


## **Biolixiviación indicativa del sulfato de cobre por crecimiento microbiano ante el drenaje minero**

Indicative bioleaching of the sulphate of copper by means of microbial growth under conditions of mining drainage

Paola del Rosario Eyzaguirre Liendo<sup>1</sup>, Daladier Miguel Castillo Cotrina<sup>2\*</sup> 

<sup>1</sup>Investigador independiente de la Región Tacna Perú egresada de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann Tacna

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann Tacna, Perú.

\*Autor para correspondencia e-mail: [daladiercastillo@hotmail.com](mailto:daladiercastillo@hotmail.com)

Daladier Miguel Castillo Cotrina  <https://orcid.org/0000-0003-0133-5921>

### **ARTÍCULO BREVE**

#### **INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO**

Artículo recibido: 08/08/2018

Artículo aceptado: 28/12/2018

En línea: 26/02/2019

#### **PALABRA CLAVE:**

drenaje ácido,  
biolixiviación,  
cobre,  
extracción mineral

### **RESUMEN**

La búsqueda de alternativas tecnológicas sostenibles para el drenaje ácido de minas es una actual necesidad. El propósito del estudio fue determinar la biolixiviación indicativa del sulfato de cobre mediante el crecimiento microbiano en el drenaje minero. Desde el 2014 hasta el 2015 se determinó de forma experimental la producción promedio máxima microbiana en lixiviados pertenecientes a cuatro botaderos del asiento minero de Toquepala de la Empresa Southern Perú Copper. Se encontró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de la actividad microbiana entre las concentraciones del sulfato de cobre aplicadas (0.0; 5.0; 10.0; 15.0; 20.0 g.L<sup>-1</sup>) donde los resultados fueron (logaritmo de cel/ml): 8.90±0.03; 7.77±0.06; 7.20±0.07; 7.04±0.04 y 7.00±0.02. Se concluyó que, la biolixiviación indicativa del sulfato de cobre se asoció al crecimiento microbiológico como proceso tecnológico. Sin embargo, se requiere establecer diseños de experimentos para determinar aquellas reacciones que optimicen el crecimiento microbiano y que permitan garantizar mayores contenidos de sulfato de cobre, a partir de la biolixiviación.

### **BRIEF ARTICLE**

#### **ARTICLE INFORMATION**

Article received: 08/08/2018

Article accepted: 28/12/2018

On line: 26/02/2019

#### **KEYWORD**

acid drainage,  
bioleaching,  
copper,  
mineral extraction

### **ABSTRACT**

The search for sustainable technological alternatives for acid mine drainage is a current necessity. The purpose of the study was to determine the bioleaching of copper sulphate by microbial growth under mining drainage conditions. From 2014 to 2015, the maximum average microbial production in leachates belonging to four dumps of the Toquepala mining site of the Southern Perú Copper Company was determined experimentally. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between the averages of the microbial activity in relation to the concentrations of the copper sulphate (0.0; 5.0; 10.0; 15.0; 20.0 g.L<sup>-1</sup>) where the results were (logarithm of cel/ml): 8.90±0.03; 7.77±0.06; 7.20±0.07; 7.04±0.04 and 7.00±0.02. It was concluded that the indicative bioleaching of copper sulphate was associated with microbiological growth as a technological process. However, it is necessary to establish experimental designs to determine those reactions that optimize microbial growth, and to guarantee greater contents of copper sulphate from the bioleaching.

## INTRODUCCIÓN

El cobre, es uno de los minerales que más movimiento de tierra produce para su extracción, trayendo consigo, contaminación ambiental del suelo y las aguas subterráneas (Amari et al., 2014; Beylot & Villeneuve, 2017; Kefeni et al., 2017), además, del grave problema recurrente e inevitable por exposición a los relaves (Nejeschlebová et al., 2015).

