oxidación biológica generada por las bacterias. Si bien en las pruebas realizadas en medios de cultivo sintéticos se observó una actividad similar de oxidación de fierro ferroso con la cepa nativa y la cepa resistente a arsénico (ver Figura 1), en presencia del mineral se presentó una diferencia notable, la velocidad de oxidación de la cepa T18 fue superior 3 veces en relación a la cepa T1, y comparado con el grado de oxidación química en el mineral no tratado, fue mayor aproximadamente 500 veces.

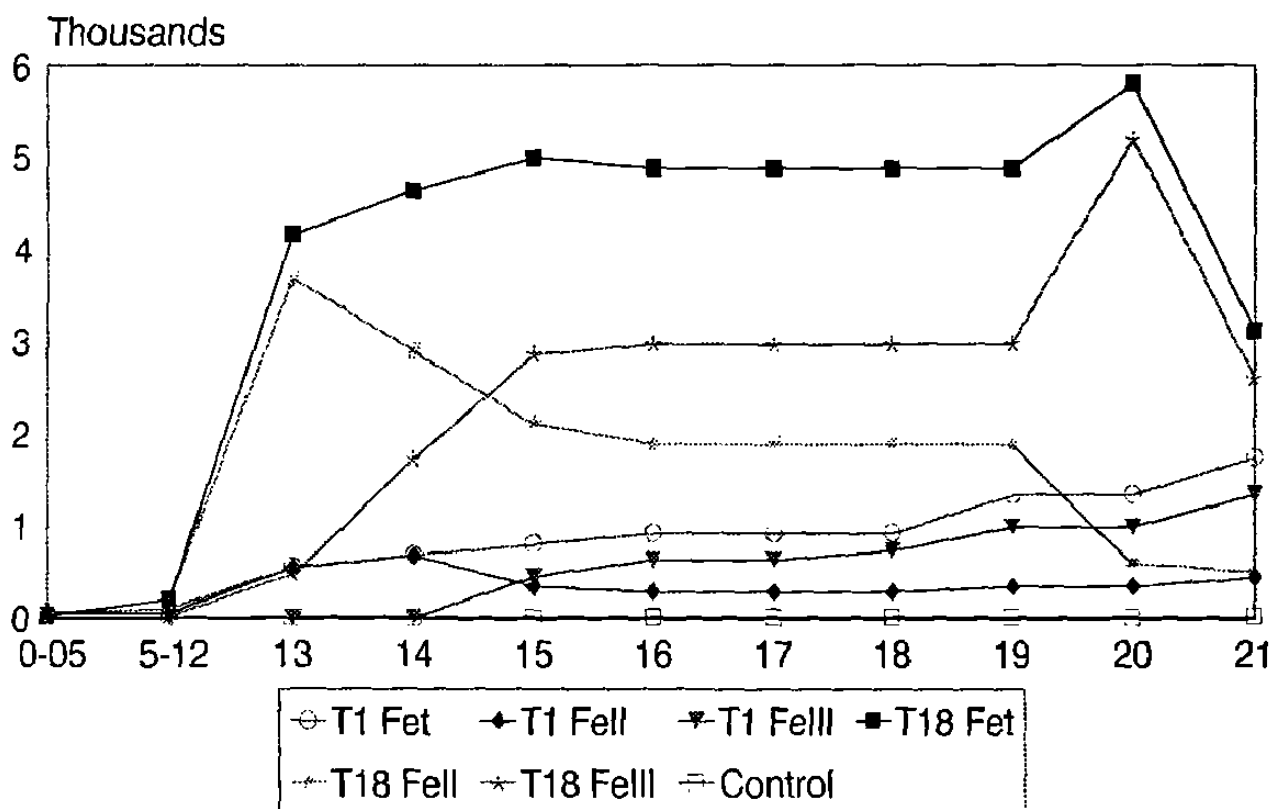


Figura 4. Cinética de oxidación del Fe ferroso en minerales tratados y no tratados con microorganismos. En el eje de las "y" se indica los valores expresados en miles de ppm de cada elemento; en el eje de la "x" los tiempos de tratamiento, expresados en días.

