



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de diferentes medios de cultivo en un proceso de biodesulfurización de carbón mediado por bacterias acidófilas

Paola Gissel Duarte Briceño

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Maestría en Ciencias - Biotecnología

Medellín, Colombia

2015

Evaluación de diferentes medios de cultivo en un proceso de biodesulfurización de carbón mediado por bacterias acidófilas

Paola Gissel Duarte Briceño

Tesis presentada como requisito parcial para optar el título de:

Magister en Biotecnología

Director:

Marco Antonio Márquez Godoy, PhD

Asesor:

Gerardo Caicedo Pineda, MSc

Línea de Investigación:

Biohidrometalurgia

Grupo de Investigación:

Grupo de Mineralogía Aplicada y Bioprocesos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Maestría en Ciencias - Biotecnología

Medellín, Colombia

2015

*A mi adorado Padre, quien siempre me motivó y apoyó,
quien me brindó un ejemplo de vida, quien siempre creyó
en mí, me dio los mejores consejos y por siempre será mi
más grande amor. Todo lo que soy y seré siempre lo
deberé a él.*

*A mi Mamita, por ser mi luz, mi fuerza y la mujer más
valiente y amorosa que he conocido.*

*A Pipe y Javito, por su amistad, su amor, sus sonrisas, su
complicidad y por ser mi más grande felicidad y orgullo.*

*A mi tía Doris, por su apoyo incondicional y por ser
como una segunda mamá.*

*A mis abuelitos, que con su dulzura y oraciones siempre
me cuidan y llevan en su corazón.*

Agradecimientos

A Dios.

A mi adorada familia.

A todos mis amigos y amigas, en especial a Laurita, por su apoyo, amistad constante e incondicional y por acompañarme paso a paso durante todo este camino. Sin su compañía y consejo este sueño hubiera sido imposible de alcanzar. También con gratitud infinita hacia Andrea, Jimena, Natalia, Carito y su familia y Luis, personas maravillosas que me dejaron entrar en sus vidas, con las que creé vínculos sinceros y una amistad que sin duda será para siempre.

A Gerardo y todos mis compañeros del grupo de investigación GMAB, por su complicidad y apoyo constante. A Maria por invitarme a hacer parte de este maravilloso grupo.

Al Profesor Marco Márquez, por todos sus valiosos aportes, orientaciones, acompañamiento y amistad.

Al Laboratorio de Biomineralogía y Biohidrometalurgia por ser el espacio adecuado para llevar a cabo la experimentación del proyecto.

A Colciencias y Argos por la financiación del proyecto.

Al CIMEX, al Laboratorio de Carbones de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, por su amable y valiosa colaboración en la realización de los diferentes análisis.

A Centricol LTDA por su paciencia, soporte y mantenimiento de los equipos.

Resumen

Se evaluó el efecto de cinco medios de cultivo: tres a base de sales de sulfato (T&K, Kos y McCready), y dos a base de sales de cloro (Hoffmann y Cloruros), sobre la acción de dos tipos de inóculo bacteriano: una cepa pura de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270) y un consorcio conformado por *A. ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* (ATCC 15494), en un proceso de biodesulfurización de un carbón a nivel de erlenmeyer (200 mL) y a nivel de reactor de tanque agitado (5000 mL). El carbón tratado (tamaño de partícula < 0.25mm) provino de la mina “La Guacamaya” (Puerto Libertador, Córdoba, Colombia). Todos los experimentos fueron monitoreados periódicamente con mediciones de pH, potencial redox, concentración celular, concentración de hierro, oxidación de pirita y oxígeno disuelto. Adicionalmente, se hicieron análisis mineralógicos a las muestras de carbón inicial y final, mediante espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Los bioensayos revelaron una mejor actividad oxidativa a nivel de erlenmeyer, alcanzando la máxima oxidación de pirita (86%) de azufre inorgánico removido (53%) en los tratamientos con el medio McCready, después de 15 días del proceso. Se evidenció la gran capacidad de las bacterias evaluadas para adaptarse a medios de cultivo muy simples, con concentraciones de nutrientes mínimas, incluso en ausencia de algunas de ellas (como es el caso del magnesio y el nitrógeno) y en presencia de iones de cloro, los cuales se considera son tóxicos para la bacteria. A nivel de reactor de tanque agitado se también se alcanzó la máxima remoción de azufre inorgánico (68%) en los tratamientos con el medio McCready. Los resultados muestran que para un proceso de biodesulfurización de carbón, con cualquiera de los tratamientos evaluados, se alcanzan altas oxidaciones del mineral, no obstante, en medios con bajas concentraciones de sulfatos (como Kos y McCready) disminuyen los procesos de re-precipitación y por tanto, se alcanzan mayores remociones de azufre inorgánico.

Palabras clave: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, medios de cultivo, sulfatos, cloruros, biodesulfurización de carbón, pirita.

Abstract

The effect of five media were evaluated, three of these based sulfate salts (T&K, Kos and McCready) and two culture media based salts chlorine (Hoffmann and Chlorides), on the action of two types of bacterial inoculum, a pure strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270) and a consortium of *A. ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* (ATCC 15494), in a coal biodesulphurization process in erlenmeyer (200mL) and stirred tank reactor (5000mL). The treated coal (particle size <0.25mm) came from "La Guacamaya" (Puerto Libertador, Cordoba, Colombia) mine. All experiments were monitored periodically with pH, redox potential, cell concentration, iron concentration, pyrite oxidation, and dissolved oxygen. Further, coal mineralogical analysis at initial and final samples by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM). Bioassays revealed better oxidative activity in a flask, reaching maximum oxidation of pyrite (86%) of inorganic sulfur removed (53%) in McCready treatments, after 15 days of the process. The high ability of bacteria tested to adapt to very simple culture media, with minimal concentrations of nutrients, even without evidenced some nutrients (such as magnesium and nitrogen) and in the presence of chloride ions, which are believed to be toxic to the bacteria. In stirred tank reactor, a higher inorganic sulfur removal (68%) was also reached with McCready treatments. The results show that for a coal biodesulphurization process with any of the treatments evaluated, high oxidation of the mineral is achieved, however, in medium with low concentrations of sulfates (Kos and McCready) decrease re-precipitation processes and therefore reach higher removal of inorganic sulfur with these culture media.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, culture media, sulfates, chlorides, coal biodesulphurization, pyrite.

Contenido

Resumen	Pág.
Abstract	VII
Lista de figuras	VIII
Lista de tablas	XI
Lista de símbolos y abreviaturas	XVI
Introducción	XVII
1. Marco Teórico	1
1.1 Carbón	4
1.1.1 Tipos de azufre presentes en el carbón	4
1.1.2 Normatividad y problemática ambiental en Colombia	4
1.2 Biodesulfurización de carbón	6
1.2.1 Bacterias involucradas en procesos de biolixiviación de azufre inorgánico	7
1.2.2 Mecanismos de biolixiviación	8
1.2.3 Aspectos claves en el desempeño de bacterias acidófilas	10
1.2.4 Biodesulfurización a gran escala	14
2. Materiales y Métodos	19
2.1 Muestra de carbón	19
2.2 Análisis físico-químicos y mineralógicos iniciales y finales del carbón	20
2.3 Medios de cultivo	21
2.4 Selección y adaptación de los microorganismos	22
2.4.1 Adaptación de las bacterias al carbón	22
2.4.2 Adaptación de las bacterias a los medios de cultivo T&K, Kos y McCready	23
2.4.3 Adaptación de las bacterias a los medios de cultivo Cloruros y Hoffmann	24
2.5 Ensayos de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer	25
2.6 Ensayos de biodesulfurización de carbón a nivel de reactor de tanque agitado	27
2.6.1 Selección de tipo de inóculo	27
2.6.2 Medios de cultivo evaluados a nivel de reactor de tanque agitado	28
3. Influencia de sales de sulfatos sobre un proceso de biodesulfurización de carbón empleando bacterias acidófilas	31
3.1 Introducción	31
3.2 Materiales y Métodos	33
3.3 Resultados	33
3.3.1 Análisis químicos y mineralógicos iniciales del carbón	33
3.3.2 Adaptación de microorganismos	39
3.3.3 Proceso de Biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer	42
3.3.4 Análisis estadístico de los ensayos de biodesulfurización de carbón y Caracterización química	53
3.3.5 Análisis mineralógicos de las muestras tratadas	57
3.4 Discusión	64
3.4.1 Adaptación de microorganismos	64
3.4.2 Ensayos de Biodesulfurización de carbón	65

3.4.3	Caracterización de muestras de carbón tratadas	72
3.5	Conclusiones preliminares	75
4.	Efecto de medios de cultivo – base cloruros – sobre la acción de bacterias acidófilas en un proceso de biodesulfurización de carbón	77
4.1	Introducción	77
4.2	Materiales y Métodos	78
4.3	Resultados	78
4.3.1	Análisis químicos y mineralógicos iniciales del carbón	78
4.3.2	Adaptación de microorganismos	78
4.3.3	Sales de cloruros en un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer	82
4.3.4	Análisis estadístico de los ensayos de biodesulfurización de carbón y Caracterización química	93
4.3.5	Caracterización de muestras de carbón tratadas	98
4.4	Discusión	107
4.4.1	Adaptación de microorganismos	107
4.4.2	Ensayos de Biodesulfurización de carbón	108
4.4.3	Caracterización de muestras de carbón tratadas	114
4.5	Conclusiones preliminares	116
5.	Evaluación de diferentes medios de cultivo sobre un proceso de biodesulfurización de carbón en reactores de tanque agitado	118
5.1	Introducción	118
5.2	Materiales y Métodos	119
5.3	Resultados	120
5.3.1	Análisis iniciales del carbón	120
5.3.2	Medios a base de sales de sulfatos y cloruro en un proceso de biodesulfurización de carbón en reactores de tanque agitado	120
5.3.3	Análisis estadísticos, y proceso comparativo entre la biodesulfurización a nivel de erlenmeyer y reactor de tanque agitado ...	127
5.3.4	Caracterización de muestras de carbón tratadas.....	130
5.4	Discusión	137
5.4.1	Medios a base de sales de sulfatos, cloruro en un proceso de biodesulfurización de carbón en reactores de tanque agitado y Proceso comparativo entre escalas erlenmeyer vs. reactor	137
5.4.2	Caracterización de muestras de carbón tratadas	141
5.5	Conclusiones preliminares	143
6.	Conclusiones y Recomendaciones	144
6.1	Conclusiones	144
6.2	Recomendaciones	145
A.	Anexos.....	153
	Bibliografía	156

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1-1: Cadena de transporte de electrones	10
Figura 2-1: Mina “La Guacamaya”, Municipio de Puerto Libertador, Córdoba.....	19
Figura 2-2: Ensayos de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, en presencia de la cepa pura (<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>) y el consorcio de bacterias acidófilas (<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>)	25
Figura 2-3: Reactores de tanque agitado empleados para la evaluación de los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann en un proceso de biodesulfurización de carbón en presencia de un consorcio de bacterias acidófilas	29
Figura 3-1: Difractograma de la muestra de carbón antes del proceso de biodesulfurización	34
Figura 3-2: Espectro de FTIR, de la muestra de carbón inicial	35
Figura 3-3: Segunda derivada del espectro de FTIR de la muestra de carbón inicial	36
Figura 3-4: Microcristales de pirita en la muestra inicial de carbón y análisis microquímico por EDS de los granos de pirita	36
Figura 3-5: Pirita framboidal, incipientemente corroída, presente en la muestra de carbón inicial y análisis microquímico por EDS de la pirita	37
Figura 3-6: Pirita euedral en la muestra inicial de carbón, análisis microquímico por EDS de la pirita	38
Figura 3-7: Pirita euedral corroída en los bordes, recubierta por película fina de sulfato, presente en la muestra inicial de carbón. Análisis microquímico de la película de sulfato y aluminosilicatos por EDS	39
Figura 3-8: Comportamiento del potencial de óxido-reducción durante el proceso de adaptación en cinco etapas de la cepa pura y el consorcio, al incremento en la concentración de carbón y la disminución de sulfato ferroso y azufre elemental, usando el medio de cultivo T&K	40
Figura 3-9: Curva de pH vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y los medios T&K, Kos y McCready	42
Figura 3-10: Curva de Eh vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y los medios T&K, Kos y McCready	43
Figura 3-11: Concentración celular vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y los medios T&K, Kos y McCready	44
Figura 3-12: Porcentaje de hierro en solución vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready	45
Figura 3-13: Porcentaje de hierro re-precipitado vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready	45
Figura 3-14: Porcentaje de pirita oxidada vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready	46
Figura 3-15: Concentración de iones Fe ³⁺ en solución a través del tiempo, usando una cepa comercial <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready	47

Figura 3-16: Curva de pH vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando un consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready	48
Figura 3-17: Curva de Eh vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready	49
Figura 3-18: Concentración celular vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando un consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready	49
Figura 3-19: Porcentaje de hierro en solución vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready	50
Figura 3-20: Porcentaje de hierro re-precipitado vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready	51
Figura 3-21: Porcentaje de pirita oxidada vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready	52
Figura 3-22: Concentración de iones Fe ³⁺ en solución vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready	53
Figura 3-23: Porcentaje de hierro en solución obtenido al final del proceso de biodesulfurización para la bacteria pura y el consorcio, en cada uno de los diferentes medios de cultivo evaluados	54
Figura 3-24: Porcentaje de hierro re-precipitado al final del proceso de biodesulfurización con la bacteria pura y el consorcio, en cada uno de los diferentes medios de cultivo evaluados	54
Figura 3-25: Porcentaje de pirita oxidada obtenido al final del proceso de biodesulfurización para la bacteria pura y el consorcio, en cada uno de los diferentes medios de cultivo evaluados	55
Figura 3-26: Análisis multivariado de componentes principales, usando una matriz de correlación, para los medios de cultivo a base de sulfatos en un proceso de biodesulfurización de carbón, usando la cepa pura y el consorcio de bacterias acidófilas	57
Figura 3-27: Difractograma de los ensayos de biodesulfurización de carbón usando la cepa pura y el consorcio en los medios de cultivo T&K, Kos y McCready	58
Figura 3-28: Espectros de FTIR para los ensayos de biodesulfurización de carbón usando la cepa pura y el consorcio en los medios de cultivo T&K, Kos y McCready	59
Figura 3-29: Micrografías de SEM en los bioensayos con el medio de cultivo T&K. Jarosita como pseudomorfo de pirita incrustada en un grano de carbón y su respectivo análisis microquímico EDS (A). Granos de pirita euhedrales corroídos con presencia de jarosita (B)	60
Figura 3-30: Hidróxido de hierro (Goethita), hallado en los bioensayos con el medio de cultivo T&K y su respectivo análisis microquímico EDS	61
Figura 3-31: Micrografías de SEM en los bioensayos con el medio de cultivo Kos. Formación de jarosita en las grietas de los granos de carbón y su respectivo análisis microquímico EDS (A). Jarosita como pseudomorfo de pirita (B)	62
Figura 3-32: Micrografías de SEM en los bioensayos con el medio de cultivo McCready	63

Transformación de pirita framboidal en pseudomorfo de jarosita y su respectivo análisis microquímico EDS (A). Jarosita, como pseudomorfo de pirita framboidal (B). Pirita corroída, bordeada por capa de jarosita (C)	
Figura 4-1: Comportamiento del potencial de óxido-reducción durante el proceso de adaptación progresiva en cuatro etapas de la cepa pura en presencia del mineral, al medio de cultivo Cloruros	79
Figura 4-2: Comportamiento del potencial de óxido-reducción durante el proceso de adaptación progresiva en cuatro etapas del consorcio en presencia del mineral, al medio de cultivo Cloruros	80
Figura 4-3: Comportamiento del potencial de óxido-reducción durante el proceso de adaptación progresiva en cuatro etapas de la cepa pura en presencia del mineral, al medio de cultivo Hoffmann	81
Figura 4-4: Comportamiento del potencial de óxido-reducción durante el proceso de adaptación progresiva en cuatro etapas del consorcio en presencia del mineral, al medio de cultivo Hoffmann	81
Figura 4-5: Curva de pH vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y los medios T&K, Cloruros y Hoffmann	82
Figura 4-6: Curva de Eh vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y los medios T&K, Cloruros y Hoffmann	83
Figura 4-7: Concentración celular vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y los medios T&K, Cloruros y Hoffmann	84
Figura 4-8: Porcentaje de hierro en solución vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann	85
Figura 4-9: Porcentaje de hierro re-precipitado vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann	85
Figura 4-10: Porcentaje de pirita oxidada vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann	86
Figura 4-11: Concentración de iones Fe^{3+} en solución a través del tiempo, usando una cepa comercial <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann	87
Figura 4-12: Curva de pH vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando un consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann	88
Figura 4-13: Curva de Eh vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann	89
Figura 4-14: Concentración celular vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando un consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann	90
Figura 4-15: Porcentaje de hierro en solución vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Cloruros y Hoffmann	91
Figura 4-16: Porcentaje de hierro re-precipitado vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo	91

T&K, Cloruros y Hoffmann	
Figura 4-17: Porcentaje de pirita oxidada vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Cloruros y Hoffmann	92
Figura 4-18: Concentración de iones Fe^{3+} en solución vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann	93
Figura 4-19: Porcentaje de hierro en solución para la bacteria pura y el consorcio, en cada uno de los diferentes medios de cultivo evaluados	94
Figura 4-20: Porcentaje de hierro de hierro re-precipitado para la bacteria pura y el consorcio, en cada uno de los diferentes medios de cultivo evaluados	94
Figura 4-21: Porcentaje de pirita oxidada para la bacteria pura y el consorcio, en cada uno de los diferentes medios de cultivo evaluados	95
Figura 4-22: Análisis multivariado de componentes principales, usando una matriz varianza correlación (A). Análisis por clúster usando un algoritmo <i>paired group</i> (B), para un proceso de biodesulfurización de un carbón colombiano en presencia de la cepa pura y un consorcio de bacterias acidófilas, usando los medios de cultivo T&K, Cloruros y Hoffmann	97
Figura 4-23: Difractograma de los ensayos de biodesulfurización de carbón usando la cepa pura y el consorcio en los medios de cultivo T&K, Cloruros y Hoffmann	99
Figura 4-24: Espectros de FTIR para los ensayos de biodesulfurización de carbón usando la cepa pura y el consorcio en los medios de cultivo T&K, Cloruros y Hoffmann	100
Figura 4-25: Micrografías de SEM en los bioensayos con el medio de cultivo T&K. Framboide de pirita semi-corroída con película superficial de jarosita en los bordes y su respectivo análisis microquímico EDS (A). Películas de jarosita en los granos de carbón (B). Granos de pirita euedral con golfos de corrosión (C). Formación de Goethita y su respectivo análisis microquímico EDS (D)	102
Figura 4-26: Micrografías tomadas de las muestras de carbón sometidas a biolixiviación usando el medio de cultivo Cloruros. Pseudomorfo de jarosita asociado a los bordes de un grano de carbón y su respectivo espectro de EDS (A). Piritas euedrales corroídas en cercanías de grietas en granos de carbón (B) y (C)	104
Figura 4-27: Micrografías del proceso de biodesulfurización de carbón usando el medio de cultivo Hoffmann. Pirita euedral corroída en cercanías a grietas en granos de carbón y el análisis microquímico EDS para la película de jarosita (A). Micro-cristales de pirita altamente corroídos (B). Pseudomorfo de pirita framboidal como jarosita (C)	105
Figura 4-28: Mapa composicional del proceso de biolixiviación de un cristal de pirita corroído y bordeado por película de jarosita en el bioensayo usando el medio Hoffmann. Se presenta un mapa composicional y el respectivo análisis micro-químico (EDS)	106
Figura 5-1: Curva de pH vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando las cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann	121
Figura 5-2: Curva de Eh vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando las cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann	122
Figura 5-3: Concentración celular vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando las cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann	122
Figura 5-4: Porcentaje de hierro en solución vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando las cepas comerciales, A.	123

<i>ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann	
Figura 5-5: Porcentaje de hierro re-precipitado vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando las cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann	124
Figura 5-6: Porcentaje de pirita oxidada vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando las cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann	125
Figura 5-7: Concentración de iones férricos en solución vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando un consorcio de bacterias acidófilas y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann	126
Figura 5-8: Velocidad de consumo de oxígeno vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando las cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann	126
Figura 5-9: Porcentaje de hierro en solución vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer y reactor tanque agitado, usando el consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann	128
Figura 5-10: Porcentaje pirita oxidada vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer y reactor tanque agitado, usando el consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann	128
Figura 5-11: Porcentaje de hierro re-precipitado en el carbón vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización a nivel de erlenmeyer y reactor tanque agitado, usando el consorcio de cepas comerciales, <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, <i>A. thiooxidans</i> 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann	129
Figura 5-12: Difractograma de los ensayos de biodesulfurización de carbón a nivel de reactor de tanque agitado	131
Figura 5-13: Espectros de FTIR de los ensayos de biodesulfurización de carbón a nivel de reactor de tanque agitado	132
Figura 5-14: Micrografías de SEM de los granos de mineral biotratados con el medio de cultivo T&K, al finalizar el proceso de biodesulfurización en reactor de tanque agitado	133
Figura 5-15: Aluminio-silicato hallado en los bioensayos con el medio de cultivo T&K, al finalizar el proceso de biodesulfurización en reactor de tanque agitado	133
Figura 5-16: Micrografías de SEM de los granos de mineral biotratados con el medio de cultivo Kos. (A) Estructuras framboidales y (B) euedrales corroídas	134
Figura 5-17: Grano de carbón asociado a arcillas en los bio-tratamientos con el medio de cultivo Kos	134
Figura 5-18: Micrografías de SEM de los granos de mineral bio-tratados con el medio de cultivo McCready y su respectivo espectro EDS	135
Figura 5-19: Micrografías de SEM de los granos de mineral bio-tratados con el medio de cultivo Cloruros. Estructura euedral poco corroída (A) y framboide corroído (B)	136
Figura 5-20: Micrografías de SEM de los granos de mineral tratados en el medio de cultivo Hoffmann. Estructura euedral poco corroída (A) y framboide corroído con formación de sulfatos precipitados en los bordes (B)	136

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Composición de los medios de cultivo evaluados	22
Tabla 2-2: Etapas de adaptación progresiva al mineral y disminución de fuentes de energía (Sulfato ferroso y azufre elemental)	23
Tabla 2-3: Etapas de adaptación progresiva a los medios de cultivo a evaluar. Relación Medio T&K: Medio a evaluar	24
Tabla 2-4: Composición de los medios de cultivo evaluados a nivel de tanque agitado (volumen de 5 L)	28
Tabla 3-1: Análisis próximos, de azufre total y diferentes formas de azufre realizados a la muestra de carbón	33
Tabla 3-2: Valores obtenidos en los parámetros de pH, Eh y concentración celular durante la adaptación en serie de repiques sucesivos realizados a la cepa pura y el consorcio en presencia del mineral, a los medios de cultivo T&K, Kos y McCready	41
Tabla 3-3: Diferentes formas de azufre para los carbones tratados con los medios de cultivo T&K, Kos y McCready en presencia de la cepa pura y el consorcio de bacterias acidófilas ..	56
Tabla 4-1: Diferentes formas de azufre para los carbones tratados con los medios de cultivo T&K, Cloruros y Hoffmann en presencia de la cepa pura y el consorcio de bacterias acidófilas	96
Tabla 5-1: Inóculo usado para llevar a cabo los procesos en reactor de tanque agitado, parámetros de pH, Eh y Conteo celular al noveno día de crecimiento	120
Tabla 5-2: Diferentes formas de azufre para los carbones tratados con los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann a nivel de erlenmeyer y reactor de tanque agitado	130

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término	Unidad SI
L	Litros	Volumen
mL	Mililitros	Volumen
g	Gramos	Masa
mg	Miligramos	Masa
cm	Centímetros	Longitud
mm	Milímetros	Longitud
µm	Micrómetros	Longitud
min	Minutos	Tiempo
ppm	Partes por millón	Concentración
vvm	Volúmenes de aire por minuto	Concentración
rpm	Revoluciones por minuto	Velocidad
kV	Kilo voltios	Energía
mV	Mili voltios	Energía
mA	Mili amperios	Intensidad corriente eléctrica

Abreviaturas

Abreviatura	Término
T	Medio de cultivo T&K
K	Medio de cultivo Kos
M	Medio de cultivo McCready
H	Medio de cultivo Hoffmann
C	Medio de cultivo Cloruros
1	Cepa pura (<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>)
2	Consorcio de bacterias acidófilas (<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y <i>A. thiooxidans</i>)
Gy	Yeso
Py	Pirita
Mos	Moscovita
Ily	Illita
Ka	Caolinita
Qz	Cuarzo
Ja	Jarosita

Introducción

Colombia se constituye como el primer productor de carbón de América Latina y décimo en el mundo. Sus reservas totales se cuentan en alrededor de 17.000 millones de toneladas y a través de los años, ha pasado de producir 3.5 millones de toneladas de mineral a 85 millones de toneladas anuales, de las cuales la mayoría son de exportación (Redacción Portafolio, 2012).

El carbón, en Colombia y a nivel mundial ha sido por muchos años una de las principales fuentes de generación de energía, por su abundancia y precio competitivo, que hace incluso gane protagonismo por encima del petróleo y sus derivados (Redacción Portafolio, 2011). No obstante, a pesar del acelerado crecimiento económico que ha tenido en los últimos años nuestro país, debido en gran medida al sector minero-energético (Clavijo et al., 2014), si la explotación minera no realiza ajustes estructurales, toma medidas ante la problemática ambiental y, por tanto, se vuelve más sostenible, podrá en unos años estancarse las explotaciones y girarse la mirada hacia otro tipo de formas de generación de energía (Clavijo et al., 2014).

La problemática que se desarrolla alrededor del uso del carbón, tiene que ver con que los compuestos sulfurosos que se generan durante la combustión de este mineral en la producción de energía, favorecen la formación de la llamada lluvia ácida, que no solo contribuye al cambio climático, sino que también causa daños irreparables en la salud de las comunidades y el deterioro en los monumentos históricos (Gray, 2003; Ohmura y Saiki, 1997).

Por tanto, es momento de que los gobiernos, industriales e investigadores le den relevancia a la gran necesidad de crear tecnologías que contribuyan a minimizar el daño ambiental tan grave, que la combustión de este mineral genera, ya que múltiples sectores como las termoeléctricas, las industrias metalúrgicas y del cemento, usan el carbón en su red energética. Es por esto, que en los últimos años se ha conducido a la búsqueda de alternativas y/o tecnologías, como pre-tratamientos que contribuyan a la reducción del azufre presente en el carbón antes de la combustión y se garantice así un uso ambientalmente más eficiente de dicho mineral, al limitarse la cantidad de óxidos de azufre que se emiten a la atmósfera durante la generación de energía (Calkins, 1994).

En este contexto, surge la iniciativa de la biodesulfurización, como una tecnología promisoría para la extracción de metales, por cuanto ofrece ventajas técnicas y ambientales, frente a otras tecnologías disponibles. Este método es principalmente un conjunto de reacciones bioquímicas en las que microorganismos aerobios actúan como catalizadores biológicos, en un medio acuoso, acelerando las tasas de solubilización u oxidación del contenido de azufre (pirita) en sulfatos, mejorando la

recuperación de metales y de otros componentes químicos presentes en los minerales (Malik et al., 2004; Cardona y Márquez, 2009; Mcintosh y Groat, 1997).

La oxidación de sulfuros se da a través de un mecanismo químico en el cual los iones férricos son reducidos a iones ferrosos y la mitad del azufre metálico se oxida a sulfato y otros compuestos de azufre (Schippers, 2007). La imposibilidad de la pirita para disolverse en soluciones ácidas, hace que solo sea atacable a través de un agente oxidante, como el hierro (III) y en presencia de bacterias que regeneren ese agente oxidante (Schippers, 2007; Rohwerder y Sand, 2007).

Las bacterias oxidantes requieren de una disponibilidad y suministro adecuado de materias primas y nutrientes, condiciones ambientales idóneas y un control adecuado de sustancias tóxicas, entre otros factores para llevar a cabo sus rutas metabólicas, un correcto crecimiento, biosíntesis de material celular, mantenimiento y producción de energía (Prescott et al., 2004; Rossi, 1990).

Los medios de cultivo, son las mezclas de compuestos químicos que brindan todos los requerimientos necesarios para el crecimiento, energía para la biosíntesis y el mantenimiento celular de los microorganismos. Este es un aspecto clave en el éxito de un proceso y está estrechamente relacionado con el metabolismo, la composición celular y el ambiente o hábitat natural en que se desarrolla el microorganismo (Prescott et al., 2004; Rossi, 1990). Además de esto, según Rossi (1990), los medios de cultivo en procesos de biolixiviación deben tener en cuenta los compuestos que puede aportar el mineral, siendo necesario que se presente un balance en la concentración adecuada de nutrientes con el fin de que no se genere acumulación de sales y a su vez, se contribuya a la disminución en la precipitación de hidroxisulfatos de hierro.

La formación de hidroxisulfatos de hierro, como la jarosita, es altamente negativa en procesos de biodesulfurización y debe tratar de evitarse al máximo, ya que perturba de forma directa la cinética del proceso, debido a que al formarse se precipita sobre la superficie de los minerales, creando una barrera física e impidiendo la correcta difusión de los agentes de lixiviación a la superficie del sulfuro y los productos de la reacción fuera de este, impidiendo que el azufre presente en el mineral continúe solubilizándose (Kaksonen et al., 2014; Kim et al., 2008; Gómez y Cantero, 2005; Jensen y Webb, 1995), además de que re-incorpora azufre a la superficie del carbón. La formación de jarosita, puede crear enlaces con nutrientes del medio, reduciendo la concentración disponible para los microorganismos (Kiani et al., 2014). Además, en los biorreactores que se usen, bloquea bombas, tuberías, válvulas, entre otros, lo que a nivel económico en las industrias produce grandes pérdidas en la producción, debido a al tiempo que se requiere para el mantenimiento de los dispositivos (Gómez y Cantero, 2005).

La formación de estos precipitados depende principalmente del pH, la composición iónica y la concentración de los diferentes compuestos en el medio de cultivo (Gómez y Cantero, 2005). Asimismo, se considera que altas concentraciones, en exceso, de cationes y compuestos catiónicos monovalentes, iones férricos y sulfato, promueve la formación de jarosita, que –como se mencionó previamente– interfiere con la cinética del proceso (Gramp et al., 2008; Cunha et al., 2008).

Este proyecto, se llevó a cabo con el fin de definir la influencia de las concentraciones de las sales de sulfato y la posibilidad de usar otro tipo de sales, sobre la biodesulfurización carbón y de manera general en estos procesos, con base en la proliferación comparativa de la biomasa y la disminución de la precipitación de sulfatos de hierro férrico. Fueron evaluados cinco medios de cultivo y dos tipos de inóculo (cepa pura y consorcio), a nivel de erlenmeyer (volumen efectivo de 200 mL) y reactor de tanque agitado (volumen efectivo de 5000 mL). Se seleccionaron tres medios a base de sulfatos, con concentraciones de nutrientes más bajas que las que se presentan en el medio T&K (Tuovinen y Kelly, 1972) (comúnmente usado en procesos de oxidación e incluido en el proyecto con fines comparativos), los cuales se denominaron McCready (McCready et al., 1986) y Kos (Kos et al., 1983) y otros dos medios a base de sales de cloruro, Cloruros (Caicedo y Márquez, 2013) y Hoffmann (Hoffmann et al., 1981), buscando de esta manera reducir las precipitaciones sobre la superficie del mineral, ya que una alta presencia de sulfatos en las disoluciones contribuyen a la formación de jarosita.

1. Marco Teórico

1.1 Carbón

El carbón es una roca natural compuesta principalmente por materia orgánica y pequeñas trazas de materia inorgánica. La materia orgánica está compuesta por cadenas poliméricas largas, derivadas de materia vegetal transformada por reacciones químicas y biológicas (Qiu et al., 2011).

El carbón se genera como producto de los restos alterados de vegetación prehistórica, acumulados originalmente en pantanos y ciénagas, los cuales al ser sometidos a condiciones de altas temperaturas y presiones, se convierten en éste, atravesando por una serie de transformaciones hasta alcanzar una 'madurez orgánica'. A este importante proceso de 'maduración' se le denomina carbonificación, el cual determina el rango del carbón, y de esta forma sus características, propiedades físicas, químicas y morfológicas (UPME, 2012; World Coal Association, 2005).

1.1.1 Tipos de azufre presentes en el carbón

El carbón está conformado por azufre inorgánico y orgánico. El azufre inorgánico se compone de sulfuros y sulfatos, donde la pirita (FeS_2) es el compuesto predominante. Sin embargo, pueden encontrarse otros sulfuros como galena (PbS) y esfalerita (ZnS) en menor proporción. Entre los sulfatos se encuentra la barita (BaSO_4), el yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y otros sulfatos de hierro (Prayuenyong, 2002).

El azufre inorgánico se encuentra disperso en la masa de carbón pero no unido químicamente a él, lo cual facilita su extracción (Rossi, 2013; Prayuenyong, 2002). Mientras que el azufre de tipo orgánico al estar unido químicamente al carbón mediante uniones covalentes, hace parte integral de la matriz de este mineral, dificultando su extracción (Ohmura y Saiki, 1997; Rossi, 1990). El azufre orgánico se une a la matriz del carbón formando tioles, sulfuros, disulfuros, sistemas de anillos tiofénicos y anillos aromáticos con enlaces C-S como el dibenzotiofeno o DBT (Rossi, 2013).

1.1.2 Normatividad y problemática ambiental en Colombia

Colombia se sitúa como el décimo productor mundial de carbón (UPME, 2012) y el primer productor de América Latina. Sus reservas totales están alrededor de 17.000 millones de toneladas y a través de los años, se ha pasado de producir 3.5 millones de toneladas de mineral a 85 millones de toneladas

anuales (Redacción Portafolio, 2012). El 95% de las reservas de este mineral se ubican en los departamentos de La Guajira, Cesar, Córdoba, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Antioquia, Valle del Cauca y Cauca (UPME, 2012).

El carbón –en Colombia y a nivel mundial–, ha sido por muchos años una de las principales fuentes de generación de energía, por su abundancia y precio competitivo, que hace que incluso esté ganando protagonismo por encima del petróleo y sus derivados (Redacción Portafolio, 2011). Los combustibles fósiles se han convertido en las principales fuentes de generación de energía en el país, cerca del 41% de la energía del sector industrial proviene del carbón (CONPES, 2005) y entre 2000 y 2010 se estimó que el carbón suministró alrededor de la mitad de la demanda mundial de energía. Además, se cree que el uso del carbón aumentará en un 50% a nivel mundial hasta el año 2030, tanto en países industrializados, como en vía de desarrollo, debido a las crisis y fluctuaciones en los precios del crudo y gas natural, y como complemento a las fuentes de energía renovables, que todavía presentan riesgos de suministro intermitente (World Coal Association, 2005).

A pesar del acelerado crecimiento económico que ha tenido en los últimos años nuestro país, debido en gran medida al sector minero-energético (Clavijo et al., 2014), la explotación minera debe realizar ajustes estructurales y tomar medidas ante la problemática ambiental, ya que cerca del 65% de las emisiones de contaminantes en fuentes fijas, se debe al uso del carbón (CONPES, 2005). Se requiere por tanto el desarrollo de procesos mineros más sostenibles, ya que de seguir por el mismo camino, en unos años las explotaciones podrían verse estancadas y girarse la mirada hacia otro tipo de formas de generación de energía (Clavijo et al., 2014).

La problemática que se desarrolla alrededor del uso del carbón, tiene que ver con la presencia de azufre en su estructura y asociado a él; ya que los compuestos sulfurosos (óxidos de azufre, SO_x) que se generan durante la combustión de este mineral en la producción de energía, favorecen la formación de la llamada lluvia ácida, que no solo contribuye al cambio climático, sino que también causa daños irreparables en la salud de las comunidades y el deterioro en los monumentos históricos (Gray, 2003; Ohmura y Saiki, 1997).

Es por esto que, actualmente se cuenta con lineamientos y normatividad formulada por el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, con el fin de prevenir, controlar y reducir la contaminación del aire, y dirigidas principalmente hacia la red de termoeléctricas, industrias cementeras y metalúrgicas del país. En el ámbito jurídico, Colombia –para este fin–, cuenta con el decreto 2 de 1982, que establece todas las normas relacionadas con emisiones atmosféricas; los artículos 6, 10 y 12 del decreto 948 de 1995, para la prevención y control de la contaminación

atmosférica y la protección de la calidad del aire; la resolución 1208 de 2003 que instituye las normas sobre prevención y control de la contaminación atmosférica por fuentes fijas y protección de la calidad del aire; y la resolución 0601 de 2006, en el capítulo 2, que establece los niveles máximos permisibles de contaminantes (nivel máximo permisible anual del SO₂ de 80 µg/m³).

1.2 BIODESULFURIZACIÓN DE CARBÓN

La biodesulfurización se define como la conversión biológica u oxidación aerobia de los compuestos de azufre.

En la mayoría de estudios, la biodesulfurización de carbón se enfoca en la remoción de pirita, al ser el compuesto que se encuentra en mayor proporción (Kiani et al., 2014; Caicedo y Márquez, 2013; Cardona y Márquez, 2009; Malik et al., 2004; Loi et al., 1994). En este proceso, el sulfuro se transforma en un compuesto soluble en medios ácidos (sulfatos), por acción de los iones férricos actúan como agentes oxidantes y el oxígeno molecular es el aceptor final de electrones (Schippers, 2007).

En la oxidación del sulfuro metálico a sulfato y compuestos intermediarios de azufre, los iones férricos son reducidos a iones ferrosos y la función de los microorganismos se centra en la regeneración de los iones Fe³⁺ (Schippers, 2007). La reacción biocatalizada de hierro ferroso a hierro férrico es de gran interés en la industria hidrometalúrgica porque ocurre a varios órdenes de magnitud más rápido, usando bacterias oxidantes que en condiciones abióticas (Rawlings, 2002; Schippers y Sand, 1999).

El azufre pirítico puede ser removido y/o minimizado también por métodos convencionales de procesamiento de minerales. Los métodos físicos como la separación por gravedad o flotación, son los más empleados y adecuados sobre todo para los granos ricos en minerales, sin embargo, su uso requiere de grandes cantidades de agua que producen relaves tóxicos e incrementan el contenido de humedad del mineral, además de que son procesos que requieren de un tamaño óptimo de partícula (1mm - 74µm), por lo que se necesitan de operaciones de molienda que pueden generar dificultades técnicas, económicas y pérdidas de mineral (Meshram et al., 2015; Rossi, 2013). También se encuentran los métodos de carácter químico como la pirometalurgia, que se puede emplear para minerales o compuestos orgánicos, dispersos o unidos al carbón, sin embargo, son procesos costosos ya que requieren reactivos químicos y condiciones especiales de presión y temperatura, además de que llegan a afectar las propiedades energéticas del carbón (Meshram et al., 2015; Rossi, 2013; Prayuenyong, 2002; Andrews y Maczuga, 1984).

Por otro lado, la remoción de azufre orgánico es más compleja, ya que inicialmente deben romperse los enlaces C-S presentes en la matriz del carbón. Los métodos físicos no se consideran aptos y los químicos como se mencionó anteriormente presentan grandes desventajas. Los métodos biológicos parecen ser los más adecuados, a pesar de que son reacciones bastante lentas (Prayuenyong, 2002). Se ha identificado a través de las investigaciones la capacidad de microorganismos como *Rhodococcus rhodochromus* (Toro, 2014; Prayuenyong, 2002), *Pseudomonas sp* (Julia de Fatima et al., 1996) y *Cunninghamella echinukata* (Cutright, 1995) para remover azufre de tipo orgánico.

1.2.1 Bacterias involucradas en procesos de biolixiviación de azufre inorgánico

Las bacterias involucradas en mecanismos de biolixiviación presentan características especiales que las hacen útiles en este tipo de procesos: son quimiolitioautótrofas, ya que obtienen el carbono a partir de la fijación de CO₂ y toman su energía para llevar a cabo su metabolismo a partir de compuestos inorgánicos y de la oxidación de iones ferrosos y compuestos de azufre. Además, son acidófilas, ya que su óptimo crecimiento ocurre a un pH inferior a 2.5. Son gram-negativas, mesófilas, ya que su temperatura óptima es de 30°C y son aerobias, puesto que el oxígeno actúa como aceptor final de electrones (Schippers, 2007; Rossi, 1990; Harrison, 1984).

Las bacterias del género *Acidithiobacillus* fueron encontradas a través de observaciones sobre las transformaciones naturales que sufrían diversos compuestos de hierro y azufre, procedentes de la disolución de ciertos minerales. Estas son las principales responsables de la rápida oxidación de hierro ferroso y, en consecuencia, son generadoras de acidez en ciertos drenajes o aguas (Rossi, 1990).

Las bacterias más usadas en este tipo de procesos son:

***Acidithiobacillus ferrooxidans*:** La bacteria *A. ferrooxidans* es ampliamente usada en procesos biohidrometalúrgicos, debido a su amplia capacidad para crecer y resistir en soluciones lixiviantes con altos contenidos de iones metálicos (Rossi, 1990). Obtiene su energía del hierro ferroso, del azufre y de compuestos reducidos de azufre (Razell, 1963). Oxida múltiples sulfuros metálicos, como la arsenopirita, calcopirita, covelita, pirita, galena, esfalerita, entre otros (Schippers, 2007).

Se ha encontrado que esta bacteria también crece en un ambiente anaerobio, usando compuestos de azufre o hidrógeno como donadores de electrones y a los iones Fe³⁺ como aceptores finales de electrones (Schippers, 2007).

***Acidithiobacillus thiooxidans*:** Presenta características similares a *A. ferrooxidans*, pero a diferencia de esta, no es un microorganismo capaz de oxidar pirita, solo crece de manera autotrófica usando

compuestos de azufre, como el azufre elemental, thiosulfato, tetrionato (Schippers, 2007). De todas las especies del género *Acidithiobacillus*, *A. thiooxidans* crece en ambientes mucho más ácidos, con un pH mínimo de 0.5. Ante su capacidad para producir ácido y resistencia, esta bacteria juega un papel muy importante en los procesos biohidrometalúrgicos, ya que ayuda a mantener las suspensiones a pHs muy bajos donde se limitan las precipitaciones de yeso y jarosita (Ballester, 2005). Esta bacteria favorece la actividad de *A. ferrooxidans* al oxidar el azufre elemental que se forma en reacciones intermedias (Meshram et al., 2015).

***Leptospirillum ferrooxidans*:** A pesar de que esta bacteria cuenta con características similares a *A. ferrooxidans*, ya que deriva su energía de la oxidación de iones ferrosos, es capaz de hacerlo a potenciales redox más altos, sin embargo, presenta una menor velocidad de oxidación y no es capaz de usar compuestos de azufre como fuente de energía. Se ha reportado además que *Leptospirillum* tiene la capacidad de oxidar pirita, esfalerita y calcopirita, fijar nitrógeno atmosférico y de tolerar concentraciones muy elevadas de iones metálicos (Schippers, 2007; Rohwerder y Sand, 2007). Este microorganismo ha sido ampliamente usado en investigaciones recientes y se ha observado que su vinculación haciendo parte de consorcios bacterianos o como cepa pura contribuye significativamente a mejorar el proceso oxidativo (Kiani et al., 2014; Dave 2008).

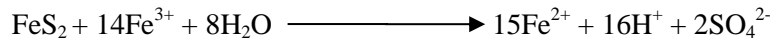
1.2.2 Mecanismos de biolixiviación

Se ha planteado que el proceso de lixiviación biológica ocurre probablemente por dos mecanismos, el mecanismo directo y el indirecto. Siendo el indirecto, el que mayor aceptación y respaldo ha presentado a lo largo de las últimas investigaciones (Tang et al., 2009; Rohwerder y Sand, 2007; Ballester, 2005; Meruane, 2002; Schippers y Sand, 1999).

