

Influencia de la densidad de pulpa de Arsenopirita en la cinética de la biomasa microbiana lixiviante

Influence of Arsenopyrite pulp density on the kinetics of leaching microbial biomass

Daladier Castillo Cotrina¹
Roberto Castellanos Cabrera²
Anacelly Valera López³
Jhonny Paredes Escobar⁴
Jose Sandoval Niebles⁵
Karen Villanueva Centeno⁶

ORCID: 0000-0003-0133-5921
ORCID: 0000-0002-9021-412X
ORCID: 0000-0002-6667-3043
ORCID: 0000-0002-2486-1652
ORCID: 0000-0001-6134-0429
ORCID: 0000-0003-4641-0040

Resumen

La biolixiviación de minerales para la recuperación de metales es una tecnología de gran aplicación, rentabilidad, de bajo costo y amigable con los ecosistemas. En este proceso los microorganismos lixiviantes catalizadores del proceso son influenciados por factores biológicos, físicos y químicos propios de su entorno, uno de estos factores es la densidad de pulpa del mineral a lixiviar; por lo que, en este trabajo se tuvo como objetivo determinar la influencia de la densidad de pulpa de la arsenopirita en la biomasa máxima, productividad de biomasa máxima y velocidad específica de crecimiento de *A. ferrooxidans* solo y en consorcio con *A. thiooxidans*. Los tratamientos experimentales considerados por duplicado fueron cultivos líquidos discontinuos, uno con *A. ferrooxidans* y otro con *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*, ambos en medio 9K con arsenopirita al 8 y 10%, incubados todos a 26 °C con aireación durante 288 horas. Se hizo recuentos de células en cámara de Neubauer tomando muestras cada 48 horas de cada cultivo. Los datos fueron procesados en el programa de Excel que permitió obtener las curvas y ecuaciones polinómicas de la producción de biomasa; asimismo, los valores de los parámetros cinéticos de la curva de crecimiento microbiano en las que la biomasa y productividad máxima en el cultivo puro fue inversamente proporcional a la densidad de pulpa, pero directamente proporcional para el consorcio; y que la velocidad de crecimiento en el cultivo puro fue directamente proporcional a la densidad de pulpa pero inversamente proporcional para el consorcio.

Palabras clave: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; *Acidithiobacillus thiooxidans*; arsenopirita; biolixiviación; densidad de pulpa.

¹ Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. Facultad de Ciencias. E-mail: dcastilloc@unjbg.edu.pe

² Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. Facultad de Ciencias. E-mail: rcastellanos@unjbg.edu.pe

³ Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. Facultad de Ciencias. E-mail: avaleral@unjbg.edu.pe

⁴ Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. Facultad de Ciencias. E-mail: jparedese@unjbg.edu.pe

⁵ Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. Facultad de Ciencias. E-mail: Jsandovaln28@gmail.com

⁶ Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. Facultad de Ciencias. E-mail: Kqqrem.kv@gmail.com

Abstract

The bioleaching of minerals for the recovery of metals is a technology with great application, profitability, low cost and friendly to ecosystems. In this process, the leaching microorganisms that are catalysts of the process are influenced by biological, physical, and chemical factors typical of their environment. One of these factors is the pulp density of the ore to be leached; Therefore, in this work, the objective was to determine the influence of the arsenopyrite pulp density on the maximum biomass, maximum biomass productivity and specific growth rate of *A. ferrooxidans* alone and in consortium with *A. thiooxidans*. The experimental treatments considered in duplicate were discontinuous liquid cultures, one with *A. ferrooxidans* and the other with *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans*, both in 9K medium with arsenopyrite at 8 and 10%, all incubated at 26 °C with aeration for 288 hours. Cell counts were made in a Neubauer chamber, taking samples every 48 hours from each culture. The data was processed in the Excel program that allowed obtaining the curves and polynomial equations of the biomass production; likewise the values of the kinetic parameters of the microbial growth curve in which the maximum biomass and productivity in the pure culture was inversely proportional to the pulp density, but directly proportional for the consortium; and that the growth rate in the pure culture was directly proportional to the pulp density but inversely proportional for the consortium.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; *Acidithiobacillus thiooxidans*; arsenopyrite; bioleaching; pulp density.

Introducción

Los microorganismos que viven en condiciones extremas de temperatura, concentración de sales, acidez y metales son llamados extremófilos; uno de estos grupos son los biolixiviantes que viven en acidez y concentraciones de metales extremos y que actualmente permiten el desarrollo de tecnologías aplicables a sectores industriales y biotecnológicos (Gómez, 2017; Castillo *et al.*, 2021). Los biolixiviantes son los que ejercen la acción de la lixiviación bacteriana; tecnología que se aplica en el sector minero para la recuperación de metales preciados en solución como el cobre, zinc y níquel a partir de minerales sulfurados; y por ser limpia, de bajo costo, generadora de significativas utilidades y amigable con el ambiente; constituyen el catalizador biológico principal en la biolixiviación, por lo que es importante el conocimiento sobre los factores ambientales que afectan su biomasa y actividad (Watling, 2015; Delgado & Castillo, 2019; Castillo *et al.*, 2021). La actividad de estos organismos microbianos sobre los minerales, que normalmente tienen una composición química y mineralógica variable, permite la separación del metal a partir del mineral por reacciones de oxidación del hierro y azufre y que pase a un estado de solución cuya concentración puede llegar a niveles que afectan a los microbios lixiviantes (Watkin *et al.*, 2009; Delgado & Castillo, 2019; Castillo *et al.*, 2021).