Estos datos sugieren que aunque ambas cepas son capaces de oxidar fierro, puede ser posible que algún elemento tóxico presente en el concentrado, puede ser responsable de la inhibición de la actividad metabólica de la cepa nativa. Debido a que las principales diferencias entre T1 y T18, es el grado de resistencia al arsénico, el cual esta presente en una cantidad considerable (2.1%), consideramos que la bacteria mejorada tiene la ventaja de resistir mayores cantidades del metal y además, también tiene una mayor oxidación sobre los minerales de arsenopirita, que es donde se encuentra el arsénico. Estos resultados confirman nuestra hipótesis de trabajo de que la utilización en biolixiviación de una cepa mejorada en su resistencia al arsénico, ejercería una mayor capacidad oxidativa sobre minerales de arsenopirita.

Durante la acción biológica de *T. ferrooxidans* sobre un mineral de sulfuro de fierro y arsénico, como es la arsenopirita, sería de esperarse que asociado al incremento de la oxidación del fierro ferroso, hubiera una solubilización concomitante del arsénico, ya que hemos demostrado que en este mineral en particular existe una estrecha asociación entre estos dos elementos. Para probar que efectivamente además de un incremento en la oxidación de fierro por la cepa T18, se presentaría un incremento en la solubilización de arsénico, simultáneamente al muestreo de la cinética de oxidación de fierro reportado en la figura 4, se tomaron alicuotas que fueron sometidas a un análisis para determinar las concentraciones totales de arsénico. Los resultados de la Figura 5, indican que si bien, ambas cepas son capaces de lixiviar arsénico, se confirma nuestra predicción de que la cepa T18 es metabólicamente mas activa, encontrando un valor superior en 1.6 veces en relación a la actividad de la cepa T1.

Otro dato a favor de nuestra hipótesis, es que después de un período de equilibrio, existe un período estrecho durante el proceso - entre 12 y 13 días - donde la mayor cantidad de solubilización de arsénico es alcanzada, lo mismo que se observó para el fierro (ver figura 4), sin cambios considerables a través de un periodo largo de tiempo. Esto confirma que por lo menos con este tipo de mineral y esta bacteria utilizada, existe una estrecha relación, entre la oxidación de fierro y arsénico