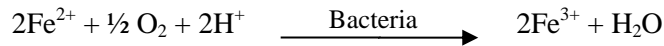
Mecanismo Directo: Este mecanismo se basa en la adherencia de los microorganismos sobre la superficie del mineral, generando la transformación enzimática de este, por el transporte de electrones que ocurre desde la parte reducida del mineral hasta el aceptor final de electrones, que por lo general es el oxígeno disuelto (Ballester, 2005). Este mecanismo particularmente para la pirita, se puede representar mediante la siguiente reacción:



Mecanismo Indirecto: Es un proceso sinérgico entre la oxidación química de metales sulfurosos por los iones Fe^{3+} y la re-oxidación biológica o enzimática de estos iones (Rohwerder y Sand, 2007). El proceso de disolución de la pirita por el mecanismo indirecto, se puede representar por las siguientes reacciones (Gómez y Cantero, 2005):



Y al mismo tiempo, los microorganismos catalizan enzimáticamente la oxidación del ion ferroso, así:



Este mecanismo presenta a su vez dos subdivisiones:

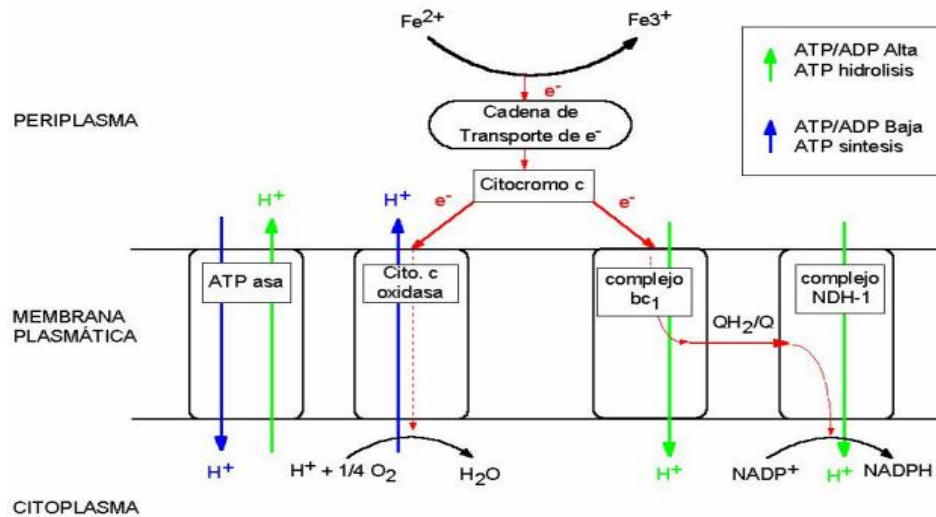
- **Mecanismo indirecto de contacto:** La disolución del sulfuro ocurre en la interfase entre la pared celular bacteriana que está conformada por sustancias poliméricas (EPS) y la superficie del mineral, debido a reacciones electroquímicas entre los iones férricos y el sulfuro metálico (Rohwerder y Sand, 2007). Las EPS, median el contacto entre la superficie del mineral, es el espacio de reacción donde se llevan a cabo los procesos de disolución, es una capa que bordea la célula, y está compuesta de azúcares, ácidos grasos saturados, polisacáridos, proteínas, ácido glucurónico y iones férricos (Rohwerer y Sand, 2007; Pogliani y Donati, 1999; Sand et al., 1999). Además, proveen protección contra ambientes de estrés y deshidratación (Vu et al., 2009). Adicionalmente, estas estructuras juegan un papel fundamental en la formación de biofilms (Rohwerder y Sand, 2007; Gehrke et al., 1998).
- **Mecanismo indirecto de no contacto:** Las células oxidan los iones ferrosos en la disolución y regeneran los iones férricos, agentes químicos involucrados en la disolución de los sulfuros (Rohwerder y Sand, 2007).

En cuanto a las rutas metabólicas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, aparentemente corresponden a las rutas estándar en microorganismos quimiolitótrofos. El proceso oxidativo tiene un rol fundamental en el metabolismo bacteriano, ya que la fijación de carbono necesaria para la síntesis de material celular y crecimiento, que se realiza a través del ciclo de Calvin, requiere de la presencia de ATP y NADPH en el citoplasma celular, y estas moléculas energéticas son obtenidas por la bacteria a través del proceso de oxidación de ion ferroso con el oxígeno, como aceptor de electrones (Meruane, 2002). Y además, la disolución del sulfuro se lleva a cabo por la acción química de los iones férricos, que son generados durante la oxidación de iones ferrosos.

Los iones ferrosos son oxidados a iones férricos y los electrones son transferidos a través de la cadena de transporte de electrones en el citoplasma de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, como se ilustra en la Figura 1-1, donde están involucrados citocromos (Cyc 1, Cyc 2), una proteína de cobre azul (rusticianina) y una citocromo oxidasa tipo aa3 (Rohwerder y Sand, 2007; Rivadeneira, 2001). La transformación energética asociada al proceso oxidativo de ion ferroso se resume en dos procesos relacionados: El transporte directo de electrones desde el ion ferroso al oxígeno, que mediante un

mecanismo de quimiosmosis produce ATP; y un mecanismo reverso de transporte de electrones que utilizando una parte de la energía disponible en el transporte directo, transfiere electrones necesarios desde el ion ferroso para generación de NADPH (Meruane, 2002).

Figura 1-1: Cadena de transporte de electrones (Tomada de: Meruane, 2002).



1.2.3 Aspectos claves en el desempeño de bacterias acidófilas

Los aspectos claves a tener en cuenta para lograr un adecuado desempeño de los microorganismos en procesos de biodesulfurización son:

- **Medios de cultivo:** Para la obtención de energía y la elaboración de material celular, los microorganismos requieren de una mezcla compensada de nutrientes que les permita llevar a cabo sus procesos de biosíntesis, producción de energía, mantenimiento y crecimiento celular (Prescott et al., 2004). Si un nutriente esencial llega a faltar o se ve limitado, el crecimiento microbiano disminuye y se vuelve independiente de la concentración de las demás materias primas (Rossi, 1990).

Para este tipo de microorganismos, los medios de cultivo son por tanto las mezclas, líquidas de sales inorgánicas, que brindan todos los requerimientos necesarios para el crecimiento, energía para la biosíntesis y el mantenimiento celular. Este es un aspecto clave en el éxito de un proceso y está estrechamente relacionado con el metabolismo, composición celular y el ambiente o hábitat natural en que se desarrolla el microorganismo (Prescott et al., 2004).

El 95% en peso seco de la composición celular está constituido por elementos, que los microorganismos captan en grandes cantidades (macroelementos), como el carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre y el fósforo, los cuales forman parte de hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Y elementos como el potasio, calcio, magnesio y el hierro, se encuentran en las células como cationes y desempeñando importantes funciones como cofactores enzimáticos (K^+), forman complejos con el ATP, contribuyen en la estabilización de ribosomas y membranas celulares (Mg^{2+}) y forman parte fundamental de complejos de la cadena respiratoria, como los citocromos (Fe^{2+} y Fe^{3+}) (Prescott et al., 2004).

El carbono es un elemento necesario para construir el esqueleto de todas las moléculas orgánicas. Una fuente de carbono sumamente importante que no aporta energía es el dióxido de carbono (CO_2) y los organismos que lo fijan y utilizan como fuente única o principal de carbono, reduciéndolo y transformándolo en moléculas orgánicas, se conocen como organismos autótrofos (Prescott et al., 2004; Elzaky y Attia, 1995); y para obtener su energía y electrones, los microorganismos acidófilos oxidan compuestos inorgánicos reducidos, como moléculas de hierro o azufre (Prescott et al., 2004).

La naturaleza aerobia de estas bacterias implica la necesidad de aportar oxígeno, ya que este es un componente esencial en las estructuras celulares, dado que al ser el aceptor de electrones en los procesos de respiración aerobia, participa en los procesos de generación de energía y oxidación de los iones ferrosos (Prescott et al., 2004). Se ha encontrado que *A. ferrooxidans* no requiere de altas concentraciones de oxígeno disuelto ($< 2\text{mg } O_2/L$) (Gómez y Cantero, 2005).

El hidrógeno es un compuesto fundamental en el intercambio de energía, la formación de agua y material celular orgánico. Los microorganismos acidófilos obtienen los átomos de hidrógeno o electrones de sustancias inorgánicas reducidas (Prescott et al., 2004).

El nitrógeno es un elemento fundamental en la síntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas, hidratos de carbono, lípidos, cofactores de enzimas y otros componentes celulares (Prescott et al., 2004). A pesar de su importancia se ha considerado que omitir sales de nitrógeno no afecta la oxidación de hierro, puesto que los medios ácidos favorecen la absorción de amonio de la atmósfera (Tuovinen et al., 1971).

El fósforo también es un elemento necesario para el crecimiento bacteriano, ya que está presente en los ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos como el ATP, algunas coenzimas como el NADP, proteínas y otros componentes celulares. La principal fuente de fósforo proviene del

fosfato inorgánico y los microorganismos son capaces de incorporarlo directamente. La falta de este elemento limita el crecimiento, es necesario para el metabolismo energético. El fosfato inorgánico se incorpora mediante la formación de ATP por: fotofosforilación, fosforilación oxidativa o fosforilación a nivel de sustrato. Las bacterias Gram negativas tienen fosfatasas en el espacio periplasmático situado entre la pared celular y la membrana plasmática que le permiten la obtención de fosfato inorgánico. Este elemento se requiere, en los inicios del proceso oxidativo de hierro fuera de la pared celular. Se ha observado que después de 13 sub-cultivos sin presencia de este elemento, se reduce la oxidación de hierro en un 20% (Prescott et al., 2004; Tuovinen et al., 1971).

La principal fuente de azufre en las bacterias oxidantes proviene de los sulfatos, los cuales son necesarios en la síntesis de aminoácidos como la cisteína y metionina, algunos hidratos de carbono, y coenzimas como biotina y tiamina, además de ser necesaria en las etapas iniciales del proceso oxidativo (Prescott et al., 2004; Tuovinen et al., 1971).

Estos microorganismos requieren de otros componentes como el potasio, magnesio, calcio, los cuales son importantes cationes inorgánicos, cofactores de algunas enzimas y reguladores metabólicos y el hierro como regulador redox, fundamental en la formación de citocromos y proteínas de hierro (Rossi, 1990).

Se ha encontrado que la deficiencia de magnesio afecta la fijación de CO₂ y por tanto la oxidación de hierro (Gale y Beck, 1966). La concentración mínima de magnesio en los medios de cultivo es 2.0 mg/L, para que no se vea afectado el proceso oxidativo (Tuovinen et al., 1971).

La presencia o ausencia de potasio y calcio no representa una influencia negativa sobre procesos de biolixiviación. Estos cationes generalmente son suplementados en residuos de los reactivos, agua, suelo o minerales (Tuovinen et al., 1971).

La completa exclusión de cloro puede generar una ligera reducción en la oxidación de hierro (Lazaroff, 1963), sin embargo, altas concentraciones de este elemento pueden convertirse en inhibitorias (Torma et al., 1970). No obstante, se considera que las bacterias son capaces de soportar altas concentraciones de cloro luego de una adaptación previa (Mayling, 1966).

Han sido múltiples las investigaciones sobre procesos de biolixiviación, sin embargo, poco el estudio que tenga relación con medios de cultivo. Las composiciones propuestas para los microorganismos acidófilos como *A. ferrooxidans* han permanecido prácticamente invariables a lo largo de los años, a excepción de algunos pocos cambios en las concentraciones de los nutrientes.

Uno de los medios más empleados ha sido el 9K propuesto por Silverman y Lundgren's (1959), sin embargo, por presentar altas concentraciones de fosfato, magnesio y amonio facilitaba la formación de precipitados como la jarosita y sulfatos sobre la superficie de los minerales. Por lo cual, Tuovinen y Kelly (1972) propusieron el medio de cultivo T&K, que cuenta con concentraciones de sales más bajas y frecuentemente se usa a pHs muy ácidos que contribuyen a prevenir las precipitaciones de hierro. Posteriormente, Hoffmann y colaboradores (1981) propusieron el medio de cultivo LOPOSO (que para la presente investigación llamamos Hoffmann) y se fundamenta en sus bajas concentraciones de fosfato y sulfato, bajo la premisa de que la bacteria puede obtener muchos de sus nutrientes a partir de los compuestos y/o minerales que son lixiviados o liberados de los minerales durante estos procesos. Posteriormente, Kos y colaboradores (1983) y McCready y colaboradores (1986) propusieron medios de cultivo con consideraciones similares a las anteriores y específicamente para trabajos con carbón. Finalmente, durante los trabajos de biodesulfurización de carbones realizados en la Universidad Nacional de Colombia, se presentaba constantemente el inconveniente de formación de precipitados, por lo que los investigadores Caicedo y Márquez (2013) propusieron el medio de cultivo Cloruros, que reemplazó los sulfatos por sus sales homologas usando cloruros.

- **Factores de estrés:** Durante los procesos de biolixiviación, *A. ferrooxidans* está sujeta a ambientes de estrés que generan cambios en su temperatura óptima de crecimiento y pH, la disponibilidad de nutrientes, presencia de metales pesados, entre otros.

Por su metabolismo aeróbico, estas bacterias generan especies reactivas de oxígeno, que bajo condiciones normales son metabolizadas por la célula, estas son, el radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot). Sin embargo, si se producen condiciones de estrés, estas especies reactivas, dependiendo de la intensidad del estrés, pueden generar muerte celular y afectar directamente el DNA, RNA, las proteínas y los lípidos, biomoléculas fundamentales de la célula (Rodrigues et al., 2010).

Las altas velocidades de agitación y las altas concentraciones de pulpa también son factores que generan un fuerte efecto negativo sobre la actividad bacteriana, que aunque puede ser mitigado si se trabaja con una alta concentración inicial de células activas (Deveci, 2001), no deja esto de producir elevados niveles de estrés hidrodinámico en los microorganismos. Según distintos estudios las interacciones partícula-partícula son las principales responsables del daño celular, el cual ocurre cuando la célula está en la vecindad o en el punto en que colisionan las partículas, generándose así, rompimiento de la matriz celular o muerte celular, dependiendo de la severidad y

fuerza de la colisión. Un incremento en la concentración de sólidos y la agitación aumenta la probabilidad de la frecuencia con que colisionen las partículas (Cherry y Papoutsakis, 1986).

La velocidad de agitación y un diseño de impulsor no adecuado son factores que intervienen directamente sobre la actividad de la bacteria (Thomas, 1990), se ha encontrado que dicha actividad disminuye cuando la velocidad de mezclado usando una turbina Rushton supera los 2.5 m/s y que además interfiere en que se dé un contacto adecuado entre el sustrato sólido y los microorganismos. Adicionalmente, se ha observado que el efecto negativo se acentúa a un mayor tiempo de circulación y es mayor en la vecindad del impulsor (Oolman, 1993).

En un estudio llevado a cabo con el fin de comparar el efecto de las partículas suspendidas sobre la oxidación bacteriana de hierro ferroso, se evaluó el efecto de la presencia de carbón activado, pirita y carbón; mostrando que la oxidación de hierro ferroso y el crecimiento bacteriano disminuyen a medida que incrementa la cantidad de pulpa en la solución, probablemente por la interferencia que causan en la velocidad de transferencia de O_2 y CO_2 , de la fase gaseosa a la fase líquida o la destrucción de las células microbianas por desgaste (Malik et al., 2004).

Las bacterias involucradas en procesos de biolixiviación a pesar de que son altamente resistentes a concentraciones de ciertos metales, ven retrasado su crecimiento y la oxidación de sulfato ferroso a altas concentraciones de iones metálicos. Los aniones metálicos, generan inhibición en los procesos de oxidación de ion ferroso por *A. ferrooxidans* considerándose que es la electronegatividad de los compuestos uno de los factores que influyen a esta inhibición. Las células bacterianas responden a un estrés generado por la presencia de especies metálicas, si han tenido la adaptación necesaria durante la fase inicial de crecimiento y como respuesta se cuenta con sistemas de protección enzimáticos asociados a las membranas (Malik et al., 2004).

No obstante, a pesar de todo el estrés que se produce sobre los microorganismos en procesos de biolixiviación, estas bacterias tienen una gran capacidad de adaptación, generan respuestas a las situaciones de estrés a las que se enfrentan, a través de distintos mecanismos que le ayudan a reparar, proteger o eliminar las biomoléculas oxidadas (Rodrigues et al., 2010).

1.2.4 Biodesulfurización a gran escala

El proceso de biolixiviación conlleva una red de complejas reacciones bioquímicas, por lo que se considera que se pueden llevar a cabo de una mejor manera con el uso de biorreactores, ya que estos permiten tener un mayor control y manipulación de las variables relevantes en el proceso, permitiendo

generar así altos rendimientos, buena productividad volumétrica y una extracción significativa del mineral (Acevedo y Gentina, 2007; Acevedo, 2000).

Los biorreactores en procesos de biolixiviación permiten una mejor y mayor transferencia de oxígeno y CO₂, mantenimiento de sólidos en suspensión y permite tratar volúmenes moderados de mineral (Acevedo, 2000).

A nivel industrial se han evaluado distintas configuraciones de reactores para este tipo de procesos, con el fin de no generar estrés por cizalla, se produzca una adecuada homogenización en las suspensiones y se alcancen altas tasas de oxidación de los minerales. Se han probado, columnas de percolación, columnas *air-lift*, reactores rotatorios, cascadas de biorreactores, como lo fue el *Pachucha Tank*, que se basó en una serie de ocho biorreactores de 20 dm³ (Rossi, 2013; Acevedo, 2000).

No obstante, han sido los reactores de tanque agitado las configuraciones más empleadas, ya que presentan ventajas técnicas y económicas frente a las demás, siempre y cuando se use un impulsor adecuado que no genere estrés por cizalla y excesiva turbulencia sobre los microorganismos (Rossi, 2001).

El mezclado es una de las operaciones más importantes en este tipo de procesos. La agitación permite que en las suspensiones de biolixiviación exista una buena homogeneidad entre el sistema gas-líquido-sólido, mejora la velocidad de transferencia de masa y calor (Sun et al., 2012; Rossi, 1999). Sin embargo, altas velocidades de agitación promueven la lisis celular, inhiben el crecimiento, generan desnaturalización de proteínas extracelulares, cambios en la morfología de las bacterias y reduce el contacto entre la bacteria y el mineral (d'Hugues et al., 1997; Sun et al., 2012).

Otro parámetro importante, es la aireación, ya que con esta, al inyectar de forma directa oxígeno y/o aire en el caldo de lixiviación, se reduce la potencia necesaria para la agitación, las burbujas disminuyen la densidad del fluido (Doran, 1995). Esto es de suma importancia en este tipo de procesos, ya que la presencia de minerales, como el carbón, incrementa fuertemente la viscosidad de la solución. En la biolixiviación, a pesar de que la demanda de oxígeno es modesta, las finas partículas de mineral dificultan la capacidad de lograr una buena homogenización en el sistema (Acevedo, 2000).

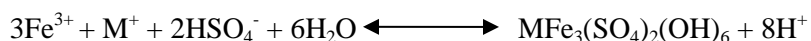
Al finalizar los procesos industriales, el reciclaje de las aguas residuales debe ser uno de los aspectos clave a tener en cuenta, ya que una correcta disposición de los subproductos asegura que el proceso efectivamente está siendo 'amigable' con el ambiente y que la calidad del agua va a permanecer dentro de los estándares y normas ambientales. Lo adecuado sería que los efluentes o lodos pudieran usarse en industrias que se encuentren en la vecindad de los sectores que empleen la biolixiviación, siendo ideal

que pudieran usarse estas aguas en procesos de riego en la agricultura, en las hidroeléctricas, e incluso reusarse en procesos mineros (Kuyucak, 2006).

Ya que los residuos o efluentes de la biolixiviación se caracterizan por ser altamente ácidos y presentar compuestos nocivos como los iones metálicos, sólidos suspendidos y sulfatos, el tipo de tratamiento que se da a estos efluentes depende del tipo de mineral y proceso metalúrgico que se haya llevado a cabo. La neutralización con cal o carbonatos y/o precipitación de metales han sido los mecanismos más usados, debido a que permiten tratar grandes volúmenes de aguas contaminadas con simplicidad y bajo costo (Kuyucak, 2006).

En la actualidad, se han realizado colaboraciones entre asociaciones de mineros y empresas de tratamiento de aguas, generando procesos viables para la recuperación de los efluentes, incluso para dirigirla al consumo humano, como la asociación entre Golder Associates Ltd. (Ottawa) con la compañía peruana, Peruvian Water Works Company. También en España, se implementó un proceso que permitía la reutilización del agua en procesos mineros, reduciendo la necesidad de agua nueva (Kuyucak, 2006).

Una de las principales dificultades que se presenta durante este tipo de procesos es la formación de hidroxisulfatos básicos de Fe (III) como la jarosita. Esta se forma y precipita sobre la superficie de los minerales disminuyendo la velocidad de biolixiviación ya que re-incorpora el azufre lixiviado sobre el mineral y a su vez impide que el azufre pueda ser removido por crear barreras físicas que afecta los mecanismos de difusión de reactivos y de transferencia de masa (Gómez y Cantero, 2005). La formación de jarosita no solo genera una serie de efectos negativos sobre el rendimiento del proceso, sino también sobre los biorreactores en los que se lleva a cabo la oxidación del sulfuro, ya que bloquea los dispositivos con los que tiene contacto (válvulas, tuberías, entre otros) (Grishin y Tuovinen, 1989). La jarosita es común en ambientes ácidos, ricos en sulfatos, y depende fundamentalmente del pH, composición iónica y la concentración del medio de cultivo. Su formación se presenta en la siguiente reacción, observándose además que se genera ácido. Donde M puede ser K⁺ (jarosita), Na⁺ (sodio-jarosita), NH₄⁺ (amonio-jarosita) (Daoud y Karamanev, 2006; Gómez y Cantero, 2005; Baron y Palmer, 1996).



Varias investigaciones se han desarrollado alrededor del uso de reactores en biominería y biolixiviación (Arroyave et al., 2013; Sun et al., 2012; Roger, 2007; Gleisner et al., 2006; Pandey et al., 2005; Cara et al., 2005 y 2006; Acevedo, 2000; Loi et al., 1994). Pandey y colaboradores (2005)

llevaron a cabo un proceso de desulfurización de carbón en un reactor de suspensión operado en continuo con un tiempo de retención hidráulico de 96 horas y obtuvieron un porcentaje de remoción de azufre del carbón entre el 78-81%, usando un tamaño de partícula de 45-65 μm y cultivo mixto de *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*. Loi y colaboradores (1994), desarrollaron un proceso de cinco reactores de tanque agitado en cascada, logrando una remoción del 90% del azufre pirítico, con una concentración de sólidos suspendidos del 40%, usando un consorcio de *A. ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*. Cara y colaboradores (2006 y 2005) llevaron a cabo procesos de desulfurización de carbón en columnas de lecho empacado y en pilas, alcanzando remociones de azufre pirítico del 43% en 125 días y del 40% en 160 días, respectivamente.

En el Grupo de Biomineralogía aplicada y Bioprocesos de la Universidad Nacional de Colombia, se han venido generando esfuerzos investigativos que contribuyan a mejorar el proceso de biodesulfurización de carbón en Colombia y que lo ayuden a posicionarse como un pre-tratamiento viable en la industria nacional. El primer trabajo sobre el tema se llevó a cabo empleando carbones colombianos con contenidos de azufre entre 2.6% y 5.7%, usando un tamaño de partícula $<74\mu\text{m}$, una densidad de pulpa del 10%, bajo la acción de un consorcio de microorganismos. Para este proceso se usó un medio de cultivo conocido como 9K (el cual es uno de los medios más usados en procesos de biolixiviación, pero presenta una concentración alta de sales, 3.0 g/L de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 0.5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L de K_2HPO_4 , 0.1 g/L de KCl , 0.01 de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) y se observó una reducción entre el 85-95% de azufre pirítico en 30 días del proceso (Cardona y Márquez, 2009; Cardona, 2008). Seguidamente, se evaluó un consorcio de cepas de *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* en un proceso de biodesulfurización de carbón en lecho empacado durante 28 días, usando también el medio de cultivo 9K y evaluado tres tamaños de partículas entre el rango de 0.6mm – 19mm, para finalmente alcanzar un porcentaje de remoción de azufre del 27.72% (Caicedo, 2008). A partir de los dos trabajos mencionados anteriormente han surgido una serie de proyectos investigativos posteriores con los que se ha alcanzado a nivel de erlenmeyer usando el consorcio de las bacterias *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* un 71.50% de remoción de azufre (Caicedo y Márquez, 2010). Un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de planta piloto (volumen efectivo de 4000 L) usando el consorcio bacteriano mencionado anteriormente y un tamaño de partícula $<19.05\text{ mm}$, lográndose una máxima oxidación de pirita del 59.22% en un tiempo de residencia de entre 4 y 8 días (Caicedo et al., 2012). No obstante, la eficiencia de todos estos trabajos se vió afectada por la formación de sales insolubles o precipitados de jarosita sobre la superficie del carbón, por lo cual, se realizó un trabajo preliminar en el que se redujeron las concentraciones de sales de sulfato utilizadas como nutrientes y se cambiaron por sales homólogas de cloruros. Se propuso así, un medio de cultivo denominado

Cloruros (0.4 g/L de NH_4Cl , 0.4 g/L de MgCl_2 y 0.4 g/L de KH_2PO_4) con el cual después de 12 días de proceso a nivel de erlenmeyer (volumen efectivo de 200ml) se llegó a una remoción del 70% de azufre, encontrándose que con estas sales se mantenía unas condiciones ambientales adecuadas para el crecimiento y actividad celular y que además se alcanzaba mejores niveles de remoción que los logrados con el medio de cultivo T&K (0.4 g/L de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 0.4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4g/L de K_2HPO_4) (Caicedo y Márquez, 2013). Es por todo lo anterior, que se propone evaluar una serie de medios de cultivo alternativos, con concentraciones bajas de sulfatos y otros a base de sales de cloro, con miras a encontrar una opción donde se logren mayores velocidades de crecimiento celular y un menor grado de precipitación de sulfatos de hierro sobre el carbón, contribuyendo de esta manera a enriquecer el conocimiento que se tiene sobre el proceso y a mejorar su efectividad y rendimiento.

A pesar de los múltiples trabajos que se han desarrollado alrededor del tema, todavía se requiere una cantidad monumental de trabajo interdisciplinario que enriquezca el conocimiento sobre los mecanismos de acción de los microorganismos, los procesos por los que se lleva a cabo la disolución de los minerales, la identificación de todos los parámetros que contribuyen a mejorar el proceso y aquellos que generan estrés celular, que afectan el crecimiento de la cepa y la funcionalidad de cada una de sus estructuras, con el fin de establecer estrategias de operación con las se puedan garantizar mayores velocidades de oxidación de las que se han obtenido hasta ahora y no se vea afectada la viabilidad celular.

Mejorar la aplicación de esta técnica podrá optimizar el alcance y la robustez de la transformación química catalizada biológicamente y así obtener combustibles, que al presentar un menor contenido de azufre, puedan elevar su precio al verse mejorada su calidad, se reduzcan las penalidades ambientales y su uso no siga generando deterioro en edificaciones, monumentos históricos, la vida en las ciudades y sobre los diversos ecosistemas existentes.

2. Materiales y Métodos

2.1 Muestra de carbón

El carbón utilizado se extrajo del manto K de la mina ‘La Guacamaya’, propiedad de la empresa ARGOS, ubicada en el municipio de Puerto Libertador, en el departamento de Córdoba (Colombia). Esta mina forma parte de una mayor área carbonífera llamada Alto San Jorge, de 778 km², la cual se encuentra localizada al sur del Departamento de Córdoba, limitando con el Departamento de Antioquia, el municipio de Montelíbano y con influencia de las riberas de los ríos San Jorge y San Pedro. Este carbón fue escogido para continuar con el proyecto preliminar realizado por Argos-Conciencias-Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín: ‘Implementación de un proceso de Biodesulfurización de carbones-estudio de laboratorio-planta piloto en la Industria Cementera Argos, Medellín-Colombia, contrato ACAC 024-2007’. En la Figura 2-1 se presenta la mina de la que fue extraído el mineral.

Se realizaron cuarteos sucesivos a la muestra de carbón tomada, la cual, posteriormente se procesó en un molino de bolas hasta llevarla a un tamaño o diámetro de partícula pasante malla 60 (<0.25 mm), de acuerdo a la serie de *Tyler* de tamices.

Figura 2-1: Mina “La Guacamaya”, Municipio de Puerto Libertador, Córdoba.



2.2 Análisis físico-químicos y mineralógicos iniciales y finales del carbón

Se hicieron análisis de las diferentes formas de azufre presentes en el carbón, determinando los contenidos en azufre orgánico, inorgánico y en la forma de sulfatos, usando la norma ASTM D 2492 (ASTM, 2007a). Adicionalmente, se hicieron análisis próximos de las muestras, donde se definieron el contenido de humedad (ASTM D 3173), cenizas (ASTM D 3174), materia volátil (ASTM D 3175), carbono fijo (ASTM D 3172), azufre total (ASTM D 4239) y poder calorífico (ASTM D 5865) (ASTM, 2007b; ASTM, 2008; ASTM, 2011a; ASTM, 2011b; ASTM, 2011c; ASTM, 2011d).

Mediante el análisis próximo, a partir del carbono fijo, material volátil y capacidad calorífica libres de agua y cenizas, que se obtienen de las Ecuaciones (1), (2) y (3), fue posible determinar el rango del carbón al que pertenecía la muestra de la mina ‘La Guacamaya’ a través de la norma ASTM D388 (Anexo 1).

$$\%MV(lac) = \frac{\%MV}{100 - (H + C_z)} \times 100 \quad (1)$$

$$\%CF(lac) = \frac{\%CF}{100 - (H + C_z)} \times 100 \quad (2)$$

$$\%PC(lac) = \frac{\%PC}{100 - (H + C_z)} \times 100 \quad (3)$$

Donde, %MV (lac) corresponde al porcentaje de materia volátil libre de cenizas, %PC (lac) es la capacidad calorífica libre de cenizas, %CF (lac) es el porcentaje de carbono fijo libre de cenizas, H es la humedad y C_z son las cenizas presentes en la muestra de carbón.

Se realizaron análisis mineralógicos iniciales, con el fin de determinar la composición y posibles minerales que podía traer este carbón, por medio de tres técnicas: Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR, por su siglas en inglés) y Microscopía electrónica de barrido (SEM, Scanning electron microscopy); utilizando un detector EDS (Energy Dispersive X ray Spectrometer), que adicionalmente permitió hacer análisis micro-químicos.

Para la realización de análisis de DRX y FTIR se tomó una muestra de la cantidad de mineral seleccionado y se llevó a cabo su molienda en un mortero de ágata, para llevarlo a un diámetro de partícula pasante malla 200 (según la serie de Tyler de tamices).

El análisis mediante DRX, se realizó en un difractómetro marca Rigaku Miniflex II, usando una radiación de Cu K α y monocromador de grafito, 30 kV voltaje y una corriente de 15 mA. El barrido se llevó a cabo por el método paso a paso, donde se usó un rango de barrido de 10° a 60° de 2 θ , un tamaño de paso de 0,04° y un tiempo de conteo de 6 s. Los difractogramas fueron analizados a través del software High X'Pert Score Plus® de PANalytical.

Para los análisis por FTIR, se usó un equipo marca Shimadzu FTIR 8400 S, con el método de transmisión mediante el uso de pastillas de KBr, para lo que se mezclaron 1 mg de muestra con 100 mg de KBr y en una prensa manual, marca Carver modelo 4350 L, se aplicó una presión de 10t. Los análisis se llevaron a cabo en modo transmitancia, con un número de 24 escaneos, resolución de 2.0 cm⁻¹, apodización Happ Genzel, en un rango de barrido entre 400 cm⁻¹ – 4000 cm⁻¹. Los espectros obtenidos fueron analizados mediante el software Shimadzu IR Solution 1.30. Para la muestra de carbón inicial se empleó adicionalmente el software Essential FTIR v3.10.041, que permitió encontrar la segunda derivada del espectro de la muestra e identificar picos solapados.

Para la caracterización de la muestra de carbón mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, Scanning electron microscopy), se usó un equipo marca JEOL JSM 5910 LV, utilizando un detector EDS (Energy Dispersive X ray Spectrometer) Oxford modelo 7324, que adicionalmente permitió hacer análisis microquímicos. Las condiciones usadas fueron un voltaje 20 kV, una distancia de trabajo de 10 mm, spot size de 50, señal BEC y alto vacío.

Para observar las muestras se hicieron secciones pulidas de aproximadamente 3cm de diámetro por 2cm de alto, donde se introdujo la muestra de carbón (pasante malla 60), mezclada con resina epóxica. Posteriormente, se metalizaron las superficies con oro a una corriente de 30 mA, durante un tiempo de 80 s.

2.3 Medios de cultivo

Se evaluaron cinco medios de cultivo reportados de la literatura, tres de ellos compuestos por sales basales de sulfato, el medio T&K (Tuovinen y Kelly, 1972), el cual es comúnmente usado para este tipo de microorganismos, Kos (Kos et al., 1983) y el medio McCready (McCready et al., 1986) y otros dos medios compuestos por sales basales de cloruros, Hoffmann (Hoffmann et al., 1981) y el medio Cloruros (Caicedo y Márquez, 2013). La composición de estos medios se presenta en la Tabla 2-1.

El medio T&K se evaluó con el objetivo de tener una referencia con la que se pudiera comparar los resultados hallados en el presente estudio, con investigaciones realizadas por otros autores sobre el

tema, y que permitiera además ver la diferencia entre usar medios a base de sales de sulfatos y cloro. Todos los reactivos usados en la investigación fueron grado analítico.

Tabla 2-1: Composición de los medios de cultivo evaluados

	Concentraciones (g) para 200 mL de medio.				
	Sulfatos			Cloruros	
Sales basales	T&K ^a	Kos ^b	McCready ^c	Cloruros ^d	Hoffmann ^e
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.080	0.007	0.017	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.080	-	0.025	-	-
K ₂ HPO ₄	0.080	0.002	0.003	0.080	-
KH ₂ PO ₄	-	-	-	-	0.020
KCl	-	-	-	-	0.020
NaCl	-	-	-	-	0.025
(NH ₄)Cl	-	-	-	0.080	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	-	-	-	0.002
MgCl ₂ ·6H ₂ O	-	-	-	0.080	0.170
Fuente de energía					
^f S ^o	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
FeSO ₄ ·7H ₂ O (g/1mL)	0.330	0.330	0.330	-	-
FeCl ₂ ·4H ₂ O (g/1mL)	-	-	-	0.238	0.238

^aTuovinen, 1972; ^bKos, 1983; ^cMcCready, 1986; ^dCaicedo y Márquez, 2013; ^eHoffmann, 1981, ^fSolo para consorcios.

2.4 Selección y adaptación de los microorganismos

Los microorganismos seleccionados para la investigación fueron bacterias comerciales *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y *A. thiooxidans* ATCC 15494, provenientes de la organización biotecnológica, *American Type Culture Collection* (ATCC) y suministrados por el Laboratorio de Biomineralogía y Biohidrometalurgia, de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

2.4.1 Adaptación de las bacterias al carbón

Inicialmente se realizó una activación de las bacterias en medio de cultivo T&K, a un pH inicial de 1.8, 10% v/v de inóculo y se adicionó como fuente de energía 10% v/v de sulfato ferroso para *A.*

ferrooxidans y para *A. thiooxidans* se agregó 1% w/v de azufre elemental, en un volumen efectivo de 100 mL, por un período de 8 días.

Posteriormente se prepararon dos tipos de inóculos: cepa pura de *A. ferrooxidans* y un consorcio formado por *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*. Cada cultivo se adaptó al carbón, usando el medio de cultivo T&K en una serie de 5 etapas. La Tabla 2-2, muestra las distintas fases de adaptación.

Tabla 2-2: Etapas de adaptación progresiva al mineral y disminución de fuentes de energía (Sulfato ferroso y azufre elemental)

Componentes del Medio	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4	Etapa 5
Solución de 33,33 g FeSO ₄ ·7H ₂ O/L (% v/v)	10	8	6	4	0,5
Inóculo (% v/v)	10	10	10	10	10
Azufre Elemental (% w/v) ^a	1	0,8	0,6	0,4	0,05
Carbón (% w/v)	2	4	6	8	10

^aEl azufre elemental solo se adicionó a los consorcios.

Durante la adaptación al carbón se aumentó de forma progresiva la concentración de pulpa, desde 2% w/v hasta 10% w/v. Paralelamente se disminuía la concentración de sulfato ferroso, pasando de un 10% v/v hasta 0.5% v/v, con el objetivo de que las bacterias reemplazaran el hierro del FeSO₄ por el hierro de la piritita y lo usaran como su fuente de energía. En el caso de los consorcios, además del sulfato ferroso se redujo gradualmente el azufre elemental desde 1% w/v hasta una concentración final de 0.05% w/v.

2.4.2 Adaptación de las bacterias a los medios de cultivo T&K, Kos y McCready

Se tomó un inóculo proveniente de la adaptación al mineral (en medio T&K), y se llevó a los medios de cultivo Kos y McCready. Se realizaron repiques sucesivos con el fin de que no hubiese trazas del medio T&K, garantizando la presencia del microorganismo en los medios a evaluar. No se realizó una adaptación progresiva a los medios de cultivo Kos y McCready, debido a que los componentes de estos medios son los mismos que para el medio T&K. Se consideró que los repiques eran suficientes para adaptar la cepa a las nuevas condiciones impuestas. Para el medio T&K tampoco se realizó adaptación puesto que este es el medio en que se han mantenido siempre estas cepas; solamente se hizo en este medio repiques sucesivos a fin de mantenerlas hasta que se terminara la adaptación de los demás medios.

2.4.3 Adaptación de las bacterias a los medios de cultivo Cloruros y Hoffmann

Cuando se alcanzó la última etapa de adaptación al carbón y las fuentes de energía, se procedió a realizar una segunda adaptación, a dos medios de cultivo compuestos principalmente por sales de cloro, Cloruros y Hoffmann. La Tabla 2-3 muestra los pasos de adaptación progresiva, la cual constó de cuatro etapas, donde se disminuía la concentración de medio T&K (disminuía concentración de sulfato ferroso) y se aumentaba gradualmente la concentración de medio nuevo (aumentaba concentración de cloruro ferroso). Al finalizar la última etapa de adaptación se realizaron repiques sucesivos con el fin de asegurar que no quedaran trazas del medio T&K, sino que el microorganismo estuviera solo en presencia de los medios nuevos.

Tabla 2-3: Etapas de adaptación progresiva a los medios de cultivo a evaluar. Relación Medio T&K: Medio a evaluar

Etapa A 70:30
Etapa B 50:50
Etapa C 30:70
Etapa D 0:100

Tanto los repiques sucesivos en los medios Kos y McCready, como las distintas etapas de adaptación en los medios Cloruros y Hoffmann, se hicieron por duplicado, con su respectivo control abiótico (sin presencia de microorganismos), empleando un volumen efectivo de 200 mL y 10% v/v de inóculo. Cada etapa tuvo una duración de 15 días, temperatura de 30°C, pH inicial alrededor de 1.6 ± 0.03 y una velocidad de agitación de 180 rpm. Las adaptaciones se monitorearon a través del crecimiento bacteriano por conteo de células en cámara de Neubauer, mediciones de pH y potencial de óxido-reducción, mediante un equipo marca HACH con electrolito de KCl y un electrodo de Ag/AgCl, respectivamente.

Los cinco medios de cultivo evaluados fueron modificados en la concentración de la fuente de energía. Se agregó la misma concentración de hierro inicial, independientemente de la fuente. Así, para realizar los ensayos experimentales en los medios a base de cloro, se usó como fuente de energía, 1% v/v de cloruro ferroso tetrahidratado, de una solución 23.8% w/v. Y para los medios a base de sulfatos, se usó

como fuente de energía, un 1% w/v de sulfato ferroso heptahidratado, de una solución 33.33% w/v. Para los consorcios, adicional a esta fuente se adicionó 0,05% w/v de azufre elemental.

2.5 Ensayos de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer

Los ensayos de biodesulfurización de carbón (Figura 2-2) fueron llevados a cabo en erlenmeyers de 500 mL, con un volumen efectivo de 200 mL, 10% v/v de inóculo, 10% w/v de pulpa de carbón, una temperatura óptima de crecimiento de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH inicial de 1.6 ± 0.03 , y una velocidad de agitación de 180 rpm durante 15 días de proceso.

- En el Capítulo 3 se presentan las siguientes variables evaluadas:

Microorganismos: *A. ferrooxidans* (1) y consorcio de *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* (2).

Medios de cultivo: Kos (K), McCready (M) y T&K (T) de la última etapa de adaptación.

- En el Capítulo 4 se presentan los ensayos realizados con las variables:

Microorganismos: *A. ferrooxidans* (1) y consorcio de *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* (2).

Medios de cultivo: Hoffmann (H), Cloruros (C) y T&K (T) de la última etapa de adaptación.

Figura 2-2: Ensayos de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, en presencia de la cepa pura (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) y el consorcio de bacterias acidófilas (*Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*)



El mineral y los medios de cultivo fueron esterilizados a 120° C, por 20 min, condiciones bajo las cuales se garantizó la integridad de los componentes de carbón, principalmente el contenido de azufre inorgánico, por medio de DRX y FTIR antes y después de esterilizar.

Con la intención de facilitar el análisis de los datos del experimento a escala de laboratorio, se utilizó un diseño factorial 3x2 (en los Capítulos 3 y 4) y el procesamiento de los datos se realizó a través del software estadístico R versión 3.0.3 y PAST versión 2.17c. A través del software R se llevaron a cabo los análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias con la prueba de Tukey y el nivel de significancia seleccionado fue de 0.05 para todos los análisis. Con el software PAST, se realizaron los análisis multivariados. Adicionalmente, en los casos en que se presentó interacción entre los factores se realizó un análisis en R con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Los análisis estadísticos aplican para los rangos de las variables evaluadas y son válidos sobre los ensayos que se realizaron en la presente investigación.

Cada proceso se monitoreó periódicamente mediante mediciones de pH y potencial redox (Eh), usando un equipo marca HACH, con un electrodo de pH con electrolito de KCl y un electrodo de Eh de Ag/AgCl. La concentración celular se determinó, por conteo directo en cámara de Neubauer. La disolución de pirita se monitoreó a partir de la concentración de hierro en solución (total y Fe^{2+}) y hierro precipitado, bajo la norma estándar 3500-Fe B (Eaton et al., 2005; APHA, 1992), usando un espectrofotómetro marca Thermo GENESYS UV 10. La concentración de hierro Fe^{3+} se calculó como la diferencia entre la concentración de hierro total y la concentración de hierro ferroso en solución. La concentración del Fe^{3+} se determinó a partir de la substracción los iones ferrosos (Fe^{2+}) y hierro total. Por otra parte, se calculó la concentración de pirita en el carbón, utilizando la norma ASTM D 2492.