Después del aluminio, el cobre representa el segundo metal no ferroso más costoso a nivel mundial donde su precio resulta muy inestable variando rápida y significativamente de un momento a otro (Volchko et al., 2017). Algunas referencias han señalado que podría agotarse sus reservas para el 2050 ante el crecimiento y demanda de consumo poblacional (Brown, 2006). Cuando el cobre se encuentra impregnado en materiales contaminados puede ser recuperado usando técnicas de lavado químico *ex-situ* en combinación con otras para la remediación ambiental (Karlfeldt, Yillin & Strömvall, 2013). La recuperación del cobre puede ser por biolixiviación (Adedigba, 2015; Andersson & Lundström, 2015) donde algunas bacterias están asociadas durante el proceso (Kondrat'eva et al., 2012; Hao et al., 2016), siendo en algunos casos, la aplicación de tecnologías genéticas con exploraciones metagenómicas para identificar a las bacterias involucradas en el proceso de lixiviación (Korehi, Blothe & Schippers, 2014; Gupta et al., 2017). Diversos estudios se han realizado sobre biolixiviación dirigidas a la protección ambiental (Cox & Bryan, 2017; Yin et al., 2018).

La biolixiviación, constituye una tecnología global (Johnson, 2014; Harrison, 2016) donde los concentrados de cobre, han recibido mayor atención en los últimos años (Brierley, 2016). Sin embargo, desde la década de 1940 diversos investigadores han contribuido al entendimiento de los mecanismos microbiológicos utilizados en la biosolubilización de óxidos y sulfuros metálicos (Mishra et al., 2005) siendo los minerales de sulfuro los que principalmente

se han biolixiviado en la minería de cobre con fines comerciales en varios países (Ehrlich, 2001).

Entre las especies más importantes involucradas en el proceso de biolixiviación se encuentran, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus albertis*, *Acidithiobacillus acidophilus*, *Acidithiobacillus concretivorus*, *Acidithiobacillus prosperus* (Hoque & Philip, 2011) y *Leptospirillum ferrooxidans* (Ewart & Martin, 1991; Bosecker, 1997; Rawlings, 2013). Asimismo, la técnica de inmovilización de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, oxidan un sustrato que contiene el hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) para formar compuestos de hierro férrico ( $Fe^{3+}$ ) en solución altamente ácida y donde cada vez más, está siendo utilizada para la biooxidación de hierro  $Fe^{2+}$  (Mazuelos et al., 1999; Giaveno et al., 2008). El propósito del estudio fue determinar la biolixiviación indicativa del sulfato de cobre mediante el crecimiento microbiano en el drenaje minero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de investigación y periodo de estudio

Se seleccionaron cuatro botaderos con presencia de lixivios (mineral calcopirita de baja ley, ubicado en el asiento minero de Toquepala) pertenecientes a la Empresa Southern Perú Copper en Tacna, Perú (Tabla 1).

**Tabla 1.** Coordenadas georreferenciadas / botaderos.

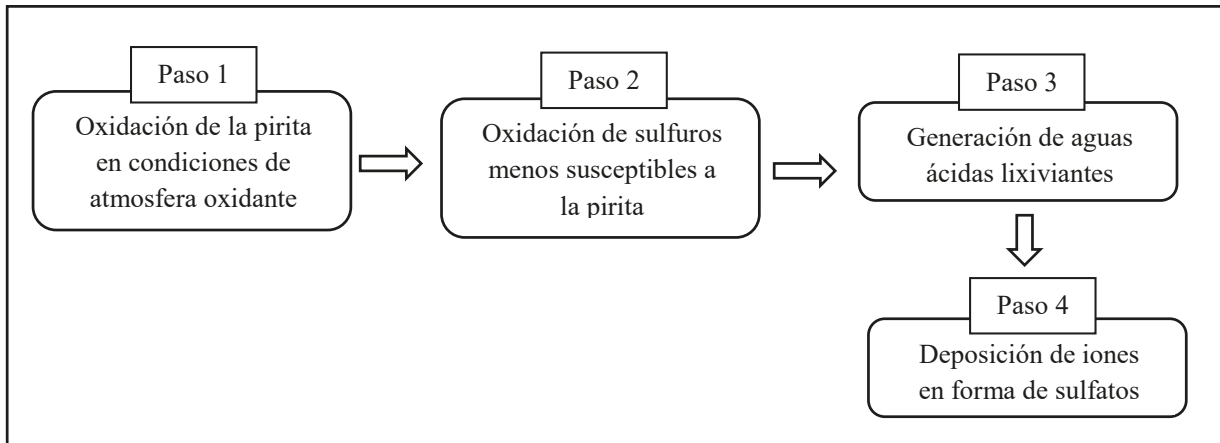
Botadero	X	Y
1	0330809	8089664
2	0329212	8088557
3	0329210	8088553
4	0329467	8089198

Los días 5 y 25 de cada mes desde julio (2014) hasta julio (2015) mediante un muestreo probabilístico aleatorio fueron recolectada utilizando un recolector (pala convencional) diversas muestras compuestas

(cuatro muestras: 5.0Kg de muestras por área: 1m<sup>2</sup> y profundidad: 30.0 cm) para su análisis en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ingeniería Metalúrgica perteneciente a la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohman.