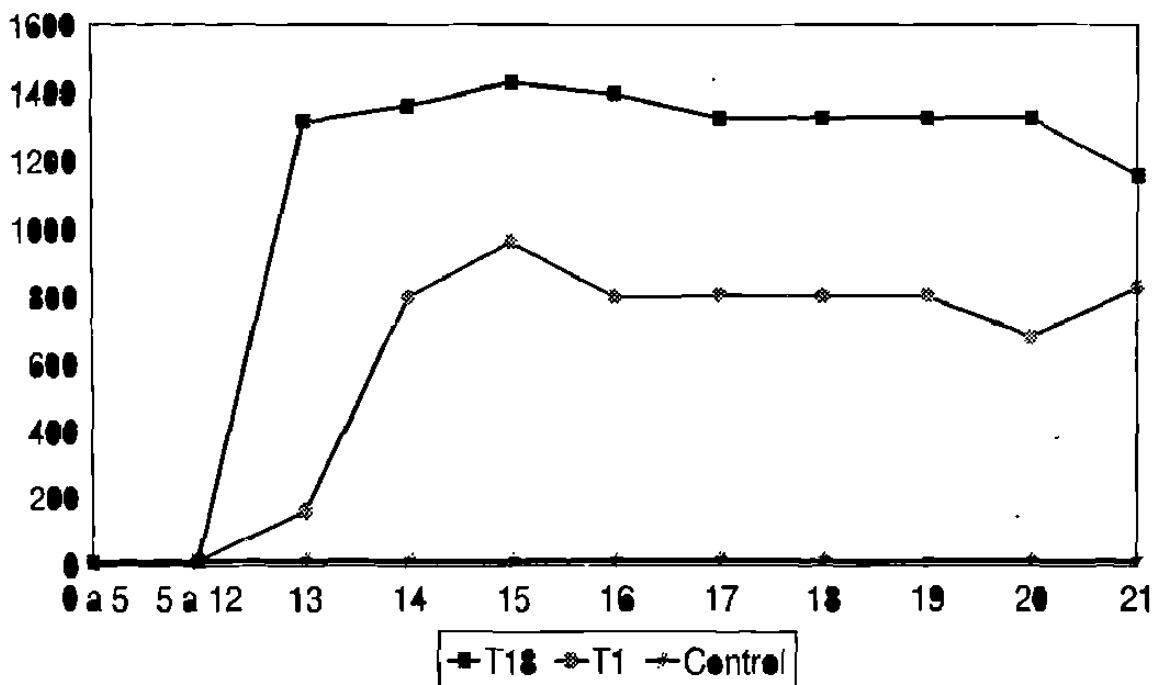


Figura 5. Cinética de solubilización del arsénico total en minerales biolixiviados y no lixiviados. El eje de las "x" indica el periodo de tiempo expresado en días; y el eje de las "y" las ppm de arsénico.

**Proceso de cianuración.** La recuperación de oro a partir de minerales refractarios por cianuración directa, es parcial y limitado. Esto se debe, principalmente, a la presencia de diferentes elementos en el mineral que actúan como cianicidas y al reaccionar con el cianuro compiten con el oro y otros metales preciosos, independientemente de la inclusión del oro dentro de la estructura cristalina del mineral, al cual no tiene acceso el cianuro, y por lo tanto es incapaz de reaccionar con él y solubilizarlo. Una biolixiviación previa, puede ser de utilidad para producir un incremento en la recuperación del oro; sin embargo, la presencia de algunos elementos tóxicos en el mineral pueden representar un inconveniente, debido a su potencial efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los microorganismos. Como se ha mencionado anteriormente uno de estos elementos puede ser el arsénico. Los resultados de oxidación de fierro y de solubilización de arsénico en los minerales biolixiviados, nos permitieron tener confianza en que la utilización de la cepa T18 en la biolixiviación de este mineral, produjera rendimientos sensiblemente mayores en la recuperación de oro por cianuración, a los obtenidos con la cepa nativa.

El mineral utilizado en este estudio, fue un concentrado de pirita y arsenopirita, conteniendo 9.8 g de oro por tonelada. Los resultados de la Figura 6, muestran que efectivamente la cepa T1 es capaz de generar una recuperación 6 veces mayor que el mineral no tratado, lo que pone de manifiesto la utilidad de la biolixiviación como pretratamiento y además, se confirma la predicción de este trabajo de que la cepa T18 aumentaría los rendimientos de recuperación de oro, en particular, nuestra cepa resistente mejora casi dos veces la recuperación de oro lograda con la cepa nativa, y diez veces los rendimientos obtenidos con el mineral no tratado. Este incremento considerable en la recuperación de oro es económicamente importante porque significa, que para este tipo particular de mineral, un proceso de cianuración directa solo produce una recuperación de 7.5%, ésta es aumentada hasta un 45% utilizando una cepa nativa y a un 75% con una cepa mejorada en su resistencia al arsénico.