El porcentaje de hierro en solución se calculó a partir de la Ecuación (4), donde % Hierro removido es el porcentaje de hierro solubilizado, $\Delta[Fe]$ es el delta de la concentración de hierro. $\Delta[Fe]=[Fe]_t - [Fe]_o$, donde $\Delta[Fe]_t$ es la concentración de hierro en el día t en solución, medida cada tres días y $\Delta[Fe]_o$ es la concentración de hierro en solución medida el día cero o inicial. V es el volumen efectivo que hay en el erlenmeyer en litros, M es la masa de carbón usada para cada bioensayo en erlenmeyer en mg y Fe_{max} es la concentración de hierro máxima que podría removerse (hierro pirítico más el hierro no pirítico).

$$\% \text{Hierro en solución} = \frac{\Delta[Fe] \times V}{M \times Fe_{max}} \times 100 \quad (4)$$

El porcentaje de hierro re-precipitado se calculó a partir de las Ecuaciones (5) y (6), donde %Hierro re-precipitado corresponde a la diferencia entre porcentaje de hierro precipitado (no pirítico) sobre la superficie del carbón al día t ($[Fe_{no\ pirítico}]_t$) y al día cero ($[Fe_{no\ pirítico}]_0$). $[Fe_s]$ es la concentración de hierro precipitado en el sólido (carbón), V_b es el volumen del balón volumétrico al que se afora la dilución y M_s corresponde a la muestra de carbón (sólido) tratado que se toma cada tres días en mg.

$$\%Hierro\ re - precipitado = [Fe_{no\ pirítico}]_t - [Fe_{no\ pirítico}]_0 \quad (5)$$

$$[Fe\ no\ pirítico] = \frac{[Fe_s] \times V_b}{M_s} \times 100 \quad (6)$$

A partir de la Ecuación (7) se determinó el porcentaje de pirita oxidada (%Pirita oxidada), donde $\%Fe_{py_0}$ corresponde al porcentaje de hierro pirítico inicial en el carbón y $\%Fe_{py_t}$ es el porcentaje de hierro pirítico en el carbón al día t.

$$\%Pirita\ oxidada = \frac{\%Fe_{py_0} - \%Fe_{py_t}}{\%Fe_{py_0}} \quad (7)$$

Al final del proceso de biodesulfurización se hicieron análisis mineralógicos de las muestras usando Difracción de rayos X (DRX), Espectroscopia de infrarrojo (FTIR) y Microscopía electrónica de barrido con detector de estado sólido (SEM/EDX), siguiendo el mismo protocolo que se empleó para analizar la muestra inicial, con el fin de definir el efecto de la oxidación bacteriana sobre los minerales (con especial énfasis en la pirita) y así como las diversas fases precipitadas. Los equipos y características usadas para la realización de estas técnicas de caracterización se mencionaron en la Sección 2.2.

2.6 Ensayos de biodesulfurización de carbón a nivel de reactor de tanque agitado

2.6.1 Selección de tipo de inóculo

Se evaluó el cambio de escala usando el consorcio de bacterias acidófilas (*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 y *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 15494), debido a que en la industria biominera es bastante difícil mantener ambientes estériles que garanticen o soporten el mantenimiento de cultivos puros (Rohwerder y Sand, 2007) y se considera que las poblaciones mixtas mejoran la eficiencia de la lixiviación (Battaglia et al., 1998).

El consorcio usado para inocular los reactores se mantuvo durante 9 días, temperatura de 30°C, pH inicial alrededor de 1.6 ± 0.03 y una velocidad de agitación de 180 rpm. Un volumen efectivo de 200 mL, 10% w/v de carbón y 10% v/v de inóculo.

2.6.2 Medios de cultivo evaluados a nivel de reactor de tanque agitado

Se evaluaron los cinco medios de cultivo que fueron seleccionados para el proyecto y su composición para un volumen efectivo de 5 L; se presenta en la Tabla 2-4.

Tabla 2-4: Composición de los medios de cultivo evaluados a nivel de tanque agitado (volumen de 5 L)

	Concentraciones (g) para 5 L de medio.				
	Sulfatos			Cloruros	
Sales basales	T&K ^a	Kos ^b	McCready ^c	Cloruros ^d	Hoffmann ^e
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0	0.18	0.42	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.0	-	0.615	-	-
K ₂ HPO ₄	2.0	0.06	0.085	2.0	-
KH ₂ PO ₄	-	-	-	-	0.5
KCl	-	-	-	-	0.5
NaCl	-	-	-	-	0.615
(NH ₄)Cl	-	-	-	2.0	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	-	-	-	0.04
MgCl ₂ ·6H ₂ O	-	-	-	2.0	4.25
Fuente de energía					
S ^o	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O (g/25mL)	8.33	8.33	8.33	-	-
FeCl ₂ ·4H ₂ O (g/25mL)	-	-	-	5.95	5.95

^aTuovinen, 1972; ^bKos, 1983; ^cMcCready, 1986; ^dCaicedo y Márquez, 2013; ^eHoffmann, 1981

Los ensayos de biodesulfurización de carbón en reactores de tanque agitado, que se muestran en la Figura 2-3, fueron llevados a cabo por 15 días, con un volumen efectivo de 5000 mL, una temperatura óptima de crecimiento de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH inicial de 1.6 ± 0.3 , una velocidad de agitación de 400 ± 10 rpm y un suministro de 0.5 vvm (2.5 Lpm) de aire. Estos dos últimos parámetros fueron seleccionados a partir de la investigación realizada por Cardona (2008) y Sun y colaboradores (2012). En particular el valor de agitación fue seleccionado ya que permitía una buena suspensión de sólidos.

Figura 2-3: Reactores de tanque agitado empleados para la evaluación de los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann en un proceso de biodesulfurización de carbón en presencia de un consorcio de bacterias acidófilas



Para el desarrollo de la experimentación se contó con una serie de cinco biorreactores cilíndricos equipados con 4 *baffles* de 90° , una turbina *Rushton* de 6 palas inclinadas, chaqueta de calentamiento y un difusor de aire comprimido, como se muestra en la Figura 2-3. Se realizaron tres corridas (ensayos, réplicas y controles abióticos), garantizando la aleatoriedad. Se usó para el proceso el consorcio de bacterias acidófilas conformado por las bacterias comerciales *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*. Los ensayos se realizaron con 10% v/v de inóculo, 10% w/v de pulpa de carbón, 0.5% v/v de sulfato ferroso o 0.5% v/v de cloruro ferroso según el medio usado y 0.05% w/v de azufre elemental. El mineral y los medios de cultivo fueron esterilizados por 20 minutos a 120°C .

El procesamiento de los datos se realizó a través del software estadístico R versión 3.0.3 y PAST versión 2.17c. En el software R se llevaron a cabo los análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de *Tukey* y el nivel de significancia seleccionado fue de 0,05 para todos los análisis.

Cada proceso se monitoreó periódicamente mediante mediciones de pH y potencial redox (Eh), usando un equipo marca HACH, con un electrodo de pH con electrolito de KCl y un electrodo de Eh de Ag/AgCl. La concentración celular se determinó, por conteo directo en cámara de Neubauer. La concentración de oxígeno disuelto se midió con un oxímetro marca HACH.

La velocidad de consumo de oxígeno se determinó a partir del agotamiento de la concentración de oxígeno disuelto después de detener el flujo de aire que ingresa al cultivo, como lo describen Doran (1995) y García-Ochoa y colaboradores (2010). Una vez se tomaron los datos experimentales se reanudó el bombeo de aire al sistema con un caudal constante hasta que dicha concentración alcanzara el estado estacionario, que indica un balance entre el suministro y el consumo de oxígeno en el sistema.

Los datos correspondientes a la desoxigenación del sistema fueron graficados y a partir de la Ecuación (8) de la recta, se hallaron las velocidades de consumo de oxígeno para cada uno de los tratamientos evaluados (García-Ochoa et al., 2010):

$$\left(\frac{dC}{dt}\right)_d = -q_{O_2} \times C_x = OUR_d \quad (8)$$

Donde, OUR_d es la velocidad de consumo de oxígeno, q_{O_2} es la velocidad específica de consumo de oxígeno y C_x corresponde a la concentración celular.

Adicionalmente se hicieron análisis de la concentración de hierro en solución (total, Fe^{2+} y Fe^{3+}) y hierro precipitado, bajo la norma estándar 3500-Fe B (Eaton et al., 2005; APHA, 1992) y la norma ASTM D 2492, respectivamente, usando un espectrofotómetro marca THERMO serie GENESYS UV 10. Por otra parte, se calculó la concentración de pirita en el carbón por medio del análisis ASTM D 2492. Los análisis de hierro precipitado y pirita oxidada se llevaron a cabo cada tres días.

Al final del proceso de biodesulfurización se caracterizaron mineralógicamente las muestras usando Difracción de rayos X (DRX), Espectroscopia de infrarrojo (FTIR) y Microscopía electrónica de barrido con detector de estado sólido (SEM/EDX).

3. Influencia de sales de sulfatos sobre un proceso de biodesulfurización de carbón empleando bacterias acidófilas

3.1 Introducción

Durante años se han venido realizando investigaciones que permitan comprender los mecanismos que hay detrás de la biolixiviación, al ser un excelente ejemplo de cómo la actividad biológica controlada trabaja de forma sinérgica con los recursos geológicos, generando la opción de una explotación y recuperación más limpia de los minerales y un uso más eficiente de la energía (Ballester, 2005).

Los microorganismos que participan en procesos de biolixiviación de minerales, representan gran interés gracias a su diversidad metabólica y gran capacidad de adaptación a ambientes altamente hostiles, pero para que lleven a cabo rutas metabólicas, un correcto crecimiento, biosíntesis de material celular, mantenimiento y producción de energía, requieren de una disponibilidad y suministro adecuado de materias primas y nutrientes, condiciones ambientales idóneas y un control adecuado de sustancias tóxicas, entre otros factores (Prescott et al., 2004; Rossi, 1990).

En los primeros años de las investigaciones en el tema, Silverman y Lundgren (1959) propusieron uno de los medios de cultivo más comúnmente usados para este tipo de microorganismos, el medio 9K. Sin embargo, la excesiva concentración de ciertos nutrientes en los medios de cultivo presenta un gran inconveniente, que es la formación de hidroxisulfatos básicos de hierro férrico, como la jarosita, los cuales generan efectos adversos sobre el proceso cinético, ya que al formarse se precipitan sobre la superficie de los minerales, afectando la adecuada solubilización y recuperación del metal de interés y ejerciendo una fuerte influencia sobre la efectividad del proceso (Kaksonen, 2014; Nurmi et al., 2010; Cunha et al., 2008; Nemati et al., 1998).

Estos compuestos al depositarse sobre los minerales sulfurados generan películas e incrustaciones, que se tornan en barreras físicas, disminuyendo la difusión de reactivos y productos a través de las zonas de precipitación (Gómez y Cantero, 2005; Jensen y Webb, 1995), dificultando de esta manera los fenómenos de transferencia de masa y por tanto el alcance global del proceso. Además, en los

biorreactores que se usen para este tipo de oxidaciones, bloquea bombas, tuberías, válvulas, entre otros, lo que a nivel económico en las industrias produce grandes pérdidas en la producción, debido al tiempo que se requiere para el mantenimiento de los dispositivos (Gómez y Cantero, 2005). Por tanto, se considera que una recuperación o solubilización más eficiente de los metales se logra tratando de comprender los fenómenos de precipitación de hierro presente en las soluciones lixiviantes, para así poder definir estrategias adecuadas sobre el manejo y control de los parámetros que más influyen en el correcto desarrollo de este tipo de procesos (Casas et al., 2000).

La formación de estos precipitados depende principalmente del pH, la composición iónica y la concentración de los diferentes compuestos en el medio de cultivo (Gómez y Cantero, 2005). Además, se considera que altas concentraciones de cationes y compuestos catiónicos monovalentes, iones férricos y sulfato, promueve la formación de jarosita (Gramp et al., 2008; Cunha et al., 2008).

La formación de jarosita puede deberse a una excesiva concentración de ciertos nutrientes en los medios de cultivo. Por tanto, Tuovinen y Kelly (1972), con el objetivo de disminuir estas dificultades, propusieron el medio T&K, que tiene concentraciones más bajas de estos reactivos (Rossi, 1990). Otros medios de cultivo han sido propuestos, con base en que el mineral tratado pueda proporcionar los elementos traza que el microorganismo necesita. Por tanto, se desarrollaron medios con concentraciones bajas de fosfato y sulfato y se han empleado en la lixiviación de minerales de uranio (McCready et al., 1986) y diferentes tipos de carbón (Kos et al., 1983; Rossi, 1990).

Los medios de cultivo que fueron evaluados en este aparte, se seleccionaron con base en lo propuesto por Rossi (1990) para trabajos similares. Estos medios de cultivo se desarrollaron por los investigadores con el objetivo de reducir la concentración de los nutrientes que pudieran afectar o precipitar durante los procesos. Se planteó usar medios de cultivo con concentraciones de nutrientes más bajas que las que se presentan en el medio T&K (comúnmente usado en procesos de oxidación). Se evaluaron los medios que fueron llamados para la investigación, McCready (McCready et al., 1986) y Kos (Kos et al., 1983), respectivamente, buscando de esta manera reducir las precipitaciones sobre la superficie del mineral.

Además del criterio de selección anterior, se decidió trabajar con el medio de cultivo Kos, que carece de fuente de magnesio, con el fin de evaluar el papel de dicho elemento sobre la actividad de los microorganismos dentro del proceso de biodesulfurización de carbón. Al ser este elemento fundamental en los procesos de división y crecimiento celular, se buscó evaluar este parámetro, para observar cómo influía la concentración celular en el proceso.

Este estudio, de manera general, se llevó a cabo con el fin de definir la influencia de las concentraciones de las sales de sulfato sobre la biodesulfurización de este tipo de carbón específico y de manera general en estos procesos, con base en la proliferación comparativa de la biomasa y la disminución de la precipitación de sulfatos de hierro férrico.

3.2 Materiales y Métodos

Los aspectos metodológicos correspondientes a esta parte del proyecto, se presentan en el Capítulo 2 (véase de las Secciones 2.1 a 2.5).

3.3 Resultados

3.3.1 Análisis químicos y mineralógicos iniciales del carbón

- **Formas de azufre y análisis próximos del carbón**

En la Tabla 3-1, se observan las principales características y propiedades del tipo de carbón usado, encontradas mediante los análisis próximos, de azufre total y diferentes formas de azufre. Se puede observar que el azufre pirítico es la forma más abundante, correspondiendo a aproximadamente un 50% del azufre total presente en el carbón. También, con base en los análisis próximos se determinó el rango del carbón del manto K de la mina ‘La Guacamaya’ como bituminoso alto en volátiles tipo C a partir de la norma ASTM D388 y las Ecuaciones (1), (2) y (3) (Anexo 1).

Tabla 3-1: Análisis próximos, de azufre total y diferentes formas de azufre realizados a la muestra de carbón.

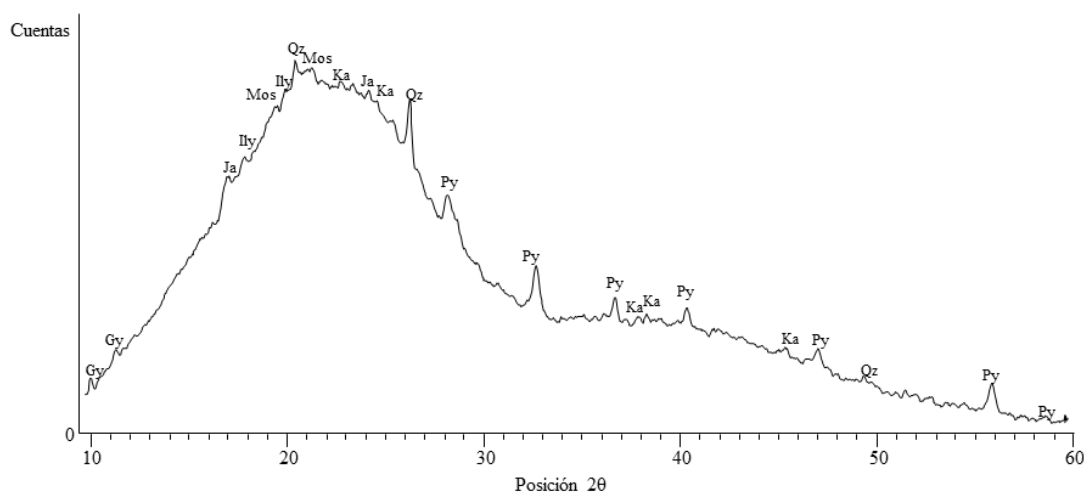
Características	Valor
Azufre total (%)	2.03
<i>Azufre pirítico (%)</i>	1.02
<i>Azufre de sulfatos (%)</i>	0.31
<i>Azufre orgánico (%)</i>	0.70
Humedad residual (%)	14.28
Cenizas (%)	4.00
Materia volátil (%)	38.75
Carbono fijo (%)	42.97
Poder calorífico superior (cal/g)	5477

Con base en los resultados de azufre pirítico y no pirítico (hierro re-precipitado día cero), se determinó que la muestra contenía 11.7 g Fe/Kg carbón, por tanto, la máxima solubilización de hierro que se puede alcanzar sería 1170 mg Fe/L en la solución lixiviante.

- **Análisis de Difracción de Rayos X (DRX)**

El espectro de DRX para la muestra de carbón inicial empleada, se presenta en la Figura 3-1. En el difractograma se observa que la muestra está conformada principalmente por cuarzo (SiO_2) y pirita (FeS_2). Además, se encontraron picos con intensidades bajas de potasio y sodio jarosita ($\text{MFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$, con M: K^+ , Na^+), yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), moscovita ($\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$), caolinita ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) e illita ($(\text{K}, \text{H}_3\text{O})(\text{Al}, \text{Mg}, \text{Fe})_2(\text{Si}, \text{Al})_4\text{O}_{10}[(\text{OH})_2, (\text{H}_2\text{O})]$) (Qiu et al., 2011; Sonibare et al., 2010; Cardona y Márquez, 2009).

Figura 3-1: Difractograma de la muestra de carbón antes del proceso de biodesulfurización. Py: pirita, Ja: jarosita, Gy: yeso, Mos: moscovita, Ka: caolinita e Illy: illita

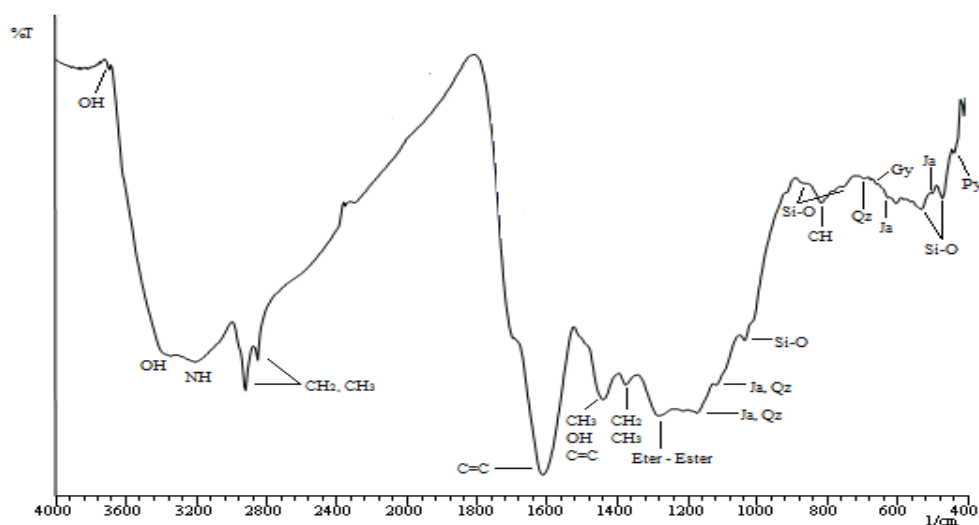


- **Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)**

En la Figura 3-2 se presenta el espectro de FTIR para la muestra inicial de carbón. La fracción orgánica del carbón se encuentra representada por las bandas a 750 cm^{-1} , 810 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} , 1372 cm^{-1} , 1436 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} , en donde se encuentran enlaces aromáticos CH, éter y esteres aromáticos, cadenas alifáticas de CH_3 y CH_2 , núcleos aromáticos C=C y grupos carbonilos C=O, principalmente (Qiu et al., 2011; Sonibare et al., 2010; Munkhtsetseg et al., 2007; Saikia et al., 2007).

Se observaron bandas correspondientes a vibraciones Si-O que indican la presencia de cuarzo a 471 cm^{-1} , 536 cm^{-1} , 693 cm^{-1} , 760 cm^{-1} , 864 cm^{-1} , 1163 cm^{-1} y minerales de arcilla como la caolinita e illita a 471 cm^{-1} , 536 cm^{-1} , 760 cm^{-1} , 864 cm^{-1} , 1032 cm^{-1} (Qiu et al., 2011; Sonibare et al., 2010; Saikia et al., 2007; Suraj et al., 1997; Oinuma y Kodama, 1967). Se encontró además, un pico entre $3600\text{-}3800\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a grupo funcional OH, asociado a minerales de arcillas como la caolinita (Sonibare et al., 2010; Saikia et al., 2007). La muestra de carbón contiene sulfato de calcio (yeso) y se encuentra representado por la banda a 670 cm^{-1} (Schiavon, 2007). Se verificó además, la presencia de grupos OH asociados a la jarosita en la muestra inicial de carbón en las bandas a 510 cm^{-1} , 630 cm^{-1} , 1090 cm^{-1} , 1170 cm^{-1} (Baruah et al., 2003; Lazaroff et al., 1982). Y finalmente, se observa la pirita al final del espectro, en la banda a 420 cm^{-1} (Qiu et al., 2011; Saikia et al., 2007).

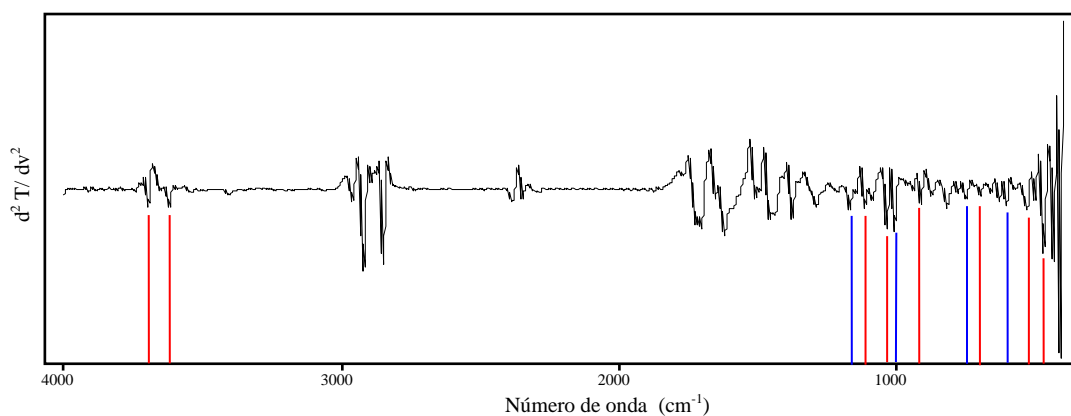
Figura 3-2: Espectro de FTIR, de la muestra de carbón inicial. Ja: jarosita, Py: pirita, Qz: cuarzo, Gy: yeso.



Las bandas obtenidas mediante la técnica de espectroscopia no permitieron identificar de forma clara la presencia de algunos minerales, que podrían estar haciendo parte de la muestra de carbón inicial, probablemente debido a la superposición de bandas. Por tanto, la determinación de la segunda derivada del espectro (Figura 3-3) fue una herramienta alternativa que permitió superar esta dificultad ya que brinda mínimos en la posición de las bandas facilitando así la resolución de los picos solapados (Subramanian y Saona, 2009; Naumann, 2006; Macho, 2002). Es posible identificar a partir de la segunda derivada, bandas correspondientes a minerales arcillosos como la caolinita e illita ($3800\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$, 1100 cm^{-1} , 1008 cm^{-1} , 912 cm^{-1} , $800\text{ cm}^{-1}\text{-}700\text{ cm}^{-1}$, 529 cm^{-1}), estas bandas están seleccionadas con rojo en la figura y se considera que pueden presentarse también feldespatos en la

muestra, como la albita, cuyas bandas se identifican en color azul (1200cm^{-1} - 1000cm^{-1} , 700cm^{-1} - 600cm^{-1})

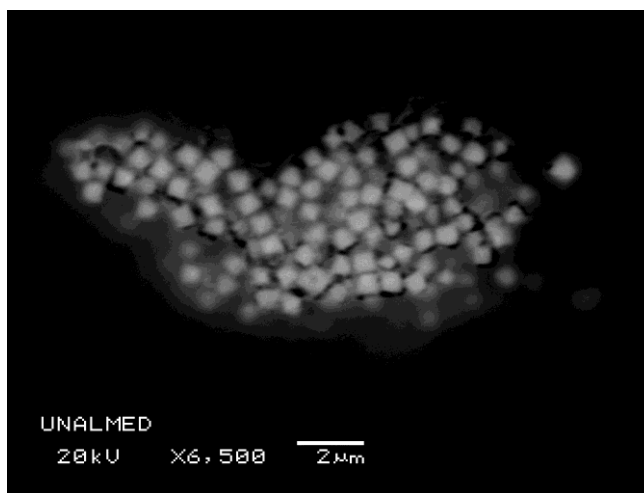
Figura 3-3: Segunda derivada del espectro de FTIR de la muestra de carbón inicial.

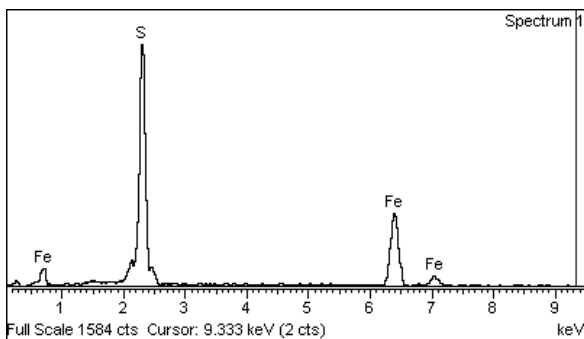


- **Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Las Figuras 3-4, 3-5 y 3-6 presentan micrografías correspondientes a la muestra inicial de carbón, con sus respectivos análisis microquímicos.

Figura 3-4: Microcristales de pirita en la muestra inicial de carbón y análisis microquímico por EDS de los granos de pirita.



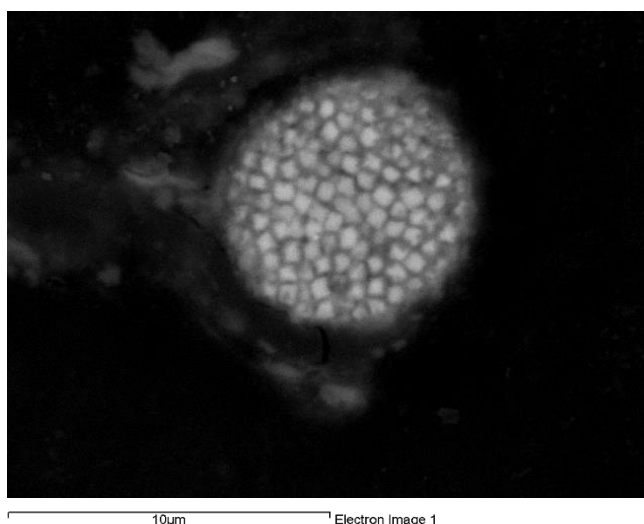


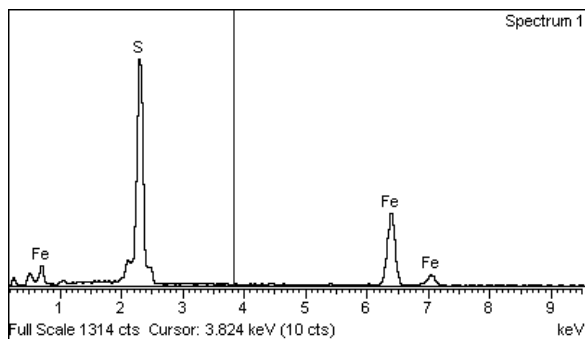
Elemento	%Peso	%Atómico
S	48.78	62.39
Fe	51.22	37.61
Total	100.00	

Mediante esta técnica se evidenciaron diferentes formas de presentación de la pirita, apareciendo en mayor proporción como pequeños Microcristales con tamaños alrededor de 1 μm o menores, los cuales presentan formas principalmente cúbicas, agrupados de forma aparentemente aleatoria (Figura 3-4) o en la forma de framboides (Figura 3-5). También se observaron, en menor proporción, cristales de pirita de forma eudral (Figura 3-6), con tamaños mayores a los de los Microcristales (máximo de 40 μm).

En las Figuras 3-5 y 3-7, se observa que los cristales de pirita presentaron frecuentemente corrosión incipiente, probablemente de origen intempérico, asociada a finas películas e intercrecimiento de sulfato de hierro, posiblemente jarosita.

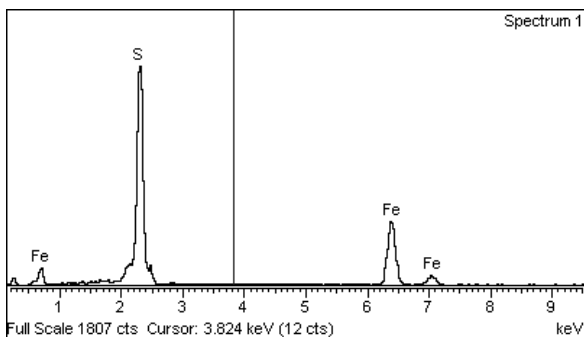
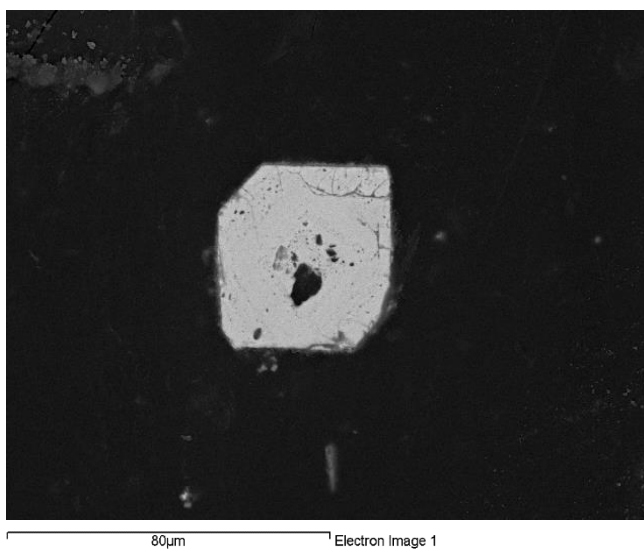
Figura 3-5: Pirita framboidal, incipientemente corroída, presente en la muestra de carbón inicial y análisis microquímico por EDS de la pirita.





Elemento	%Peso	%Atómico
S	45.42	59.18
Fe	54.58	40.82
Total	100.00	

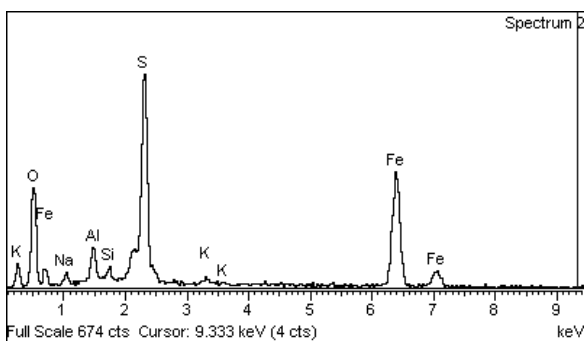
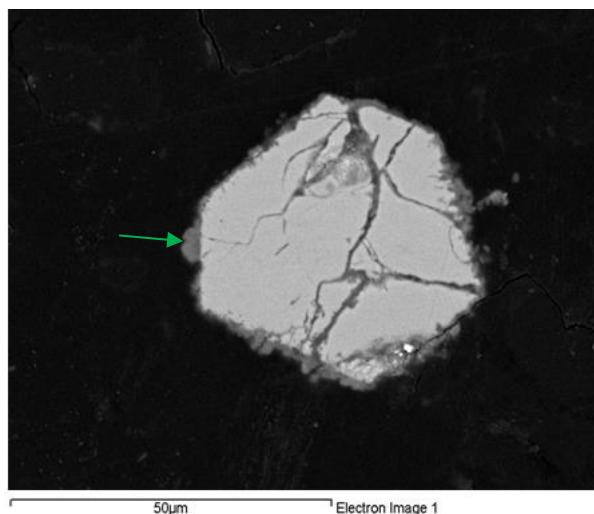
Figura 3-6: Pirita eudral en la muestra inicial de carbón, análisis microquímico por EDS de la pirita.



Elemento	%Peso	%Atómico
S	47.70	61.37
Fe	52.30	38.63
Total	100.00	

Por otra parte, los análisis de DRX y FTIR habían dado un indicio de la presencia aluminosilicatos en la muestra de carbón, lo cual se comprobó debido a la presencia de Al y Si en el análisis microquímico de EDS (Figura 3-7) (En la figura se señala con una flecha verde el punto donde se realizó el análisis

Figura 3-7: Pirita eudral corroída en los bordes, recubierta por película fina de sulfato (aparentemente jarosita), presente en la muestra inicial de carbón. Análisis microquímico de la película de sulfato y aluminosilicatos por EDS



Elemento	%Peso	%Atómico
O	30.95	53.77
Na	2.37	2.87
Al	3.67	3.78
Si	1.17	1.15
S	20.37	17.66
K	0.62	0.44
Fe	40.86	20.33
Total	100.00	

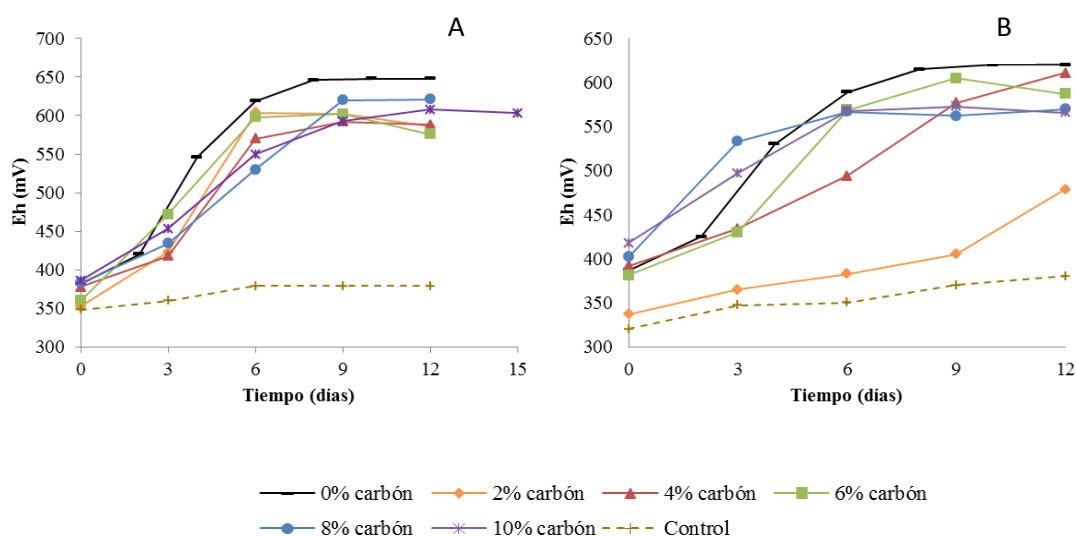
3.3.2 Adaptación de microorganismos

- **Adaptación progresiva al mineral**

En la Figura 3-8 se muestra el proceso de adaptación progresiva de la cepa pura y el consorcio hasta la concentración de pulpa deseada (Véase Capítulo 2, Sección 2.4.1), representado por el comportamiento el potencial de óxido reducción. Se observó en ambas adaptaciones un incremento en el Eh a medida que se aumentaba de etapa.

Para la cepa pura en particular, se evidenció un incremento en el Eh desde la Etapa 1 (2% carbón) (Figura 3-8A) y la reducción en la tendencia a la fase *lag* los primeros tres días del proceso (presente en las primeras etapas). Durante las tres primeras etapas (2%, 4% y 6% carbón) se observa una reducción en el Eh comparada con el cultivo sin presencia de carbón (0%). En las dos últimas etapas (8% y 10% carbón) no se observó fase *lag* y los valores de Eh tendieron a aumentar respecto de las etapas anteriores. La última etapa con la cepa pura (10% carbón) se mantuvo por tres días más, debido a que a los doce días, no se observaba estabilización del parámetro, llegando finalmente a obtener en estas suspensiones un potencial de 608mV.

Figura 3-8: Comportamiento del potencial de óxido - reducción durante el proceso de adaptación en cinco etapas de la cepa pura (A) y el consorcio (B), al incremento en la concentración de carbón y la disminución de sulfato ferroso y azufre elemental, usando el medio de cultivo T&K



En cuanto al consorcio (Figura 3-8B), es evidente que la fase *lag* y exponencial se redujo en cada etapa de adaptación. Puede observarse que cuando se adicionó 2% de carbón hubo una reducción significativa, comparada con el ensayo en ausencia de carbón (0%). No obstante los valores de Eh se incrementaron para las etapas a mayores concentraciones de pulpa, especialmente al utilizar 4% de pulpa (Etapa 2), aunque no superaron los valores obtenidos en el cultivo sin carbón. En la última etapa de adaptación (con 10% de pulpa), el consorcio alcanza su máximo valor al sexto día, entrando en estado estacionario a 570mV. Es claro por tanto que se lograron mayores valores para este parámetro usando la cepa pura.

Durante la etapa con una concentración de pulpa a 10% (Etapa 5) además, se llegó a un pH y una concentración celular para la cepa pura de 1.9 y 8×10^8 células/mL y con el consorcio de 1.34 y 4×10^8 células/mL respectivamente.

Finalmente, se observó que los controles abióticos (control), no presentaron ningún aumento en el potencial, el cual se mantuvo por debajo de 380mV.

- **Adaptación a los medios de cultivo a evaluar**

En la Tabla 3-2, se presentan los valores obtenidos para los parámetros de pH, potencial redox y concentración celular luego de 15 días de proceso y cinco repiques sucesivos para la cepa pura y el consorcio en presencia de los medios de cultivo T&K, Kos y McCready. De manera general se observa que los valores de pH final para la cepa pura fueron superiores a los obtenidos con el consorcio, pero en cuanto a los parámetros de Eh y conteo celular no se observaron diferencias significativas. Se alcanzaron potenciales redox en todos los medios superiores a 600mV y concentraciones celulares superiores al orden de 10^7 .

Tabla 3-2: Valores obtenidos en los parámetros de pH, Eh y concentración celular durante la adaptación en serie de repiques sucesivos realizados a la cepa pura y el consorcio en presencia del mineral, a los medios de cultivo T&K, Kos y McCready

Medios de cultivo	Parámetro	Tipo de inóculo	
		Cepa pura	Consortio
T&K	pH	1.69	1.60
	Eh (mV)	621	627
	Conteo celular (cel/mL)	8.0×10^7	7.0×10^7
Kos	pH	1.64	1.58
	Eh (mV)	632	642
	Conteo celular (cel/mL)	9.0×10^7	1.8×10^8
McCready	pH	1.68	1.61
	Eh (mV)	632	625
	Conteo celular (cel/mL)	1.6×10^8	1.3×10^8

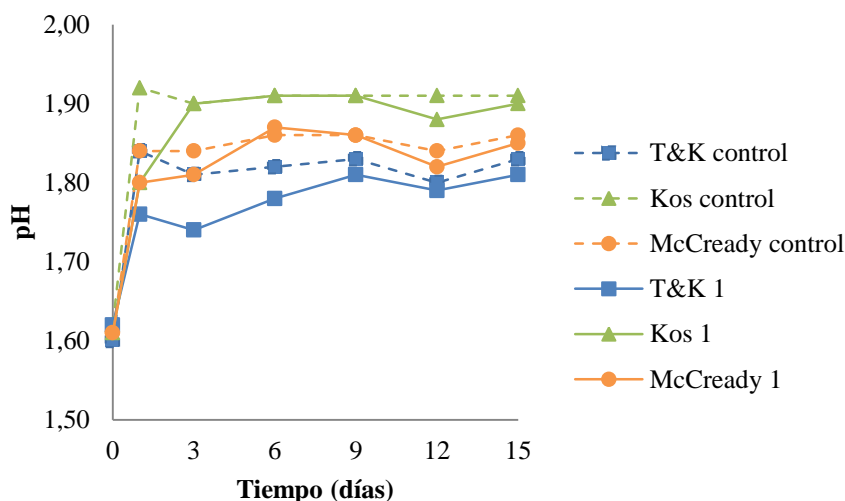
3.3.3 Proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer

- **Ensayos con cepas puras de *Acidithiobacillus ferrooxidans***

En la Figura 3-9, se observa el comportamiento del pH a través del tiempo para los distintos tratamientos. En general, la tendencia de este parámetro en todos los ensayos (bióticos o abióticos) fue a incrementar en los primeros tres días del proceso, para luego permanecer casi constante. Se pudo observar que todos los bioensayos partieron desde un valor inicial de pH de 1.6, posteriormente los ensayos T&K y McCready presentaron un incremento significativo al primer día del proceso, alcanzando valores de 1.76 y 1.81, respectivamente, mientras que en el ensayo Kos alcanzó el máximo (1.90) al tercer día, siendo superior a los otros dos tratamientos. Todas las suspensiones después del aumento inicial tendieron a la estabilización llegando al final del proceso a valores de 1.81 con T&K, 1.85 con McCready y 1.90 con Kos.

Se pudo observar además que los controles abióticos de los ensayos McCready y Kos, presentaron tendencias y valores similares a los ensayos bióticos respectivos. Por su parte, el ensayo biótico T&K, a pesar de mostrar un pH menor que su respectivo control hasta el sexto día, se equiparó prácticamente a éste después del noveno día, continuando así hasta el final del experimento.

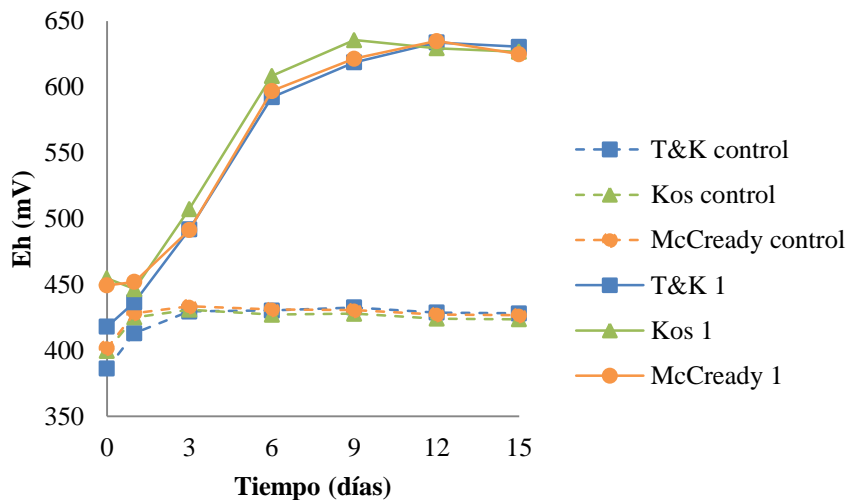
Figura 3-9: Curva de pH vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y los medios T&K, Kos y McCready



En la Figura 3-10, se presenta el comportamiento del potencial de óxido reducción (Eh) a través del tiempo. El Eh, mostró un comportamiento similar en todos los tratamientos evaluados, inicialmente se presentó un incremento significativo hasta el sexto día, seguido de un leve aumento hasta el noveno día y la posterior estabilización hasta el final del proceso. Se obtuvieron valores máximos de Eh de alrededor de 636mV al noveno día en el ensayo Kos y al doceavo día en T&K y McCready.