Las altas concentraciones de metales pesados, formas inorgánicas y orgánicas en los ecosistemas afectan la biomasa, morfología y metabolismo de los microorganismos por lo que se producen alteraciones como desnaturalización de las proteínas, alteración de las membranas celulares, disminución de la actividad y tamaño de la biomasa (Pirt, 1975; Brookes & McGrath, 1984; Leita *et al.*, 1995). En los suelos de cultivo, cuando están contaminados con metales por encima de los límites aceptables, las poblaciones microbianas benéficas disminuyen significativamente su abundancia, por lo que la tasa de respiración en estos suelos es baja, además la nodulación y fijación de nitrógeno en las raíces de las plantas por los microorganismos fijadores de nitrógeno disminuye (Renella *et al.*, 2002; Brookes, 1995; Brookes *et al.*, 1986; McGrath *et al.*, 1988).

En los ambientes mineros, los microorganismos lixiviantes viven y actúan en altas concentraciones de metales; sin embargo, son afectadas con inhibición o disminución en su tamaño de biomasa, productividad

de biomasa, velocidad de crecimiento, funcionalidad y o actividad cuando la concentración de los metales se incrementa a valores superiores a los tolerados, debido a la toxicidad de los metales. El cobre y el zinc en concentraciones mayores a 10 000 mg/L causa efectos inhibitorios en *Acidithiobacillus ferrooxidans*; asimismo, el plomo cuando está en concentraciones igual o superior a 0. 012 mg/L (Gentina & Acevedo, 2005; Aston *et al.*, 2010; Mejía *et al.*, 2011)

La arsenopirita (FeAsS) es la fuente mineral de arsénico más común en la superficie terrestre, se encuentra en una variedad de sistemas como depósitos magmáticos, hidrotermales y pórfidos, se asocia a la aparición de oro, su explotación origina residuos sólidos. Es común encontrarlo combinado con otros minerales y metales pesados como plata, cadmio, hierro, níquel, cobre, plomo (Corkhill y Vaughan, 2009; Castillo *et al.*, 2021).

En la biolixiviación, los microorganismos lixivian el metal de interés y otros como el hierro, dependiendo de la composición química y mineralógica del mineral, esta actividad es favorecida en la medida que los microorganismos lixiviantes tengan un contacto con una mayor área superficial del mineral, que a su vez se relaciona con el tamaño y la densidad de pulpa (concentración) del mineral y la biomasa microbiana. Estos factores determinan el aumento de la concentración de los metales pesados en la solución lixiviada que puede sobrepasar los límites superiores tolerables por los microbios lixiviantes, causando un efecto limitante o la muerte de los biolixiviantes. En la Arsenopirita, por su composición mineralógica, se puede encontrar galena, calcopirita, pirita, esfalerita, y por su composición química a As, Pb, Fe, Cu, Cd. (Baloch *et al.*, 2017; Deng *et al.*, 2020; Castillo *et al.*, 2021;)

La biomasa de los microorganismos lixiviantes es importante para la eficiencia de la recuperación de los metales preciados, por lo que sus características cinéticas, considerando los parámetros físicos (densidad de pulpa, área superficial y tamaño del mineral), químicos (pH, composición química y mineralógica) y biológicos (especies y cepas microbianas lixiviantes y microbios heterótrofos) del ambiente fermentativo en la naturaleza o en un biorreactor deben ser estudiados. El comportamiento cinético de la biomasa puede ser explicado por su respectivo modelo matemático que permite determinar su concentración máxima de biomasa, velocidad específica de crecimiento y productividad máxima. La velocidad de crecimiento es el incremento de células en la unidad de tiempo, o el valor de la pendiente de una recta inclinada ascendente cuando en un gráfico se relaciona la biomasa con el tiempo. Cuando la velocidad aumenta, la multiplicación celular sucede en un menor tiempo; asimismo, si la biomasa máxima obtenida en la fermentación se divide con el tiempo transcurrido, se obtiene la productividad máxima, que es un parámetro que ayuda a optimizar la recuperación de un producto. La determinación de la velocidad específica de crecimiento microbiano se hace en la fase logarítmica de la curva de crecimiento que además presenta una fase de latencia anterior y una fase estacionaria posterior a la fase logarítmica (Zárate, 2015; Baloch *et al.*, 2017; Colorado, 2018).

La efectividad de la biolixiviación en los minerales para la recuperación de metales preciados necesita del más amplio conocimiento de los factores que lo afectan, por lo cual, el objetivo en este trabajo fue determinar la influencia de la densidad de pulpa de arsenopirita sobre la cinética de la biomasa de microorganismos lixiviantes, con el propósito de establecer en qué medida los parámetros cinéticos de biomasa máxima, productividad máxima de biomasa y velocidad específica de crecimiento microbiano son afectados por los cambios de la densidad de pulpa del mineral.

Material y métodos

Características de la arsenopirita y los microorganismos lixiviantes

La arsenopirita utilizada; concentrado mineralógico con 1.6 % galena (PbS), 7 % pirita (FeS₂), 4.3 % esfalerita, 0.2 % calcopirita (CuFeS₂), 73.5 % arsenopirita (FeAsS) y 13.4 % ganga; tuvo una composición

química de SiO₂ (5.15 %), Cu (0.07 %), Zn (2.88 %), Pb (1.21 %), As (33.8 %), Al (0.21 %), Ni (1.72 %), Au (81.5g/t), CO (1.4 %), Bi (1.84 %), Cd (0.01 %), Fe (27.9 %), Sb (0.22 %) y Ag (154 g/t). Los microorganismos lixiviantes empleados fueron *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Activación y adaptación de los lixiviantes

Cada *Acidithiobacillus*, 2 ml, se sembró en 25 ml del medio 9K, incubó a 25 °C y aireó hasta que alcanzó 10⁸ cel ml⁻¹ con ayuda de una cámara de conteo de Neubauer y un microscopio de campo claro, y finalmente 25 ml de esta suspensión última se sembró en 225 ml de medio 9K hasta que alcanzó 10⁸ cel ml⁻¹ (Kim *et al.*, 2002; Pavez, 2011).