### Diseño del estudio

Considerando de forma general el proceso de formación de drenaje ácido se evaluó la biolixiviación en el paso 4 (Figura 1).



**Figura 1.** Formación de drenaje ácido.  
Fuente: modificado de: Hallberg, K.B (2010)

### Análisis de las variables

La presencia de actividad biolixivante se reconoció por la coloración anaranjado-rojiza. Una vez muestreadas la masa mineral de interés fue sumergida en 3L de medio 9K (líquido modificado) a pH 1.8 donde se insufló, 1 vvm de aire durante 15 días a temperatura ambiente (25°C) con agitación diaria mediante un biorreactor cuyas características son las siguientes (Figura 2):

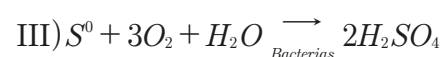
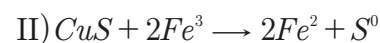
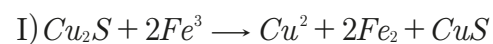
- Tipo cilíndrico de polietileno transparente de 1L de capacidad, tapa desmontable y aireación (1 vvm) bajo sistema de motores eléctricos (Rokasd: modelo SB-348A y mangueras de silicona).
- Funcionalidad en condiciones aséptica (no aparición de contaminantes).

Se sembró mediante asa de Koll por extensión, inóculos tomados del cultivo de enriquecimiento sobre la superficie del medio de cultivo agar, 9K contenido en placas Petri las cuales fueron incubadas a temperatura ambiente por 15 días para su observación y confirmación al microscopio óptico de campo claro con 400X.



**Figura 2.** Biorreactor cilíndrico aireado.

Para la obtención del inóculo (consorcio microbiano) se tomó 0.5L de cultivo enriquecido y por separado se agregó con 3L de medio 9K líquido, pH 1.8; contenido en un biorreactor que se agitó diariamente por 15 minutos, durante 15 días a temperatura ambiente con una aireación de 1 vvm. Por lo general, las reacciones químicas del proceso biolixivante son las siguientes (Yin et al., 2018):



La cuantificación del sulfato de cobre se realizó por pesada analítica, solubilización y dilución en agua destilada según la concentración de cobre establecida como parámetro experimental (0.0; 5.0; 10.0; 15.0; 20.0 g.L<sup>-1</sup>). Luego a cada concentración de cobre se le agregó el inóculo microbiano previamente preparado para dar inicio así a la experimentación. Para la confiabilidad de los resultados los experimentos se replicaron cuatro veces donde el margen de error en las mediciones analíticas se redujo y con ello, las posibles fuentes de variación fueron más precisas.

### Análisis estadístico

Para el tratamiento de los datos se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion versión 18 donde se realizó la comparación de los valores promedios referidos a la concentración de la biooxidación del hierro y actividad del crecimiento microbiano mediante el análisis de la varianza. La prueba de Bonferroni fue la utilizada para la homogeneidad de los grupos siendo considerados significativos con un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 3.** Análisis de varianza entre la concentración del sulfato de cobre y la actividad microbiana.

Fuente de Variación	Suma de Cuadros	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Coficiente Fisher	Valor de P
Entre grupos	7.6717	4	1.91792	239142713.20	0.0000
Intra grupos	8.02E-8	10	8.02E-9		
Total (Corr.)	7.6717	14			
Prueba de Bonferroni					
Producción máxima microbiana	Grupo homogéneos				
5	a				
4	b				
3	c				
2	d				
1	e				

Letras: significan diferencias estadísticamente significativas

### DISCUSIÓN

A pesar, que el drenaje ácido es perjudicial ambientalmente donde algunos autores han indicado el uso de soluciones de cal para neutralizar las concentraciones (de Godoi, Foresti & Damianovic, 2017; Kefeni, Msagati & Mamba, 2017), la búsqueda de alternativas sostenibles para no reducir compuestos del sulfato de cobre intenta plantearse.