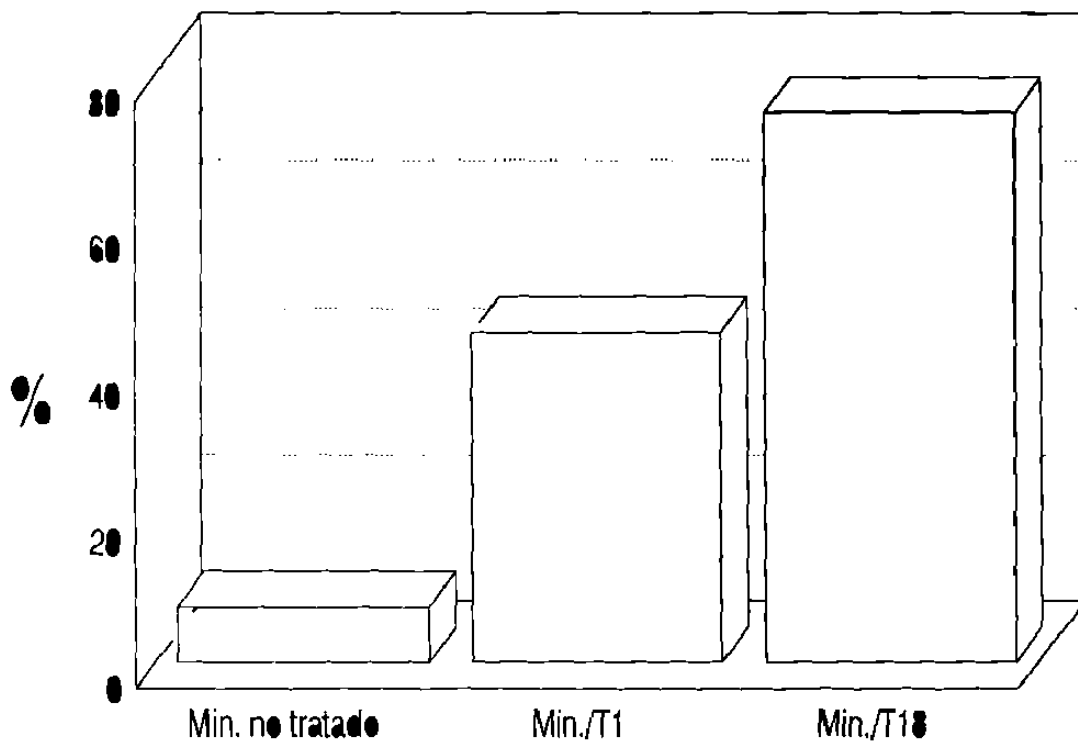


Figura 6. Recuperación de oro a partir de concentrados con pirita y arsenopirita.

Estos datos fueron corroborados analizando el oro remanente en las “colas” de cianuración, el cual no fue lixiviado por la solución de cianuro y los resultados obtenidos fueron de 9.6 g/t para el mineral no lixiviado, 5.2 g/t para el mineral tratado con la cepa T1 y 2.3 g/t para el mineral tratado con la cepa T18. Nuestros resultados se asemejan a los obtenidos por Lawrence (1994), quien al trabajar con cepas aisladas de distintas minas, encontró que las mejores cepas permitieron recuperaciones de oro de hasta un 80%.

## CONCLUSIONES

- 1.- Logramos aislar un total de 29 cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* a partir de minas con alto contenido de pirita y arsenopirita.
- 2.- Las cepas nativas y resistentes al arsénico, mostraron niveles similares de resistencia natural a los metales pesados (Cu, Ag, Mo y Cd), con excepción del mercurio.
- 3.- Obtuvimos una cepa con alta resistencia a arsénico (1800 ppm). La cual también presentó resistencia a Hg (15 ppm).
- 4.- La cepa T18 desarrolló mejor actividad metabólica en el proceso de biolixiviación.
- 5.- Ambas cepas lixivian fierro y arsénico, mostrándose un incremento con la cepa T18 de 3 y 1.5 veces para fierro y arsénico, respectivamente, con respecto a la cepa nativa.
- 6.- La recuperación de oro, por cianuración, se incrementa substancialmente con la biolixiviación comparando con minerales sin tratamiento.
- 7.- La cepa resistente produce un incremento de 1.6 y 10 veces con respecto al mineral tratado con la cepa nativa y el mineral no biolixiviado, respectivamente.