El microorganismo activado, en un volumen del 10 % se inoculó a 600 ml de medio OK, que tuvo una densidad de pulpa de arsenopirita de 1 % (w/v), e incubó y aireó a 25 °C hasta que alcanzó 10⁸ células ml⁻¹.

Cultivos microbianos con diferentes densidades de pulpa de arsenopirita

En un frasco de vidrio estéril de 1000 cm³ se colocaron 630 ml de medio OK, 70 ml de *A. ferrooxidans* del cultivo adaptado y 8 % (w/v) de densidad de pulpa de arsenopirita; en un segundo frasco, 630 ml de medio OK, 70 ml de *A. ferrooxidans* del cultivo adaptado y 12 % (w/v) de densidad de pulpa de arsenopirita; en un tercer frasco, 630 ml de medio OK, 35 ml de *A. ferrooxidans* con 35 ml de *A. thiooxidans* de los cultivos adaptados y 8 % (w/v) de densidad de pulpa de arsenopirita; y en un cuarto frasco, porciones similares al tercero, pero con 12 % (w/v) de densidad de pulpa de arsenopirita. Cada frasco constituyó un biorreactor que estuvo por duplicado. Se incubaron con aireación a 25 °C por 288 horas.

Evaluación del crecimiento microbiano

Se evaluó con cámara de Neubauer y graficó el número de células por mililitro cada 48 horas versus el tiempo, para la obtención de una curva de líneas y puntos que fue ajustada, con el programa Excel, a una curva polinómica con R² lo más cercano a 1, obteniendo a su vez la respectiva ecuación del modelo matemático representativo del crecimiento poblacional de *A. ferrooxidans* y del consorcio *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*, a diferentes densidades de pulpa. Esta ecuación permitió con el programa Excel, aplicando los máximos y mínimos, la determinación del Máximo crecimiento microbiano, que, dividido con el tiempo, que tuvo de incubación, permitió conocer la Productividad máxima de biomasa microbiana.

La observación de cada una de las curvas polinómicas permitió que se establezca, con el programa Excel, la fase logarítmica de la curva de crecimiento con su respectiva recta, ecuación y pendiente que constituyó la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos lixiviantes.

Los datos de máximo crecimiento, productividad máxima y velocidad específica de crecimiento microbiano (μ) fueron llevados a gráficos de columnas para su evaluación en relación a la densidad de pulpa de la arsenopirita.

Resultados

Por el R², cercano a uno, las ecuaciones polinómicas de las respectivas curvas ajustadas de crecimiento de biomasa representaron los procesos de producción de biomasa. En estas curvas se muestra que tienen en común las fases de latencia, logarítmica y estacionaria; sin embargo, presentan diferencias cinéticas, ya sea en los cultivos de *A. ferrooxidans* y el consorcio *A. ferrooxidans* con *A. thiooxidans*, como cuando la densidad de pulpa de Arsenopirita es de 8 y 12%, lo cual se refleja en modelos matemáticos diferentes para cada caso de producción de biomasa (Figura 1) (Figura 2) (Figura 3) (Figura 4).

Figura 1

Curva polinómica y modelo matemático de la producción de biomasa de *A. ferrooxidans* en una densidad de pulpa del 8% de arsenopirita.

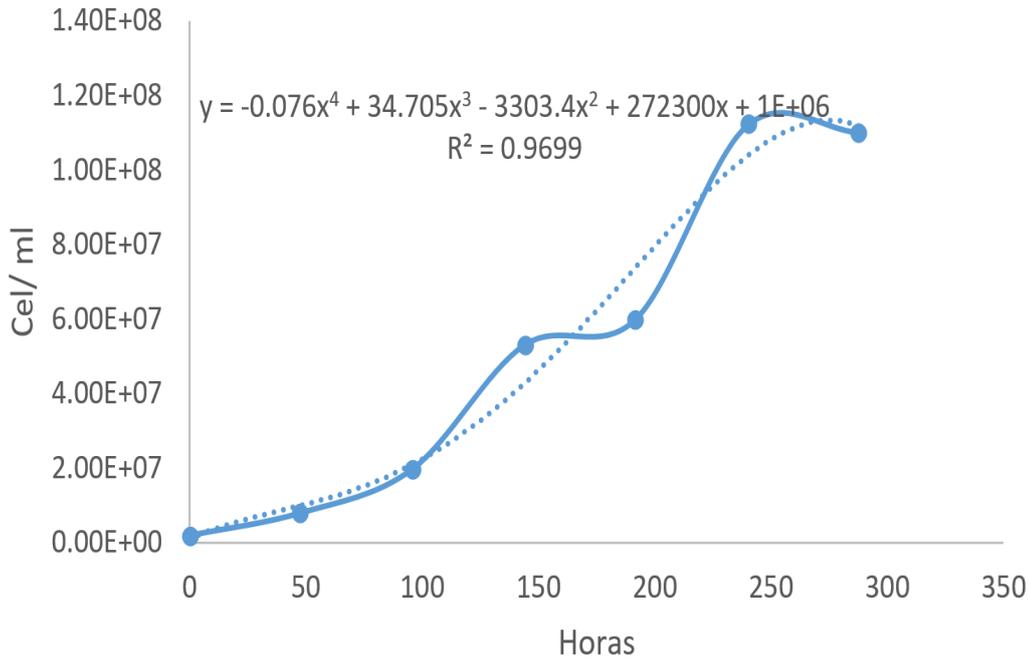


Figura 2

Curva polinómica y modelo matemático de la producción de biomasa de *A. ferrooxidans* en una densidad de pulpa del 12% de arsenopirita.