### RESULTADOS

Se encontró concentraciones de sulfato de cobre asociado a la actividad microbiana en los botaderos del asiento minero. Asimismo, hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) y desigual homogeneidad en los promedios de agrupación de muestras compuestas para la actividad microbiana (Tabla 2 y 3).

**Tabla 2.** Concentración de sulfato de cobre / actividad microbiana.

Concentración de sulfato de cobre (g.L <sup>-1</sup> )	Producción máxima microbiana (logaritmo de cel/ml)
0	8.90±0.03
5	7.77±0.06
10	7.20±0.07
15	7.04±0.04
20	7.00±0.02

Pozo et al., (2017) plantearon que, bacterias ferrooxidantes catalizan la oxidación de minerales sulfurados con lo cual, pudo asumirse en este estudio la presencia de dichas bacterias como agentes involucrados en el proceso biólíxivante. Vahidi & Zhao (2016) y Bonilla et al., (2018) señalaron a la biólíxivación, una alternativa eficiente para el tratamiento de las aguas y con ello, reducir el impacto de la contaminación ambiental, así como

una recuperación de minerales de baja ley (Jones & Johnson, 2016) mediante este proceso biotecnológico (Bryan et al., 2015; Watling, 2016).

Otro proceso biotecnológico utilizó a la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* para remover por horas, algunos metales incluyendo el cobre donde se obtuvo concentraciones superiores (hasta 400mg por actividad celular) a las encontradas en este estudio (Hocheng et al., 2012) de modo que, puede mostrarse la relación positiva de bacterias presentes en la lixiviación para concentrar metales. Asimismo, se sembró en medios sulfurados al 1%, calcopirita (1%) a pH 2.5 para evaluar el crecimiento de dos cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (D3-2 y ATCC23270) donde se indicó que, la cepa D3-2 al poseer resistencia al ion sulfito (producto intermedio muy tóxico e inhibidor de la actividad oxidativa) fue capaz de solubilizar mayor cantidad de cobre, pues la cepa ATCC23270, resultó más sensible a la enzima sulfito oxidasa (Sugio et al., 2008). En este estudio, una de las bacterias identificadas en el proceso de biolixiviación del cobre precisamente fue, la *Acidithiobacillus ferrooxidans* lo cual puede señalar, el vínculo indicativo en el proceso biotecnológico.

Aunque se sugiere establecer otros diseños de experimentos para determinar, aquellas reacciones que optimicen, no solo el crecimiento microbiano sino, garanticen las mayores concentraciones del sulfato de cobre, a partir de la biolixiviación, los resultados hallados de forma experimental señalaron que, hubo indicación para el  $\text{CuSO}_4$  mediante crecimiento microbiano.

Finalmente, ante la ductilidad, conductividad eléctrica y térmica del cobre, las industrias del transporte, electricidad, construcción y manufacturas han utilizado considerablemente este metal (Panda et al., 2015; Dunbar, 2017) de modo que, la necesidad de pensar sobre, cómo recuperar el mineral y no, remediar la zona de impacto donde se halla de forma combinada con otros contaminantes producto de la actividad minera (Park et al., 2015), diversos

proyectos son realizados diariamente para extraer y concentrar selectivamente los minerales del drenaje ácido pero desafortunadamente, la biolixiviación como tecnología sostenible, aún no permite el 100% de eficiencia (Simate & Ndlovu, 2014).

## FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Laboratorio de Biotecnología Microbiana. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional "Jorge Basadre Grohmann", Tacna, Perú.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional "Jorge Basadre Grohmann" de Tacna, Perú por su colaboración en la gestión de los resultados analíticos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adedigba, A. (2015). Assessment of Metal Recycling in Remediation Projects: Application and Evaluation of a Cost-benefit Analysis Method. (Master's Thesis). Chalmers Reproservice, Gothenburg. <http://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/226582/226582.pdf>
- Amari, K.E., Valera, P., Hibti, M., Pretti, S., Marcello, A. & Essarraj, S. (2014). Impact of mine tailings on surrounding soils and ground water: Case of Kettara old mine, Morocco. *Journal of African Earth Sciences*; 100, 437–449. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2014.07.017>
- Andersson, D. & Lundström, J. (2015). Enhanced Soil Washing – A Study on Treatment of Copper Polluted Soil and Bark. (Master's thesis 2015:45). Chalmers Reproservice, Gothenburg
- Beylot, A. & Villeneuve, J. (2017). Accounting for the environmental impacts of sulfidic tailings storage in the Life Cycle Assessment of copper production: A case study. *Journal of Cleaner Production*; 152, 139–145. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jclepro.2017.03.129>