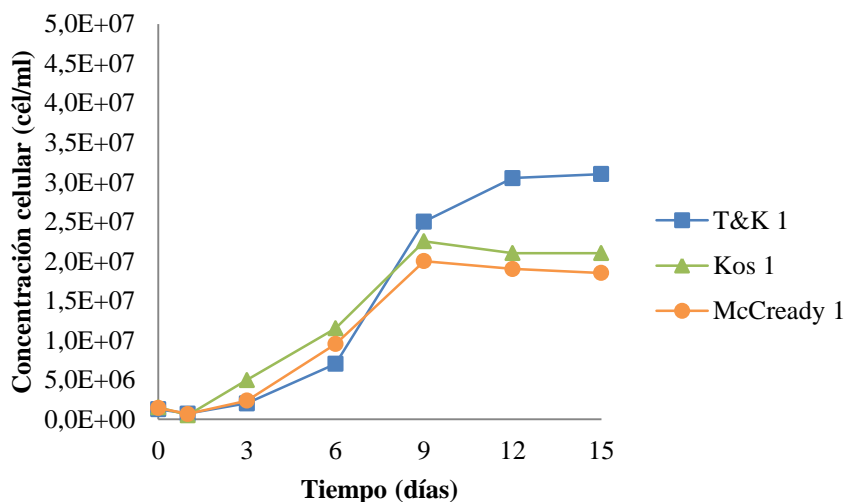
En la Figura 3-11, se observa el seguimiento que se realizó a la concentración celular a través del tiempo. Se evidenció en todos los tratamientos la existencia de una fase *lag* que duró aproximadamente un día, posteriormente ocurre un crecimiento significativo (fase exponencial) hasta el noveno día en los ensayos Kos y McCready, mientras que en el ensayo T&K después de este incremento inicial continúa una leve tendencia en aumento hasta el doceavo día, para luego en todos los bioensayos alcanzar la estabilidad hasta el final del proceso.

Figura 3-10: Curva de Eh vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y los medios T&K, Kos y McCready



Se alcanzaron concentraciones celulares máximas en las suspensiones T&K de 3.1×10^7 células/mL, en Kos de 2.5×10^7 células/mL y en McCready de 2.0×10^7 células/mL. En esta Figura no es claro que en los ensayos McCready y T&K aumente la concentración celular al tercer día (inicio la fase exponencial), pero esto es debido a la escala que se usó para la realización de la gráfica.

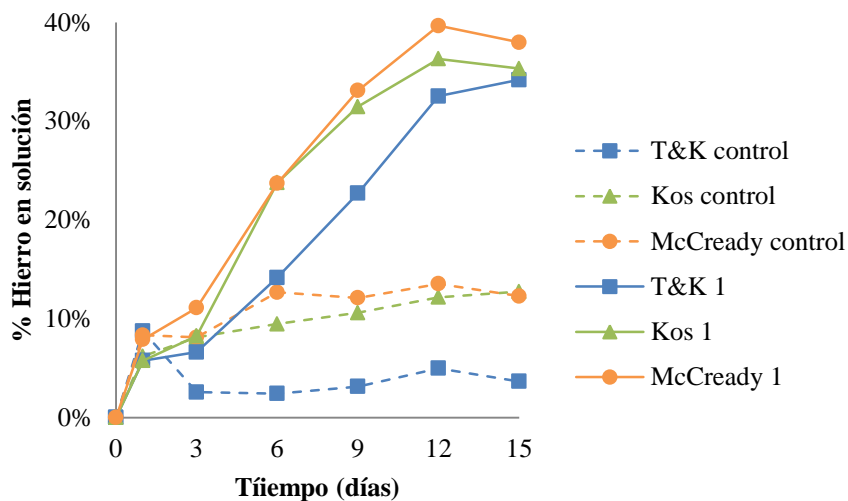
Figura 3-11: Concentración celular vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y los medios T&K, Kos y McCready



En la Figura 3-12, se presenta el porcentaje de hierro solubilizado a través del tiempo. Dicho comportamiento muestra un aumento progresivo de hierro en la solución hasta el doceavo día. No obstante, en los ensayos Kos y McCready se presenta una tendencia leve a disminuir y en el ensayo T&K tiende a aumentar hasta llegar al final del proceso. Después del doceavo día, Kos alcanza valores similares a lo observado con T&K; sin embargo, la solubilización de hierro fue superior en el bioensayo McCready durante todo el proceso. Finalmente, se presentó una concentración de hierro en solución del 34% (833ppm), 35% (903ppm) y 38% (912ppm) en los tratamientos T&K, Kos y McCready, respectivamente.

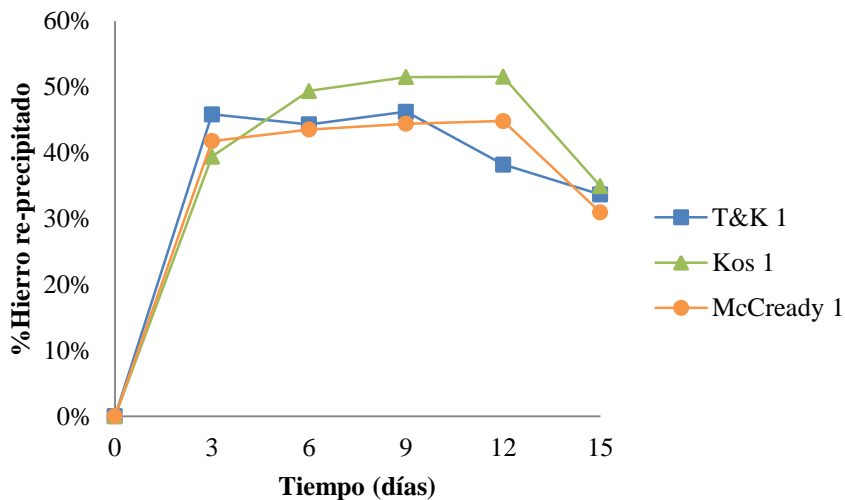
Todos los controles abióticos mostraron solubilización de hierro desde el inicio del proceso, los controles McCready y Kos mostraron una leve tendencia de aumento hasta el final del proceso, llegando a un porcentaje de hierro solubilizado al final del proceso de 12%, sin embargo, en el control T&K después de la solubilización inicial (aprox. 10%) se presentó una fuerte reducción, seguida de la estabilización.

Figura 3-12: Porcentaje de hierro en solución vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready



En la Figura 3-13, se muestra el porcentaje de hierro re-precipitado en el mineral a través del tiempo. Se observa que en todos los tratamientos, existe una fase inicial de re-precipitación al principio el proceso, luego, se presenta una segunda fase de estabilidad en la re-precipitación, y finalmente, se produce una fase de solubilización del precipitado.

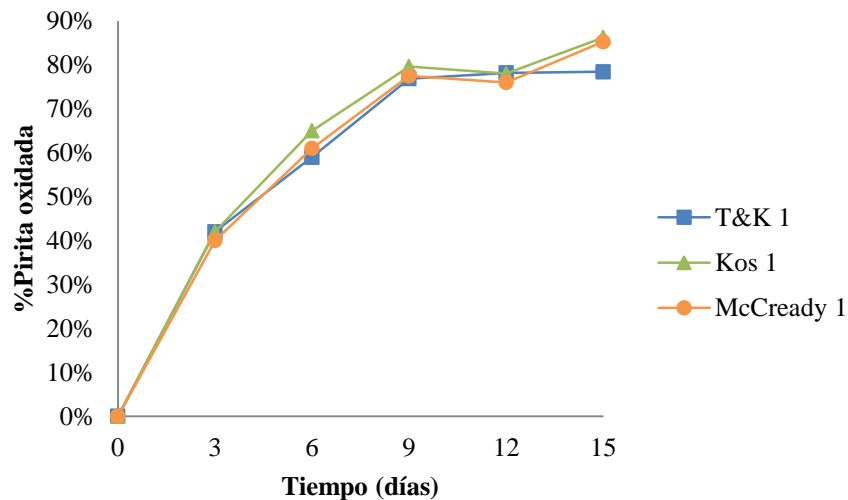
Figura 3-13: Porcentaje de hierro re-precipitado vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready



Después de la fuerte re-precipitación durante los primeros tres días del proceso, se observa un leve incremento hasta el sexto día en los ensayos Kos, seguido de la estabilización entre el sexto y doceavo día y una pequeña solubilización del parámetro hasta el final del proceso. Por su parte, en los tratamientos T&K y McCready, después del tercer día, se observa una estabilización hasta el noveno día en T&K y hasta el doceavo día en McCready, seguido de la solubilización hasta el decimoquinto día. El mayor porcentaje de re-precipitación al finalizar el proceso se observó en el ensayo Kos (35%), seguido de los tratamientos con T&K (34%) y McCready (31%).

En la Figura 3-14, se presenta el comportamiento de la oxidación de la pirita durante el transcurso del proceso de biodesulfurización. En general, se observó un aumento constante en el porcentaje de oxidación del mineral hasta el noveno día, seguido de la estabilización del parámetro hasta el final del proceso en el ensayo T&K, y en los bioensayos Kos y McCready una pequeña estabilización entre el noveno y doceavo día, para continuar con un leve aumento hasta el decimoquinto día. Se presentan oxidaciones de pirita en los medios Kos (86%) y McCready (85%) muy similares, y superiores a la oxidación que se observa con T&K (78%).

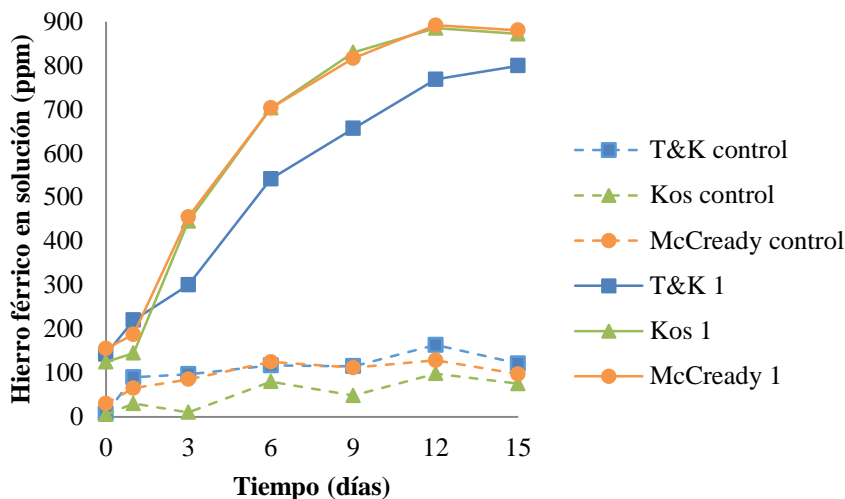
Figura 3-14: Porcentaje de pirita oxidada vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready



En la Figura 3-15, se presenta la concentración de iones férricos vs. Tiempo. En todos los tratamientos desde el inicio del proceso se observa una tendencia creciente en la regeneración de iones férricos, hasta el final del proceso en el ensayo T&K y hasta el doceavo día en los medios Kos y McCready, después de lo cual se alcanza la estabilización del parámetro, lo que puede indicar un acople en la velocidad de oxidación química y la velocidad de catálisis biológica en estas suspensiones. En los ensayos McCready (880ppm) y Kos (872ppm) después del primer día la regeneración iónica es superior que la que se observa en el ensayo T&K (799ppm).

Por su parte los controles abióticos muestran una baja y prácticamente estable concentración de iones férricos durante todo el proceso, llegando a concentraciones de 121ppm en el control T&K, 97ppm en el control McCready y 75ppm en el control Kos.

Figura 3-15: Concentración de iones Fe^{3+} en solución a través del tiempo, usando una cepa comercial *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready

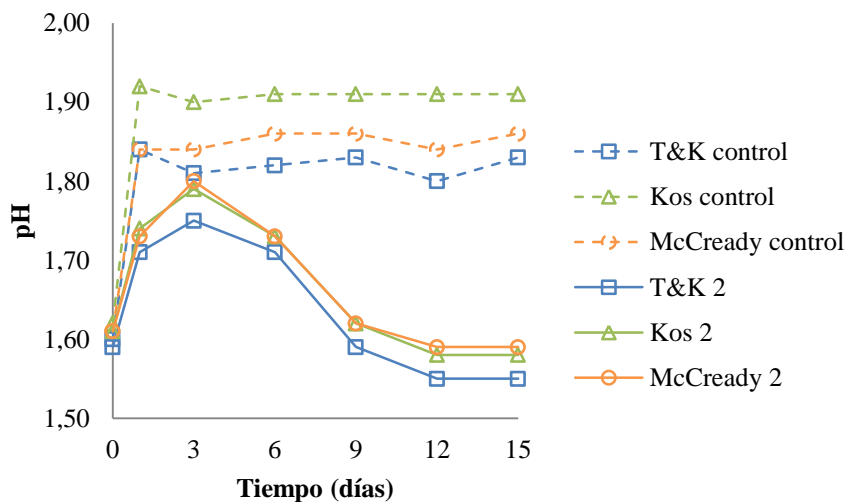


- **Ensayos con consorcio de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans***

La Figura 3-16 presenta el comportamiento del pH a través del tiempo para el proceso de biodesulfurización. Se puede observar que, igual como se presentó para la cepa pura, en los tratamientos con el consorcio, los primeros días del proceso ocurre un aumento en el pH desde 1.6 hasta 1.75, 1.79 y 1.80 para los medios de cultivo T&K, Kos y McCready, respectivamente. Después del tercer día, el pH disminuye progresivamente hasta el doceavo día, donde finalmente se alcanza la estabilidad al final del proceso y llegando a pHs de 1.55, 1.58 y 1.59 en los ensayos T&K, Kos y McCready respectivamente.

Los controles abióticos incrementan el pH al primer día del proceso y posteriormente se estabilizan hasta el final del proceso, presentando significativamente menor acidez que sus respectivos ensayos bióticos. El control Kos es superior (1.91), seguido de los controles McCready (1.86) y el control T&K (1.83).

Figura 3-16: Curva de pH vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando un consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready



En la Figura 3-17, se muestra el seguimiento que se realizó al parámetro de óxido reducción (Eh) durante el transcurso del proceso de biodesulfurización. De forma general en todos los tratamientos, este parámetro muestra un crecimiento constante hasta el noveno día, alcanzando posteriormente la estabilidad hasta el final del proceso. Se alcanzaron valores de Eh similares, de 637mV en el ensayo T&K, 634mV en McCready y 633mV en los ensayos Kos. Los controles abióticos por su parte, presentaron bajos valores de potencial de alrededor de 423mV.

En la Figura 3-18, se observa la concentración celular durante el tiempo del proceso de biodesulfurización. En todos los tratamientos se presenta una fase *lag* al primer día del proceso, seguido por una marcada fase exponencial hasta el final del proceso.

Figura 3-17: Curva de Eh vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready

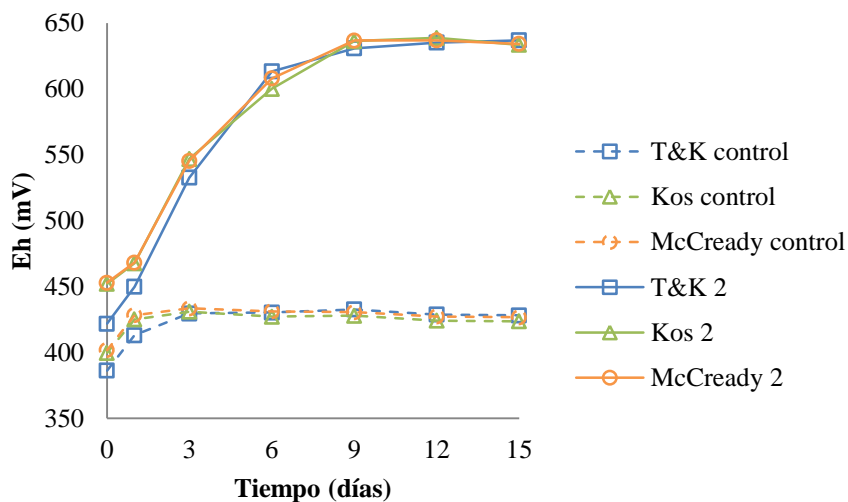
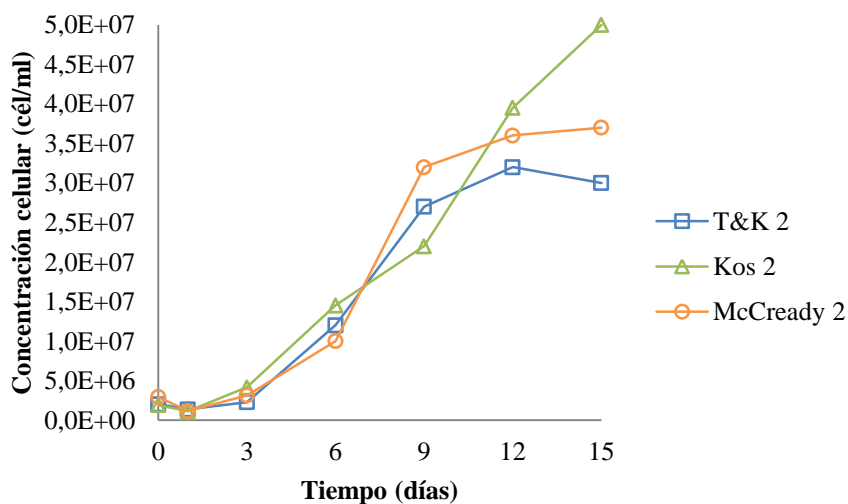


Figura 3-18: Concentración celular vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando un consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready

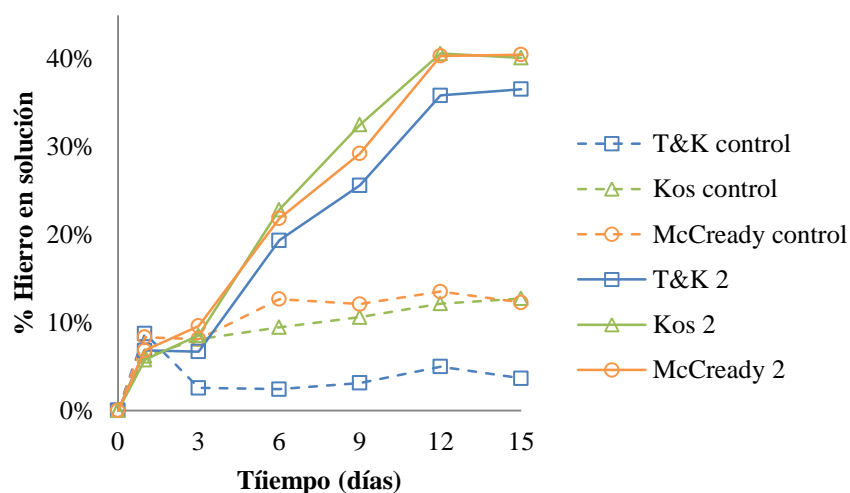


En la Figura 3-19, se presenta la concentración de hierro solubilizado durante el proceso de biodesulfurización. En todos los tratamientos la solubilización de hierro se lleva a cabo desde el inicio del proceso, llegando hasta el doceavo día en aumento y la posterior estabilización del parámetro hasta

el decimoquinto día. No obstante, se observó que en el ensayo T&K la solubilización permaneció invariable entre el primer y tercer día del proceso. Desde el primer día se vio que la solubilización en los ensayos Kos y McCready fue superior y por tanto, el porcentaje máximo de hierro en solución se observó en estas suspensiones (40%), seguido del ensayo T&K con 36%.

Los controles abióticos por su parte, evidenciaron la baja capacidad de solubilización química de la pirita. Sin embargo, en los controles Kos y McCready se presenta al final del proceso, una solubilización del 12%, superior a que se observó en el control T&K, del 3%, ya que este después del primer día del proceso redujo de forma significativa el hierro soluble en esta suspensión.

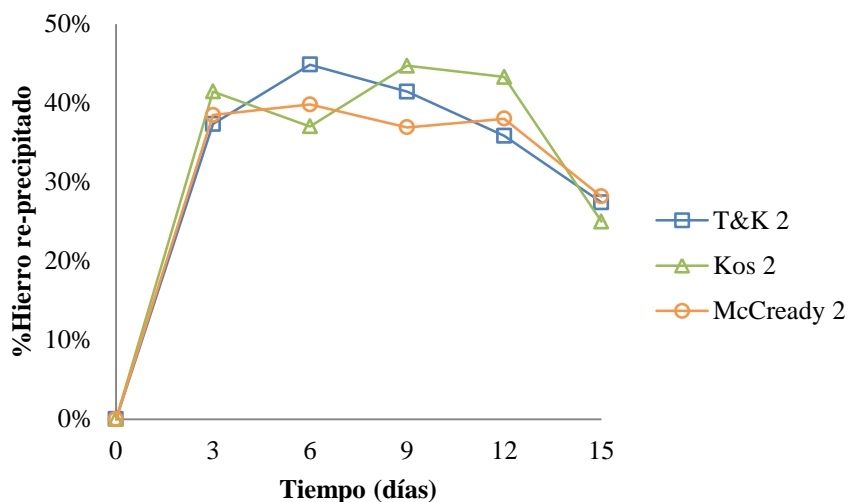
Figura 3-19: Porcentaje de hierro en solución vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready



En la Figura 3-20 se muestra el porcentaje de hierro re-precipitado a través del tiempo del proceso. Se observa de manera general, una primera fase en que incrementó la precipitación durante los primeros tres días del proceso, posterior a esto el parámetro varía de forma leve y llega al final del proceso a solubilizar el precipitado en todos los tratamientos. De manera particular en el ensayo T&K, después del incremento inicial, aumenta de forma leve hasta el sexto día, luego se presenta una solubilización del precipitado hasta el final del proceso. En el bioensayo McCready, la re-precipitación permanece prácticamente invariable desde el tercer al doceavo día, pero posterior se presenta una leve solubilización este precipitado. Por su parte, en el ensayo Kos ocurre una leve solubilización entre el tercer y sexto día, seguido de un pequeño aumento hasta el noveno día, luego el parámetro tiende a estabilizarse hasta el doceavo día y finalmente se presenta la solubilización de una parte del re-

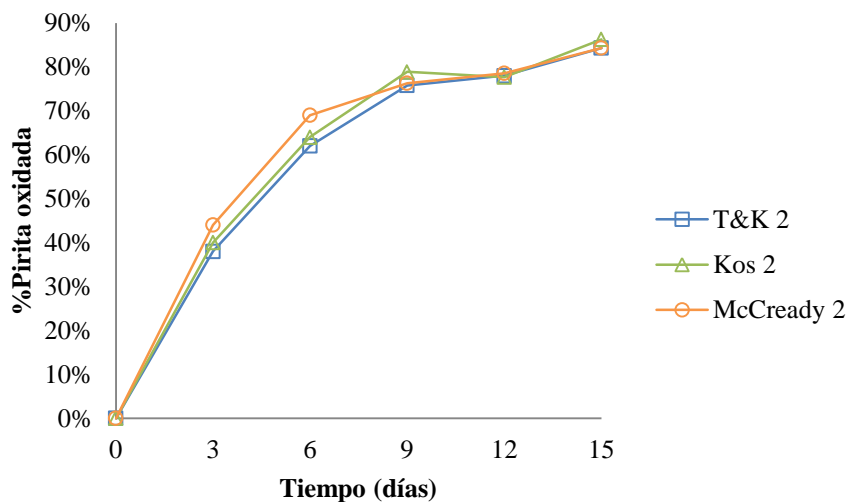
precipitado, obteniendo valores similares a los alcanzados en el ensayo McCready y T&K. Finalmente, en las suspensiones con el consorcio se obtuvo porcentajes de re-precipitación de hierro similares en todos los tratamientos, 25% en Kos, 28% en McCready y T&K.

Figura 3-20: Porcentaje de hierro re-precipitado vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready



En la Figura 3-21, se observa el comportamiento para el porcentaje de pirita oxidada a través del proceso de biodesulfurización. De manera general, se observa una tendencia creciente de oxidación desde el inicio del proceso y hasta el noveno día, y continúa de forma más sutil hasta el final del proceso. Después del noveno día, el parámetro en el ensayo Kos sufre una ligera estabilización hasta el doceavo día y un pequeño incremento hasta el final del proceso, mientras que en los ensayos T&K y McCready, hasta el final del proceso se observa un aumento leve. Se alcanzan porcentajes de oxidación de 86% en el tratamiento Kos y de 84% con T&K y McCready.

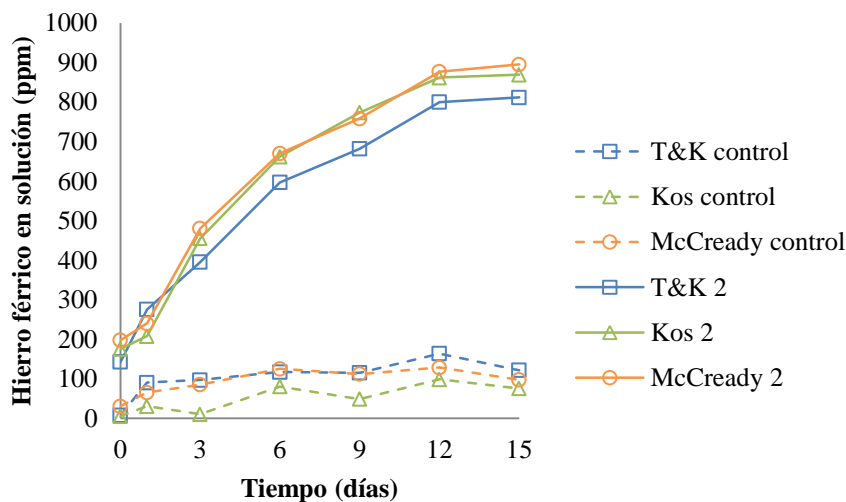
Figura 3-21: Porcentaje de pirita oxidada vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready



En la Figura 3-22, se encuentra la concentración de iones férricos (Fe^{3+}) a través del proceso. De manera general, la re-regeneración iónica ocurre desde el inicio del proceso y aumenta de manera constante hasta el doceavo día, donde se produce la estabilización del parámetro. Al primer día del proceso la regeneración de iones es mayor en el ensayo T&K, pero posterior a esto, en los tratamientos Kos y McCready se evidencia una producción de iones férricos superior hasta el final del proceso. Finalmente, hubo una concentración de iones férricos en solución de 895 ppm en McCready, 869 ppm en Kos y 811 ppm en T&K.

Por otra parte, los controles abióticos presentan una baja concentración iónica en solución, la cual permanece casi invariable durante todo el proceso.

Figura 3-22: Concentración de iones Fe^{3+} en solución vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos y McCready

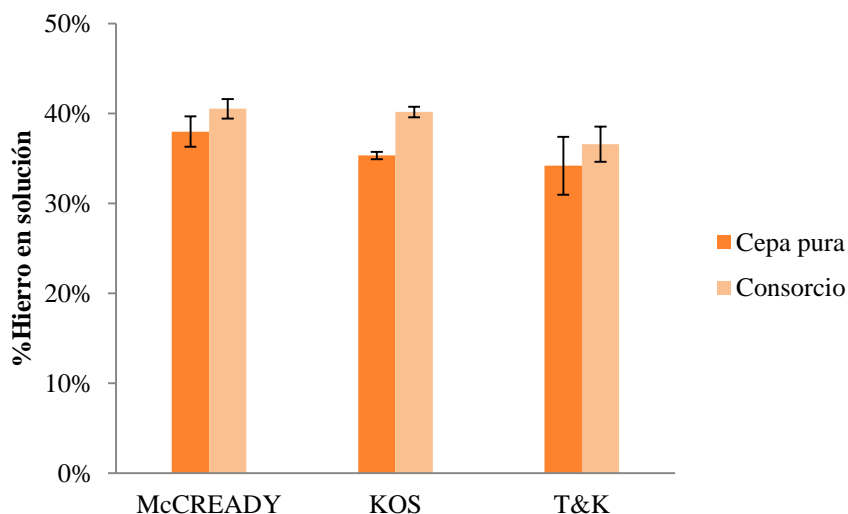


3.3.4 Análisis estadístico de los ensayos de biodesulfurización de carbón y Caracterización química

En las Figuras 3-23, 3-24 y 3-25 se presentan el porcentaje de hierro en solución, de hierro reprecipitado y de pirita oxidada, obtenidos al final del proceso de biodesulfurización en los tratamientos con los medios T&K, Kos y McCready en presencia de la cepa pura y el consorcio de bacterias acidófilas.

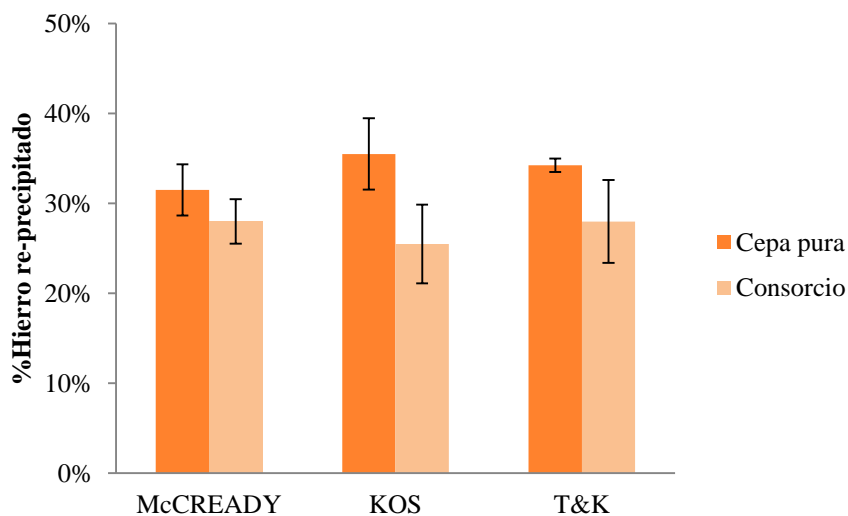
De la Figura 3-23, se evidencia que los tratamientos McCready y Kos en presencia del consorcio permiten solubilizar un mayor porcentaje de hierro. Y que cuando se emplea el medio de cultivo T&K, no hay diferencias entre el tipo de inóculo que se use. Estadísticamente mediante una prueba ANOVA se comprueba que existen diferencias significativas entre el tipo de inóculo (valor p de 0.02) y medio de cultivo (valor p de 0.007) que se use. La prueba de Tukey además, muestra que hay diferencias significativas entre el ensayo T&K y los otros dos ensayos (valor p de 0.02 con Kos y valor p de 0.009 con McCready), mientras que no existen diferencias entre los medios McCready y Kos (valor p de 0.76).

Figura 3-23: Porcentaje de hierro en solución, obtenido al final del proceso de biodesulfurización para la bacteria pura y el consorcio, en cada uno de los diferentes medios de cultivo evaluados.



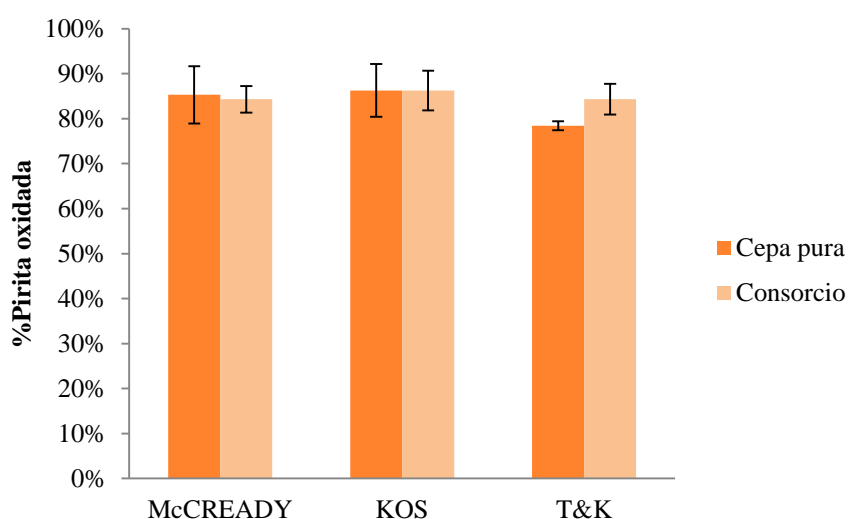
En la Figura 3-24, se observa que no existen diferencias significativas entre los medios de cultivo (valor p de 0.47) ni entre los tipos de inóculo (valor p de 0.80) en cuanto al porcentaje de re-precipitación. Se observa que a los tratamientos en presencia de los medios Kos y T&K les favorece la presencia del consorcio, ya que con este se reduce la re-precipitación, mientras que con el medio McCready no es relevante el tipo de inóculo que se use.

Figura 3-24: Porcentaje de hierro re-precipitado al final del proceso de biodesulfurización con la bacteria pura y el consorcio, en cada uno de los diferentes medios de cultivo evaluados.



En la Figura 3-25, se observa que en el bioensayo con T&K, la presencia del consorcio ayuda a crear un ambiente un poco más oxidativo, que el que se logra con la cepa pura, pero en los tratamientos con los medios de cultivo Kos y McCready, la oxidación de pirita, no depende del tipo de inóculo que se use. Estadísticamente, a través de la prueba ANOVA, se encuentra que no existen diferencias significativas para este parámetro, entre el tipo de inóculo (valor p de 0.055) o tipo de medio de cultivo (valor p de 0.37) que se use.

Figura 3-25: Porcentaje de pirita oxidada obtenido al final del proceso de biodesulfurización para la bacteria pura y el consorcio, en cada uno de los diferentes medios de cultivo evaluados.



En la Tabla 3-3, se presenta el análisis de diferentes formas de azufre de los carbones tratados. De manera cuantitativa se observa que hay una disminución evidente en el contenido de azufre pirítico en todos los tratamientos, siendo el bioensayo conformado por el medio Kos con cualquier tipo de inóculo, el tratamiento con el que se alcanza la más alta remoción. Por otra parte, la concentración de azufre proveniente de los sulfatos, es mayor que el contenido presente en la muestra de carbón inicial, y es superior en las suspensiones en que se usó el medio de cultivo T&K.

El azufre de inorgánico depende de la concentración de azufre pirítico y del azufre proveniente de los sulfatos en la solución, es por esto que se presentaron las mayores remociones de azufre en los tratamientos en que se usaron los medios de cultivo Kos y McCready.

Como se mencionó anteriormente, en presencia del consorcio se puede garantizar con mayor certeza que se logren altos porcentajes de oxidación de pirita con cualquiera de los medios de cultivo evaluados.

Se observa que el mayor porcentaje de remoción de azufre (%Biodesulfurización) de tipo inorgánico para la cepa pura ocurre en el bioensayo en que se usa el medio de cultivo McCready, y cuando se emplea un consorcio de bacterias acidófilas la suspensión con el medio Kos es la más adecuada para remover azufre. Estadísticamente la prueba ANOVA muestra que no existen diferencias significativas entre el tipo de medio de cultivo (valor p de 0.12), ni entre el tipo de inóculo (valor p de 0.24) que se use, sin embargo, a través de una prueba de Tukey se encuentra que estos resultados estadísticos anteriores, se deben a la alta similitud que existe entre los bioensayos con los medios Kos y McCready (valor p de 0.96) y no a que con el medio T&K se alcancen resultados igual de satisfactorios (T&K y McCready: valor p de 0.19; T&K y Kos: valor p de 0.14). Es por lo anterior que, se considera que los mayores porcentajes de remoción de azufre inorgánico se alcanzaron en los tratamientos con los medios Kos y McCready.

Tabla 3-3: Diferentes formas de azufre para los carbones tratados con los medios de cultivo T&K, Kos y McCready en presencia de la cepa pura (1) y el consorcio de bacterias acidófilas (2). T: T&K, K: Kos, M: McCready

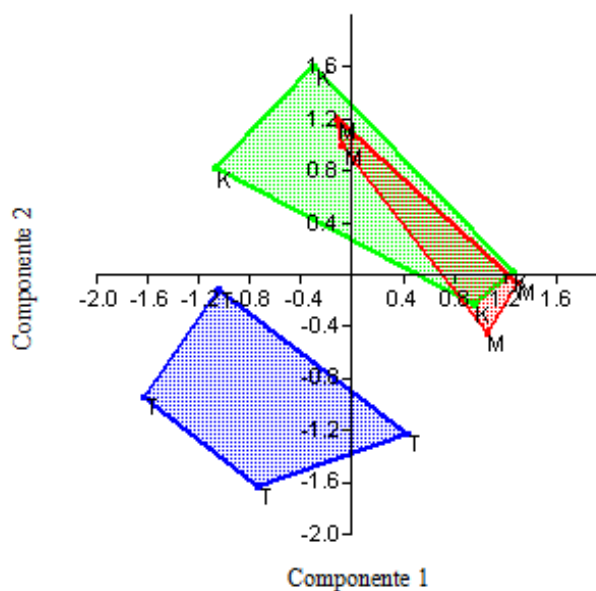
	%S _{pirítico}	%S _{sulfato}	%S _{inorgánico}	% Py _{oxidada}	% S _{removido}
Muestra de carbón inicial	1.02	0.31	1.33	--	--
T1	0.22	0.54	0.76	78.43	42.86 ±3.5
K1	0.14	0.50	0.64	86.27	51.88 ±3.4
M1	0.15	0.47	0.62	85.29	53.38 ±4.2
T2	0.16	0.68	0.84	84.31	36.84 ±2.0
K2	0.14	0.53	0.67	86.27	49.62 ±0.3
M2	0.16	0.53	0.69	84.31	48.12 ±0.9

Finalmente, en la Figura 3-26 se presenta el análisis multivariado de componentes principales (PCA) que se realizó a través del software PAST, con el fin de dar una mayor validez a las conclusiones que todas las variables pudieran aportar por separado (Oviedo, 2011). Esto buscó describir el proceso conservando la mayor cantidad posible de información, por lo cual se tuvo en cuenta variables como: concentración de hierro solubilizado durante el sexto, doceavo y decimoquinto día, la velocidad de oxidación, el porcentaje de hierro re-precipitado, porcentaje de pirita oxidada, concentración de iones

férricos en solución, pH, potencial de óxido - reducción, concentración celular y porcentaje de azufre inorgánico removido.

Para el análisis multivariado (Figura 3-26) se usó una matriz de correlación, ideal cuando se cuenta con un grupo de variables que presentan distintas unidades de medida (Oviedo, 2011). Los resultados de este estudio indican que el proceso de biodesulfurización genera distintas respuestas, si se lleva a cabo con bajas concentraciones (Kos y McCready) o altas concentraciones (T&K) de sulfatos presentes en los medios de cultivo.

Figura 3-26: Análisis multivariado de componentes principales, usando una matriz de correlación, para los medios de cultivo a base de sulfatos, en un proceso de biodesulfurización de carbón, usando la cepa pura y el consorcio de bacterias acidófilas. El color azul representa el medio T&K, el verde a Kos y el rojo a McCready



3.3.5 Análisis mineralógicos de las muestras tratadas

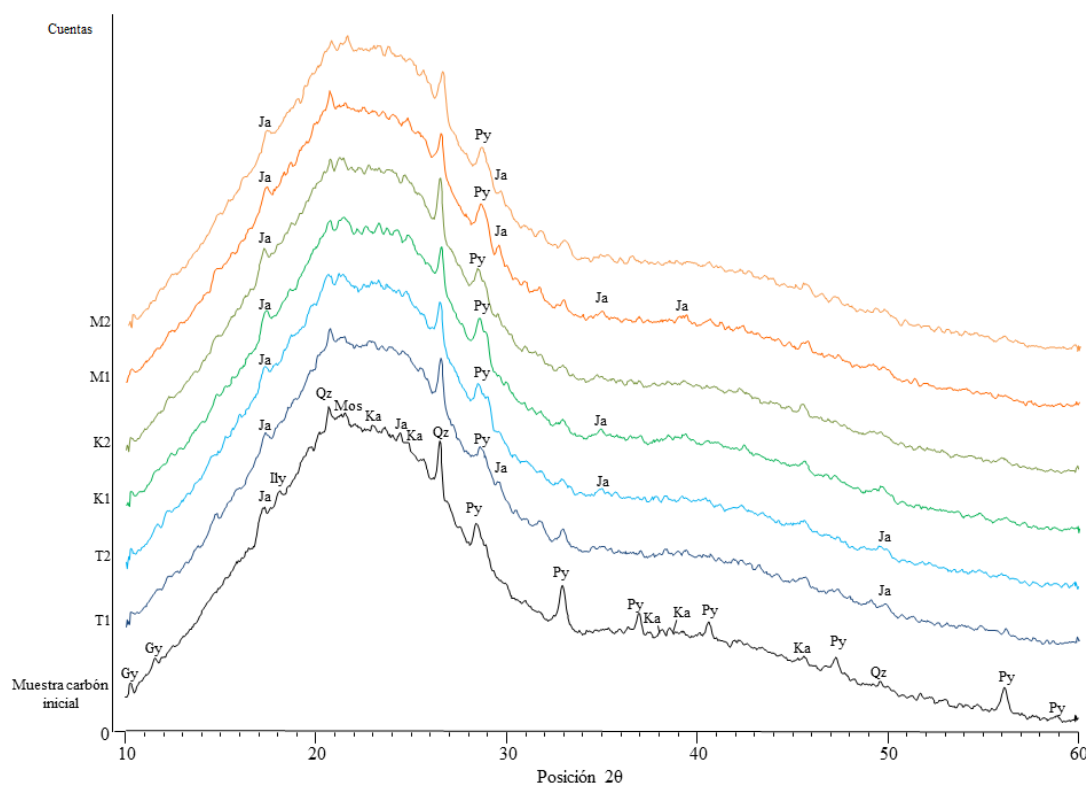
- **Difracción de rayos X**

Los espectros de difracción de rayos X para los ensayos usando la cepa pura y el consorcio, presentados en la Figura 3-27, permiten observar que debido a la baja concentración de pirita (1%) y de materia mineral en el carbón inicial, los picos no presentan intensidades altas y por tanto, es difícil poder identificar con los análisis de difracción, con cuál tratamiento los picos correspondientes a la pirita disminuyeron más y si hubo disolución de algunos minerales presentes en la muestra. A pesar de

esto, se observa que los picos asociados al mineral de pirita, casi que desaparecen durante los ensayos de biodesulfurización y que los pequeños picos correspondientes a la jarosita que se presentan en la muestra inicial, se acentúan durante el tratamiento y también, se observa la aparición de otros picos correspondientes a la presencia de este mineral.

Los picos de minerales como el cuarzo y la caolinita se conservan a lo largo del proceso, pero se observa desaparición de picos que corresponden a la illita (18°), el yeso (12°) en todos los tratamientos y la moscovita (21°) en el tratamiento McCready + cepa pura.

Figura 3-27: Difractograma de los ensayos de biodesulfurización de carbón usando la cepa pura y el consorcio en los medios de cultivo T&K, Kos y McCready. T1: T&K + cepa pura, T2: T&K + consorcio, K1: Kos + cepa pura, K2: Kos + consorcio, M1: McCready + cepa pura, M2: McCready + consorcio

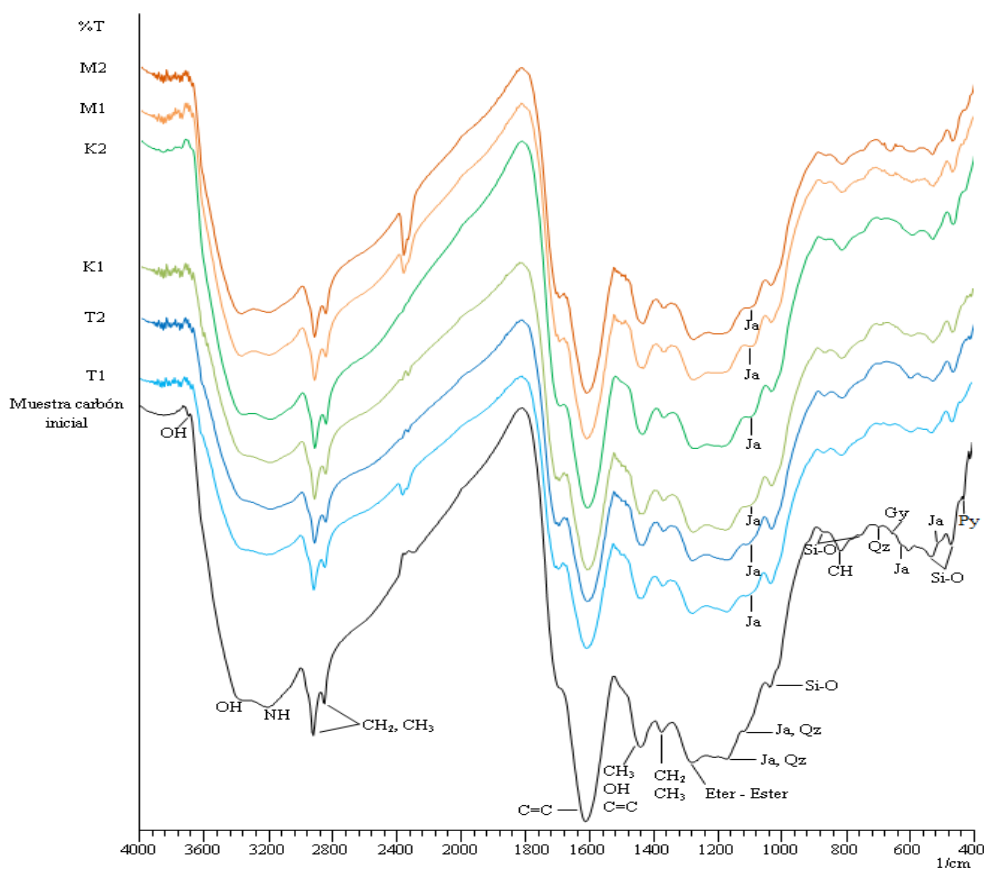


- **Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier**

En la Figura 3-28 se presentan los espectros de FTIR para las muestras de carbón oxidado biológicamente por la cepa pura y el consorcio. Este análisis permitió observar que la fracción

orgánica del carbón, representada por las bandas en 750 cm^{-1} , 810 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} , 1372 cm^{-1} , 1436 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} , permanecen invariables a lo largo del proceso de biodesulfurización con los medios T&K, Kos y McCready.