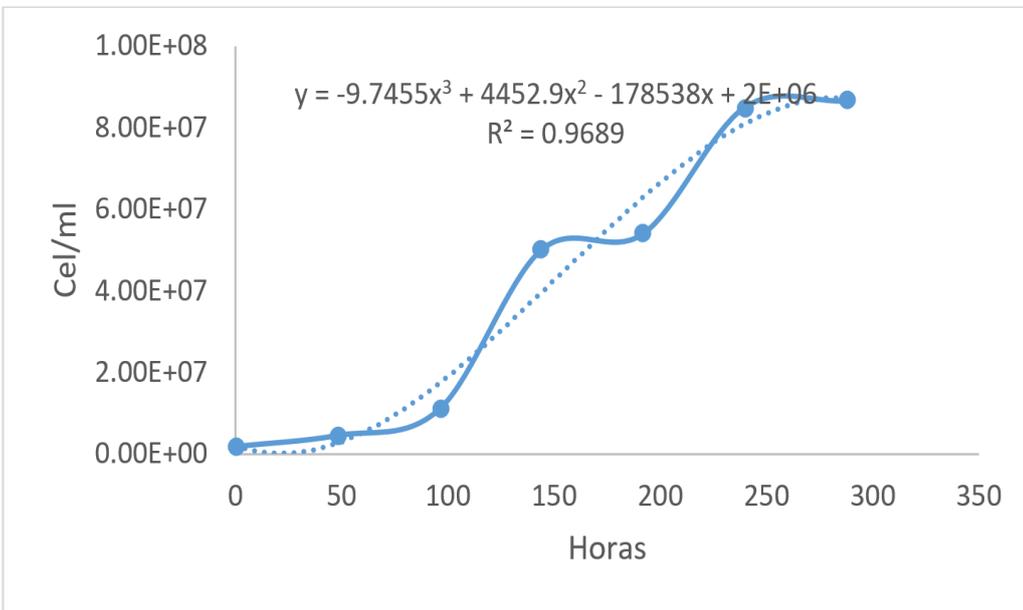
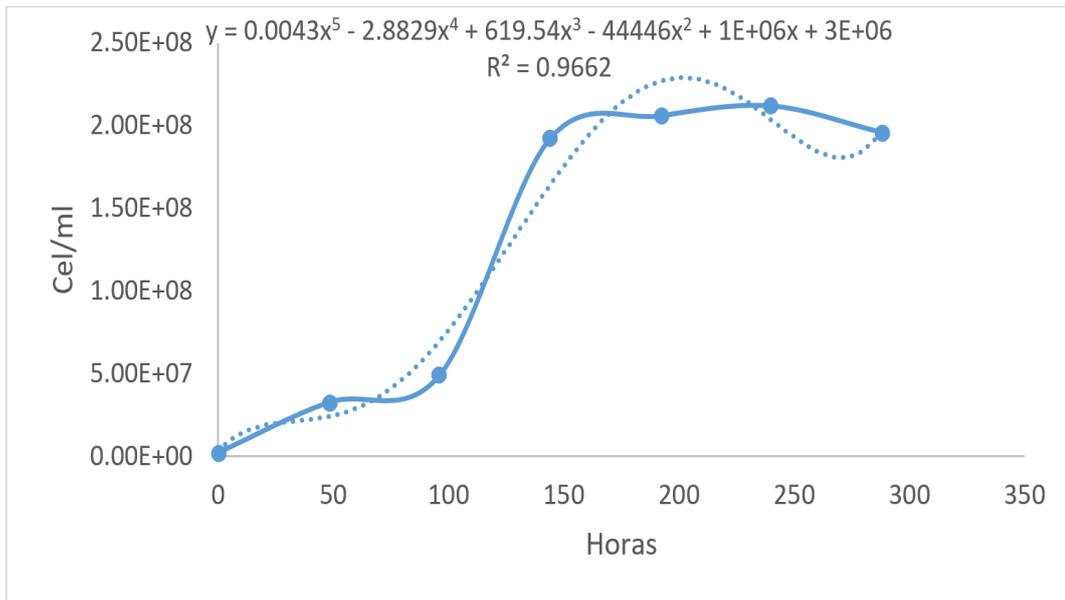
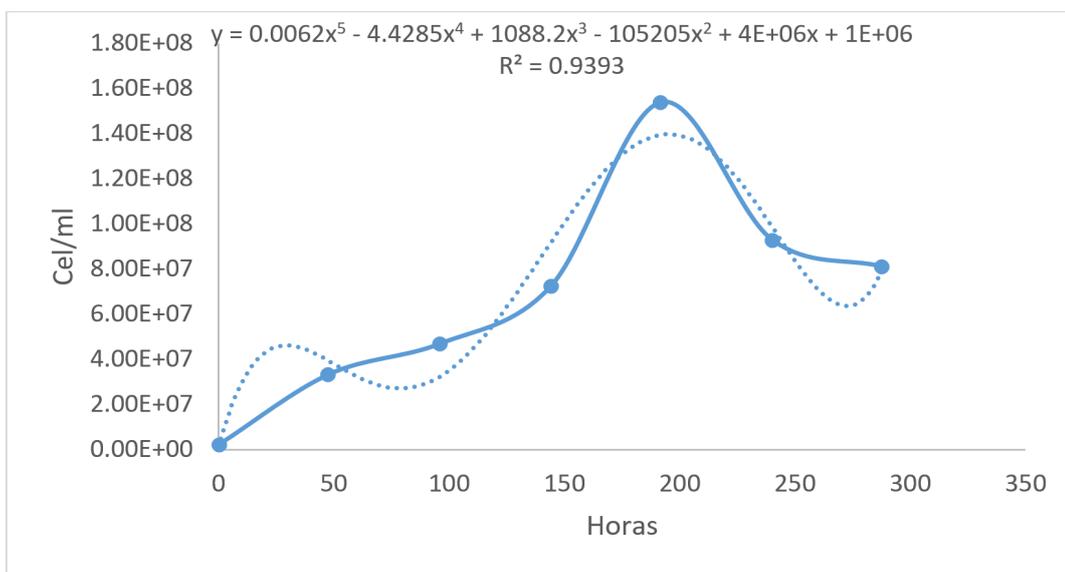


Figura 3

Curva polinómica y modelo matemático de la producción de biomasa del consorcio *A. ferrooxidans* con *A. thiooxidans* en una densidad de pulpa del 8% de arsenopirita.