## LITERATURA CITADA

- Addison, R. 1980. Gold and silver extraction from sulfide ores. *Min. Congr. J.* **66**:47-54.
- Baldi, F., Clark, T., Pollack, S.S., y Olson, G.J. 1992. Leaching of pyrites of various reactivities by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1853-1856.
- Beattie, M.J.V., y Raudsepp, R. 1988. The Arseno process-an update, in *Projects 88, Proc. 18th Hydrometallurgical Meeting of CIM, Edmonton, Alberta*, Conference of Metallurgists.
- Bennet, J.C., y H. Tributsch. 1978. Bacterial leaching patterns on pyritic crystals surfaces. *J. Bacteriol.* **134**:310-317.
- Berezowsky, R.M.G.S., y Weir, D.R. 1974. Pressure oxidation for treating refractory uranium and gold ores in *Proc. 22nd Conf. Metallurgists, CIM, Edmonton, Alberta*.
- Brierley, C.L. 1978. Bacterial Leaching. *Crit. Rev. Microbiol.* **6**:207-262
- Brierley, C.L. 1982. Microbiological mining. *Sci. Am.* **247**:42-51.
- Cervantes, C., y Ohtake, H. 1988. Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Letters.* **56**:173-176.
- Cervantes, C., y Vaca, S. 1991. Cromatos: resistencia y detoxificación en bacterias. *Lat-amer. Microbiol.* **33**:71-76
- Cervantes, C. y Chávez, J. 1992. Plasmid-determined resistance to arsenic and antimony in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **61**:333-337.
- Cha, J-S, y Cooksey, D.A. 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:8915-8919.
- Chen, C.-M., Mobley, H.L.T., y Rosen, B.P. 1985. Separate resistances to arsenate and arsenite (antimonate) encoded by the arsenical resistance operon of R-factor R773. *J. Bacteriol.* **161**:758-763.
- Chen, C.-M., Misra, T., Silver, S., Rosen, B.P. 1986a. Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump: The plasmid encoded arsenical resistance operon. *J. Biol. Chem.* **261**:15030-15038.
- Connel, L., y Cross, B. 1981. Roasting process at the Giant Yellowknife (arsenic) mine, in *Proc. 20th Conf. Metallurgists, Hamilton, Ontario, CIM*.
- Dana, E.S., y Ford, W.E. 1984. *Tratado de Mineralogía*, 4a. Edición, CECSA Edit., pp. 443-444.

- Devasia, P., K.A. Natarajan, D.N. Sathyanarayana y G. Ramananda Rao. 1993. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* to adhesion on mineral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:4051-4055.
- Dud'a, R., Rejl, L., y Slivka, D. 1989. La Gran Enciclopedia de los Minerales. 3a. De. SUSAETA, S.A. Eds. México. pp. 280-281, 346-347.
- Ehrlich, H.L. 1964. Bacterial oxidation of arsenopyrite and enargite. *Econ. Geol.* **59**:1306-1312.
- Goddard, P.A., y Bull, A.T. 1989. The isolation and characterization of bacteria capable of accumulating silver. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:308-313.
- Goddard, P.A., y Bull, A.T. 1989a. Accumulation of silver by growing and non-growing populations of *Citrobacter intermedius* B6. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:314-319.
- Guinivire, R. 1984. McLaughlin Project: Process, project and construction development, in *Proc. 1st Intern. Symp. on Precious Metal Recovery, Reno, Nevada*.
- Habashi, F. 1967. Kinetics and mechanism of gold and silver dissolution in cyanide solution. Department of Metallurgy. Montana College of Mineral Science and Technology. *Bulletin* 59.
- Haefel, C., C. Franklin, y K. Hardy. 1984. Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from silver mine. *J. Bacteriol.* **158**:389-392.
- Hansford, G.S., y Drossou, M. 1987. A propagating pore model for the batch bioleach kinetics of refractory gold-bearing pyrite, en P.R. Norris and D.P. Kelly (eds.), *Biohydrometallurgy, Proc. Intern. Symp.*, Warwick, Science and Technology Letters, Kew, U.K., pp. 525-527.
- Harrison, A.P., Jr. 1984. The acidophilic *thiobacilli* and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**:265-292.
- Harrison, A.P., Jr. 1989. Genus *Acidiphilium*, 1981. 211<sup>VP</sup>, pp. 1863-1868. In: J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig, y J.G. Holt. (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.3, The Williams & Wilkins, Co. Baltimore.
- Hedges, R.W., y Braumberg, S. 1973. Resistance to arsenic compounds conferred by a plasmid transmissible between strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **115**:459-460.
- Henley, K.J. 1975. Gold ore mineralogy and its relation to metallurgical treatment. *Miner. Sci. Eng.* **7**:289-312.
- Hutchins, S.R., M.S. Davidson, J.A. Brierley, y C.L. Brierley. 1986. Microorganisms in reclamation of metals. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**:311-336.