Figura 3-28: Espectros de FTIR para los ensayos de biodesulfurización de carbón usando la cepa pura y el consorcio en los medios de cultivo T&K, Kos y McCready. T1: T&K + cepa pura, T2: T&K + consorcio, K1: Kos + cepa pura, K2: Kos + consorcio, M1: McCready + cepa pura, M2: McCready + consorcio



Se observó en todos los ensayos que la presencia de jarosita existente en la muestra inicial se conserva y se evidencia que la banda en 1090 cm^{-1} aumenta durante los tratamientos.

Por otra parte, la banda correspondiente a la pirita (420 cm^{-1}) por encontrarse cerca al rango de barrido ($400\text{ cm}^{-1} - 4000\text{ cm}^{-1}$) impide que se observe con exactitud si esta disminuye, en comparación con la banda de pirita presente en la muestra de carbón original.

Finalmente, la bandas correspondientes al enlace Si-O que indica la presencia de minerales arcillosos y compuestos de sílice (como la caolinita, illita y moscovita), son de intensidades mayores a las observadas en la muestra inicial, especialmente las bandas en 864 cm^{-1} y 1032 cm^{-1} (esta última banda aumenta especialmente en los tratamientos con el medio T&K).

- **Microscopía Electrónica de Barrido**

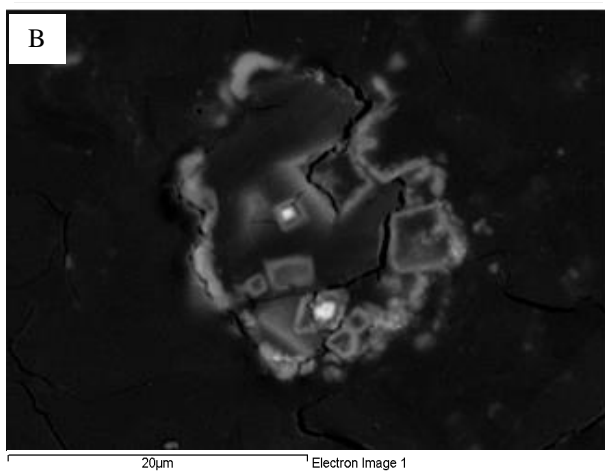
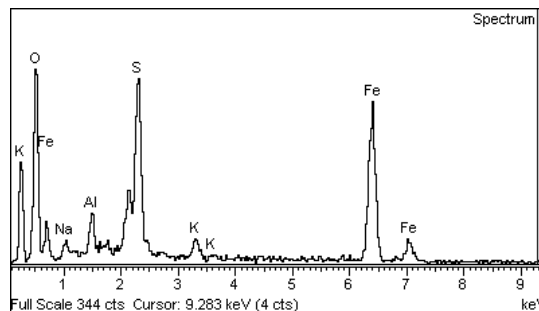
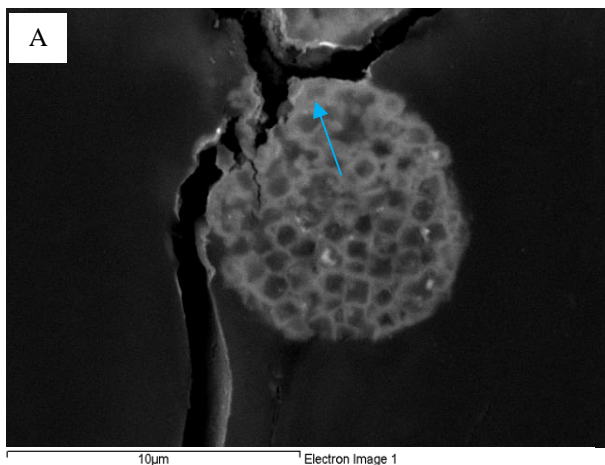
Medio de cultivo T&K

En la Figura 3-29, se presenta las micrográficas tomadas con SEM/EDS al bioensayo con el medio de cultivo T&K. A través de este análisis se observó que la disolución de la pirita ocurrió en la cercanía a las microgrietas de los granos de carbón y que los framboides de pirita se transformaron en pseudomorfos de jarosita (Figura 3-29A). Además, a partir del análisis microquímico (hecho en el lugar donde se señala con una flecha azul) se evidenció la formación de jarosita (K^*) y natrojarosita (Na^+), presentándose en mayor cantidad la natrojarosita. También se encontró un porcentaje de aluminio en esta zona de muestreo, lo que puede indicar que el ensayo T&K, contribuye a la precipitación de este elemento proveniente de los minerales arcillosos que contenía la muestra. La solubilización de Al y Si se también ha observado en otros trabajos de biodesulfurización de carbón (Malik et al., 2001; Malik et al., 2004).

Por otro lado, se apreció la corrosión de los cristales euedrales de la pirita que llegan casi hasta desaparecer, convirtiéndose en pseudomorfos de jarosita (Figura 3-29B). Todos los espacios vacíos de los granos de pirita, se consideran resultado de la disolución de la misma, durante el proceso de biolixiviación.

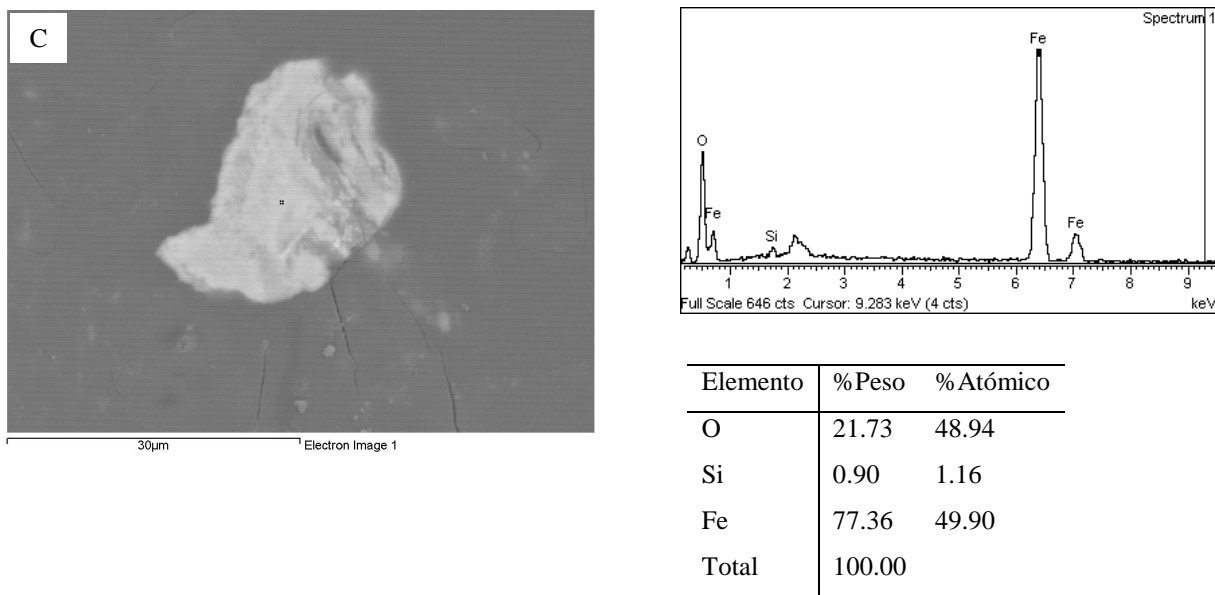
Adicionalmente, en la Figura 3-30 se muestra que en los tratamientos con T&K se dio la formación de goethita, mineral del grupo de los óxidos e hidróxidos, con un contenido del 50% de hierro, además de la aparición en la zona de muestreo de partículas de sílice. Es posible que la formación de la goethita, ocurriera en cercanías de zonas donde hay presencia de arcillas.

Figura 3-29: Micrografías de SEM en los bioensayos con el medio de cultivo T&K. Jarosita como pseudomorfo de pirita incrustada en un grano de carbón y su respectivo análisis microquímico EDS (A). Granos de pirita euhedrales corroídos con presencia de jarosita (B)



Elemento	%Peso	%Atómico
O	38.96	63.30
Na	2.68	3.03
Al	3.30	3.17
S	13.07	10.60
K	1.84	1.22
Fe	40.15	18.69
Total	100.00	

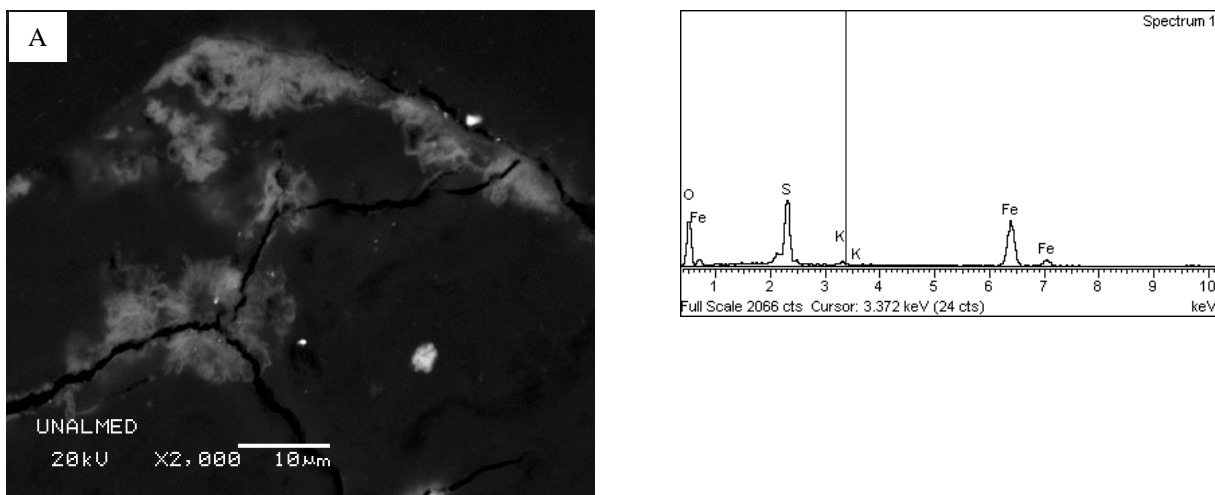
Figura 3-30: Hidróxido de hierro (Goethita), hallado en los bioensayos con el medio de cultivo T&K y su respectivo análisis microquímico EDS

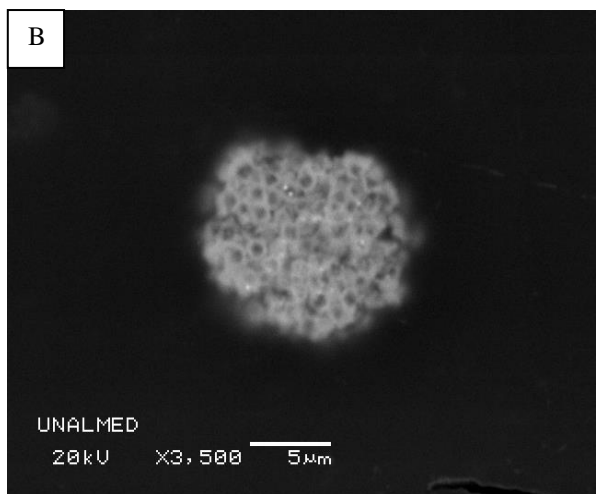


Medio de cultivo Kos

En la Figura 3-31, se presenta las micrografías tomadas con SEM/EDS al bioensayo con el medio de cultivo Kos. Se observó la formación de jarosita en la cercanía a las microfracturas de los granos de carbón (Figura 3-31A) y como pseudomorfo de las estructuras framboidales de pirita (Figura 3-31B).

Figura 3-31: Micrografías de SEM en los bioensayos con el medio de cultivo Kos. Formación de jarosita en las grietas de los granos de carbón y su respectivo análisis microquímico EDS (A). Jarosita como pseudomorfo de pirita (B).





Elemento	%Peso	%Atómico
O	36.38	62.09
S	18.26	15.55
K	0.87	0.61
Fe	44.49	21.76
Total	100.00	

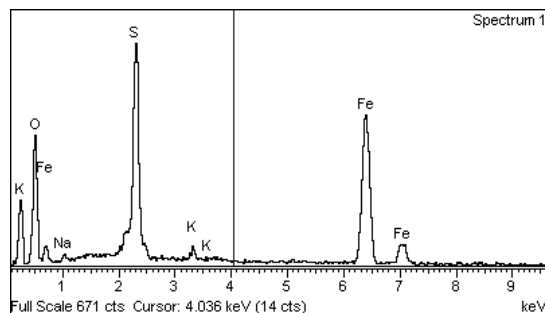
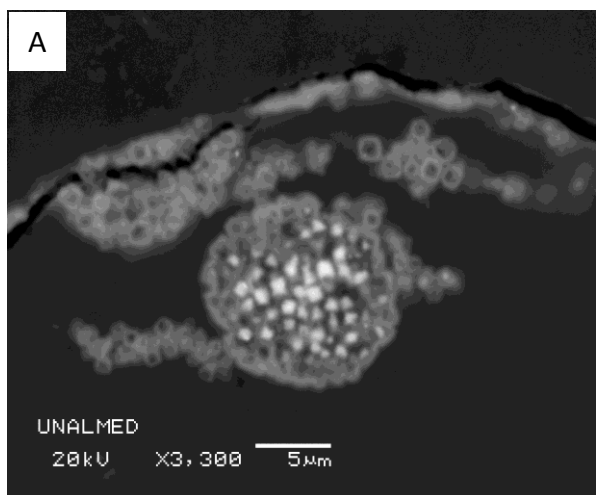
Medio de cultivo McCready

En la Figura 3-32, se presenta las micrografías tomadas con SEM/EDS al bioensayo con el medio de cultivo McCready. La transformación que ocurre durante un proceso de biolixiviación se representa de una buena manera en la Figura 3-32A, donde se observan granos de pirita sin corroer en un framboide y otras zonas donde se evidencia la disolución del mineral. La jarosita que ocupa la forma de la pirita disuelta, es principalmente natrojarosita como se evidencia en el análisis EDS. Se puede observar que la corrosión ocurrió en las cercanías a las grietas y en los bordes del framboide, como se vio con los ensayos T&K y Kos.

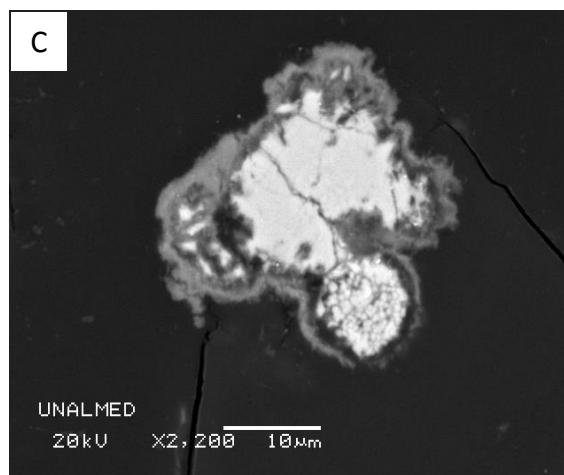
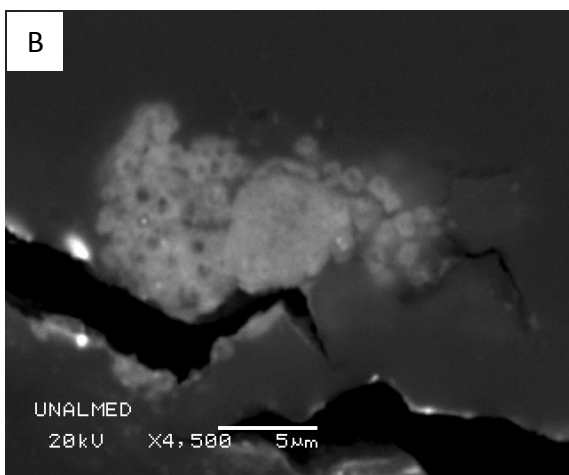
Se observó además, una alta presencia de framboides de mineral totalmente disueltos ocupados en su lugar por jarosita (Figura 3-32B), y asociados principalmente a la formación de microfracturas en el carbón.

Finalmente, en la Figura 3-32C, se aprecian los surcos de corrosión en el mineral, y la precipitación de jarosita alrededor, se observa a la pirita con una geometría no definida.

Figura 3-32: Micrografías de SEM en los bioensayos con el medio de cultivo McCready. Transformación de pirita frambooidal en pseudomorfo de jarosita y su respectivo análisis microquímico EDS (A). Jarosita, como pseudomorfo de pirita frambooidal (B). Pirita corroída, bordeada por capa de jarosita (C)



Elemento	%Peso	%Atómico
O	30.50	55.35
Na	1.66	2.09
S	18.33	16.59
K	1.03	0.76
Fe	48.49	25.20
Total	100.00	



3.4. Discusión

3.4.1 Adaptación de microorganismos

Durante los procesos de biolixiviación, las bacterias acidófilas están sujetas a ambientes de estrés que generan cambios en su temperatura óptima de crecimiento, pH y afectan su actividad y crecimiento. El estrés celular depende de factores como la disponibilidad de nutrientes, presencia de metales pesados, el estrés por cizalla que es propio de la presencia de finas partículas de mineral (Deveci, 2002), el cambio de una fuente de energía de fácil acceso (FeSO_4) por una más complicada de obtener (FeS_2),

además de que por su metabolismo aerobio se enfrentan al estrés oxidativo. Todos estos son aspectos determinantes en el correcto desempeño de las bacterias en procesos de biooxidación y debe por tanto, realizarse una adaptación bacteriana, ya que si los microorganismos se enfrentan a condiciones adversas sin un previo acondicionamiento, se puede generar muerte celular y afectar directamente el DNA, RNA, y biomoléculas fundamentales como las proteínas y los lípidos (Rodrigues et al., 2010).

El parámetro de potencial redox es un buen indicador del crecimiento celular y de la actividad de las bacterias en soluciones de lixiviación (Schippers y Sand, 1999). Se observó que el proceso realizado en una serie de subcultivos de concentraciones crecientes de pulpa, permitieron reducir la fase *lag* a pesar de que se observa un efecto negativo del carbón sobre el potencial redox. Esto se observó también en los trabajos realizados por Malik y colaboradores (2004) y Deveci (2002), quienes observaron que en ausencia de mineral la oxidación se lleva a cabo rápidamente, pero en presencia de este, el potencial redox disminuye y se ve reflejado en la oxidación y el crecimiento celular y que además este efecto negativo se hace más evidente al incrementarse la cantidad de pulpa en la solución. Considerándose por tanto que esta inhibición puede deberse a la obstrucción en la velocidad de transferencia de O₂ y CO₂ de la fase gaseosa a la fase líquida, o la destrucción de las células microbianas por desgaste. El efecto negativo del mineral sobre el potencial redox puede deberse también a la disolución de ciertas especies metálicas que al ser tóxicas generan inhibición en el crecimiento y capacidad lixivadora de los microorganismos (Bosecker, 1997).

No obstante, el proceso en repiques sucesivos parece ser efectivo cuando el medio a evaluarse no presenta muchas diferencias con el medio o las condiciones ambientales en que han venido creciendo los microorganismos. No existe un protocolo específico, y son múltiples las metodologías y períodos que pueden emplearse con el fin de adaptar las células, pero se considera que el método en series de subcultivos permite alcanzar buenos resultados, sin que las bacterias sean sometidas a condiciones elevadas de estrés y cambios drásticos. Un acondicionamiento paulatino ha mostrado ser un mecanismo bastante apropiado, como lo han propuesto otros investigadores (Das et al., 1997; Natarajan et al., 1994; Brahma Prakash et al., 1988).

3.4.2 Ensayos de Biodesulfurización de carbón

Los medios de cultivo que fueron evaluados en este aparte, se seleccionaron con base en lo propuesto por Rossi (1990) para trabajos similares. Se planteó el uso de medios de cultivo con concentraciones de nutrientes más bajas que las que se presentan en el medio T&K (comúnmente usado en procesos de oxidación), buscando de esta manera reducir las precipitaciones sobre la superficie del mineral, ya que

una alta presencia de sulfatos en las disoluciones contribuyen a la formación de hidroxisulfatos de hierro como la jarosita, que genera efectos adversos sobre la transferencia de masa y la efectividad de los procesos de biodesulfurización de carbón (Kaksonen, 2014; Nurmi, 2010).

Además del criterio de selección anterior, se decidió trabajar con el medio de cultivo Kos, que carece de fuente de magnesio, con el fin de evaluar el papel de dicho elemento sobre la actividad de los microorganismos dentro del proceso de biodesulfurización de carbón. Al ser este elemento fundamental en los procesos de división y crecimiento celular, se buscó evaluar este parámetro, para observar cómo influía la concentración celular en el proceso.

A partir del comportamiento del pH a través del tiempo para la cepa pura y el consorcio (Figuras 3-9 y 3-16), se observó que los medios de cultivo presentaron un incremento significativo en este parámetro los primeros días del proceso. No se considera que haya sido debido al consumo de protones que trae consigo la oxidación biológica de iones ferrosos, ya que este incremento inicial también se evidenció en los controles abióticos, lo que permite pensar que es la presencia de arcillas en el mineral el factor que contribuye a que se produzca este aumento en dicho parámetro. La presencia de minerales arcillosos en la muestra de carbón, como la caolinita e illita, se evidenciaron en los análisis de DRX, FTIR y a partir de la segunda derivada del espectro de infrarrojo. Estos minerales se caracterizan porque en la parte más externa de su estructura (vértices) se encuentran grupos hidroxilo u oxígeno, lo que hace que puedan generar fácilmente sustituciones iónicas (intercambio iónicos) en las disoluciones (López, 2012), enlazándose con los protones y contribuyendo al incremento inicial del pH (Manafi, 2002; Sarcheshmehpour et al., 2009). Como plantean Fitzpatrick y Shand (2008), las arcillas al disolverse consumen ácido. Chen y colaboradores (2013), exponen que en soluciones ácidas las arcillas adsorben preferiblemente iones H^+ que otro tipo de iones metálicos, dejando en solución los metales pesados. Y Tremolada (2011) por su parte observó que al ser las arcillas estructuras cargadas negativamente y por tanto, altamente reactivas, atrapan los cationes para balancear su carga, afectando la efectividad del proceso.

Se observa la importancia de la bacteria *A. thiooxidans* como generadora de ácido sulfúrico (Kamimura et al., 2005), ya que después del aumento inicial de pH en las suspensiones con la cepa pura, no se generaron protones suficientes para acidificar las suspensiones, posiblemente debido a la ausencia de esta bacteria oxidante de azufre y la baja concentración de pirita (1%) en la muestra de carbón. Mientras que, en los tratamientos con el consorcio si se observa una disminución del pH durante el proceso, que pudo ocurrir por la generación de protones durante la hidrólisis de iones

férricos, la solubilización de pirita, las precipitaciones de hidróxidos y jarosita (Kaksonen et al., 2014; Casas et al., 2000), pero principalmente, por la presencia de *A. thiooxidans*.

Adicionalmente, se apreció que el incremento inicial en el pH fue mayor en los tratamientos Kos y McCready, sin importar el tipo de inóculo usado. Es posible que esto se haya debido a un problema de solubilidad químico en los bioensayos con T&K, y que se evidenció en los controles abióticos de dicho tratamiento, al producirse una rápida precipitación del hierro solubilizado químicamente (Figuras 3-12 y 3-19). Así, se considera que altas concentraciones de sulfatos (T&K) en los medios de cultivo pudieron promover la formación de precipitados, lo que a su vez pudo conllevar a la producción de protones. Esta fuente adicional de H^+ en los tratamientos con T&K fue entonces, la que hizo que en estas suspensiones el pH se mantuviera un poco más bajo de lo que se observó al inicio del proceso en los ensayos Kos y McCready.

Por otro lado, la concentración de hierro en solución (Figuras 3-12 y 3-19) es un parámetro que permite obtener datos cuantitativos iniciales, a cerca de cuánta pirita durante los bioensayos ha sido solubilizada del carbón en cada uno de los tratamientos. A través de las cinéticas y la evaluación estadística se encontró que en los ensayos Kos y McCready se promueve una mayor solubilización de hierro en el proceso de biodesulfurización, sin importar el tipo de inóculo que se use.

Se encontró además, en los controles abióticos, un pequeño porcentaje de hierro en solución, debido probablemente a la disolución del hierro no pirítico presente en la muestra de carbón inicial por la acidez del medio. En contraste, la pirita no es un mineral soluble en ácido y la imposibilidad de regeneración de iones férricos en estas suspensiones abióticas, brindan elementos para decir que la pirita es únicamente disuelta cuando en el ambiente existen bacterias oxidantes de iones ferrosos (Schippers, 2007; Rohwerder y Sand, 2007).

Esta disolución de hierro al inicio del proceso en los controles abióticos, permite pensar que la solubilización que ocurre al primer día en los ensayos bióticos pudo ser netamente química. Y el hecho de que en los controles de los ensayos Kos y McCready la solubilización se mantuviera alrededor del 10% durante todo el proceso, mientras que en el control para el ensayo T&K, después de la solubilización inicial se generara problemas de precipitación, brinda evidencias del problema de solubilidad químico que probablemente se presentó en medios de cultivo con altas concentraciones de sulfatos. Esto da indicios de que las concentraciones de sulfatos en el medio de cultivo T&K pudieron inducir más fácilmente la formación de precipitados.

Estos problemas de re-precipitación de hierro ocurrieron en los primeros días del proceso (Figuras 3-13, 3-20 y 3-24), cuando apenas iniciaba la solubilización y oxidación del mineral. Se considera que el incremento de pH inicial pudo tener un fuerte efecto en este parámetro, ya que valores cercanos a 1.90 producen una extensión en la precipitación de compuestos como la jarosita (Gómez y Cantero, 2005).

Estos problemas de solubilidad se comprueban también con los análisis de diferentes formas de azufre, en especial porque en los bioensayos T&K se obtuvo una mayor precipitación de azufre en forma de sulfatos, y en el hecho de que en estas suspensiones se haya presentado una menor concentración de iones férricos en solución, ya que una disminución en la concentración de hierro puede estar relacionada con la remoción de iones como precipitados de jarosita (Kiani et al., 2014).

A pesar de que se considera que fue en el tratamiento T&K donde se presentó la mayor tendencia a la precipitación, la generación de jarosita se observó en todos los bioensayos. La re-precipitación final de hierro en el presente trabajo fue de alrededor del 38% en todos los tratamientos (Figura 3-24), y es similar a lo que ha sido obtenido en otras investigaciones, como la de Nurmi y colaboradores (2010), donde en un proceso de oxidación biológica de sulfuros de bajo grado, se observaron precipitaciones entre el 30% y el 40%. La formación de este hidroxisulfato de hierro es altamente negativa en este tipo de procesos y debe tratar de evitarse al máximo, ya que perturba de forma directa la cinética del proceso, debido a que al formarse se precipita sobre la superficie de los minerales, creando una barrera física e impidiendo la correcta difusión de reactivos y productos durante la biolixiviación (Kaksonen et al., 2014; Kim et al., 2008; Gómez y Cantero, 2005; Jensen y Webb, 1995).

Con base en lo anterior se puede deducir que a pesar de los múltiples esfuerzos que se realicen para tratar de impedir la formación de este tipo de compuestos indeseables, la precipitación de hierro siempre ocurrirá en estos procesos, por la biooxidación de sulfato ferroso y la presencia de concentraciones de protones en la solución (Casas, 2000), además de que es un resultado de los incrementos en el pH a elevados potenciales rédox (Kiani et al., 2014).

La comprensión a cerca de todos los fenómenos que ocurren durante el proceso y de cómo es exactamente la disolución y precipitación de los diferentes iones en el sistema de biolixiviación, se dificulta enormemente por la gran cantidad de cationes (H^+ , Fe^{2+} , Fe^{3+} , NH_4^+ , K^+ , etc) y aniones metálicos (SO_4^{2-}) presentes (Casas, 2000). Parámetros como el pH, la temperatura, la razón Fe^{3+}/H^+ , las concentraciones de hierro, metales y sulfato, definen la concentración de los diferentes iones y los precipitados que se forman en la disolución (Kaksonen et al., 2014; Filippou, 1995; Toro et al., 1988).

A partir del comportamiento de oxidación de la pirita con el tiempo (Figuras 3-14 y 3-21), se observó que en todos los tratamientos al noveno día del proceso, se alcanza una oxidación del mineral aproximada del 75%, lo cual se relaciona con el período de crecimiento exponencial bacteriano, basado en los valores obtenidos de potencial rédox (Figuras 3-10 y 3-17) y el crecimiento celular (Figuras 3-11 y 3-18).

En todos los tratamientos se generó un contexto adecuado para la oxidación de la pirita, las cinéticas del potencial rédox lo ponen de relieve, ya que, este parámetro se relaciona con el par Fe^{3+}/Fe^{2+} en soluciones ricas en ácidos de hierro y se considera que si esta relación aumenta se favorece la biolixiviación (Rohwerder y Sand, 2007; Gleisner et al., 2006). Valores por encima de 600mV se alcanzaron en todos los tratamientos y por tanto, indican que las bacterias presentaron una buena actividad oxidativa y existe un ambiente favorable para la solubilización del mineral sulfurado (Schippers y Sand, 1999). Los resultados de los ensayos bióticos contrastan con sus respectivos controles abióticos, los cuales presentan valores por debajo de los 430 mV, lo que indica que en estas suspensiones se presentó un ambiente de bajo poder oxidativo (Hiroyoshi et al., 2007).

Durante este proceso se logró una alta solubilización de pirita (86% en los bioensayos Kos), pues en anteriores trabajos realizados en el mismo grupo de investigación, con carbones colombianos, se llegó a oxidaciones del 68% (Caicedo y Márquez 2010), 63% (Caicedo et al., 2011), 59% (Caicedo et al., 2012), 74% (Peláez et al., 2013) y 96% (Cardona y Márquez 2009). Sin embargo, este último trabajo se realizó con un tamaño de partícula pasante malla 200 ($75\mu m$), un grano mucho más pequeño del que se usó en esta investigación ($250\mu m$), lo cual contribuyó a aumentar el área superficial en contacto y facilitar así, el proceso de lixiviación. Los resultados obtenidos durante esta investigación indican que el proceso obtuvo mejores tasas de oxidación de las que hasta el momento se han logrado en nuestro país.

Los resultados también son satisfactorios si se comparan con otras investigaciones. Andrews y Maczuga (1984) lograron remover 90% de la pirita en 10 días, usando un tamaño de partícula $150\mu m$. Jorjani y colaboradores (2007), alcanzaron un 91.58% de oxidación en 11 días, con un porcentaje de pulpa del 5% (w/w) y usando un tamaño de partícula de $180\mu m$. He y colaboradores (2012) usando *Acidithiobacillus caldus* lograron remover el 47% del azufre pirítico a nivel de erlenmeyer en 30 días.

De otra parte, se observa en los tratamientos en presencia de la cepa pura, que cuando se usan los medios de cultivo Kos y McCready se alcanzan bajas concentraciones bacterianas (Figura 3-11). Es probable que las concentración de nutrientes en los medios de cultivo Kos y McCready no sean

suficientes para la bacteria o que se haya visto disminuida esta concentración por la jarosita que al formarse eliminó parte de los nutrientes de los medios de cultivo (Kiani et al., 2014).

La disminución de los nutrientes, en los ensayos Kos y McCready, permite observar que aunque se presenta crecimiento bacteriano, es probable que este no sea el óptimo. Los microorganismos requieren, por tanto, de una mezcla compensada de nutrientes y si alguno de ellos llega a faltar o se ve limitado, el crecimiento microbiano disminuye y es independiente de la concentración de las demás materias primas en los medios de cultivo (Rossi, 1990).

Adicionalmente, en el ensayo Kos, la ausencia del aporte de magnesio en este medio de cultivo, pudo haber influido en que se generaran bajas concentraciones celulares de la bacteria pura. Ya que se considera que el máximo crecimiento de los microorganismos depende entre muchos factores, de la concentración de magnesio óptima en el medio, más si se trata de un medio de cultivo simple (Lodge y Hinshelwood, 1939). A pesar de que se ha encontrado que el requerimiento de magnesio para las bacterias gram-negativas, es diez veces menor, que el que requieren bacterias gram-positivas (Webb, 1949), este elemento parece ser fundamental para la síntesis de material celular y desempeña un papel importante en la división celular (Webb, 1949).

Por otra parte, en los ensayos en presencia del consorcio, contrario a los que se observó con la cepa pura, es en los tratamientos Kos y McCready que se logran las más altas concentraciones bacterianas. Y además, se observa que para todos los tratamientos se lograron mayores densidades bacterianas cuando se usó el consorcio y no la cepa pura, lo que puede ser debido al azufre que se adicionó a estos cultivos, como fuente de energía para *A. thiooxidans*. Ya que se ha encontrado que el crecimiento sobre azufre induce nuevas proteínas en las células de *A. ferrooxidans* que también están creciendo sobre una fuente de hierro (Ohmura et al., 1996). Las bacterias sintetizan enzimas, expresan o reprimen ciertas vías metabólicas dependiendo de la fuente de energía sobre la cual estén creciendo y esto afecta o causa diferencias en su crecimiento (Karavaiko et al., 2002; Aguirre, 2012). Por tanto, la presencia azufre en los tratamientos con el consorcio, pudo contribuir a que fueran expresadas ciertas enzimas en las bacterias, que promovieron un mayor crecimiento celular, neutralizando o minimizando probablemente el efecto de la falta de magnesio y las bajas concentraciones de nutrientes en los ensayos Kos y McCready.

El Eh (representa la relación Fe^{3+}/Fe^{2+}) en este punto, parece haber jugado un papel fundamental, ya que se considera que valores altos de este parámetro permiten que el azufre elemental adicionado a las suspensiones con el consorcio no formen barreras sobre la capa del sulfuro, es decir, contribuyen a que el azufre presente no genere inhibición en el proceso de biolixiviación (Rohwerder y Sand, 2007).

Dado que se ha observado durante procesos de oxidación de esfalerita, que a bajos potenciales redóx, en ausencia de bacterias oxidantes de azufre, la velocidad de lixiviación disminuye al generarse capas de azufre sobre el mineral, reduciendo la velocidad de difusión de los iones y el oxígeno (Bevilaqua et al., 2002). Esto puede explicar por qué con los consorcios el porcentaje de azufre adicionado (0,05% w/v) no representó ser una fuente muy significativa de azufre proveniente de los sulfatos que pudiera generar precipitación, en comparación con la cepa pura (Tabla 3-3).

Otro factor importante que pudo aportar en la obtención de una mayor concentración celular con el consorcio bacteriano, es el hecho de que el fosfato estimula el crecimiento y la oxidación de hierro sobre bacterias creciendo en presencia de azufre (Harahuc et al., 2000). El fosfato es requerido para el funcionamiento normal de la célula y para que no se vea afectada la división celular por la alteración de varias proteínas bacterianas (Seeger y Jerez, 1992; McCready, 1986). Esta capacidad potenciadora del fosfato no se evidencia en los bioensayos con la cepa pura, porque se ha encontrado que el efecto de este elemento en ausencia de azufre puede causar inhibición en la oxidación y el crecimiento (Harahuc et al., 2000; Ramirez et al., 2004).

En investigaciones anteriores (Rossi, 1990) se ha dicho que la obtención de altas velocidades de crecimiento de los microorganismos puede asegurar que se presenten buenas velocidades de oxidación y solubilización de los minerales. Sin embargo, de acuerdo a los resultados de este estudio se puede pensar como han determinado otros investigadores, que la concentración bacteriana no afecta la oxidación de pirita cuando esta es mayor de 10^6 células/mL (Gleisner et al., 2006; Olson, 1991; Myerson, 1981). Esto debido a que en los ensayos Kos y McCready, en particular usando la cepa pura, se obtuvo la menor concentración bacteriana y sin embargo, durante todo el proceso se presentaron en estos ensayos las más altas concentraciones de iones férricos en solución (Figuras 3-15 y 3-22), lo cual es altamente beneficioso para el proceso, ya que estos son los agentes químicos que solubilizan el mineral (Gleisner et al., 2006; Crundwell, 2001). Es decir, en las suspensiones Kos y McCready se generó un ambiente más oxidativo, superior al que se observó en los bioensayos T&K. Como se mencionó anteriormente, la baja concentración de iones férricos en las suspensiones T&K, puede estar relacionada con una alta remoción de iones como precipitados (Kiani et al., 2014).

Hay una fuerte importancia de que en las suspensiones se generan altas concentración de iones férricos, ya que estos están relacionados con la capacidad de adhesión de las células a la superficie de los minerales. La alta concentración de iones férricos en las suspensiones acelera la degradación del sulfuro, ya que contribuye a que aumente la cantidad de estos iones en la interfase mineral/células o EPS (membrana polimérica extracelular), y favorece la adherencia de una mayor cantidad de bacterias

al mineral, acelerando así el proceso de disolución (Gómez y Cantero, 2005; Kinzler et al., 2003; Sand et al., 1999).

En definitiva, podría decirse por tanto, que la velocidad de solubilización de la pirita no depende de que en la suspensión exista una alta población bacteriana, sino que dicha población presente una buena actividad regeneradora de iones.

El hecho de que con los medios de cultivo Kos y McCready no se presentaran en todos los tratamientos altas concentraciones bacterianas y sin embargo, se alcanzaran valores altos de Eh (oxidación de ion ferroso) y oxidación de pirita, podría determinar que la cantidad de células presentes en las suspensiones de biolixiviación no determinan el grado de oxidación sino otros factores como mantener la razón Fe^{3+}/Fe^{2+} alta en el medio. Es decir, existe una mayor influencia del ataque químico (mecanismo indirecto) durante este tipo de procesos.

El proceso de biolixiviación efectivamente disminuyó el contenido de azufre inorgánico presente en la muestra inicial de carbón. Se alcanzaron durante este proceso, porcentajes de biodesulfurización de las formas inorgánicas del carbón que van del 37% al 53% (Tabla 3-3). En trabajos similares de investigación se logró remover el 50% del azufre total, durante 30 días, usando un 5% (w/w) de pulpa y un 15% (v/v) de inóculo inicial (Kiani et al., 2014).

A pesar de que estadísticamente no se encuentran diferencias estadísticas significativas bajo la prueba ANOVA para ninguno de los factores evaluados (tipo de inóculo y tipo de medio de cultivo) en parámetros fundamentales como el porcentaje de hierro re-precipitado, el porcentaje de pirita oxidada y el porcentaje de azufre inorgánico removido, las pruebas de Tukey y el Análisis multivariado evidencian que si hay una clara diferencia entre los medios de bajas (Kos y McCready) y altas (T&K) concentraciones de sulfatos.

Es importante resaltar la gran capacidad de las bacterias evaluadas para adaptarse a medios de cultivo muy simples, con concentraciones de nutrientes mínimas e incluso en ausencia de algunos de ellos (como es el caso del magnesio). Los resultados muestran que para un proceso de biodesulfurización de carbón, con cualquiera de los tratamientos evaluados, se alcanzan buenas oxidaciones del mineral, sin embargo en medios con altas concentraciones de sulfatos se incentivan los procesos de re-precipitación y no se alcanzan remociones de azufre como las que se alcanzan en los medios con bajas concentraciones de sulfatos, debido a que la formación de jarosita se promueve a altas concentraciones de iones Fe^{3+} y SO_4^{2-} (Gramp et al., 2008; McCready, 1986).

La actividad lixiviadora de las bacterias oxidantes de sulfuros metálicos, es selectiva dependiendo de la manipulación y control que se ejerza sobre el medio de cultivo (Harahuc et al., 2000).

Finalmente, en vista de los buenos resultados obtenidos en los ensayos Kos y McCready, se pueden considerar como una buena opción, que a nivel de un proceso industrial ayudaría en la reducción de costos.

3.4.3 Caracterización de muestras de carbón tratadas

El alto poder calorífico de la muestra de carbón que se evaluó, permitió que sea un mineral apto para combustión. Sin embargo, su alto porcentaje de azufre es el principal inconveniente, ya que genera problemas con la normativa en cuanto a emanaciones de SO_x a la atmósfera. Carbones con estas características son usados en procesos de licuefacción (combustible líquido) pero cuando se desea usar definitivamente como combustible sólido, se requiere realizar primero la eliminación o reducción de su contenido de azufre, mediante la mezcla con carbones de menores contenidos de azufre o con pre-tratamientos, como es el caso de la biodesulfurización.

Las técnicas de caracterización DRX, FTIR y SEM han sido usadas durante un gran número de estudios con el fin de conocer cómo ocurre el proceso de disolución de los minerales en presencia de bacterias acidófilas como biocatalizadores (Ribeiro et al., 2010; Maity y Mukherjee, 2006; Sampson et al., 2000). El uso de estas metodologías, permitió identificar que la muestra de carbón está compuesta por materia orgánica y minerales como arcillas (moscovita, illita, caolinita), cuarzo, yeso, piritita y pequeñas concentraciones de sulfatos precipitados (jarosita). En otro tipo de investigaciones, también se encontró la asociación de estos minerales con carbones provenientes de Portugal (Ribeiro et al., 2010).

A través de las técnicas de caracterización empleadas y en especial de la técnica de microscopía SEM/EDS, se observó en la muestra de carbón inicial que la relación estequiométrica de los elementos es acorde con la piritita, al no existir elementos adicionales en solución sólida se contó con un mineral puro (Figuras 3-4, 3-5 y 3-6).

A través de la técnica FTIR se pudo observar que durante un proceso de biodesulfurización de carbón, empleando este tipo de bacterias acidófilas no se afectó la matriz carbonosa y por tanto el contenido energético del mineral (Tuovinen y Fry, 1993), ya que se evidenció claramente que los enlaces aromáticos, éteres, ésteres y todos los enlaces relacionados con la fracción orgánica del carbón permanecieron invariables durante el proceso con cualquier tipo de tratamiento.

La fuerte corrosión que se observó en los granos de pirita a través de las micrográficas de SEM de los carbones tratados, pudo estar principalmente asociada a la presencia de fracturas y grietas al interior de los granos de carbón y a la presencia de estructuras framboidales del sulfuro. Esto posiblemente fue debido a que, a través de las fracturas se inicia el proceso oxidativo, donde se pudieron facilitar los procesos de difusión y el contacto del mineral con los diferentes iones y microorganismos involucrados en la disolución (Gleisner et al., 2006; Hone et al., 1987). Se considera además, que al presentar las grietas una cierta ‘rugosidad’, los microorganismos probablemente colonizaron con mayor facilidad estas superficies, ya que les brindan cierta protección ante las fuerzas de cizalla y el estrés hidrodinámico que se producen en las bacterias ante el contacto con partículas de minerales (Donlan, 2002). Las estructuras framboidales por su parte, al ser altamente porosas, debido a que están conformadas por pequeños microcristales, proporcionan incrementos en el área superficial, lo cual pudo haber facilitado la transferencia de masa y el ataque bacteriano (Donlan, 2002).