**Figura 4**

Curva polinómica y modelo matemático de la producción de biomasa del consorcio *A. ferrooxidans* con *A. thiooxidans* en una densidad de pulpa del 12% de arsenopirita



En el cultivo de *A. ferrooxidans* se observa que cuando la densidad de pulpa de arsenopirita es del 8% se obtiene la mayor biomasa y productividad máxima, pero con menor velocidad específica de crecimiento (Figura 1) (Figura 2) (Figura 5) (Figura 6) (Figura 7) (Tabla 1); sin embargo, en el consorcio *A. ferrooxidans* con *A. thiooxidans*, la mayor biomasa y productividad máxima con menor velocidad de crecimiento se obtiene cuando la densidad de pulpa de arsenopirita es del 12% (Figura 3) (Figura 4) (Figura 5) (Figura 6) (Figura 7) (Tabla 1).

Tabla 1

Biomasa, productividad de biomasa máxima y velocidad específica de crecimiento (μ) de A. ferrooxidans y el consorcio A. ferrooxidans con A. thiooxidans a diferentes densidades de pulpa (%) de arsenopirita, durante 288 horas de incubación.

Microorganismo con arsenopirita	Tiempo de incubación (Horas)	Biomasa máxima (Cel/ml)	Productividad máxima (Cel/ml.h)	Velocidad específica de crecimiento (μ) (h^{-1})
A. ferrooxidans + arsenopirita 8%	275	1.13E+08	4.12E+05	0.011 h^{-1}
A. ferrooxidans + arsenopirita 12%	283	8.72E+07	3.08E+05	0.0137 h^{-1}
A.ferrooxidans + A.thiooxidans + arsenopirita 8%	193	1.46E+08	7.56E+05	0.0332 h^{-1}
A.ferrooxidans + A. thiooxidans + arsenopirita 12%	211	1.99E+08	9.42E+05	0.0166 h^{-1}

Figura 5

Porcentaje de biomasa máxima de A. ferrooxidans y el consorcio A. ferrooxidans con A. thiooxidans a diferentes densidades de pulpa (%) de arsenopirita.