- Ingledeu, W.J. 1982. *Thiobacillus ferrooxidans*. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochim. Biophys. Acta.* **683**:98-117.
- Inoue, Ch., Sugawara, K., Shiratori, T., Kusano, T., y Kitagawa, Y. 1989. Nucleotide sequence of the *Thiobacillus ferrooxidans* chromosomal gene encoding mercuric reductase. *Gene* **84**:47-54.
- Inoue, Ch., Sugawara, K., y Kusano, T. 1990. *Thiobacillus ferrooxidans* mer operon: sequence analysis of the promoter and adjacent genes. *Gene* **96**:115-120.
- Ishibashi, Y., C. Cervantes, y S. Silver. 1990. Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2268-2270.
- Karavaiko, G.I., Chuchalin, L.K., Pirovarova, T.A., Yemel'yanov, B A., y Dorofojev. A.G. 1986. Microbiological leaching of metals from arsenopyrite containing concentrates. En R.W. Lawrence, R.M.R. Branion, and H.E. Ebner (eds.). *Fundamental and Applied Biohydrometallurgy*, Elsevier, New York. pp.115-126.
- Kaur, P., y B.P. Rosen. 1992. Plasmid-encoded resistance to arsenic and antimony. *Plasmid* **27**:29-40.
- Kelly, D.P., Norris, P.R., y Brierley, C.L. 1979. Microbiological methods for the extraction and recovery of metals, in A.T. Bull, D.C. Elwood, and C. Ratledge (eds.). *Microbial Technology: Current State, Future Prospects*, Cambridge University Press, Cambridge, U.K. pp. 969-989.
- Kelly, D.P., y A.P. Harrison. 1989. Genus *Thiobacillus*, Beijerinck 1904b, 597<sup>AL</sup>, pp. 1842-1858, In: J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig, y J.G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3. The Williams & Wilkins, Co. Baltimore.
- Knowles, F.C., y Benson, A.A. 1983. The biochemistry of arsenic. *Trends Biochem. Sci.* **8**:178-180.
- Lawrence, R.W. 1994. Biooxidation for the treatment of refractory gold ores and concentrates-a Canadian perspective. *Mineral Proc.* **87**:58
- Lawrence, R.W., y Bruynesteyn, A. 1983. Biological preoxidation to enhance gold and silver recovery from refractory pyrite ores and concentrates. *CIM Bull.* **76**(857):107-110.
- Lawrence, R.W., y Gunn, J.D. 1985. Biological preoxidation of a pyritic gold concentrate, in J.F. Spisak and G.V. Jurgensen (eds.), *Frontier Technology in Mineral Processing*, Soc. Min. Eng. AIME, New York, pp 13-17.