Se ha observado, que la disolución del sulfuro metálico no se produce al azar. Estudios a través de imágenes tomadas por microscopia de fuerza atómica (AFM), mostraron que los microorganismos atacaron con un 80% más de posibilidades los sitios que presentaban imperfecciones en la superficie del mineral, debido a diferentes fuerzas atrayentes que surgen probablemente de los iones metálicos y del azufre liberados más fácilmente a través de las grietas (Kinzler et al., 2003; Rodriguez-Leiva y Tributsch, 1988).

Se ha encontrado que la presencia de quimio-sensores (quimiotaxis) en bacterias como *A. ferrooxidans*, les permiten dirigirse preferiblemente a las grietas en los granos y reaccionar ante diferentes gradientes de iones ferrosos y férricos (Acuña et al., 1992; Meyer et al., 2002). La pirita al ser un sulfuro cargado negativamente permite que la bacteria sea atraída a lugares como los ánodos locales donde se lleva a cabo la oxidación, en una celda galvánica (Rohwerder y Sand, 2007), ya que cuando las bacterias crecen sobre sulfato ferroso o pirita, incorporan en su pared de exopolisacáridos externa (EPS), ácidos urónicos y iones férricos, haciendo que la superficie celular sea cargada positivamente (Sharma et al., 1999).

La forma euedral de la pirita, durante el proceso de biodesulfurización se va desgastando desde sus bordes hasta el interior del grano, perdiendo de esta manera su geometría de caras muy bien definidas. Se observan claros surcos de corrosión, comparados con las formas halladas en la muestra de carbón inicial. Y se evidencia, asociada a la biolixiviación del sulfuro, la acumulación o generación de precipitados sobre los bordes y la superficie de los granos disueltos de pirita, como se ha presentado en otras investigaciones (Kiani et al., 2014; Sampson et al., 2000).

Las jarositas que se encontraron en las muestras tratadas, deducidas a partir de los análisis químicos, mostraron una producción predominante en las formas de jarosita de potasio y sodio (Figuras 3-29, 3-31, 3-32), como ha sido observado en trabajos de biooxidación de sulfuros metálicos sin control de pH, mediante la técnica de DRX, donde se ha puesto de relieve la formación predominante de natrojarosita (Na^+) (Kaksonen et al., 2014; Nurmi et al., 2010; Gaboreau y Vieillard, 2004; Dutrizac y Jambor, 2000).

Ya que en este estudio no se contaba en los medios de cultivo con una fuente que pudiera aportar sodio a las suspensiones, se considera que estos iones fueron disueltos de la fracción mineral, ya que se ha observado la fácil liberación de Mg, K, Ca y Na de los silicatos (Kalinowski y Schweda, 2007; Metz et al., 2005). Este resultado puede estar indicando que a pesar de que la albita no haya sido identificada mediante la técnica de DRX, probablemente por la baja concentración en que se encontraba, las bandas identificadas con la segunda derivada del espectro de infrarrojo y las bandas de los enlaces Si-O encontradas a través de la técnica FTIR, efectivamente pueden estar indicando la presencia de este tipo de minerales, como fuente de sodio en los distintos tratamientos.

La estabilidad de las jarositas de acuerdo a la energía libre de Gibbs se presenta en el orden $\text{K}^+ > \text{Na}^+ \sim \text{H}_3\text{O}^+ > \text{NH}_4^+$ y por tanto, la formación de potasio jarosita durante este tipo de procesos normalmente es la forma predominante, sin embargo parece haber también una fuerte formación de natrojarosita (Gaboreau y Vieillard, 2004; Dutrizac y Jambor, 2000; Kaksonen et al., 2014). Puede que los iones de sodio superaran más fácilmente el límite de solubilidad en las suspensiones ácidas, que los iones de potasio y de amonio. Debido a que la solubilidad de las jarositas obedece a los equilibrios iónicos entre complejos de sulfatos, y especies como HSO_4^- y H^+ (Casas et al., 2007). Este resultado parece estar indicando que la efectividad de la biolixiviación no solo depende del tipo de medio de cultivo en que se lleve a cabo el proceso, sino que es fuertemente influenciado por la composición y concentraciones de los diferentes minerales que estén asociados al carbón evaluado.

De otro lado, aunque a través de la técnica de DRX se dio un indicio de que la muestra contenía silicatos como la moscovita, la illita y la caolinita, no se tenía mucha seguridad al respecto, debido a que su baja concentración (inferior al 5%), no permitió que se lograra una intensidad alta de los picos en el background (Nurmi et al., 2010; Mojica, 2008). Sin embargo, a través de los análisis químicos SEM/EDX y la segunda derivada del espectro de infrarrojo, se puede comprobar la existencia de dichos minerales y de feldspatos como la albita, ya que se observa la precipitación de iones de sodio y aluminio en las distintas suspensiones. Wang y colaboradores (2006), también han identificado la presencia de minerales arcillosos asociados al carbón.

Adicionalmente, se identificó la formación del óxihidróxido de hierro (goethita) en el tratamiento T&K. Este tipo de precipitaciones son comunes cuando en la disolución existen iones férricos (Casas, 2000) y ya se han detectado en otros trabajos, trazas de goethita en drenajes ácidos de minas y suelos sulfato-ácidos (Brady et al., 1986). Además se considera que incrementos en los valores de pH en medios oxidantes, hacen que la jarosita sea inestable y se transforme en óxidos de hierro aunque este proceso sea muy lento debido a su baja solubilidad (Brown, 1971).

3.5. Conclusiones Preliminares

Durante todos los tratamientos de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer (Kos, McCready y T&K), se creó un ambiente altamente oxidativo (Eh) y se alcanzaron buenos porcentajes de solubilización de pirita.

La sensibilidad de la bacteria a altas concentraciones de pulpa, cambios en su fuente de energía y variaciones en las concentraciones de los medios de cultivo, puede ser minimizada a través de etapas de adaptación y series de subcultivos, que permiten mejorar el crecimiento y la actividad oxidativa de las células.

La oxidación de pirita no depende tanto de que en la suspensión exista una alta concentración celular, sino que dicha población presente una buena actividad oxidativa.

Las bacterias acidófilas empleadas en el proyecto fueron capaces de sobrevivir y crecer bajo condiciones limitadas de nutrientes.

La concentración celular no es un factor determinante en el alcancé del proceso. Para lograr altos porcentajes de oxidación de pirita y de remoción de azufre inorgánico, es más importante que en la suspensión exista una relación Fe^{3+}/Fe^{2+} alta, lo que a su vez favorece el mecanismo indirecto de biolixiviación.

El azufre elemental adicionado a los tratamientos con el consorcio, contribuyó a activar la síntesis de enzimas relacionadas con el crecimiento de las bacterias acidófilas, minimizando el efecto de la baja cantidad de nutrientes y ausencia de ellos en los medios de cultivo Kos y McCready. Además, dicho compuesto permitió que los iones de fosfato estimularan el crecimiento bacteriano en estas suspensiones.

Aunque se alcanzaron porcentajes de oxidación de pirita similares con los diferentes tratamientos evaluados, se observó que con el uso de medios bajos en concentraciones de sulfatos se minimiza la re-

precipitación, lo cual no solo brinda beneficios a nivel del proceso, sino que además, en un proceso a nivel industrial contribuiría a minimizar los costos del proceso.

El proceso de biolixiviación contribuyó a disminuir el contenido de azufre inorgánico, hasta en un 53% en los tratamientos con el medio de cultivo McCready.

A pesar de que la alta amorficidad del carbón impidió que algunos minerales fueran reconocidos a través de las técnicas de DRX y FTIR, con la segunda derivada del espectro de infrarrojo y la técnica de SEM se pudo comprobar la existencia de minerales de los que no se tenía total certeza de que estuvieran presentes, como la moscovita, caolinita, illita y albita.

Se observó la importancia de las fracturas y grietas en los granos de carbón y la porosidad que se presentó en las estructuras framboidales de la pirita, ya que estas probablemente facilitaron la oxidación al ser estructuras con una mayor área superficial.

La efectividad del proceso depende en gran medida de la concentración y tipo de minerales que compongan el grano de carbón y de los componentes de los medios de cultivo. Ya que, en los diferentes tratamientos evaluados, se observó la formación de potasio-jarosita y natrojarosita, lo que indica que este tipo de soluciones ácidas ($\text{pHs} < 1.90$) promueven la precipitación de iones de sodio y potasio, que fueron aportados por la materia mineral asociada al carbón, como la albita y los reactivos que hacen parte de los medios de cultivo evaluados.

4. Efecto de medios de cultivo – base cloruros – sobre la acción de bacterias acidófilas en un proceso de biodesulfurización de carbón

4.1. Introducción

Las bacterias, requieren de una disponibilidad y suministro adecuado de materias primas y nutrientes, condiciones ambientales idóneas y un control de sustancias tóxicas, entre otros factores para llevar a cabo sus rutas metabólicas, un correcto crecimiento, biosíntesis de material celular, mantenimiento y producción de energía (Prescott et al., 2004; Rossi, 1990). Los medios de cultivo son un aspecto clave en el éxito de un proceso y está estrechamente relacionado con el metabolismo, la composición celular y el ambiente o hábitat natural en que se desarrolla el microorganismo.

En varias investigaciones de biolixiviación se han hecho esfuerzos por proponer medios de cultivo que suplan los requerimientos nutricionales de los microorganismos y contribuyan a potenciar su actividad metabólica, además de que favorezcan la reducción en la formación de los precipitados que generan una negativa y fuerte influencia en la cinética del proceso, ya que además de retirar el hierro férrico del medio de reacción, impiden el contacto de estos agentes químicos con el mineral sulfurado a solubilizar (Ballester, 2005).

La excesiva concentración de ciertos nutrientes en los medios de cultivo suscita la formación de estos precipitados y con el objetivo de disminuir las dificultades que esto genera, se ha motivado el desarrollo de medios de cultivo con bajas concentraciones de sales. Tuovinen y Kelly (1972), propusieron el medio de cultivo T&K, que tiene concentraciones más bajas de los reactivos (Rossi, 1990). Posteriormente, investigadores como Hoffmann y colaboradores (1981) y Caicedo y Márquez (2013) diseñaron medios de cultivo a base de sales de cloro y concentraciones bajas de fosfato específicamente para procesos de desulfurización de carbón.

Además, según Rossi (1990), los medios de cultivo en procesos de biolixiviación deben tener en cuenta los compuestos que puede aportar el mineral, siendo necesario que se presente un balance en la

concentración adecuada de nutrientes con el fin de que no se genere acumulación de sales y a su vez se contribuya a la disminución en la precipitación de hidroxisulfatos de hierro.

Con base en lo anterior, en este capítulo se evaluó el comportamiento de los microorganismos acidófilos en un proceso de biodesulfurización de carbón, bajo el efecto de diferentes composiciones de medios de cultivo a base de sales de cloro, buscando así poder reducir las precipitaciones sobre la superficie del mineral. Los bioensayos fueron realizados con los medios propuestos por Hoffmann y colaboradores (1981) y Caicedo y Márquez (2013) y que para efectos del proyecto, se llaman Hoffmann y Cloruros, respectivamente; se compararon con el medio de cultivo T&K el cual ha sido ampliamente utilizado e investigado en este tipo de procesos. Este estudio se llevó a cabo con el fin de definir la influencia de los iones o sales de cloro sobre la biodesulfurización de este tipo de carbón específico y de manera general en este tipo de procesos, con el fin de determinar si su uso es factible, con base en la proliferación comparativa de la biomasa y la disminución de la precipitación de sulfatos de hierro férrico.

4.2. Materiales y Métodos

Los aspectos metodológicos correspondientes a esta parte del proyecto, se presentan en el Capítulo 2 (véase de las Secciones 2.1 a 2.5).

4.3. Resultados

4.3.1. Análisis químicos y mineralógicos iniciales del carbón

Los análisis correspondientes a las diferentes formas de azufre, análisis próximos del carbón, DRX, FTIR y SEM/EDX, se presentan en el Capítulo 3 (véase la Sección 3.5.1)

4.3.2. Adaptación de microorganismos

Con el fin de obtener unos microorganismos más preparados y menos sensibles a las condiciones ambientales impuestas a través del proyecto, estos inicialmente fueron adaptados al incremento en la concentración de mineral y la disminución en la concentración de sulfato ferroso; posteriormente estas bacterias atravesaron por un proceso de adaptación progresiva para cambiar del medio T&K a base de sulfatos, a los medios a base de sales de cloro (Hoffmann y Cloruros), como se describe a continuación:

- **Adaptación progresiva al mineral**

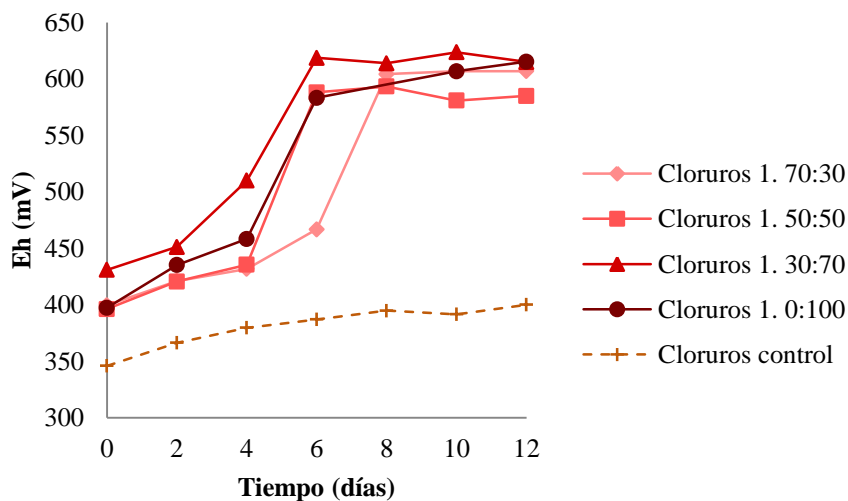
El proceso de adaptación progresiva de la cepa pura y el consorcio al carbón en medio T&K, se presentó en el Capítulo 3 (véase sección 3.5.2, subsección 3.5.2.1).

- **Adaptación a los medios de cultivo a evaluar**

De la Figura 4-1 a la 4-4, se presenta el comportamiento del Eh durante cada una de las cuatro etapas de adaptación progresiva de la cepa pura y el consorcio con mineral, a los medios de cultivo Cloruros y Hoffmann (Véase capítulo 2, sección 2.4.3). Durante los procesos de adaptación se observó que hubo una reducción de la fase *lag* y un incremento en el potencial de oxido-reducción. Todos los controles abióticos mostraron un ambiente poco oxidativo, ya que no hubo incremento alguno en el Eh.

En la Figura 4-1, se observa el comportamiento del Eh en la adaptación de la cepa pura al medio de cultivo Cloruros. Se observó que con el transcurso de las etapas se incrementó el valor de este parámetro.

Figura 4-1: Comportamiento del potencial de óxido-reducción durante el proceso de adaptación progresiva en cuatro etapas de la cepa pura (1) en presencia del mineral, al medio de cultivo Cloruros. Etapa A - 70:30 (relación de medio T&K: medio Cloruros), Etapa B - 50:50, Etapa C - 30:70, Etapa D - 0:100 (Etapa final con 100% del medio Cloruros)

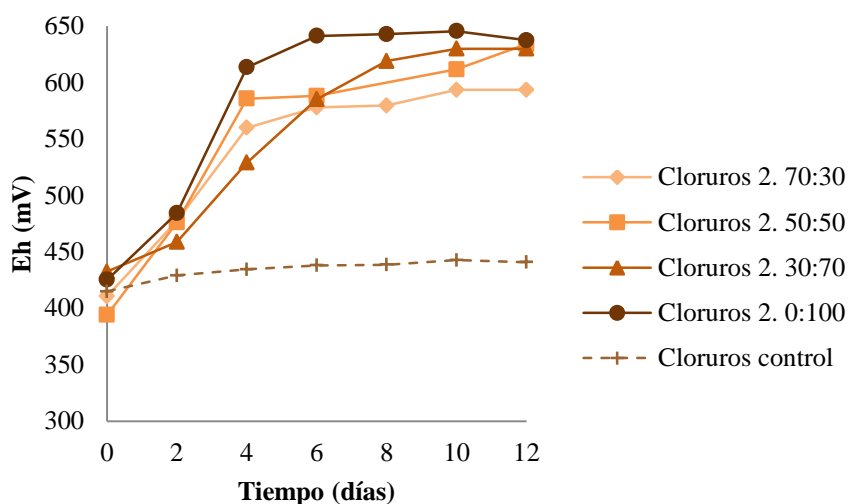


En la Etapa 70:30, la fase *lag* fue de casi seis días. En la etapa 50:50, se redujo la fase *lag* a cuatro días, pero hubo una reducción en el Eh. En la siguiente etapa (30:70) se redujo a dos días la fase *lag* y

la fase exponencial fue la más larga e incrementó el valor de Eh. Ya en la última etapa (0:100) se generó una fase *lag* más larga pero se mantuvo el incremento en el Eh respecto de la etapa anterior. Al llegar a esta última etapa se realizaron repiques sucesivos, llegando a un tener en estas suspensiones un Eh de 615mV, un pH de 1.55 y una concentración celular de 5.0×10^7 células/mL.

En la Figura 4-2, se observa el comportamiento del Eh en la adaptación del consorcio al medio de cultivo Cloruros. Se observó que con el transcurso de las etapas se incrementó el potencial Eh y no se evidenció presencia de fase *lag* en ninguna de las etapas. Al llegar a la última etapa (0:100) se realizaron repiques sucesivos, llegando a un valor de Eh de 637mV y en los parámetros de pH y concentración celular a 1.49 y 6.0×10^7 células/mL.

Figura 4-2: Comportamiento del potencial de óxido-reducción durante el proceso de adaptación progresiva en cuatro etapas del consorcio (2) en presencia del mineral, al medio de cultivo Cloruros. Etapa A - 70:30 (relación de medio T&K: medio Cloruros), Etapa B - 50:50, Etapa C - 30:70, Etapa D - 0:100 (Etapa final con 100% del medio Cloruros)



En la Figura 4-3, se observa el comportamiento del Eh en la adaptación de la cepa pura al medio de cultivo Hoffmann. En las tres primeras etapas (de 70:30 a 30:70) se evidenció una reducción en la fase *lag*, de seis a dos días y un incremento gradual en el potencial. En la última etapa (0:100) se observó una fase *lag* de dos días, pero incrementándose el valor del potencial. Finalmente en esta suspensión se alcanzó un Eh, pH y concentración celular de, 633 mV, 1.58 y 5.5×10^7 células/mL, respectivamente.

Figura 4-3: Comportamiento del potencial de óxido-reducción durante el proceso de adaptación progresiva en cuatro etapas de la cepa pura (1) en presencia del mineral, al medio de cultivo Hoffmann. Etapa A - 70:30 (relación de medio T&K: medio Hoffmann), Etapa B - 50:50, Etapa C - 30:70, Etapa D - 0:100 (Etapa final con 100% del medio Hoffmann)

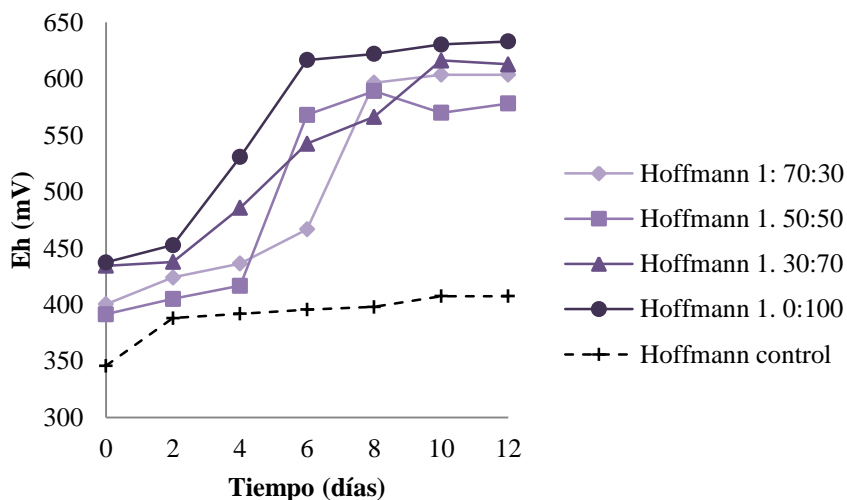
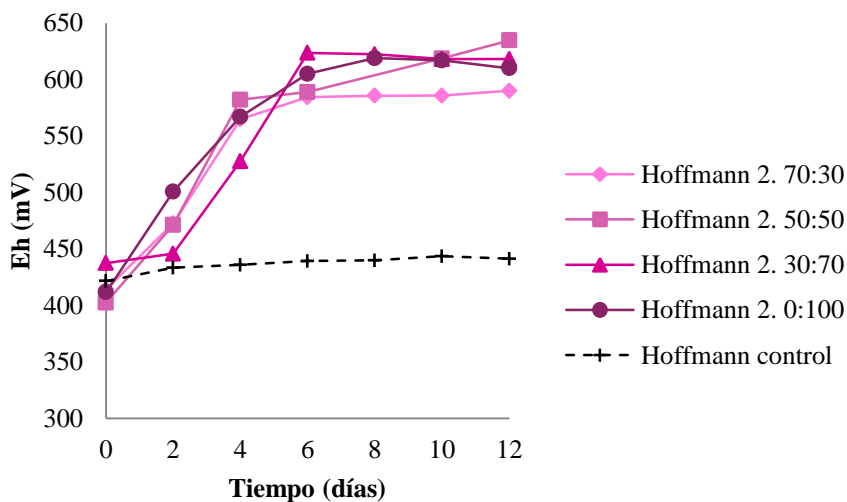


Figura 4-4: Comportamiento del potencial de óxido-reducción durante el proceso de adaptación progresiva en cuatro etapas del consorcio (2) en presencia del mineral, al medio de cultivo Hoffmann. Etapa A - 70:30 (relación de medio T&K: medio Hoffmann), Etapa B - 50:50, Etapa C - 30:70, Etapa D - 0:100 (Etapa final con 100% del medio Hoffmann).



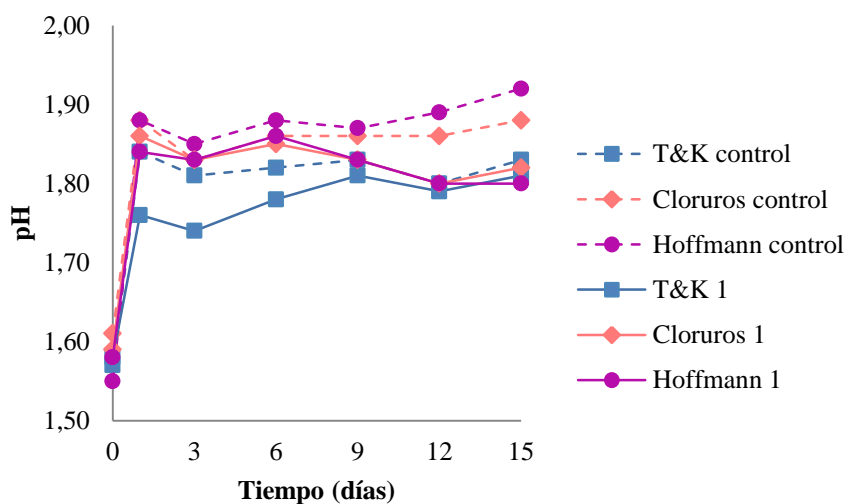
En la Figura 4-4, se observa el comportamiento del Eh en la adaptación del consorcio al medio de cultivo Hoffmann. Se observó que la etapa 30:70, fue la única etapa donde en que se presentó fase *lag*. En la segunda etapa (50:50), no se observó estabilización del parámetro. Y en la última etapa (0:100) se llegó a un Eh en la suspensión de 610mV, pH de 1.46 y una concentración celular de 5.0×10^7 células/mL.

4.3.3. Sales de cloruros en un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer

- **Ensayos con cepas puras de *Acidithiobacillus ferrooxidans***

La Figura 4-5 muestra el comportamiento del pH a través del tiempo para los bioensayos con la cepa pura. Se presentó un incremento en el valor al primer día del proceso el cual fue mayor en los ensayos con Hoffmann y Cloruros (1.84 y 1.86 respectivamente).

Figura 4-5: Curva de pH vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y los medios T&K, Cloruros y Hoffmann

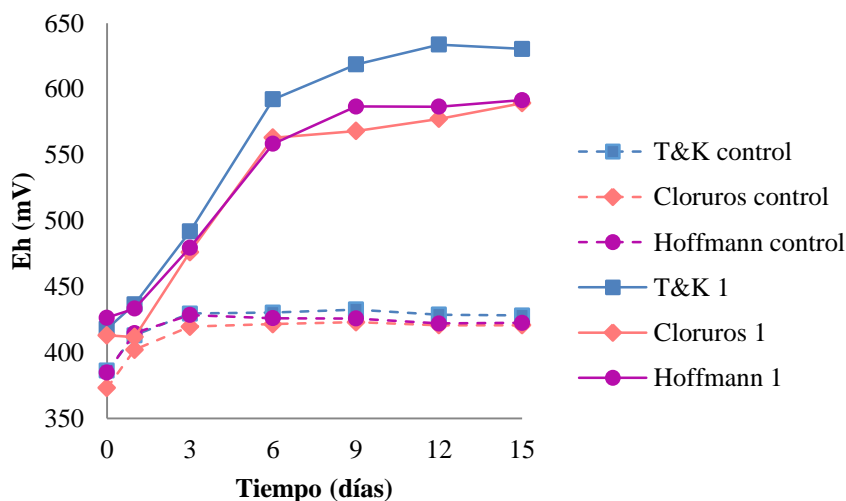


Luego del primer día, los ensayos T&K siguieron mostrando un leve aumento en el valor hasta alcanzar un máximo al noveno día (1.81), punto en el cual no se presentaron variaciones significativas hasta el final del proceso. Por otra parte, los ensayos Hoffmann y Cloruros presentaron un pequeño

aumento al sexto día (1.86 y 1.85, respectivamente), seguido de una leve y continua disminución hasta el día 12, alcanzando valores entre de 1.80 y 1.82 en las suspensiones con Hoffmann y Cloruros, respectivamente al finalizar el proceso. Por su parte, los controles abióticos presentaron tendencias similares a los bioensayos, aunque con valores superiores de pH.

En la Figura 4-6, se presenta el comportamiento del potencial de óxido-reducción (Eh) a través del tiempo para todos los ensayos. A nivel general, se observó un incremento en el Eh con una pendiente pronunciada hasta el sexto día, siendo mayor en el ensayo T&K. Cabe señalar que el ensayo con Cloruros, no tuvo variación en el valor sino después del primer día del proceso. Posteriormente, el ensayo con Hoffmann alcanza su máximo valor al noveno día (592 mV), mientras que los ensayos Cloruros lo igualan al día 15. Por otra parte los ensayos T&K tuvieron un aumento mayor hasta el doceavo día alcanzado un máximo de 630mV. En cuanto a los controles, los valores de Eh son bastante bajos y se mantienen estables, alrededor de 430mV.

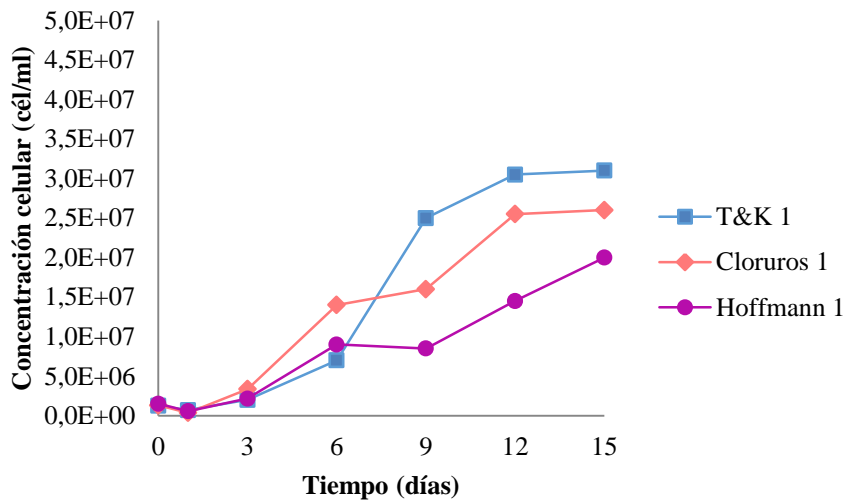
Figura 4-6: Curva de Eh vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y los medios T&K, Cloruros y Hoffmann



En la Figura 4-7, se presenta el comportamiento de concentración celular en la fase líquida a través del tiempo. A nivel general, no se observaron cambios en la concentración sino a partir del tercer día de proceso (fase *lag*). Posteriormente, todos los ensayos entraron en una fase de crecimiento exponencial la cual fue mayor para el ensayo Cloruros hasta el sexto día. No obstante, el ensayo T&K tuvo un incremento significativo desde el sexto hasta el noveno día, alcanzado la mayor concentración de entre

todos los ensayos y tendiendo hacia la fase estacionaria después del doceavo día, a un valor de 3.1×10^7 células/mL. Los ensayos Cloruros y Hoffmann, no presentaron variaciones entre el sexto y noveno día. Luego del noveno día, el ensayo Cloruros presentó una fase exponencial hasta el doceavo día de proceso, para luego estabilizarse a una concentración menor a la del ensayo T&K (2.6×10^7 células/mL). Por otra parte, el ensayo Hoffmann tuvo una fase exponencial continua, sin llegar a la fase estacionaria al finalizar el proceso, aunque alcanzó la menor concentración de entre todos los ensayos (2.0×10^7 células/mL).

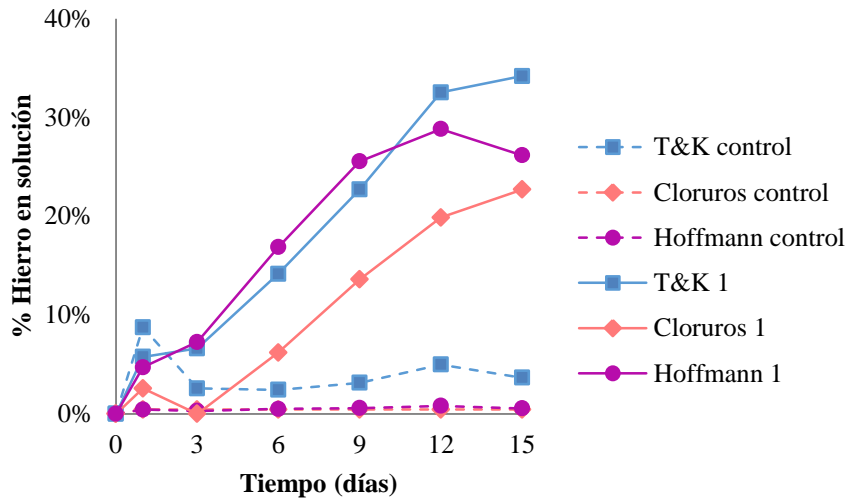
Figura 4-7: Concentración celular vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y los medios T&K, Cloruros y Hoffmann



En la Figura 4-8, se presenta el porcentaje de hierro solubilizado a través del tiempo. En general, se observó un comportamiento de aumento progresivo de hierro en la solución para todos los ensayos hasta el final del proceso. Específicamente, en los ensayos T&K del primer a tercer día no existe variación alguna, pero se llega finalmente a una solubilización de hierro superior a la que se presentó en los demás ensayos, del 34% (833ppm). Por su parte, en los ensayos Hoffmann se observó que entre el tercer y noveno día, la solubilización fue mayor que con los otros dos ensayos, en esta suspensión se evidenció un aumento progresivo de hierro en solución hasta el doceavo día (en este día se vio un porcentaje de remoción del 29% equivalente a 745ppm de hierro en solución), pero posteriormente se genera una leve disminución en el parámetro, llegando al final del proceso a obtener una solubilización de 26% (714ppm). Por otra parte, en los ensayos Cloruros se presentó una reducción significativa al

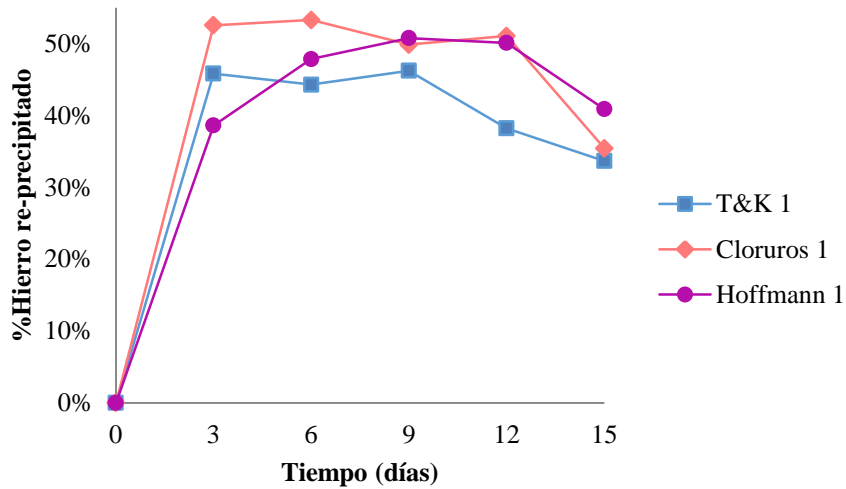
tercer día, no obstante, el parámetro alcanzó un porcentaje de solubilización del 23% (698ppm) hasta el final del proceso.

Figura 4-8: Porcentaje de hierro en solución vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann



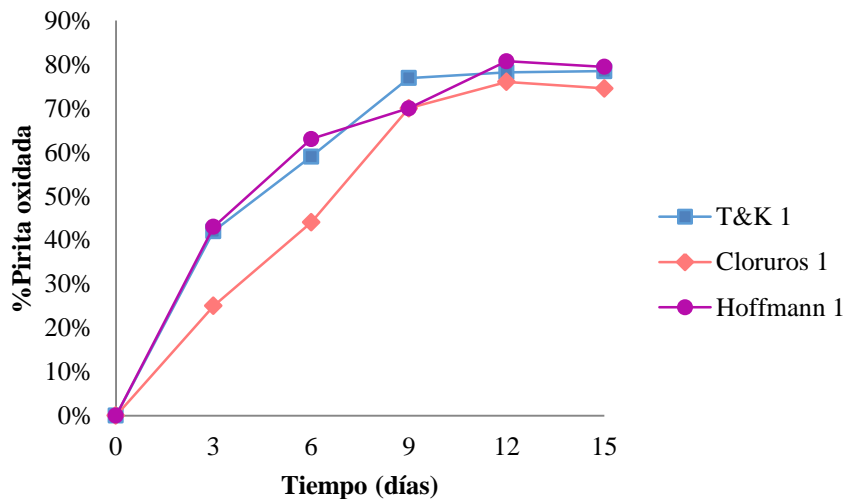
En la Figura 4-9, se muestra el porcentaje de hierro re-precipitado en la superficie del mineral a través del tiempo. De manera general, se observó que en todos los ensayos el mayor porcentaje de re-precipitación ocurrió al tercer día del proceso y que en los últimos días tendió a mostrar una marcada solubilización del hierro precipitado en las suspensiones. Después de la re-precipitación inicial en los ensayos Cloruros y T&K se presenta una tendencia a disminuir, mientras que en los ensayos Hoffmann si continua en aumento la re-precipitación aunque de forma muy leve hasta el doceavo día, para luego reducirla hasta el último día del proceso. Finalmente, se llega a una re-precipitación de hierro para los bioensayos con la cepa pura del 34% en T&K, 35% en Cloruros y del 41% en Hoffmann.

Figura 4-9: Porcentaje de hierro re-precipitado vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann



En la Figura 4-10, se muestra el comportamiento de la oxidación de la piritita durante el transcurso del proceso.

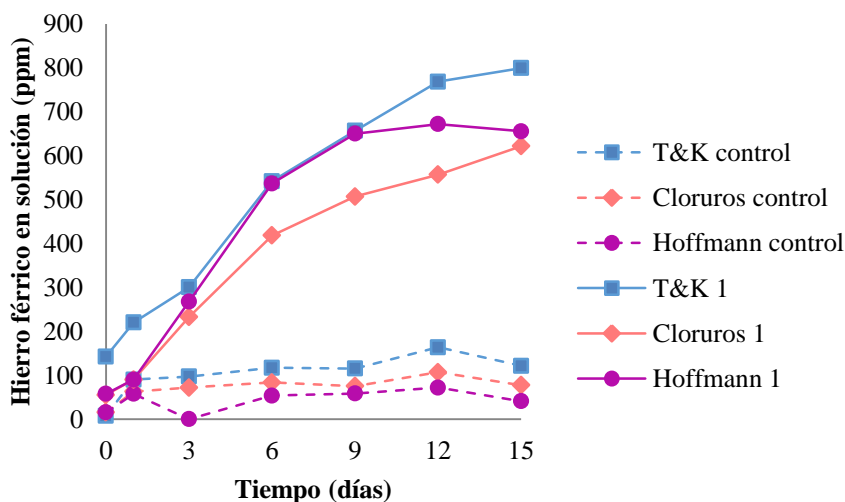
Figura 4-10: Porcentaje de piritita oxidada vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando la cepa comercial *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann



Se observó un aumento constante en el porcentaje de oxidación del mineral hasta el sexto día en el tratamiento Hoffmann y hasta en noveno día en los tratamientos T&K y Cloruros, después de lo cual el parámetro tendió a aumentar levemente y/o alcanzar la estabilidad al final del proceso. Después del sexto día, en el tratamiento Hoffmann, se observó un leve aumento hasta el doceavo día, donde se llegó a la estabilidad. En el tratamiento T&K por su parte, después del noveno día se alcanza la estabilidad del proceso. Y en el tratamiento Cloruros se observó que la capacidad oxidativa desde el inicio del proceso y hasta el noveno día fue inferior a los otros dos tratamientos, posteriormente el parámetro aumentó de forma leve hasta el doceavo día y al final se tiende a la estabilización. Finalmente, las oxidaciones de piritita fueron del 79%, 78% y 74% en los bioensayos Hoffmann, T&K y Cloruros, respectivamente.

En la Figura 4-11, se presenta la concentración de iones férricos a través del tiempo. Se observó que en los controles abióticos la regeneración de iones en los medios de cultivo es prácticamente nula, sin embargo en el control del ensayo T&K se alcanzó la mayor re-generación (121ppm). Por otra parte, en todos los bioensayos se evidenció un claro aumento en la concentración de iones férricos desde el inicio y hasta el final del proceso.

Figura 4-11: Concentración de iones Fe^{3+} en solución a través del tiempo, usando una cepa comercial *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann

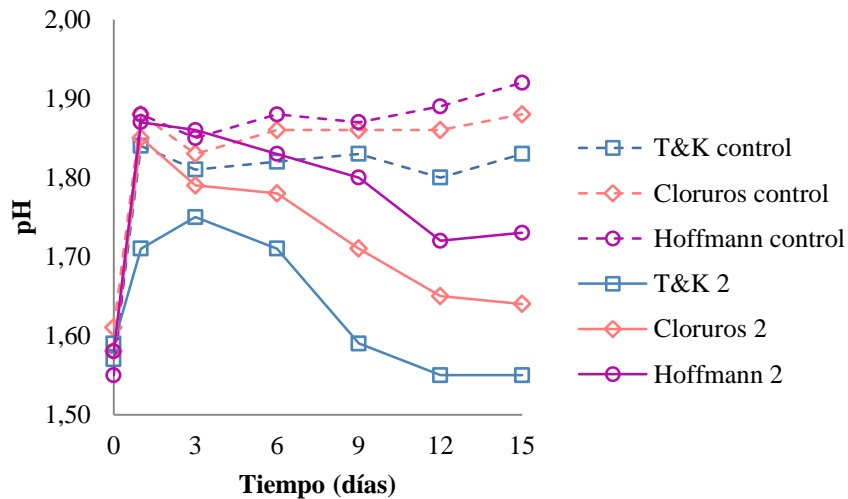


La concentración de iones férricos siempre fue mayor en el ensayo T&K, seguida por Hoffmann, donde al doceavo día se observó una estabilización hasta el final. Mientras que en los ensayos Cloruros, aunque hubo una regeneración constante se observó el más bajo valor para este parámetro. Se obtuvo al día 15 del proceso una concentración de iones Fe^{3+} de 799 ppm en las suspensiones T&K, 655 ppm en Hoffmann y 622 ppm en Cloruros. En los controles se observó una baja concentración de iones férricos, que se mantuvo constante durante todo el proceso.

• **Ensayos con consorcio de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans***

En la Figura 4-12, se presenta el comportamiento del pH a través del tiempo. En todos los ensayos se evidenció una tendencia creciente los primeros días hasta alcanzar un máximo, para luego producirse una marcada disminución y estabilización hasta el final del proceso. El aumento inicial de pH para los ensayos Hoffmann y Cloruros se evidenció al primer día y fue de 1.87 y 1.85, respectivamente. Este aumento inicial es mayor en los ensayos Cloruros y Hoffmann en comparación con el ensayo T&K, donde se observa un máximo de 1.71 al tercer día del proceso.

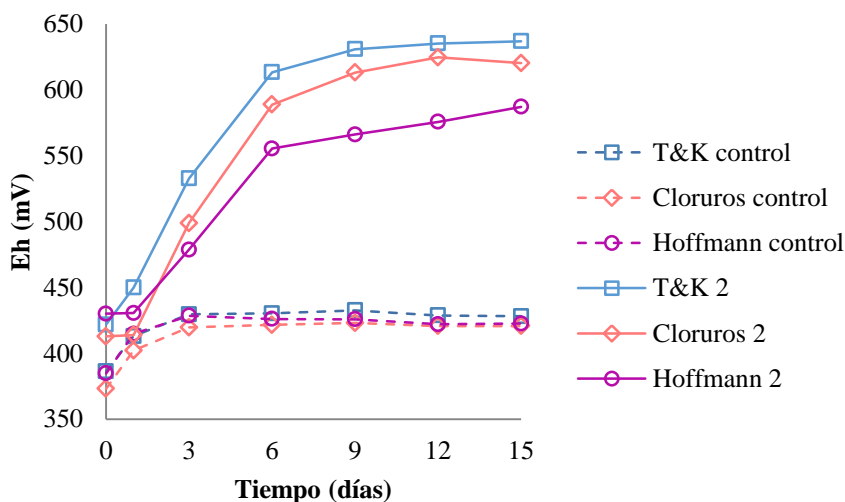
Figura 4-12: Curva de pH vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando un consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann



El pH posteriormente disminuye en todos los bioensayos hasta el doceavo día, donde se estabiliza el parámetro hasta el final, llegando a un valor mínimo de pH de 1.73, 1.64 y 1.55 en Hoffmann, Cloruros y T&K, respectivamente. Los controles mostraron tendencias similares a los observados usando la cepa pura, son prácticamente estables en valores de pH superiores a sus respectivos bioensayos.

En la Figura 4-13, se presenta el seguimiento que se realizó al parámetro de óxido-reducción (Eh) durante el transcurso del proceso. A nivel general, se observa un incremento en el Eh con una pendiente pronunciada hasta el sexto día, siendo mayor en el ensayo T&K, donde posteriormente se observó un leve aumento hasta el noveno día y luego la estabilidad hasta el final del proceso, llegando a un valor máximo de 636mV. Por su parte, aunque los ensayos Cloruros y Hoffmann presentaron tendencias similares a T&K, no hubo variación en este parámetro sino después del primer día del proceso y fue menor la regeneración iónica.