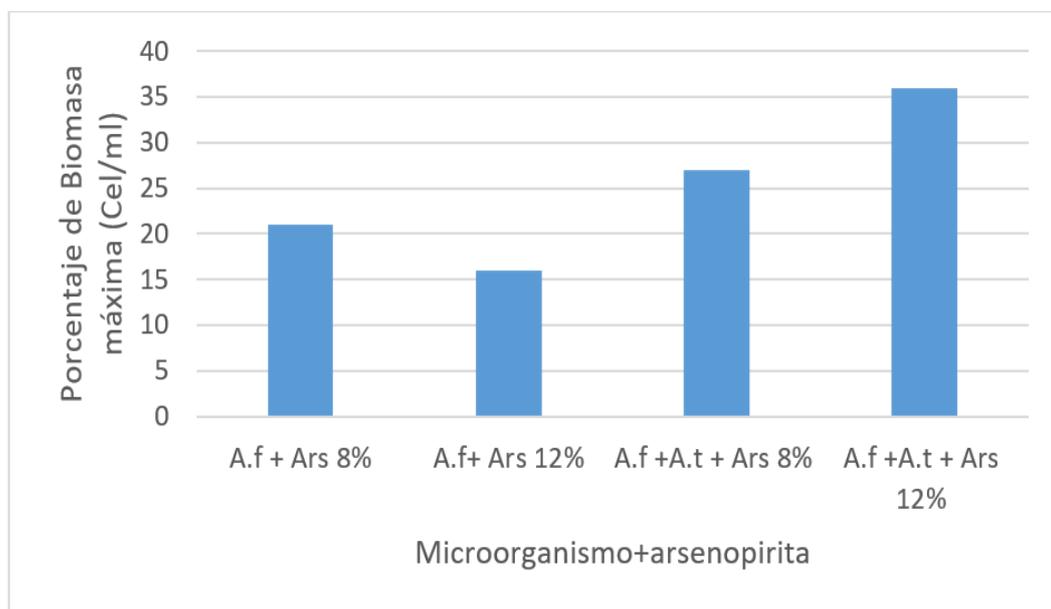
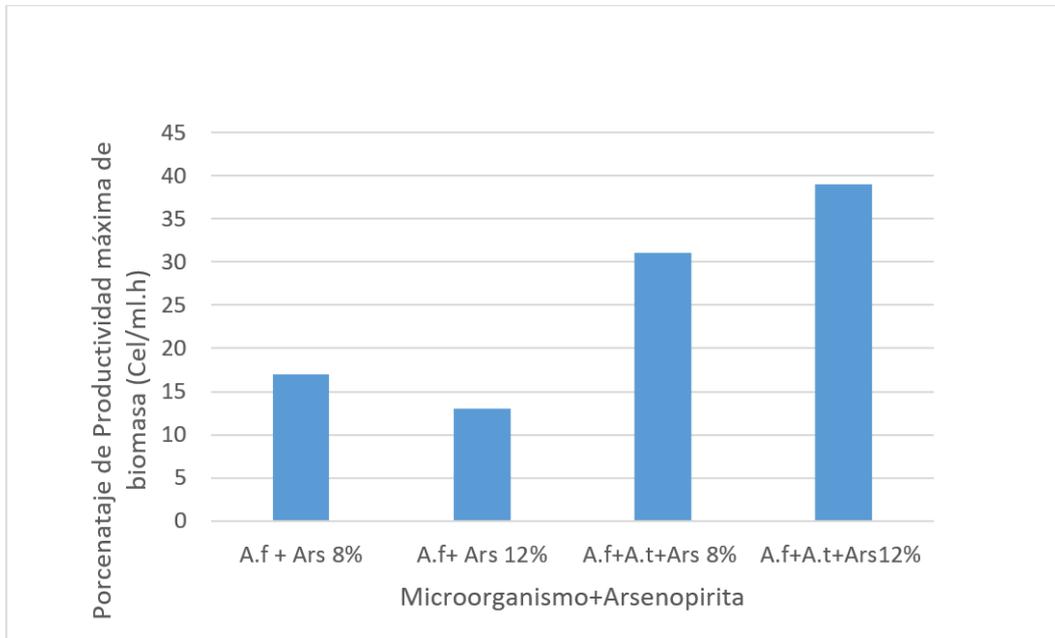
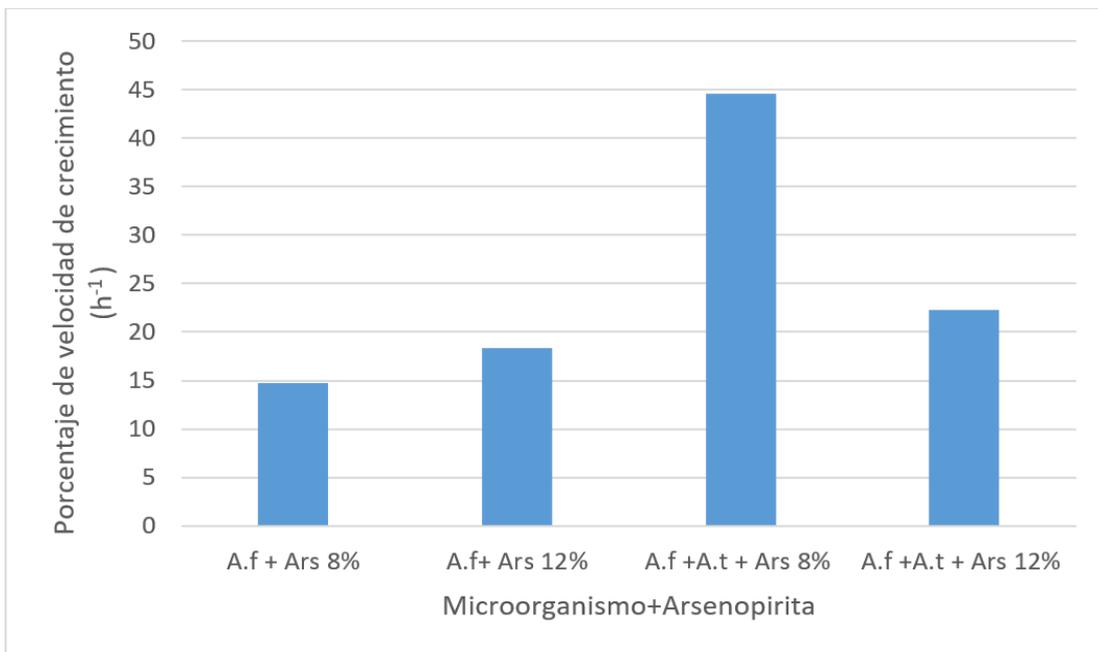


Figura 6

Porcentaje de productividad de biomasa máxima de *A. ferrooxidans* y el consorcio *A. ferrooxidans* con *A. thiooxidans* a diferentes densidades de pulpa (%) de arsenopirita.

**Figura 7**

Porcentaje de velocidad de crecimiento (h^{-1}) de *A. ferrooxidans* y el consorcio *A. ferrooxidans* con *A. thiooxidans* a diferentes densidades de pulpa (%) de arsenopirita.



Discusión

Las curvas de producción de biomasa obtenidas son similares a las polinómicas establecidas para los microorganismos, en las que se muestran las fases de latencia, logarítmica y estacionaria; asimismo, sus ecuaciones que se asemejan al de una curva de crecimiento microbiano (Braddock *et al.*, 1984; Zárate, 2015; Vanegas & Ramírez, 2016; Chambi & Torres, 2021). Las diferencias en las curvas y ecuaciones de los cultivos microbianos se debe a que los factores ambientales físicos, químicos y biológicos de los cultivos fueron diferentes; así en cada cultivo puro y en consorcio hubieron dos niveles de densidad de pulpa de arsenopirita (8 y 12%); en el cultivo puro una sola especie microbiana; y en el consorcio dos especies; donde hubo mayor densidad de pulpa (12 %) fue mayor el número de partículas de arsenopirita; en consecuencia, mayor el área superficial total del sustrato y de la concentración de metales en solución. Esto explica porque cada cultivo tuvo su propia curva y ecuación polinómica representativa del crecimiento microbiano específico, la cual es propia de cada especie microbiana y de los factores ambientales de su entorno. En estos factores se considera también las propiedades de la superficie del mineral que se sabe afectan su corrosión como la adsorción y la cinética de la oxidación microbiana, asimismo, el estado del microorganismo, que en consorcio se adhiere más rápidamente y en mayor cantidad a la superficie del mineral a lixiviar, que cuando está en solución (Natarajan, 2003; Ndlovu & Monhemius, 2005; Liu *et al.*, 2011).