- Lawrence, R.W., y Marchant, P.B. 1988. Biochemical pretreatment in arsenical gold ore processing, in R.G. Reddy, J.L. Hendrix, and P.B. Queneau (eds.), *Arsenic Metallurgy-Fundamentals and Applications*, Met. Soc., AIME, Warrendale, PA, pp.199-211.
- Livesey-Goldblatt, E., Norman, P., y Livesey-Goldblatt, D.R. 1983. Gold recovery from arsenopyrite/pyrite ore by bacterial leaching and cyanidation, in G. Rossi and A.E. Torma (eds.), *Recent Progress in Biohydrometallurgy*, Assoc. Mineraria Sarda, Iglesias, Italy, pp. 627-641.
- MacArthur, J.S., Forrest, R.W., y Forrest, W. Process of obtaining gold and silver from ores. British Patent 14,174 (1887), US Patent 403,202 (1889), US Patent 418,137 (1889).
- MacFadden, B.A., y Denend, A.R. 1972. Ribulose diphosphate carboxylase from autotrophic microorganisms. *J. Bacteriol.* **110**:633-642.
- Marchant, P.B. 1985. Plant scale design and economic considerations for biooxidation of an arsenical sulfide concentrate, in *Internat. Symp. Complex Sulfides, San Diego*, CIM-AIME.
- Marchant, P.B. 1986a. Commercial application of biotechnology to enhance gold extraction from complex sulfides, in *Proc. 18th Canadian Mineral Processors Congress*, Energy, Mines and Resources Canada, Ottawa, Ontario, pp. 407-437.
- Marchant, P.B. 1986b. Commercial piloting and the economic feasibility of plant scale continuous biological tank leaching at Equity Silver Mines Limited, en R.W. Lawrence, R.M.R. Branion, and H.E. Ebner (eds.), *Fundamental and Applied Biohydrometallurgy*, Elsevier, New York. pp. 53-76.
- McPheat, I.W., Gooden, J.E.A., y Townend, R. 1969. Submicroscopic gold in a pyrite concentrate. *Proc. Aust. Inst. Min. Metall.* **231**:19-25.
- McCready, R.G.L., y Gould, W.D. 1990. Bioleaching of uranium. In: H.L. Ehrlich and C.L. Brierley (eds.) *Microbial mineral recovery*. McGraw-Hill Book Co., New York. pp. 107-126.
- Merson, J. 1992. Mining with microbes. *New Sci.*, **133**:17-19.
- Mobley, H.L.T., Chen, C.-M., Silver, S., y Rosen, B.P. 1983. Cloning and expression of R-factor mediated arsenate resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **191**:421-426.
- Monroy, M.G., M.A. Dziurla, B.-T. Lam, J. Berthelin, and P. Marion. 1994. A laboratory study on the behavior of *Thiobacillus ferrooxidans* during pyrite bioleaching in percolation columns. En: E. Galindo and O.T. Ramirez (eds.), *Advances in Bioprocess Engineering*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 509-517.



- Monroy-Fernández, M.G., C., Mustin, P., de Donato, O., Barres, P., Marion, y J., Berthelin. 1995. Occurrences at mineral-bacteria interface during oxidation of arsenopyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Bioengin.* **46**:13-21.
- Nies, A., D.H. Nies, y S. Silver. 1990. Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* **265**:5648-5653.
- Norman, P.F., and Snyman, C.P. 1988. The biological and chemical leaching of an auriferous pyrite/arsenopyrite flotation concentrate: A microscopic examination. *Geomicrobiol. J.* **6**:1-10.
- Norris, P.R., y Parrott, L.M. 1986. High temperature mineral concentrate dissolution with *Sulfolobus*, in R.W. Lawrence, R.M.R. Branion, and H.E. Ebner (eds), *Fundamental and Applied Biohydrometallurgy*, Elsevier, New York, pp. 355-365.
- Norris, P.R., Parrot, L.M., y Marsh, R.M. 1986. Moderately thermophilic mineral-oxidizing bacteria, in H.L. Ehrlich and D.S. Holmes (eds.). *Biotechnology for the Mining, Metal-Refining, and Fossil Fuel Processing Industries, Biotechnology and Bioengineering Symp.* No. 16, Wiley, New York, pp. 253-262.
- Nucifora, G., Chu, L., Misra, T.K., y Silver, S. 1989. Cadmium r resistance from *Staphylococcus* plasmid P1258 cadA gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:3544-3548.
- Ohmura, N., Kitamura, K., y Saiki, H. 1993. Selective adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4044-4050.
- Ohtake, H., CervantesC., y Silver, S. 1987. Chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* **169**:3853-3856.
- Owolabi, J.B., y Rosen, B.P. 1990. Differential mRNA stability controls relative gene expression within the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J. Bacteriol.* **172**:2367-2371.
- Pehlke, R.D. 1979. *Unit Processes of Extractive Metallurgy*. Elsevier North Holland Publishing, Co., Inc. New York. pp. 191-193.
- Pinches, A. 1975. Bacterial leaching of an arsenic-bearing sulfide concentrate. En A.R. Burkin (ed.). *Leaching and Reduction in Hydrometallurgy*. Inst. Min. Met. London, pp. 28-34.
- Rawlings, D.E., y Kusano, T. 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* **58**:39-55.
- Reese, K. 1994. Gold: Noblest of the Noblest. *Today's Chemist at Work.* **October** 47-48.