- Bosecker, K. (1997). Bioleaching: metal solubilization by microorganisms - Bosecker – 1997. *FEMS Microbiol. Rev*; 20, 591–604. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(97\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00036-3)
- Brierley, C.L. (2016). Biological processing of sulfidic ores and concentrates – integrating innovations. In: Lakshmanan, V.I., Roy, R., Ramachandran, V. (Eds.): *Innovative Process Development in Metallurgical Industry. Springer International Publishing, Switzerland*; 109–135.
- Brown, L., (2006). *Plan B 2.0: rescuing a planet under stress and a civilization in trouble*. Earth Policy Institute. W.W. Norton & Co., New York. ISBN: 0-393-32831-7
- Bryan, C., Watkin, E., McCredden, T., Wong, Z., Harrison, S. & Kaksonen, A. (2015). The use of pyrite as a source of lixiviant in the bioleaching of electronic waste. *Hydrometallurgy*; 152, 33–43. <http://doi.org/10.1016/j.hydromet.2014.12.004>
- Cox, A. & Bryan, C.G. (2017). Insights into Heap Bioleaching at the Agglomerate-Scale. *Solid State Phenom. Trans. Tech. Publ.* 185–188. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.262.185>
- de Godoi, L.A.G., Foresti, E. & Damianovic, M.H.R.Z. (2017). Down-flow fixed-structured bed reactor: an innovative reactor configuration applied to acid mine drainage treatment and metal recovery. *J. Environ. Manag*; 197, 597–604. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.027>
- Dunbar, W.S. (2017). Biotechnology and the mine of Tomorrow. *Trends Biotechnol*; 35, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.07.004>
- Ehrlich, H.L. (2001). Past, present and future of biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*; 59, 127–134. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00165-1](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00165-1)
- Ewart, D.K. & Martin, N.H. (1991). The extraction of metals from ores using bacteria. *Adv. Inorg. Che*; 36, 103–135. [https://doi.org/10.1016/S0898-8838\(08\)60038-0](https://doi.org/10.1016/S0898-8838(08)60038-0)
- Giaveno, A., Lavalle, L., Guibal, E. & Donati, E. (2008). Biological ferrous sulfate oxidation by *A. ferrooxidans* immobilized on chitosan beads. *J. Microbiol. Methods*; 72, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.002>
- Gupta, A., Dutta, A., Sarkar, J., Paul, D., Panigrahi, M.K. & Sar, P. (2017). Metagenomic exploration of microbial community in mine tailings of Malanjkhand copper project, India. *Genomics Data*; 12, 11–13. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2017.02.004>
- Hallberg, K.B. (2010). New perspectives in acid mine drainage microbiology. *Hydrometallurgy*; 104, 448–453. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2009.12.013>
- Hao, X.D., Liang, Y.L., Yin, H.Q., Ma, L.Y., Xiao, Y.H., Liu, Y.Z., Qiu, G.Z. & Liu, X.D. (2016). The effect of potential heap construction methods on column bioleaching of copper flotation tailings containing high levels of fines by mixed cultures. *Minerals Engineering*; 98, 279–285. <http://dx.doi.org/10.3390/min8020032>
- Harrison, S.T.L. (2016). Biotechnologies that utilize acidophiles. In: Quatrini, R., Johnson, D.B. (Eds.), *Acidophiles: Life in Extremely Acidic Environments*. Caistor Academic Press, Haverhill, UK, 265–283.
- Hocheng, H., Chang, J.H., Hsu, H.S., Han, H.J., Chang, Y.L. & Jadhav, U.U. (2012). Metal removal by *Acidithiobacillus ferrooxidans* through cells and extra-cellular culture supernatant in biomachining. *CIRP J Manuf Sci Technol*; 5, 137–141. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.cirpj.2012.03.003>
- Johnson, D.B. (2014). Biomining – biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Curr. Opin. Biotechnol*; 30, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.04.008>
- Karlfeldt, F.K., Yillin, L. & Strömvall, A.M. (2013). Remediation of metal polluted hotspot areas through enhanced soil washing - evaluation