La mayor biomasa y productividad máxima obtenida en el cultivo de *A. ferrooxidans* a una menor densidad de pulpa (8 %) son probables debido a que en el cultivo líquido con menor densidad de pulpa hubo menos concentración de metales inhibidores del crecimiento celular y de hidrofobicidad de *A. ferrooxidans* en solución (Natarajan, 2003; Liu *et al.*, 2011); a diferencia del cultivo consorcio, donde la mayor biomasa y productividad máxima obtenida con la mayor densidad de pulpa (12%) son probables porque el consorcio estuvo más cerca de una fermentación de sustrato sólido, donde la adherencia microbiana a las superficies de las partículas se incrementó por la relativa hidrofobicidad de los microorganismos, aumentada en consorcio junto con la multiplicación celular con un desprendimiento de células que elevan su concentración en suspensión, a pesar del aumento de metales en solución producto de la biolixiviación (Natarajan, 2010; Liu *et al.*, 2011). Esto refleja que la biomasa y la productividad máxima en el cultivo puro *A. ferrooxidans* es inversamente proporcional a la densidad de pulpa; pero directamente proporcional para el consorcio *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*.

La mayor velocidad de crecimiento en el cultivo *A. ferrooxidans* con la densidad de pulpa más alta (12%) es probable porque a una mayor concentración de metales inhibidores en solución, los microorganismos adoptan una mayor capacidad de adaptación y resiliencia, por lo que en el cultivo puro su velocidad de crecimiento fue directamente proporcional a la densidad de pulpa; a diferencia que el consorcio, donde la velocidad de crecimiento fue mayor con la menor densidad de pulpa (8 %), por lo que el consorcio tuvo una velocidad de crecimiento inversamente proporcional a la densidad de pulpa, posiblemente debido a que la concentración de metales en solución estuvieron por debajo de los niveles en el que se limita la respuesta de capacidad de adaptación y de resiliencia. Los microorganismos en los concentrados de sulfuros metálicos sufren inhibición o disminución de su actividad a altas densidades de pulpa, por la fricción de las partículas minerales con sus paredes celulares que son dañadas y el efecto nocivo de iones metálicos como Pb^{2+} , Cu^{2+} , y Zn^{2+} ; asimismo, el crecimiento de *A. ferrooxidans* es inhibida con 20.8 g/L de hierro ferroso; de *A. thiooxidans*, con 30 g/L de hierro ferroso; y de *A. ferrooxidans* con *A. thiooxidans*, con 10 g/L de ión férrico, 5 g/L de arsenito y 40 g/L de arsenato (Collinet & Morin, 2003; Akcil *et al.*, 2007; Zárate, 2015)

La velocidad de crecimiento con 8 y 12% de arsenopirita, en el cultivo *A. ferrooxidans* (0.011 h^{-1} y 0.0137 h^{-1}) y el consorcio, *A. ferrooxidans* con *A. thiooxidans*, (0.332 h^{-1} y 0.0166 h^{-1}) al

compararse con las velocidades de 0.03 h^{-1} de *Thiobacillus ferrooxidans* en el medio líquido Touvinen and Kelly modificado, 0.016 h^{-1} de *Leptospirillum ferrooxidans* en medio 9K a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 0.021 h^{-1} de *Leptospirillum ferrooxidans* en medio 9K a $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 0.018 h^{-1} del consorcio acidófilo en medio 9K a $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y de 0.067 h^{-1} y 0.0404 h^{-1} de *Thiobacillus thiooxidans* con diferentes condiciones en el medio Starkey corrobora que la velocidad de crecimiento es propia de cada microorganismo y de determinados factores presentes en el ambiente del microbio como el de la temperatura (Braddock *et al.*, 1984; Rohr *et al.*, 2005; Zárata, 2015; Castillo *et al.*, 2016).

Conclusiones

La biomasa máxima, productividad de biomasa máxima y velocidad específica de crecimiento de *A. ferrooxidans* y del consorcio *A. ferrooxidans* con *A. thiooxidans*, en cultivo líquido discontinuo, son influenciados por la densidad de pulpa de arsenopirita. La biomasa y productividad máxima en el cultivo puro fue inversamente proporcional a la densidad de pulpa, pero directamente proporcional para el consorcio. La velocidad de crecimiento en el cultivo puro fue directamente proporcional a la densidad de pulpa, pero inversamente proporcional para el consorcio.

Referencias bibliográficas

- Akcil, A., Ciftci, H., & Deveci, H. (2007). Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcopyrite concentrate. *Minerals Engineering*, 20, 310-318.
- Aston, E., Peyton, M., Lee, B., & Apel, A. (2010). Effects of ferrous sulfate, inoculum history, and anionic form on lead, zinc, and copper toxicity to *Acidithiobacillus caldus* strain BC13. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29 (12), 2669-2675.
- Baloch, M. A., Baloch, N., Bhatti, T. M., Faheem, M., Behlil, F. & Ali, I. (2017). Bioleaching of copper from copper sulfide minerals of reko diq deposits in Chagai, Balochistan. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, 04(10), 3849–3854. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1027995>
- Braddock, J.F., Luong, H.V., & Brown, E.J. (1984). Growth kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* isolated from arsenic mine drainage. *Appl Environ Microbiol.* 48(1), 48–55.
- Brookes, P.C. (1995). Use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biol. Fertil. Soils* 19, 269-279.
- Brookes, P. C., & McGrath, S. P. (1984). Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. *J. Soil Sci.* 35, 341-346.
- Brookes, P.C., McGrath, S.P., & Heijnen, C. (1986). Metal residues in soils previously treated with sewage sludge and their effects on growth and nitrogen fixation by bluegreen algae. *Soil Biol. Biochem.* 18, 345-353
- Castillo, D., Clavijo, D., Chipana, V., Centeno, J., Eyzaguirre, P., Delgado, S., & De la Vega, L. (2016). *Evolución del crecimiento en consorcios microbianos nativos en la mina de Toquepala de Tacna-Perú*. XIII Jornadas Mineras de tratamiento de minerales. Mendoza. Argentina.