Figura 4-13: Curva de Eh vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann

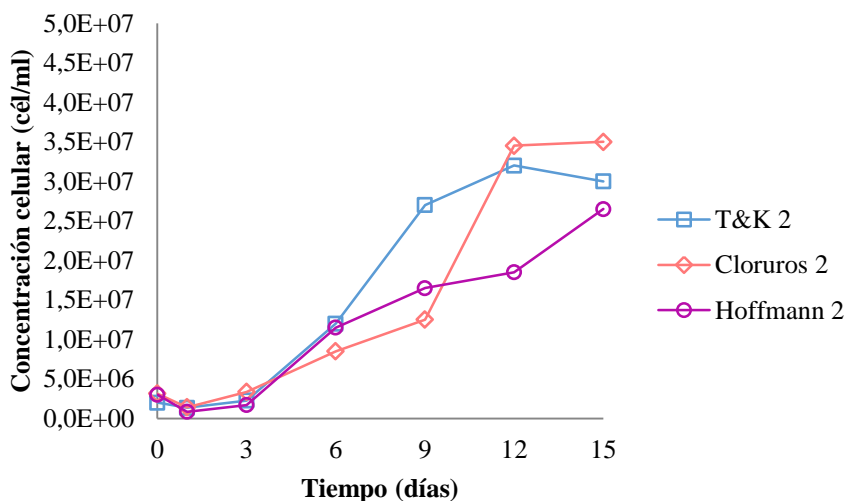


Con los ensayos Cloruros y Hoffmann el incremento después del sexto día es más leve. Con Cloruros se alcanzó la estabilización al final y se llegó a un valor máximo de 630mV, mientras que con Hoffmann se vio un aumento constante hasta el final sin alcanzar la estabilización llegando un Eh de

587mV. Los valores de los controles, igual que como se presentó en los ensayos para la cepa pura, fueron bastante bajos y se mantienen estables, alrededor de 420mV.

En la Figura 4-14, se observa la concentración celular del consorcio de bacterias acidófilas a través del tiempo del proceso. En todos los medios evaluados se observa una fase *lag* en el primer día del proceso, en la gráfica no es muy claro, pero del primer al tercer día se evidenció un pequeño crecimiento bacteriano, después de lo cual se observó una pendiente en aumento hasta el final del proceso. Específicamente, en la disolución de Cloruros después del tercer día se observó un incremento en la concentración hasta el noveno día, donde se produjo un aumento significativo hasta el doceavo día, seguido de una estabilización. En Hoffmann se observó un crecimiento constante (fase exponencial) después del tercer día hasta el final del proceso, siendo significativamente superior el medio Cloruros. El bioensayo T&K, por su parte, presentó un crecimiento hasta el noveno día, un posterior aumento leve hasta el doceavo día y una disminución en el parámetro hasta el final. Finalmente, las concentraciones celulares en las disoluciones fueron de 3.5×10^7 células/mL, 3.0×10^7 células/mL y 2.65×10^7 células/mL con Cloruros, T&K y Hoffmann, respectivamente.

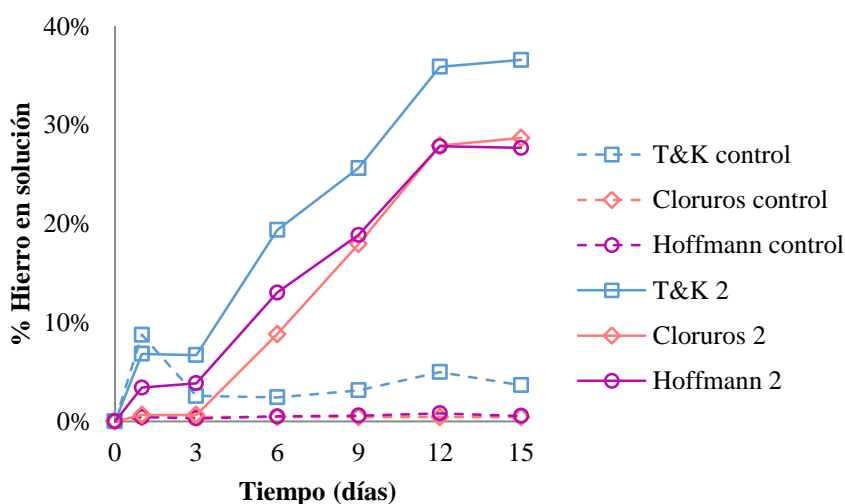
Figura 4-14: Concentración celular vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando un consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann



En la Figura 4-15, se muestra el porcentaje de hierro solubilizado durante el proceso. En general, en todos los bioensayos los primeros tres días no se observó una variación significativa, pero después y hasta el doceavo día se presentó una alta solubilización de hierro y al final la estabilización en el

parámetro. En los bioensayos T&K y Hoffmann la solubilización incrementó al inicio del proceso, pero del primer al tercer día el parámetro no presentó variación. Posterior a esto, el porcentaje de remoción aumentó hasta el doceavo día donde se estabilizó el parámetro y se alcanzaron valores de solubilización del 36% (898ppm) y 28% (741ppm), respectivamente. Cabe señalar que durante los tres primeros del proceso en el ensayo Cloruros no se evidenció ninguna solubilización de hierro, pero posterior hubo una tendencia similar a la observada en las otras dos suspensiones, llegando hasta 29% (771ppm) de hierro soluble. A pesar de que en los primeros tres días del proceso con Cloruros no se observó solubilización, se logra alcanzar un porcentaje similar que el que se obtuvo en las suspensiones con el medio Hoffmann. La máxima solubilización se obtuvo en el medio T&K (sales basales de sulfato). Por otra parte, en los controles de los medios de base de cloro no se evidenció ninguna solubilización química de hierro, mientras que en el ensayo T&K al primer día se presentó una solubilización cercana al 9%, sin embargo, el parámetro luego sufrió una caída y se mantuvo alrededor del 4% de hierro soluble durante todo el proceso.

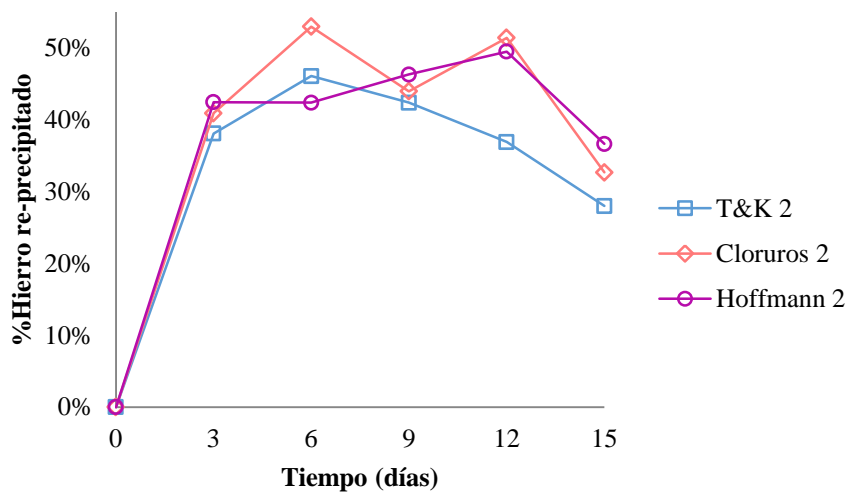
Figura 4-15: Porcentaje de hierro en solución vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Cloruros y Hoffmann



En la Figura 4-16, se encuentra el hierro re-precipitado usando un consorcio de bacterias acidófilas. De manera global e igual como se observó con el uso de la cepa pura, la re-precipitación de hierro se dispara al inicio del proceso en todos los tratamientos y la mayor re-precipitación se observa en los medios a base de cloro. En los ensayos Hoffmann y Cloruros después del tercer día se observa un leve

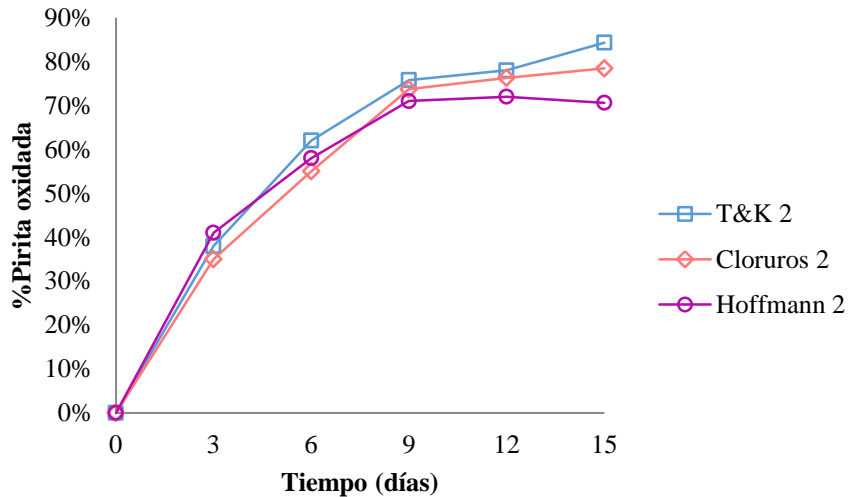
incremento en la re-precipitación hasta alcanzar el doceavo día, a partir del ocurre una caída en el parámetro hasta el final del proceso, señalando que en el ensayo Cloruros se presenta con una caída en el parámetro al noveno día. Por su parte, en el bioensayo T&K, entre el tercer y sexto día hay un leve aumento, pero en adelante se presenta una pronunciada solubilización de hierro o disminución en la re-precipitación hasta el último día. Finalmente, en el mineral se presentó un porcentaje de hierro re-precipitado del 28% en T&K, 33% en Cloruros y del 37% en Hoffmann.

Figura 4-16: Porcentaje de hierro re-precipitado vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Cloruros y Hoffmann



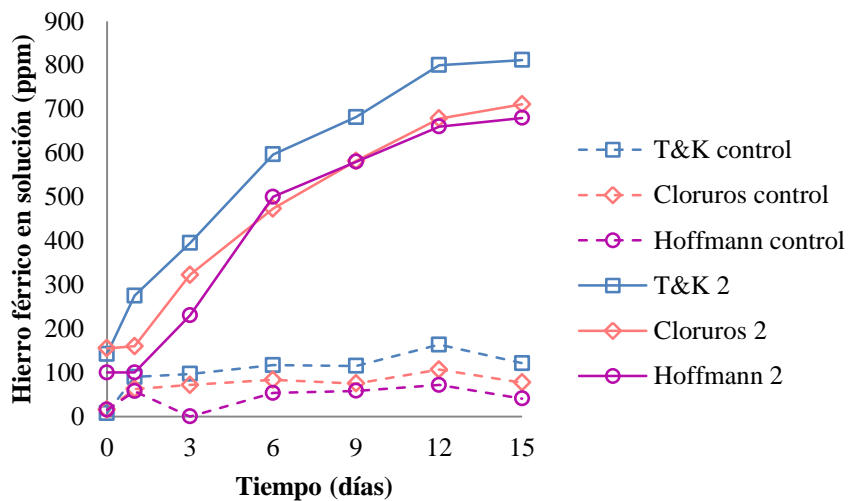
En la Figura 4-17, se observa el comportamiento para el porcentaje de pirita oxidada a través del proceso con el consorcio de bacterias acidófilas. El porcentaje de oxidación incrementó desde el inicio del proceso y hasta el noveno día. Posterior a esto, ocurre la estabilización del parámetro hasta el final del proceso en los tratamientos Cloruros y Hoffmann, mientras que en T&K solo hay estabilidad hasta el doceavo día, seguido de un leve aumento hasta el decimoquinto día. Se alcanzan oxidaciones del 84%, 78% y 70% para los bioensayos T&K, Cloruros y Hoffmann, respectivamente.

Figura 4-17: Porcentaje de pirita oxidada vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Cloruros y Hoffmann



En la Figura 4-18, se encuentra la concentración de iones férricos (Fe^{3+}) en solución.

Figura 4-18: Concentración de iones Fe^{3+} en solución vs. Tiempo para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer, usando el consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Cloruros, Hoffmann



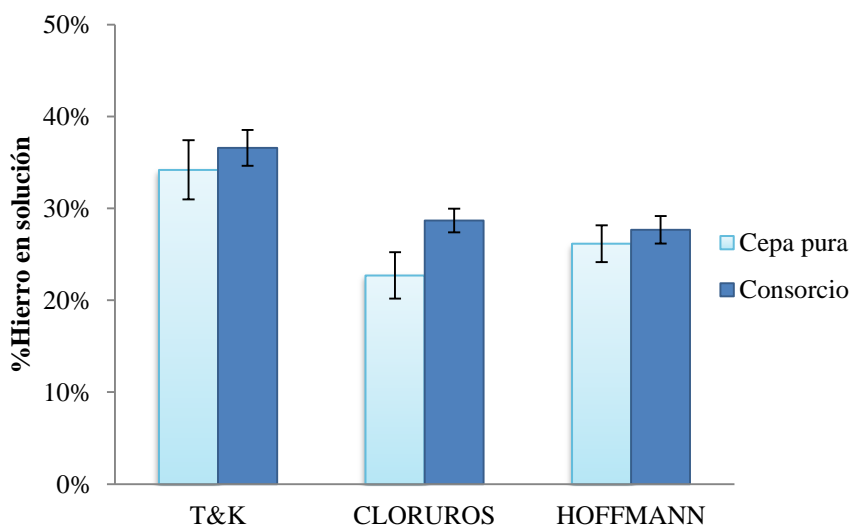
La tendencia es creciente para todos los ensayos hasta el doceavo día donde tiende a estabilizarse el parámetro, siendo superior en el ensayo T&K. Cabe señalar que los bioensayos Cloruros y Hoffmann,

no presentaron variación en el valor sino después del primer día del proceso. Finalmente, se obtuvo una concentración de iones Fe^{3+} de 812ppm en las suspensiones T&K, 711 ppm en Cloruros y 680ppm en Hoffmann. En los controles abióticos, la concentración de iones férricos fue baja y se mantuvo durante todo el proceso.

4.3.4 Análisis estadístico de los ensayos de biodesulfurización de carbón y Caracterización química

La Figura 4-19, presenta el porcentaje de hierro solubilizado obtenido al final del proceso en los tratamientos con la cepa pura y el consorcio. Pudo observarse que la mayor solubilización de hierro se promovió en los ensayos T&K en presencia de cualquier tipo de inóculo. A través de un análisis estadístico, realizado en el software R, bajo la prueba ANOVA y un nivel de significancia del 0.05, se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas dependiendo del tipo de inóculo (valor p de 0.05), pero si del medio de cultivo usado (valor p de 0.01) en la obtención de los mayores porcentajes de hierro soluble.

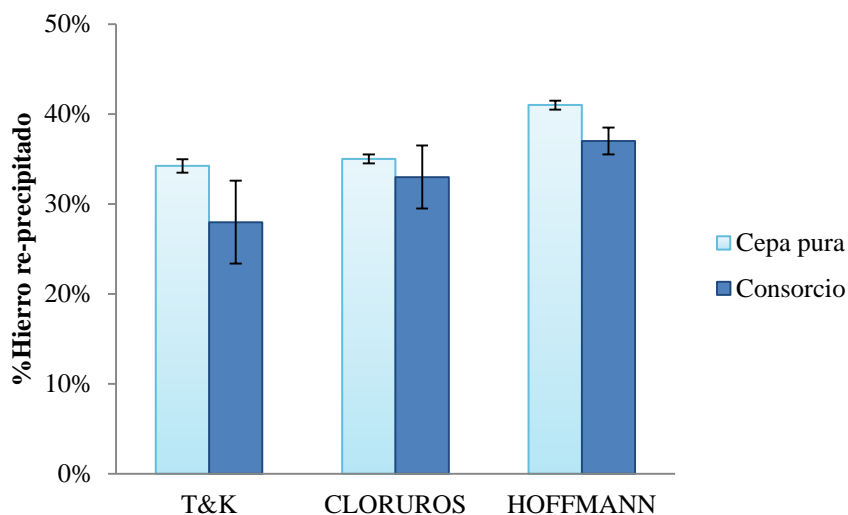
Figura 4-19: Porcentaje de hierro en solución para la bacteria pura y el consorcio, en cada uno de los diferentes medios de cultivo evaluados.



En la Figura 4-20, se presenta el porcentaje de hierro re-precipitado obtenido al final del proceso en los tratamientos con la cepa pura y el consorcio. Aunque pareciera que en los tratamientos con Hoffmann se favorece la re-precipitación, a nivel estadístico en la prueba ANOVA no se encontraron diferencias

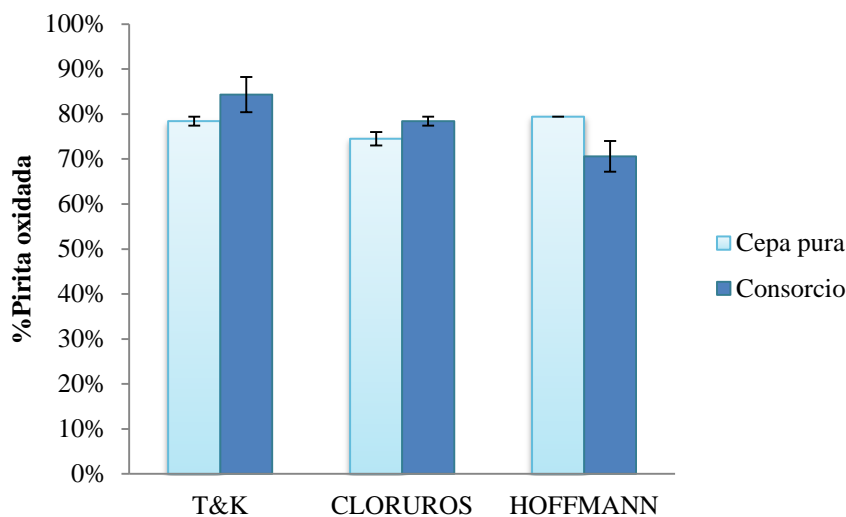
significativas para este parámetro, ni en cuanto al tipo de inóculo (valor p de 0.51) o medio de cultivo (valor p de 0.09) que se emplee.

Figura 4-20: Porcentaje de hierro re-precipitado para la bacteria pura y el consorcio, en cada uno de los diferentes medios de cultivo evaluados.



En la Figura 4-21, se presenta el porcentaje de pirita oxidada obtenida al final del proceso en los tratamientos con la cepa pura y el consorcio. Se observó que en el ensayo Hoffmann se generó una mayor oxidación de pirita cuando se usa la cepa pura, mientras que en los ensayos T&K y Cloruros se promovió un ambiente más oxidativo con el consorcio bacteriano. Estadísticamente, se encontró a través de una prueba ANOVA que existe una interacción entre los factores, es decir, que dependiendo de la combinación tipo de inóculo y medio de cultivo, se favorece más o menos el proceso oxidativo. Por tanto, se debió realizar un análisis no paramétrico para cada factor, encontrándose que no hay diferencias estadísticas significativas entre el tipo de inóculo (valor p de 0.423), pero si hay diferencias entre los medios de cultivo evaluados (valor p de 0.01).

Figura 4-21: Porcentaje de pirita oxidada para la bacteria pura y el consorcio, en cada uno de los diferentes medios de cultivo evaluados.



En la Tabla 4-1 se observan los resultados de los análisis de las diferentes formas de azufre para las muestras sólidas al final de los bioensayos. Se evidencia una reducción en el contenido de azufre pirítico durante los tratamientos de biodesulfurización, siendo la suspensión del medio T&K en presencia del consorcio en donde se observa la mayor solubilización de pirita del mineral.

El porcentaje de sulfatos en el mineral, fue mayor al contenido de sulfatos presente en la muestra inicial. Es evidente que la concentración de este parámetro es mayor en el bioensayo T&K ya que está compuesto principalmente de sales basales de sulfatos, mientras que con Hoffmann y Cloruros, la precipitación de estos compuestos es menor.

Y ya que estos dos parámetros anteriores, tanto el azufre pirítico como el azufre proveniente de los sulfatos, genera el porcentaje de azufre inorgánico, es claro que en los ensayos Hoffmann y Cloruros, la solubilización de azufre inorgánico es mayor de la que se observa en los ensayos T&K, independientemente del tipo de inóculo usado, como se observa en la Tabla 4-1 (% S_{removido}).

En cuanto al porcentaje de oxidación de pirita, como se mencionó anteriormente, se observaron diferencias estadísticas significativas en el factor medio de cultivo, es decir, que el proceso efectivamente se favorece usando el ensayo T&K en presencia del consorcio de bacterias acidófilas (84.3%).

Tabla 4-1: Diferentes formas de azufre para los carbones tratados con los medios de cultivo T&K, Cloruros y Hoffmann en presencia de la cepa pura (1) y el consorcio de bacterias acidófilas (2). T: T&K, C: Cloruros, H: Hoffmann

	%S _{pirítico}	%S _{sulfato}	%S _{inorgánico}	% Pirita oxidada	% S _{removido}
Muestra de carbón inicial	1.02	0.31	1.33	--	--
T1	0.22	0.54	0.76	78.43	42.86 ±3.8
C1	0.26	0.44	0.70	74.51	47.37 ±2.7
H1	0.21	0.49	0.70	79.41	47.37 ±2.0
T2	0.16	0.68	0.84	84.31	36.84 ±2.8
C2	0.22	0.50	0.72	78.43	45.86 ±2.5
H2	0.30	0.47	0.77	70.59	42.11 ±5.4

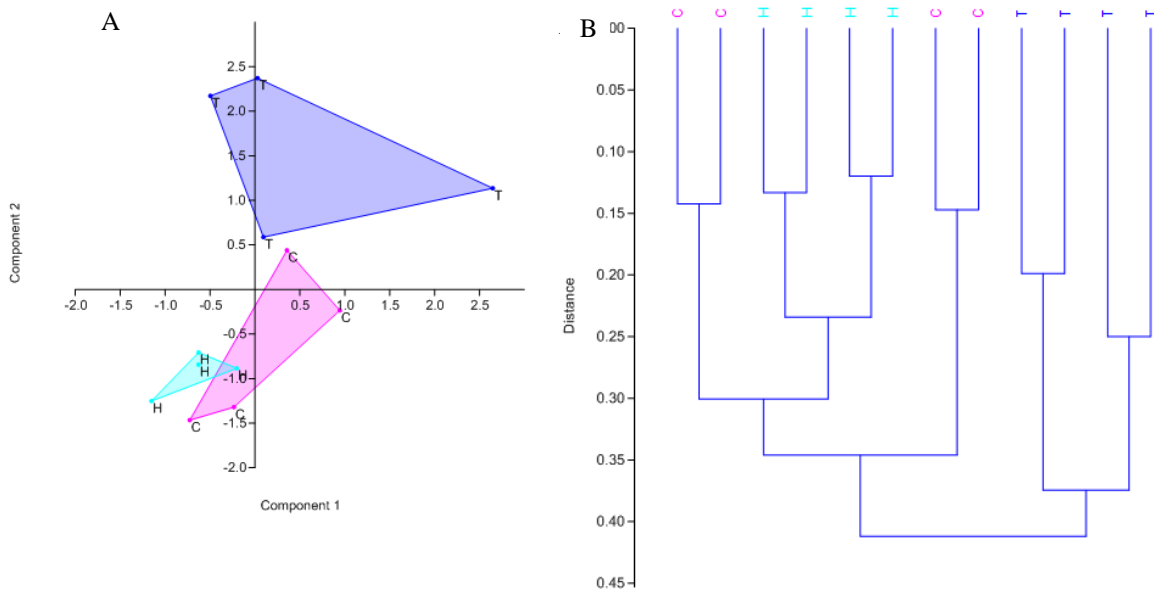
Se observó que cuando el microorganismo empleado fue la cepa pura, los ensayos con los medios de cultivo a base de sales de cloro (Cloruros y Hoffmann) contribuyen a generar una mayor remoción de azufre del sustrato (47%). Y que cuando el inóculo usado es un consorcio de bacterias acidófilas, con el ensayo Cloruros se alcanzan las mayores tasas de desulfurización del carbón (46%). Estos resultados en cuanto a porcentaje de remoción de azufre presentan diferencias estadísticas significativas (valor p de 0.01 para los medios y 0.003 para el tipo de inóculo) con la prueba ANOVA a un nivel de significancia del 0.05.

Finalmente, se realizó un análisis multivariado de componentes principales (PCA) (A) y de clúster (B) a través del software PAST, que se presentan en la Figura 4-28. Esto con el fin de agrupar todas las variables en un análisis que pudiera dar una mayor validez a las conclusiones que las variables pudieran aportar por separado (Oviedo, 2011). Este análisis buscó describir el proceso conservando la mayor cantidad posible de información, por lo cual se tuvo en cuenta, variables como: porcentaje de hierro solubilizado durante varios días del proceso (día 6, 9 y 15), velocidad de oxidación, porcentaje

de pirita oxidada, concentración de iones férricos, pH, potencial de óxido--reducción, concentración celular y concentración de hierro re-precipitado.

Para el análisis multivariado (Figura 4-22A) se usó una matriz de correlación, ideal cuando se cuenta con un grupo de variables que presentan distintas unidades de medida (Oviedo, 2011). Y el análisis por clúster contribuyó a agrupar los diferentes bioensayos según su grado de similitud y cercanía.

Figura 4-22: Análisis multivariado de componentes principales, usando una matriz varianza correlación (A). Análisis por clúster usando un algoritmo *paired group* (B), para un proceso de biodesulfurización de un carbón colombiano en presencia de la cepa pura y un consorcio de bacterias acidófilas, usando los medios de cultivo T&K, Cloruros y Hoffmann.



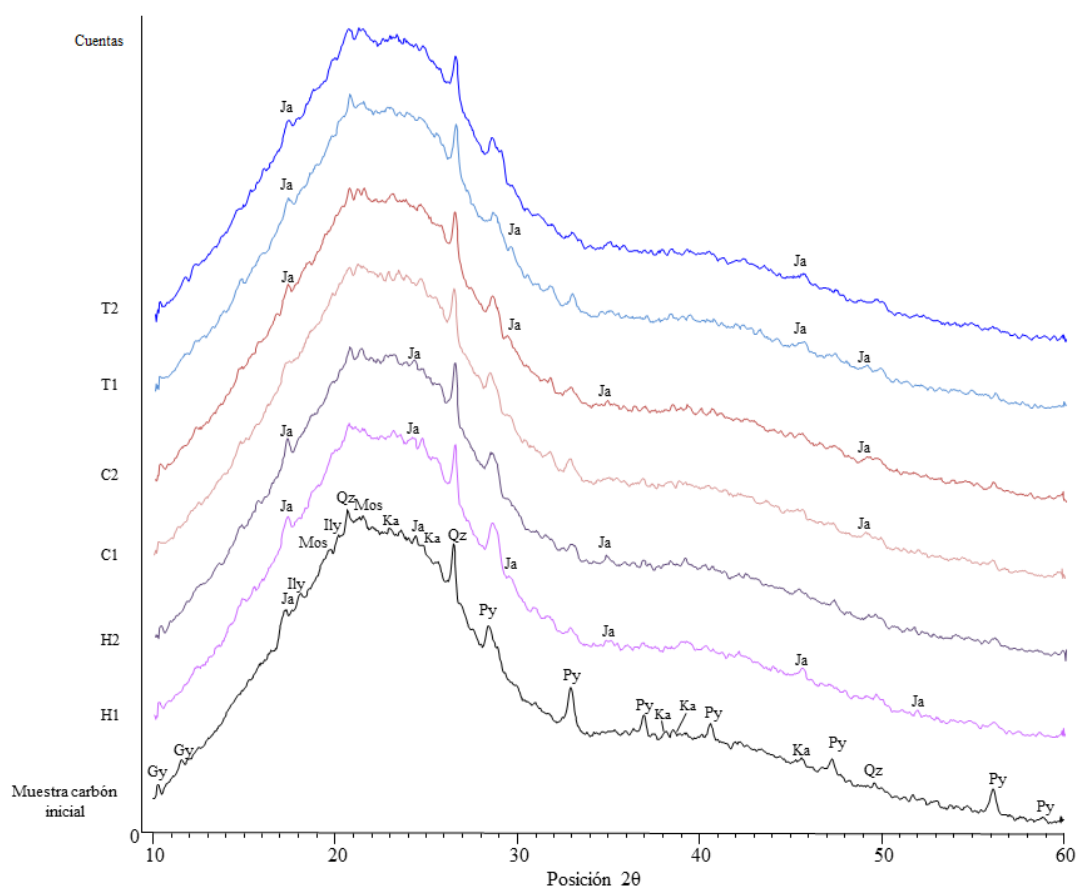
Del análisis de la matriz se puede inferir que se presentaron diferencias en el proceso de biodesulfurización de carbón dependiendo de si se realiza con medios de sales basales de cloruros o sulfatos. Esto se originó por variables como la concentración de hierro en solución, oxidación de pirita y remoción de azufre inorgánico. Adicionalmente, el análisis por clúster (Figura 4-22B) permitió corroborar lo obtenido en el análisis anterior (matriz de correlación), ya que también se encontraron diferencias entre los medios Hoffmann y Cloruros con el medio T&K, separándolos en corrientes distintas.

4.3.5 Caracterización de muestras de carbón tratadas

- **Difracción de Rayos X**

La Figura 4-23, presenta los espectros de difracción de rayos X para los ensayos en presencia de la cepa pura y el consorcio.

Figura 4-23: Difractograma de los ensayos de biodesulfurización de carbón usando la cepa pura y el consorcio en los medios de cultivo T&K, Cloruros y Hoffmann. T1: T&K + cepa pura, T2: T&K + consorcio, C1: Cloruros + cepa pura, C2: Cloruros + consorcio, H1: Hoffmann + cepa pura, H2: Hoffmann + consorcio.



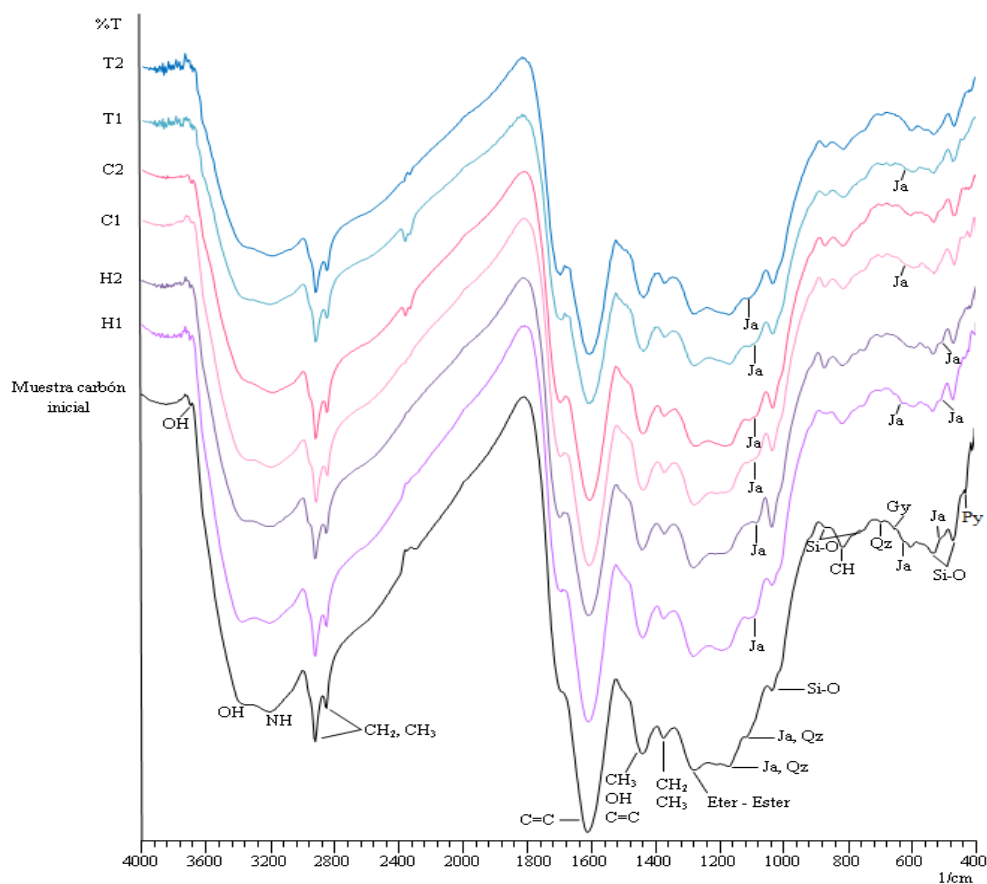
Aunque los picos de los difractogramas no mostraron intensidades altas, es evidente que los picos correspondientes a la pirita disminuyeron notoriamente durante el tratamiento de biodesulfurización. No obstante, este análisis no deja claro con cual bioensayo se generó una mayor solubilización. Se observó también la aparición de picos correspondientes a la jarosita y que los picos ya existentes se

acentúan con el proceso. Minerales como el cuarzo (Qz) y sulfatos como el yeso (Gy), permanecieron invariables durante los tratamientos. Solo se observó una aparente disminución en algunos picos correspondientes a la caolinita (Ka), la illita (Ily) y moscovita (Mos), pero esto no es una evidencia clara, debido a que los picos no presentan intensidades altas.

• **Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier**

En la Figura 4-24, se presentan los espectros de FTIR para las muestras del carbón oxidado biológicamente por la cepa pura y el consorcio.

Figura 4-24: Espectros de FTIR para los ensayos de biodesulfurización de carbón usando la cepa pura y el consorcio en los medios de cultivo T&K, Cloruros y Hoffmann. T1: T&K + cepa pura, T2: T&K + consorcio, C1: Cloruros + cepa pura, C2: Cloruros + consorcio, H1: Hoffmann + cepa pura, H2: Hoffmann + consorcio.



La fracción orgánica del carbón representada por las bandas 750 cm^{-1} , 810 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} , 1372 cm^{-1} , 1436 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} , permanecieron invariables a lo largo del proceso de biooxidación.

En cuanto a la jarosita se observó en particular que la banda 1090 cm^{-1} durante el proceso de biolixiviación aumenta con respecto a la muestra inicial y que la baja intensidad de las bandas en 510 cm^{-1} y 630 cm^{-1} presentes en la muestra inicial, solo se logró observar en los tratamientos H1, H2, C1 y T1.

Debido a que la banda de pirita (420 cm^{-1}) se encontraba cerca al rango de barrido ($400\text{ cm}^{-1} - 4000\text{ cm}^{-1}$) no se pudo observar con exactitud si esta disminuyó en comparación con la banda de pirita presente en la muestra de carbón original.

Finalmente, las bandas correspondientes a los minerales arcillosos y compuestos de sílice, como la caolinita, illita y moscovita fueron de intensidades mayores a las observadas en la muestra inicial, especialmente las bandas en 864 cm^{-1} y 1032 cm^{-1} .

- **Microscopía Electrónica de Barrido**

El análisis realizado por medio de la técnica de microscopía electrónica (SEM/EDS) para los diferentes medios de cultivo evaluados, se encuentra en las Figuras 4-25, 4-26, 4-27 y 4-28. Mediante este análisis se pudo observar los surcos de corrosión generados en los cristales de pirita después del tratamiento de biodesulfurización. Las micrografías además permiten observar la formación de hidroxisulfatos de hierro, como la jarosita, asociados a la disolución del mineral. Adicionalmente, se determinó a priori la microquímica de las fases minerales presentes en las muestras de carbón al final de cada proceso de biolixiviación.

Medio de cultivo T&K

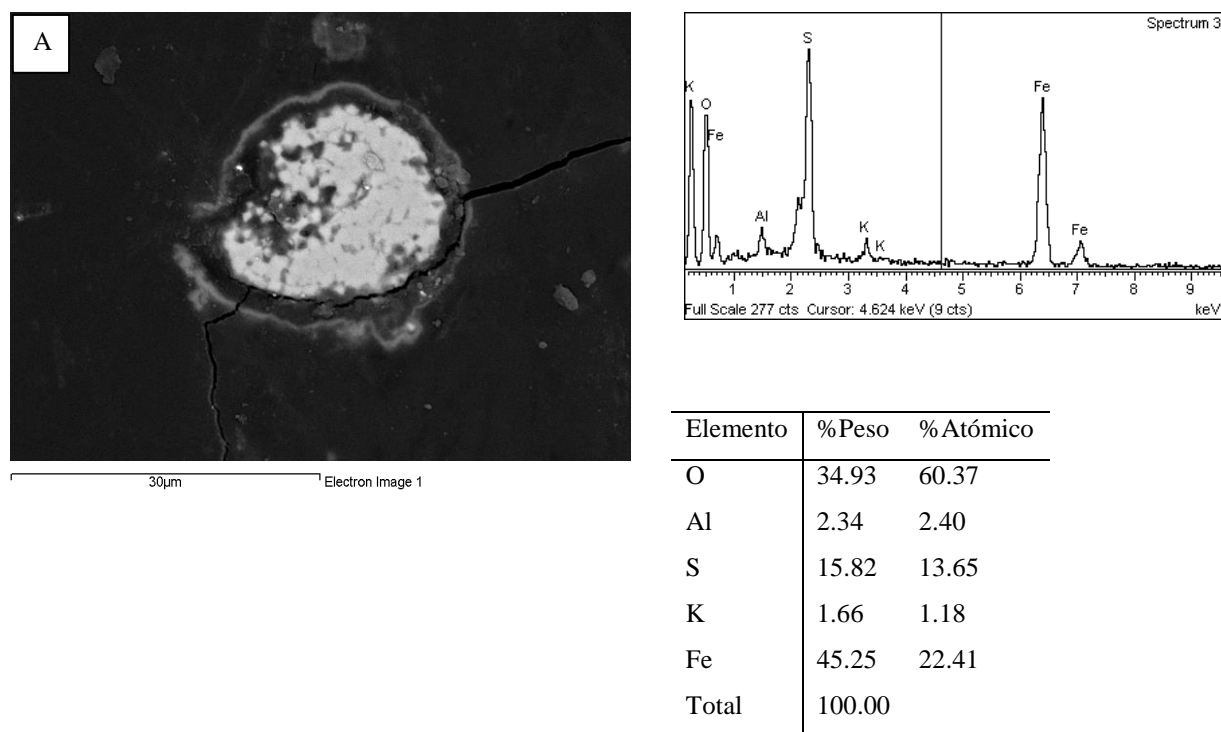
En la Figura 4-25, se observa el análisis de SEM/EDS al bioensayo con el medio de cultivo T&K. Se observó la transformación o pérdida de la forma geométrica ‘redondeada’ definida de los framboides de pirita y la formación de películas de jarosita alrededor de estas (Figura 4-25A) y sobre los granos de

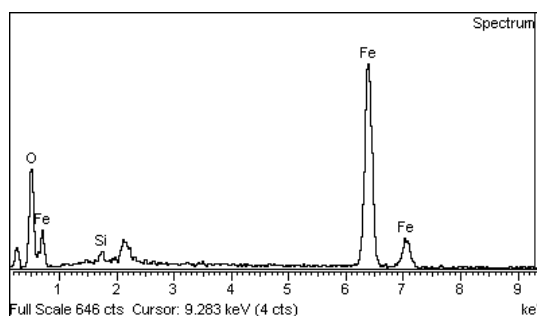
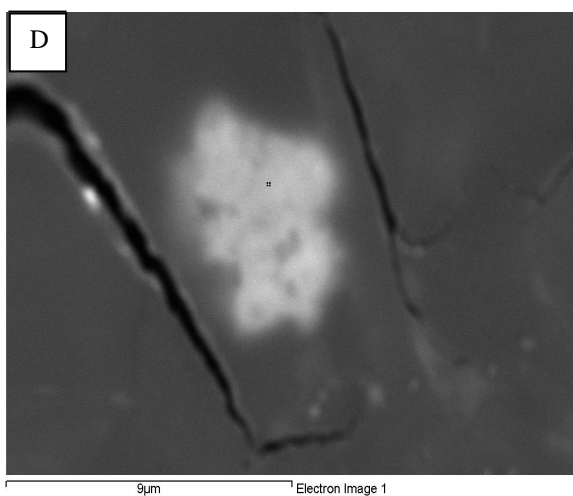
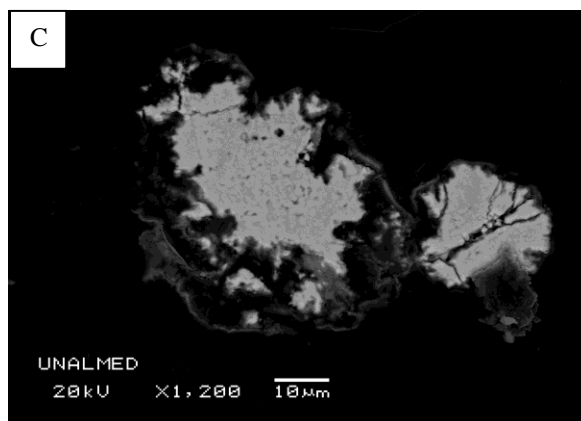
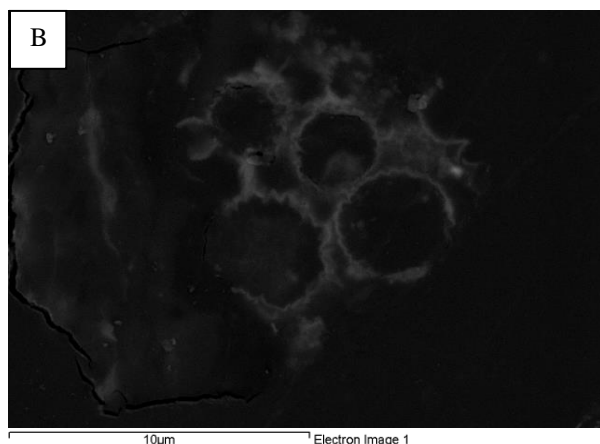
carbón (Figura 4-25B). El análisis microquímico en la película alrededor de la pirita (EDS) permitió observar la precipitación de iones de potasio (K^+) de aluminio (Al^+) (Figura 4-25A).

Se observaron claros surcos de corrosión sobre los cristales euedrales de la pirita que los lleva a la pérdida de su geometría (Figura 4-25C).

Además, los ensayos de biodesulfurización con el medio de cultivo T&K contribuyeron a la formación de goethita, mineral del grupo de los óxidos e hidróxidos (Figura 4-25D), con un contenido del 50% de hierro, oxígeno y la presencia de trazas de silicio que correspondían posiblemente a las arcillas asociadas al mineral. Este hidróxido no se encontró mediante técnicas de caracterización como el DRX, lo que indica que se encontraba en una baja concentración en la muestra de carbón o se promovió su formación.