- of leaching methods. *J. Environ. Manag*; 128, 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.05.056>
- Kefeni, K.K., Msagati, T.A.M & Mamba, B.B. (2017). Acid mine drainage: prevention treatment options, and resource recovery: a review. *J. Clean. Prod*; 151, 475–493. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.082>
- Kondrat'eva, T.F., Pivovarova, T.A., Bulaev, A.G., Melamud, V.S., Muravyov, M.I., Usoltsev, A.V. & Vasil'ev, E.A. (2012). Percolation bioleaching of copper and zinc and gold recovery from flotation tailings of the sulfide complex ores of the Ural region, Russia. *Hydrometallurgy*; 111–112, 82–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hydromet.2011.10.007>
- Korehi, H., Blothe, M. & Schippers, A. (2014). Microbial diversity at the moderate acidic stage in three different sulfidic mine tailings dumps generating acid mine drainage. *Research in Microbiology*; 165, 713–718. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.08.007>
- Martins, C.J., Piacentini, R.R. & Sancinetti, G.P. (2017). Removal sulphate and metals Fe<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> and Zn<sup>+2</sup> from acid mine drainage in an anaerobic sequential batch reactor. *J. Environ. Chem. Eng.* 5(2), 1985–1989. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.04.011>
- Mazuelos, A., Romero, R., Palencia, I., Iglesias, N. & Carranza, F. (1999). Continuous ferrous iron biooxidation in flooded packed bed reactors. *Miner. Eng*; 12(5), 559–564.
- Mishra, D., Kim, D.J., Ahn, J.G. & Rhee, Y.H. (2005). Bioleaching: a microbial process of metal recovery; A review. *Met. Mater. Int*; 11, 249–256. <https://doi.org/10.1007/BF03027450>
- Nejeschlebová, L., Sracek, O., Mihaljević, M., Ettler, V., Kr̃ibek, B. & et al. (2015). Geochemistry and potential environmental impact of the mine tailings at Rosh Pinah, southern Namibia. *Journal of African Earth Sciences*; 105, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2015.02.005>
- Panda, S., Akcil, A., Pradhan, N. & Deveci, H. (2015). Current scenario of chalcopyrite bioleaching: A review on the recent advances to its heap-leach technology. *Bioresour. Technol*; 196, 694–706. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.064>
- Park, S.M., Yoo, J.C., Ji, S.W., Yang, J.S. & Baek, K. (2015). Selective recovery of dissolved Fe, Al, Cu, and Zn in acid mine drainage based on modeling to predict precipitation pH. *Environ. Sci. Pollut. Res*; 22, 3013–3022. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.07.021>
- Pozo, A.J.S., Puente, I., Lagueta, S. & Veiga, Ma. (2017). Tratamiento microbiano de aguas ácidas resultantes de la actividad minera: una revisión. *Tecnología y Ciencias del Agua*; 8(3), 75–91. <http://dx.doi.org/10.24850/tyca-2017-03-05>
- Rawlings, D.E. (2013). *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes*. Springer, Berlin-New York
- Simate, G.S. & Ndlovu, S. (2014). Acid mine drainage: Challenges and opportunities. *J. Environ. Chem. Eng*; 2, 1785–1803. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.07.021>
- Sugio, T., Wakabayashi, M., Kanao, T. & Takeuchi, F. (2008). Isolation and characterization of Acidithiobacillus ferrooxidans strain D3-2 active in copper bioleaching from a copper mine in Chile. *Biosci Biotechnol Biochem*; 72(4), 998–1004. <https://doi.org/10.1271/bbb.70743>
- Vahidi, E. & Zhao, F. (2016). Life cycle analysis for solvent extraction of rare earth elements from aqueous solutions. In: *Rewas 2016*. Springer, 113–120. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48768-7\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48768-7_17)
- Volchko, Y., Norrman, J., Rosén, L. & Karlfeld, F.K. (2017). Cost-benefit analysis of copper recovery in remediation projects: A case study from Sweden. *Science of the Total Environment*; 605–606, 300–314. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.128>

Watling, H. (2016). Microbiological advances in biohydrometallurgy. *Fortschr. Mineral*; 6(2), 49. <https://doi.org/10.3390/min6020049>

Yin, S., Wang, L., Kabwe, E., Chen, X., Yan, R. & et al. (2018). Copper Bioleaching in China: Review and Prospect. *Minerals*; 8(32). 1–26. <http://dx.doi.org/10.3390/min8020032>