- Castillo, D., Castellanos, R., & Tirado, E. (2021). Acción biooxidativa de cultivos microbianos biolixivantes sobre la arsenopirita. *Ciencia & Desarrollo*, (20), 57-69.
- Chambi, A.D., & Torres, A.M. (2021). Modelos cinéticos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Saccharomyces boulardii*. *Revista de investigaciones altoandinas*, 23 (1), 47-54.
- Collinet, M., & Morin, D. (2003). Characterization of arsenopyrite oxidizing *Thiobacillus*. Tolerance to arsenite, arsenate, ferrous and ferric iron. *Rev.Orstom Lab. De Microbiologie*, 4(4),456-65.
- Colorado, S. (2018). *Determinación de parámetros cinéticos de Synechococcus sp. pcc 7002 en cultivo sumergido* (tesis de pregrado). Universidad EAFIT. Medellín. Colombia.
- Corkhill, C.L., & Vaughan, D.J. (2009). Arsenopyrite oxidation. *Applied Geochemistry*, 24 (2342-2361).
- Delgado, S., & Castillo, D. (2019). Influencia de la temperatura en el crecimiento de un consorcio microbiano y su capacidad biooxidativa sobre el hierro de la calcopirita. *Ecología aplicada*, 18 (1).
- Deng, Y., Zhang, D., Xia, J., Nie, Z., Liu, H., Wang, N., & Xue, Z. (2020). Enhancement of arsenopyrite bioleaching by different Fe (III) compounds through changing composition and structure of passivation layer. *Journal of Materials Research and Technology*, 9(6).
- Gentina, J., & Acevedo, F. (2005). Biolixiviación de minerales de oro. In: Fernando Acevedo y Juan Carlos Gentina (eds.). *Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras*. 79-91.
- Gómez, A. (2017). *Influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento microbiano y perfil de actividad enzimática de dos Geobacillus aislados del volcán "El Chichón"* (tesis de pregrado). Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. México.
- Kim, T., Kim, C., Chang, Y., Ryuand, H., & Cho, K. (2002). Development of an optimal medium for continuous ferrous iron oxidation by immobilized *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells. *Biotechnology Progress*. 18, 752-759.
- Leita, L., De Nobili, M., Muhlbalchova, G., Mondini, C., Marchiol, L., & Zerbi, G. (1995). Bioavailability and effects of heavy metal son soil microbial biomass survival during Laboratory incubation. *Biol fertil Soils* 19, 103-108.
- Liu, H., Gu, G., & Xu,Y. (2011). 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, 143 - 148.
- McGrath, S.P., Brookes, P.C, & Giller, K.E. (1988). Effects of potentially toxic metals in soils derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. *Soil Biol. Biochem*. 20, 415-424.
- Mejía, E., Ospina, J.D., Osorno, B.L., Marquez, L.A., & Morales, A.L. (2011). *Adaptación de una cepa compatible con Acidithiobacillus ferrooxidans sobre concentrados de calcopirita (CuFeS₂), esfalerita (ZnS) y galena (PbS)*. Grupo de Investigación. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.

- Natarajan, K. (2003). Surface chemical studies on “*Acidithiobacillus*” group of bacteria with reference to mineral flocculation. *International Journal of Mineral processing* 72 (1-4), 189-198.
- Ndlovus, S., & Monhemius, A.J. (2005). The influence of crystal orientation on the bacterial dissolution of pyrite. *Hydrometallurgy* 78(3-4), 187-197.
- Pavez, B. (2011). Cuantificación de la expresión del gen omp-40 y de los genes que conforman el operón gal, vinculado a cambios cinéticos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en respuesta adaptativa a mineral sulfurado de cobre (tesis para optar el título de Bioquímico).
- Pirt, S.J. (1975). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Blackwell Scientific Publication, Oxford. <https://doi.org/10.1002/aic.690220342>
- Rohr, M., Lavalle, L., Pettinari, G., Giaveno, A., & Donati, E. (2005). *Lixiviación de un mineral sulfurado utilizando cepas acidófilas nativas*. Universidad Nacional del Comagüe. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Renella, G., Brookes, P.C., & Nannipieri, P. (2002). Cadmium and Zinc toxicity to soil microbial biomass and activity. *Developments in Soil science*, 28(2), 267-273 [https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(02\)80024-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(02)80024-1)
- Vanegas, D.M., & Ramírez, M.E. (2016). Correlación del crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en la producción de polihidroxialcanoatos de cadena media (PHA_{PCM}) mediante modelos primarios de Gompertz, Logístico y Baranyi. *Información tecnológica*, 27 (2), 87-96.
- Watling, H.R. (2015). Review of Biohydrometallurgical Metals Extraction from Polymetallic Mineral Resources. *Minerals* 5(1), 1-60. <https://doi.org/10.3390/min5010001>
- Watkin, E.L.J., Keeling, S.E., Perrot, F. A., Shiers, D.W., Palmer, M.L., & Watling, H. R. (2009). Metals tolerance in moderately thermophilic isolates from a spent copper sulfide heap, closely related to *Acidithiobacillus caldus*, *Acidimicrobium ferrooxidans* and *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.*, 36 (3), 461–465. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0508-5>
- Zárate E. (2015). *Determinación de los parámetros cinéticos del crecimiento de Thiobacillus thiooxidans en sustrato hidrófobo de azufre*. <http://hdl.handle.net/20.500.12952/1107>