- Rosen, B.P., Weigel, U., Karkaria, C., y Gangola, P. 1988. Molecular characterization of an anion pump. The ArsA gene product is an arsenite (antimonate) stimulated ATPase. *J. Biol. Chem.* **263**:3067-3070.
- Rosen, B.P., Weigel, U., Monticello, R.A., y Edwards, Brian, P.F. 1991. Molecular analysis of an anion pump: Purification of the ArsC protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**:381-385.
- San Francisco, M.J.D., C.L. Hope, J.B. Owolabi, L.S. Tisa, y B.P. Rosen 1990 Identification of the metalloregulatory element of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Nucleic Acids Res.* **19**:619-624.
- Shiratori, T., Inoue, Ch., Sugawara, K., Kusano, T., y Kitagawa, Y. 1989. Cloning and expression of *Thiobacillus ferrooxidans* mercury ion resistance genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:3458-3464.
- Shiratori, T., C. Inoue, M. Numata, and T. Kusano. 1991. Characterization and cloning of plasmids from the iron-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Curr. Microbiol.* **23**:321-326.
- Silver, S., y Misra, T.K. 1988. Plasmid-mediated heavy metals resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**:717-743.
- Silver, S. 1991. Bacterial heavy metals resistance systems and the possibility for bioremediation, In: "Biotechnology: bridging research and applications" (D. Kamely, A.M. Chakrabarty, y S. E Korngurth). pp. 265-287. Kluwer Academic. Publ. Boston.
- Silverman, M.P., y Lundgren, D.G. 1959. Studies on the chemnoautrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*, I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacterio.* **77**:642-647.
- Southam, G., y T.J. Beveridge. 1992. Enumeration of *Thiobacilli* with pH-neutral and acidic mine tailings and their roles in the development of secondary mineral soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1904-1912.
- Southwood, M.J., y Southwood, A.J. 1986. Mineralogical observations on the bacterial leaching of auriferous pyrite, en R.W. Lawrence, R.M.R. Branion, & H E Ebner (eds.), *Fundamental and Applied Biohydrometallurgy*, Elsevier, New York, pp. 98-113.
- Sugio, T., Y. Tsujita, T. Katagari, K. Inagaki, y T. Tano. 1988. Reduction of Mo<sup>o</sup> with elemental sulfur by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **170**:5956-5959.
- Van Aswegen, P.C., y Haines, A.K. 1988. Bacteria enhance gold recovery. *Intern Min.* **May**:19-23.

- Van Loosdrecht, M.C.M., J. Lyklema, W. Noorde, G. Schraa, y A.J.B. Zehnder. 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1898-1901.
- Van Loosdrecht, M.C.M., J. Lyklema, W. Noorde, y A.J.B. Zehnder. 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.* **54**:75-87.
- Venkateswerlu, G., Yoder, M.J., y Stozky, G. 1989. Morphological ultrastructural and chemical changes induced in *Cunninghamella blakesleeana* by copper and cobalt. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:204-210.
- Wiegel, J., y Ljungdahl, L.G. 1986. The importance of termophilic bacteria in biotechnology. *Crit. Rev. Microbiol.* **3**:39-108.
- Williams, J.W., y S. Silver. 1984. Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. *Enzyme Microbial Tech.* **6**:530-536.
- Willsky, G.R., y Malamy, M.H. 1981. Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **144**:366-374.
- Wu, J.H., y Rosen, B.P. 1991. The ArsR protein is a trans-acting regulatory protein. *Mol. Microbiol.* **5**:1331-1336.