Figura 4-25: Micrografías de SEM en los bioensayos con el medio de cultivo T&K. Framboide de pirita semi-corroída con película superficial de jarosita en los bordes y su respectivo análisis microquímico EDS (A). Películas de jarosita en los granos de carbón (B). Granos de pirita euedral con golfos de corrosión (C). Formación de Goethita y su respectivo análisis microquímico EDS (D)





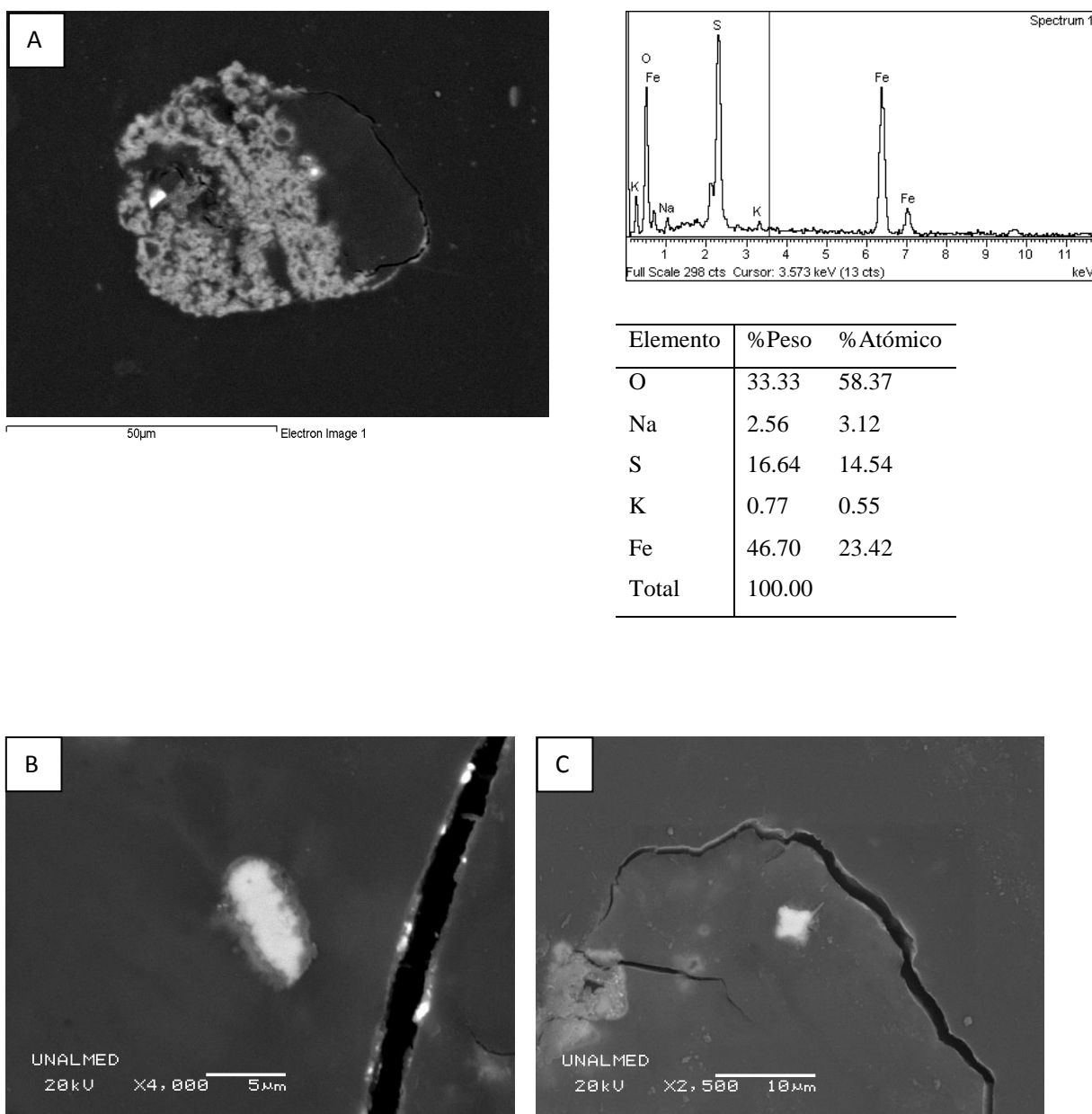
Elemento	%Peso	%Atómico
O	21.74	48.82
Si	1.31	1.68
Fe	76.95	49.50
Total	100.00	

Medio de cultivo Cloruros

En la Figura 4-26, se presenta el análisis de SEM/EDS al bioensayo con el medio de cultivo Cloruros. Se observaron pseudomorfos de jarosita asociada a los bordes de los granos de carbón, producto de la oxidación de la pirita (Figura 4-26A). Además, a partir del espectro del análisis de EDS se observa la formación de jarosita (K^+) y natrojarosita (Na^+).

Las Figuras 4-26B y 4-26C, muestran que la oxidación de las piritas euedrales ocurre desde los bordes hacia el centro del cristal, deformando sus caras geométricas.

Figura 4-26: Micrografías tomadas de las muestras de carbón sometidas a biolixiviación usando el medio de cultivo Cloruros. Pseudomorfo de jarosita asociado a los bordes de un grano de carbón y su respectivo espectro de EDS (A). Piritas euedrales corroídas en cercanías de grietas en granos de carbón (B) y (C)



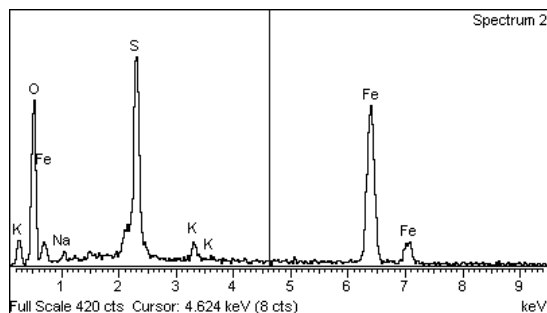
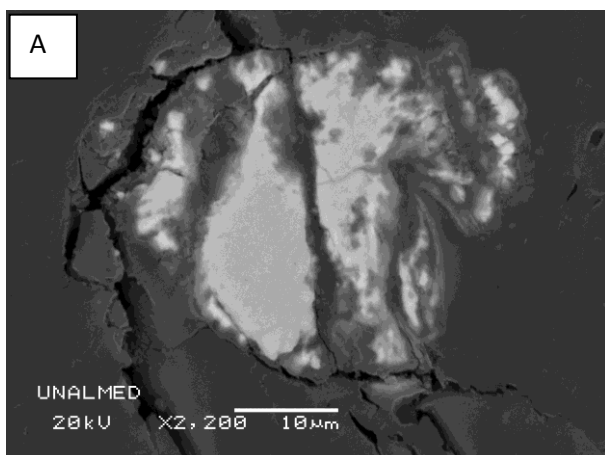
Medio de cultivo Hoffmann

Las Figuras 4-27 y 4-28 son micrografías que muestran la transformación de los cristales de pirita durante el proceso de biolixiviación usando el medio de cultivo Hoffmann.

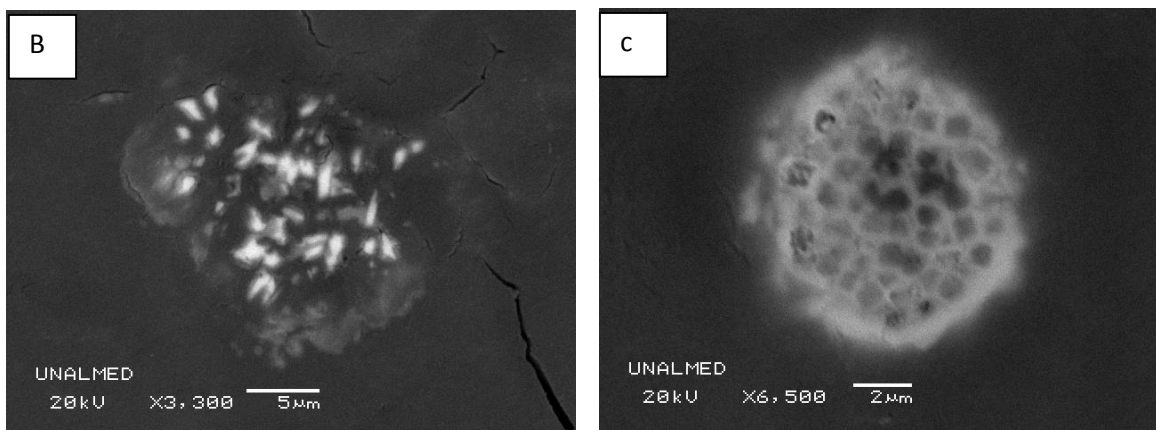
En la Figura 4-27, se observa cómo la disolución de los granos de pirita con mayor cercanía a las microgrietas del carbón presentan una alta corrosión y golfos muy definidos por el ataque químico (Figura 4-27A). El análisis microquímico (EDS) muestra la formación de jarosita y natrojarosita en los sitios de disolución de la pirita.

En la Figura 4-27B, se evidencia la alta corrosión en los microcristales del mineral sulfurado, y es notorio que son restos de una estructura framboidal. En la Figura 4-27C, se aprecia una pirita framboidal disuelta reemplazada por un pseudomorfo de jarosita.

Figura 4-27: Micrografías del proceso de biodesulfurización de carbón usando el medio de cultivo Hoffmann. Pirita euédral corroída en cercanías a grietas en granos de carbón y el análisis microquímico EDS para la película de jarosita (A). Micro-cristales de pirita altamente corroídos (B). Pseudomorfo de pirita framboidal como jarosita (C)

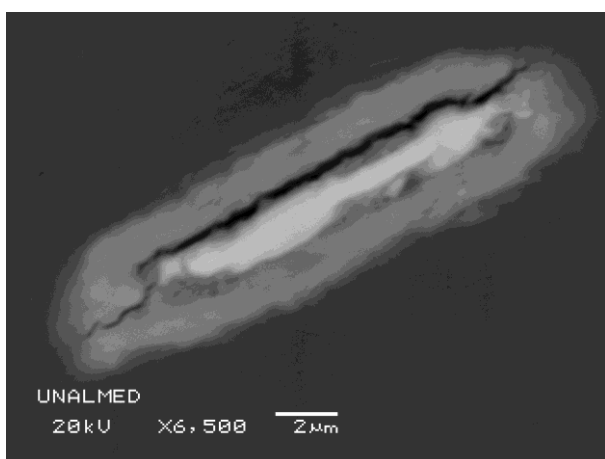


Elemento	%Peso	% Atómico
O	34.42	59.91
Na	1.94	2.35
S	15.39	13.36
K	1.49	1.06
Fe	46.76	23.32
Total	100.00	

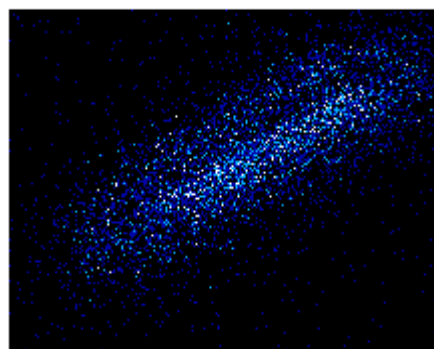


Adicionalmente, se realizó un mapa composicional de un cristal de pirita y se muestra en la Figura 4-28; esto, con el fin de observar cómo es ocupado el espacio que van dejando los cristales disueltos. Se observó que los sectores oxidados, van comenzando a ser ocupados por precipitados de jarosita. Los elementos se distribuyeron espacialmente en el sector corroído. Mientras el área interior estuvo conformada por azufre y hierro, en los bordes se encontraron elementos como el oxígeno y en pequeñas trazas el potasio.

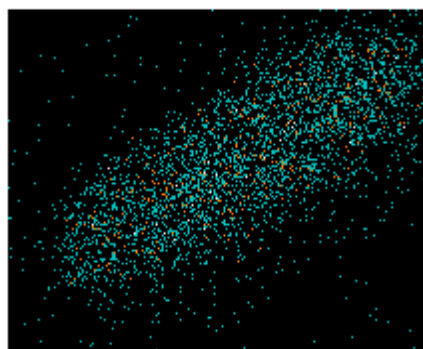
Figura 4-28: Mapa composicional del proceso de biolixiviación de un cristal de pirita corroído y bordeado por película de jarosita en el bioensayo usando el medio Hoffmann. Se presenta un mapa composicional y el respectivo análisis micro-químico (EDS)



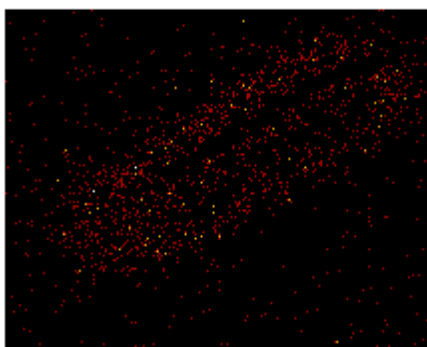
Elemento	%Peso	%Atómico
O	34.25	59.02
S	22.60	19.43
K	1.13	0.79
Fe	42.03	20.75
Total	100.00	



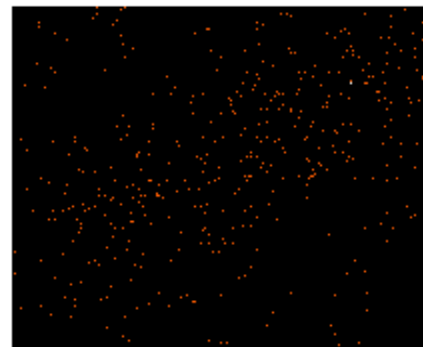
S Ka1



Fe Ka1



O Ka1



K Ka1

4.4. Discusión

4.4.1 Adaptación de microorganismos

El potencial redox (Figuras 4-1 a 4-4) fue dependiente de la cantidad de iones férricos en solución. Con este parámetro es posible inferir cómo fue el crecimiento celular ya que la regeneración iónica, en este tipo de procesos, está estrechamente ligada a la cantidad de células presentes en las suspensiones de biolixiviación (Rossi, 1990). Los dos procesos de adaptación, tanto al incremento en la concentración de mineral, como a los distintos medios de cultivo a evaluar, permitieron observar que los microorganismos requirieron de una adaptación paulatina que les permitió prepararse ante las distintas condiciones ambientales, para así poder llevar a cabo una buena actividad oxidativa.

Algunos investigadores consideran además, que la exposición bacteriana a minerales de sulfuro generan inhibición, sobre todo a altas concentraciones de pulpa, ya que esto produce una reducción en la velocidad de transferencia de oxígeno y dióxido de carbono, desgastan las células como

consecuencia del contacto con las partículas de mineral y generan un efecto tóxico debido al alto contenido de iones metálicos lixiviados (Marhual et al., 2008; Akcil et al., 2007; Hoffmann et al., 1981). Trabajos de investigación con carbón han mostrado como durante los procesos de biodesulfurización no se da solamente la disolución de la pirita sino de otros componentes inorgánicos/orgánicos y minerales como la caolinita y los silicatos que brindan a la suspensiones Al y Si, los cuales son tóxicos e inhiben la actividad de la bacteria *A. ferrooxidans* (Malik et al., 2001; Malik et al., 2004). Sin embargo, se considera que los cultivos bacterianos pueden adaptarse a tolerar toda esta serie de efectos adversos e inhibitorios (Xia et al., 2008; Mason y Rice, 2002).

Los microorganismos lograron acondicionarse al cambio en las sales basales de los medios, pasando de un medio principalmente a base de sales de sulfato a otros compuestos fundamentalmente de sales de cloro. El método de adaptación basado en series de subcultivos con concentraciones crecientes de iones metálicos, como fue usado en esta investigación, es bastante empleado por distintos investigadores (Haghshenas et al., 2009), demostrando que aún bajo condiciones altamente hostiles, los microorganismos acidófilos a través de las distintas etapas de adaptación, fueron capaces de reducir la fase *lag* que se evidenciaba los primeros días del proceso en las primeras etapas y alcanzaron a valores cada vez más altos de potencial redox.

4.4.2 Ensayos de Biodesulfurización de carbón

Los medios de cultivo evaluados fueron seleccionados, debido a que se propusieron en anteriores trabajos de investigación con carbón y pirita. Como el objetivo de la investigación era tratar de encontrar medios alternativos con los que se pudiera minimizar la precipitación sobre la superficie del mineral, se seleccionaron medios a base de cloruros ya se tenía una referencia por investigaciones previas, que las bacterias eran capaces de realizar sus actividades metabólicas y contribuir a catalizar el proceso de biolixiviación en presencia de este tipo de sales (Caicedo y Márquez, 2013).

Además del criterio de selección anterior, se decidió trabajar con el medio de cultivo Hoffmann, que carece de fuente de nitrógeno, con el fin de evaluar el papel de dicho elemento sobre la actividad de los microorganismos (en particular sobre *Acidithiobacillus ferrooxidans*), dentro del proceso de biodesulfurización de carbón, ya que se sabe que el nitrógeno es fundamental en la síntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas, hidratos de carbono, lípidos, cofactores de enzimas y otros componentes celulares (Prescott et al., 2004). Y aunque los microorganismos prefieren usar el nitrógeno que aportan fuentes inorgánicas como el amonio, se habla también de la capacidad que tienen estas bacterias para fijar el nitrógeno atmosférico (Prescott et al., 2004).

Del comportamiento del pH a través del tiempo para la cepa pura y el consorcio (Figuras 4-5 y 4-12), se observó que los medios de cultivo presentaron un incremento significativo en este parámetro los primeros días del proceso, y como se mencionó en el Capítulo 3 (Véase sección 3.6.2), es probable que este incremento haya sido debido a la presencia de minerales arcillosos (caolinita e illita) en la muestra de carbón que al disolverse consumen ácido.

El efecto del carbón fue contrarrestado en los tratamientos donde se usó el consorcio de bacterias acidófilas, ya que se observa una clara disminución en el pH hasta el final del proceso (Figura 4-12), lo que no se presenta en los bioensayos con la cepa pura. Este resultado es similar a lo que se ha observado en otras investigaciones (Liu et al., 2011). La evidente disminución en este parámetro en presencia del consorcio no solamente pudo ocurrir por la generación de protones durante la hidrólisis de iones férricos, la solubilización de pirita, y las precipitaciones de hidróxidos y jarosita (Kaksonen et al., 2014; Casas, 2000), sino que en gran medida se consideró que fue probablemente debido a la presencia de la bacteria *A. thiooxidans*, cuya principal función es la generación de sulfatos y protones (ácido sulfúrico) durante el proceso de lixiviación a partir del azufre elemental adicionado al medio (Kamimura et al., 2005).

Además, se observó que el incremento inicial de pH en los ensayos con los medios de cultivo de sales basales de cloro (Cloruros y Hoffmann) fue mayor que el que se obtuvo con T&K, tanto en presencia de la cepa pura como del consorcio. Aunque los microorganismos acidófilos presentaron cierta tolerancia a los iones de Cl^- , la alta permeabilidad de estos iones hizo que se constituyeran en inhibidores del sistema de enzimas oxidantes de hierro ferroso y del crecimiento celular (Gahan et al., 2010; Harahuc et al., 2000; Din y Suzuki, 1967). Un elevado incremento en el pH pudo haber afectado la velocidad de crecimiento de los microorganismos, especialmente en presencia de la cepa pura en los medios de cultivo Cloruros y Hoffmann (Figura 4-7), ya que se considera que este parámetro influye sobre los grupos ionizables presentes en las enzimas citoplasmáticas y periplasmáticas de las células, que les permite enlazarse con los sustratos que requieren para su crecimiento (Gómez y Cantero, 2005).

El mecanismo de inhibición de los iones de cloro en *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* es atribuido al flujo de Cl^- a través de la membrana citoplasmática, puesto que disipa el potencial positivo de la membrana, resultando en una fuga de H^+ dentro de la célula y perturbando los procesos de homeostasis celular (Gahan et al., 2010). La entrada de cloro y protones a las células genera un desequilibrio en el potencial de membrana y la fuerza motriz protónica que afecta directamente la capacidad oxidativa de

las bacterias, ya que esta fuerza determinada por el gradiente de pH entre la célula y su exterior, es la que impulsa de manera directa los mecanismos de producción de ATP y NADPH, moléculas energéticas fundamentales para la fijación de carbono, necesario en la síntesis de material celular (Gahan et al., 2010; Gahan et al., 2009; Meruane, 2002; Suzuki et al., 1999). Todo esto conlleva a un desequilibrio en la cadena de transporte de electrones provenientes de la oxidación del ion ferroso y por tanto una reducción en la capacidad de solubilización de la pirita.

El efecto del cloro es casi cuatro veces más grande que el efecto de los sulfatos en los medios de cultivo, presentando efectos iniciales en el crecimiento, como el aumento en la fase *lag* y la reducción en la velocidad de crecimiento celular (Shiers et al., 2005). Además, en investigaciones de biolixiviación sobre sulfuros de zinc, se observó una tendencia decreciente con el aumento en las concentraciones de cloruros (Deveci et al., 2008).

Las menores concentraciones celulares se obtuvieron en los bioensayos en los que se usó la cepa pura y los medios de cultivo Cloruros y Hoffmann, esto da indicio de que a pesar de la adaptación realizada, la concentración de iones Cl^- en el medio pudo influenciar de forma negativa el crecimiento bacteriano de *A. ferrooxidans*.

Las bajas concentraciones celulares en el ensayo Hoffmann pudieron resultar también de la carencia de una fuente de nitrógeno en este medio de cultivo. En algunas investigaciones se ha hablado de la capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico de las bacterias acidófilas, especialmente de *A. ferrooxidans* (Norris et al., 1995; Mackintosh et al., 1978) y se ha encontrado que la oxidación de hierro no se ve inhibida por la falta nitrógeno en los medios de cultivo, incluso después de varios subcultivos, debido a que los medios ácidos facilitan la absorción de amonio de la atmósfera (Tuovinen et al., 1971). No obstante, en las bacterias evaluadas se observó una disminución en su crecimiento y actividad oxidativa, probablemente porque la necesidad de fijar nitrógeno del aire presenta una demanda energética alta para alcanzar crecimientos similares a los observados en los demás ensayos, puesto que se requiere reducir el N_2 a NH_4^+ , lo que a su vez limita la asimilación de CO_2 (Tyson et al., 2005; Tuovinen et al., 1979).

La reducción de nitrógeno atmosférico a amonio la cataliza generalmente la enzima nitrogenasa, la cual es bastante propensa a sufrir inactivación por presencia de oxígeno y además es una reacción exergónica, lo que hace que el microorganismo necesite para este proceso una energía de activación

alta y por esto es que precisa de un alto gasto energético o de ATP (Prescott et al., 2004). Por tanto, suministrar fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables como el amonio a este tipo de cultivos, se hace necesario, a menos que el mineral contenga compuestos de fácil disolución en ácido que provean nitrógeno al microorganismo.

Cabe resaltar que a pesar de haberse observado al final del proceso en el ensayo Cloruros + consorcio la mayor concentración celular, durante los primeros nueve días en este bioensayo se presentaron las más bajas concentraciones bacterianas (Figura 4-14). Sin embargo, el rápido crecimiento observado en este bioensayo pudo haberse relacionado con que el crecimiento sobre azufre indujo nuevas proteínas en las células que también crecieron sobre una fuente de hierro (Ohmura et al., 1996). Cuando *A. ferrooxidans* crece sobre azufre induce proteínas en la membrana externa como la sulfuro thiosulfato transferasa, proteínas de transporte de polisacáridos y otras de función desconocida (Ramírez et al., 2004). Es probable que este resultado se haya originado por la presencia de azufre elemental en estos bioensayos (y la no carencia de fuente de nitrógeno), lo que permitió al consorcio de bacterias expresar ciertas vías metabólicas o enzimas en la membrana de las bacterias que contribuyeran a protegerlas y atenuaran el efecto tóxico de los iones de cloro.

Pese a lo anterior, el efecto negativo que promueven iones de cloro sobre la actividad de la población bacteriana se puso de relieve al observar que en los ensayos Cloruros y Hoffmann se presentaron los más bajos potenciales redox (Figuras 4-6 y 4-13), concentraciones de iones férricos (Figuras 4-11 y 4-18) y los menores porcentajes de hierro solubilizado (Figuras 4-8 y 4-15) independientemente del tipo de inóculo usado.

Una población bacteriana que ha sido sometida a condiciones de estrés presenta una actividad oxidativa deficiente que le impide producir una regeneración de iones férricos adecuada. Lo que es un resultado indeseable, ya que estos iones son los agentes determinantes en los procesos de biolixiviación, están directamente relacionados con el proceso de disolución de hierro y por tanto, la velocidad de disolución de los minerales depende de que exista en la fase acuosa una alta concentración de estos, y una baja concentración de iones ferrosos y protones (Gahan et al., 2009).

Se observó además que la concentración de iones férricos fue mayor en las disoluciones en presencia del consorcio (Figura 4-18). Lo anterior, fue posiblemente debido a que la presencia de *A. thiooxidans* puede generar un metabolismo complementario y/o crecimiento sinérgico con las bacterias oxidantes de hierro (*A. ferrooxidans*), además de que favorece la formación de biofilms. Varias investigaciones

comparan el rendimiento de los cultivos puros y mixtos en procesos de biolixiviación, mostrando que los cultivos mixtos a pesar de la complejidad de sus interacciones proporcionan una más rápida oxidación de los sulfuros y un ataque más eficiente de la pirita, por el incremento en la relación Fe^{3+}/Fe^{2+} (Bellenberg et al., 2014; Akcil et al., 2007; Battaglia et al., 1998). Además, de que con la presencia de *A. thiooxidans* el azufre que se produzca durante el proceso puede removerse de la superficie de los minerales continuamente, haciendo que no se vea afectada la actividad de las bacterias oxidantes de hierro (Akcil et al., 2007).

Por otro lado, en el control para el ensayo T&K se observó una pequeña disolución de hierro al primer día del proceso, y esta probablemente es debida a la oxidación química del azufre no pirítico presente en la muestra inicial de carbón. No se considera que esta solubilización haya provenido de la pirita, ya que este no es un mineral soluble en ácido y la imposibilidad de re-generación de iones Fe^{3+} en estas suspensiones abióticas, brinda elementos para decir que la pirita es únicamente disuelta cuando en el ambiente existen bacterias oxidantes de iones ferrosos (Schippers, 2007; Rohwerder y Sand, 2007; Olson, 1991). La solubilización en el control del ensayo T&K es del 10% (442ppm), pero posteriormente ocurre la precipitación de ese solubilizado, dando evidencias de los problemas de solubilidad químicos que se presentan a concentraciones iguales o superiores a 800ppm de sulfatos (concentración aportada por el sulfato de amonio y sulfato de magnesio en el medio T&K) en procesos de biodesulfurización de carbón.

La precipitación de hierro ocurre los primeros días del proceso (Figuras 4-9 y 4-16), indicando que probablemente se deba al incremento inicial en el pH y/o el efecto del carbón sobre el proceso (Kiani et al., 2014). Es posible considerar esto, ya que algunos investigadores consideran que la precipitación está influenciada fuertemente por factores como la temperatura, la edad del mineral, el pH, la composición iónica y la presencia de carbono disuelto en el mineral (Caicedo y Márquez, 2013; Nurmi et al., 2010; Liao et al., 2009; Cardona y Márquez, 2009; Wang et al., 2006).

Los ensayos Cloruros y Hoffmann presentaron un porcentaje de precipitado mayor tanto para la cepa pura como para el consorcio, evidenciado que el pH juega un papel fundamental en la solubilidad de los iones en las suspensiones (Pappu et al., 2006). Aunque se considera que la formación de jarosita solo se presenta a un pH superior a 2.0, que medios de cultivo con pH inferior a 1.8 son adecuados para limitar la precipitación de este hidroxisulfato de hierro (Gómez y Cantero, 2005; Carranza y García, 1990) y la solubilidad de los iones férricos disminuye a pHs superiores a 2.5 (Nurmi et al., 2010), se ha encontrado en otros trabajos de investigación que la jarosita puede formarse a pHs

altamente ácidos, incluso menores a 1.0 (Gramp et al., 2008; Dutrizac, 1980; Babcan, 1971) y cuando se tienen ambientes ricos en sulfato (Kaksonen et al., 2014). Adicionalmente, en otras investigaciones se ha observado la precipitación de jarosita alrededor de la pirita y el carbón desde el inicio del proceso de biodesulfurización (Cardona y Márquez, 2009).

Kaksonen y colaboradores (2014), usaron modelos empíricos para determinar la velocidad de oxidación y precipitación de hierro de acuerdo al pH inicial de las soluciones de lixiviación (1.0 a 2.2). Encontrándose con que la oxidación de los iones ferrosos y la precipitación de los iones férricos son función del pH inicial de la solución, y que dicha precipitación incrementa a medida que disminuye la acidez. Esto es un indicio de que el incremento en el pH al inicio del proceso, debido a minerales presentes en el carbón (arcillas), favoreció el proceso de precipitación en todos los medios de cultivo evaluados.

De otro lado, aunque los ensayos con los medios de cultivo Cloruros y Hoffmann alcanzaron buenos porcentajes de oxidación, no lograron los obtenidos con el medio T&K. (Figuras 4-10, 4-17 y 4-21). Se obtuvieron porcentajes de oxidación entre el 78% y el 84%. Este rango de resultados es comparable a los que han sido logrados para procesos similares usando el medio de cultivo T&K y medios con adición de iones Cl⁻. Caicedo y colaboradores (2013), realizaron un proceso de biodesulfurización de carbón evaluando el medio de cultivo Cloruros y T&K con un consorcio de bacterias acidófilas, obteniendo un porcentaje máximo de oxidación de pirita del 70% cuando usaron del medio a base de cloruros. Hoffmann y colaboradores (1981), lograron un porcentaje de desulfurización bacteriana entre 90% - 98% en 12 días con un tamaño de partícula < 74µm usando el medio de cultivo que se ha llamado Hoffmann en esta investigación. Otros investigadores como Acharya y colaboradores (2001) llevaron a cabo un proceso de biodesulfurización de tres tipos de carbones usando una cepa aislada de *A. ferrooxidans*. Ellos generaron un porcentaje de remoción de azufre del 91% en un carbón lignítico, usando un pH de 1.5, un tamaño de partícula <45µm durante un período de incubación de 30 días.

Se observó que los resultados obtenidos en la investigación están acordes con la literatura y que incluso se han obtenido resultados satisfactorios, debido a que en este proyecto el tamaño de partícula usado es alto (<250µm). Durante el proceso se observa que por un lado la presencia de sulfatos entorpecen la solubilización del mineral ya que contribuyen a la formación de precipitados y los cloruros por su parte afectan directamente a los microorganismos que participan en el proceso.

El porcentaje de hierro solubilizado brinda una 'idea' inicial de con qué medios de cultivo se alcanza una mayor solubilización de la pirita presente en el carbón, y esta idea se complementó con los análisis

de precipitación de hierro y cuantificación de las diferentes formas de azufre presentes en el carbón después del tratamiento de biodesulfurización, lo que brindó un panorama más general de con cuál medio de cultivo se benefició el proceso.

A partir de la cuantificación de las diferentes formas de azufre para las muestras sólidas al final de los bioensayos (Tabla 4-1), se evidenció que los tratamientos con medios de sales basales de cloro (Hoffmann y Cloruros) y sales basales de sulfatos (T&K), en presencia de microorganismos acidófilos como *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*, contribuyeron a minimizar el contenido de azufre en forma de pirita principalmente, reduciendo así el contenido de azufre inorgánico total en la muestra de carbón.

Sin embargo, se observó que el porcentaje de azufre en forma de sulfatos fue mayor al final del proceso (Tabla 4-1) en comparación con el porcentaje de azufre que contenía la muestra original, principalmente en los bioensayos con el medio T&K. Esto permite corroborar que el azufre una vez solubilizado se pudo haber re-precipitado en el sistema, incorporándose nuevamente a la matriz carbonosa, pero en forma de sulfatos.

Además, se evidenció que aunque la concentración de azufre elemental adicionado a los bioensayos en presencia del consorcio fue mínima (0,05% w/v), esta se convierte en una fuente adicional de sulfatos y contribuye a la reducción del porcentaje de remoción de azufre inorgánico, principalmente en los bioensayos con altas concentraciones de sales de sulfato, como T&K.

La composición del medio de cultivo ejerció una fuerte influencia sobre la solubilización de hierro, la capacidad oxidativa y la remoción de azufre inorgánico. El objetivo de este tipo de proyectos es alcanzar altas tasas de remoción de azufre, que se lograron por la ausencia de sulfatos de una manera más eficaz en los medios a base de cloro, especialmente en el medio Cloruros. Es importante resaltar que a pesar de la toxicidad de los iones Cl^- y aún en ausencia de una importante fuente de nutriente como lo es el amonio, se lograron buenos porcentajes de oxidación del mineral en los medios Cloruros y Hoffmann. Sin embargo, se recomienda que con el uso de los medios a base de cloruros se empleen cepas que presenten resistencia a este tipo de iones.

4.4.3 Caracterización de muestras de carbón tratadas

Después de los tratamientos, se observó una clara oxidación de la pirita presente en el mineral y la formación de precipitados principalmente jarositas de K^+ y Na^+ (natrojarosita). La estabilidad de las jarositas de acuerdo a la energía libre de Gibbs se presenta en el orden $\text{K}^+ > \text{Na}^+ \sim \text{H}_3\text{O}^+ > \text{NH}_4^+$ y por tanto, la formación de potasio jarosita durante este tipo de procesos normalmente es la forma

predominante, pero en el presente trabajo la jarosita de sodio fue significativa (Gaboreau y Vieillard, 2004; Dutrizac y Jambor, 2000; Kaksonen et al., 2014). Es probable que bajo las condiciones de acidez, temperatura y composición iónica específicas del proyecto, se hubiera favorecido la solubilidad de los iones de potasio y se promoviera la formación preferencial de sodio jarosita (proveniente del mineral de Albita asociado a la muestra de carbón). Además de que la solubilidad de las jarositas obedece a los equilibrios iónicos entre complejos de sulfatos, y especies como HSO_4^- y H^+ (Casas et al., 2007).

En algunos análisis micro-químicos se observó que la relación estequiométrica ($\text{Fe}:\text{SO}_4$) de la jarosita no fue exacta. En otros trabajos también ha sido observada la deficiencia de hierro en esta relación molar, siendo significativamente menor que la ideal (3:2) (Kubisz, 1970; Alpers et al., 1989).

La formación de hidróxidos de hierro, probablemente goethita (Figura 25C) también ha sido identificada en esta investigación en el ensayo T&K. Breemen (1976), y Brady y colaboradores (1986) observaron en sus investigaciones la formación de goethita en suelos sulfato-ácidos y en drenajes ácidos de mina. Se ha considerado que la formación de este mineral es una consecuencia negativa común en los procesos hidrometalúrgicos de remoción de hierro y que cuando se produce la hidrólisis de hierro en presencia de sulfatos (relación de $\text{SO}_4 < 0.5$) se favorece la formación de goethita por encima de otros óxidos (Barral, 1989; Willis, 2007; Kaksonen et al., 2014).

En los distintos tratamientos se evidenció que los granos de pirita más altamente corroídos, son los que se encuentran en la cercanía de las grietas o micro-fracturas en los granos de carbón, debido a que a través de estas se facilita el contacto del mineral con la disolución en la que se encuentran los agentes lixiviantes (iones Fe^{3+}) y los microorganismos involucrados. Además, que las estructuras más fácilmente oxidables son los framboides ya que al estar conformados por micro-granos de sulfuro son altamente porosos. Las estructuras euedrales por su parte, pierden su geometría de caras bien definidas y muestran una oxidación que va desde los bordes hacia el centro del cristal (Donlan, 2002).

La presencia de Si y Al en los análisis micro-químicos EDS del carbón corroboraron la existencia de arcillas asociadas al mineral evaluado. La presencia de arcillas afecta este tipo de procesos ya que no solo generan un efecto de impermeabilización del carbón, sino que disminuyen el proceso de transferencia de oxígeno, reducen la concentración celular en suspensión y generan un negativo incremento inicial en el pH de las suspensiones, lo cual contribuye a la formación de precipitados y dificultan el proceso global de biolixiviación (Garzón et al., 2010; Sarcheshmehpour et al., 2009).

La baja intensidad en los picos y bandas correspondientes a la materia mineral en la muestra de carbón evaluada, impidieron que las técnicas DRX y FTIR aportaran mayor información al proceso. A pesar de esto, los resultados que pudieron obtenerse son coherentes y respaldan los resultados del proyecto en cuanto a generación de jarosita y disminución de la concentración de pirita en la muestra de carbón inicial.

Además de que el contenido de pirita fue de solo el 1%, se consideró que la proporción de minerales también es relativamente baja, ya que los picos en el difractograma fueron pequeños. Pero, vale la pena anotar que el pico amplio y grande, que domina el difractograma, fue debido a una alta concentración de grafito y al aporte del carbón como material amorfo. Este pico amorfo se encuentra entre el rango 25° y 26.6° (2θ), se relaciona con la fracción orgánica del carbón y varía de acuerdo al rango de éste (Manoj y Kunjomana, 2012; Maity y Mukherjee, 2006). En algunos estudios se ha encontrado que en carbones de rangos bajos, el componente amorfo no solo es aportando por el carbón, también lo hacen algunos sulfatos e hidróxidos de hierro amorfos (Mojica, 2008). Además, a un mayor rango y tamaño de grano en el carbón, la intensidad del espectro aumenta (Maity y Mukherjee, 2006).

Se comprueba además, que la biodesulfurización no es una técnica invasiva que afecte la estructura del carbón. A través de la técnica de FTIR se observó que se mantuvo la integridad en las bandas correspondientes a los enlaces aromáticos, éteres, esterres y los enlaces relacionados con la fracción orgánica propia del mineral, como no ocurre por ejemplo, con algunas metodologías de desulfurización químicas.

La lenta cinética de la biodesulfurización hace que se proponga la combinación de metodologías de desulfurización, físicas y biológicas que aceleren el proceso y permitan obtener remociones más altas de pirita y hacer más viable el proceso a nivel económico (Blázquez et al., 1991).

4.5. Conclusiones preliminares

Se alcanzó un porcentaje máximo de oxidación de pirita del 84% en las suspensiones en las que se usó el medio de cultivo T&K. Sin embargo, se observó que la presencia de altas concentraciones de sulfatos en los medios de cultivo generan problemas de solubilidad química.

Los medios de cultivo a base de sales basales de cloro redujeron la precipitación de sulfatos en los medios de cultivo; sin embargo, afectaron los procesos de solubilización de pirita, debido a que los iones de cloro son altamente permeables a las membranas citoplasmáticas de las bacterias acidófilas, y

afectan la velocidad de crecimiento bacteriano y todo el sistema enzimático de oxidación de hierro ferroso.

A pesar de la toxicidad de los iones Cl^- y aún en ausencia de una importante fuente de nutriente como lo es el amonio, se lograron buenos porcentajes de oxidación del mineral en los medios de cultivo Cloruros (78.43%) y Hoffmann (79.41%). Siendo posible conducir este tipo de procesos con estos dos medios de cultivo y especialmente con el medio Cloruros, ya que aunque con este no se obtuvo los mayores porcentajes de oxidación, al final permitió obtener un porcentaje más alto de azufre inorgánico removido con cualquiera de los tipos de inóculo usados.

Las sales de sulfato interfirieron en el proceso mediante la formación de precipitados (mayor precipitación de sulfatos), mientras que las sales de cloro afectaron de forma directa la actividad y crecimiento de los microorganismos implicados en el proceso.

La adición de azufre elemental (en los consorcios) probablemente contribuyó a atenuar la toxicidad de los iones de Cl^- , al expresarse proteínas de membrana que confieren resistencia.

El suministro de fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables como el amonio es indispensable para que las bacterias acidófilas no gasten energía de forma innecesaria durante la reducción de nitrógeno atmosférico, ya que esto afecta su velocidad de crecimiento y actividad oxidativa.

El pH es un factor que juega un rol fundamental en la solubilidad de los iones en las suspensiones de biolixiviación. La formación y precipitación de jarosita en los procesos de biodesulfurización se observó desde el inicio del proceso fue función del incremento en este parámetro en los primeros días del proceso.

La presencia de Al y Si lixiviado de las arcillas se observó mediante las técnicas de caracterización, especialmente a través de los análisis químicos en SEM, y son metales que influyeron negativamente en el proceso de biodesulfurización, ya que impermeabilizan el carbón, afectando la transferencia de oxígeno y contribuyen a los incrementos en el pH de las suspensiones, contribuyendo a la formación de precipitados.

La técnica de caracterización que más aportes brindó a los resultados fue la técnica de microscopía óptica (SEM), ya que permitió identificar la presencia de elementos que con las demás técnicas no se evidenciaron y permitió observar de forma clara la oxidación de la piritita y la formación de jarosita.

Evidenciándose que la corrosión de pirita se ve favorecida en la cercanía de las grietas, en las microfracturas de los granos de carbón y en las estructuras framboidales debido a su alta porosidad.

5. Evaluación de diferentes medios de cultivo sobre un proceso de biodesulfurización de carbón en reactores de tanque agitado

5.1. Introducción

Son múltiples los obstáculos y el esfuerzo que tienen que realizar las bacterias involucradas en procesos de biolixiviación, con el objetivo de crecer y oxidar compuestos reducidos de azufre y hierro para producir la energía que necesitan, en sus rutas metabólicas y en la biosíntesis de material celular. Sin embargo, hay que destacar la gran capacidad que presentan estos microorganismos para adaptarse a ambientes altamente adversos, desarrollando sistemas de adaptación y líneas de defensa basados en mecanismos moleculares, en los que participan enzimas que ayudan a reparar o eliminar las biomoléculas afectadas por situaciones de estrés (Cárdenas et al., 2012; Rodrigues et al., 2010).

La complejidad de las reacciones que ocurren en un proceso de biolixiviación dificultan el control de todas las variables implicadas, sin embargo con el uso de biorreactores puede llevarse a cabo una mejor vigilancia y manipulación sobre estas (Acevedo, 2000).

Entre las variables que hacen de la biodesulfurización una tecnología bastante hostil para los microorganismos y compleja para alcanzar altas velocidades de oxidación e implementarse a nivel industrial, se destacan: (i) la agitación con un impulsor que no sea adecuado y caer en altas velocidades por querer mantener los sólidos en suspensión, lo cual genera estrés por cizalla y aumenta la probabilidad en que colisionan las partículas, (ii) el carácter aerobio del proceso, que hace que las células se enfrenten al estrés oxidativo produciendo daños en su ADN e incluso lisis celular, (iii) la baja afinidad de los nutrientes por ser algunos recalcitrantes, además de la presencia de sólidos en suspensión y metales pesados, muchos de ellos tóxicos que inhiben el crecimiento celular y retardan su actividad, (iv) la viscosidad de las suspensiones (en procesos con carbón), que entorpece los procesos de transferencia de masa y calor, (v) la formación de precipitados (jarosita), que genera barreras físicas entre la solución lixiviante y la superficie del sulfuro, dificultando la difusión y salida de la pirita solubilizada, reduciendo así, la eficiencia y productividad del proceso oxidativo (Kiani et al., 2014;

Rodrigues et al., 2010; Sun et al., 2012; Jorjani et al., 2007; Acevedo, 2000; d'Hugues et al., 1997; Torma et al., 1991).

De otra parte, los tanques agitados han sido las configuraciones más ampliamente usadas para este tipo de procesos a escala industrial y de laboratorio, debido a las ventajas técnicas y económicas (Rossi, 2001) por encima de reactores de lecho empacado, columnas *air-lift*, reactores rotatorios, columnas de percolación, etc (Sun et al., 2012). Y una de las mayores ventajas a nivel industrial que trae el uso de tanques agitados es cuando se requieren volúmenes significativos de reacción (Acevedo y Gentina, 2007).

Se han desarrollado múltiples configuraciones y trabajos previos sobre procesos de biodesulfurización de carbón. Y especialmente se llevó a cabo un proceso apoyado por la Universidad de Cagliari en Italia, donde a través de una cascada de cinco biorreactores de tanque agitado operando en continuo, se logró oxidar del 40% de sólidos en suspensión un 90% de pirita; aunque, con el inconveniente de los altos costos energéticos de potencia (Loi et al., 1994). En Colombia ha sido poco el trabajo que se ha hecho comparado con otras instituciones a nivel mundial, sin embargo se llevó a cabo un proceso similar a escala piloto en operación en *feedback*, en el laboratorio de Biomineralogía de la Universidad Nacional y se alcanzó una oxidación de pirita del 59% con un tiempo de residencia de 4 días (Caicedo et al., 2012). Esto muestra que aunque todavía se requiere un amplio trabajo investigativo en el área, se han logrado hasta el momento grandes avances que posibilitan y enriquecen el ingreso de esta tecnología como una herramienta viable en la industria colombiana.

Es por esto que se planteó un experimento en reactor de tanque agitado para cada uno de los medios de cultivo propuestos, usando un consorcio de bacterias acidófilas. Con el objetivo no solamente de realizar una comparación entre el cambio de escala (erlenmeyer vs. reactor de tanque agitado), si no en mayor medida con la idea de poder controlar algunas variables relevantes e identificar las principales dificultades o cuellos de botella al trabajar con carbones colombianos, tratando de esta manera de encontrar una posible solución y contribuir al conocimiento adquirido hasta el momento por el grupo de investigación. Esto con miras a seguir avanzando y perfeccionando el proceso de biodesulfurización de carbón, que permitiera a un no muy largo plazo, poder convertirla en una alternativa medio-ambiental factible, anexa y necesaria en las actividades mineras, en las industrias productoras de cemento y en las múltiples termoeléctricas de nuestro país.

5.2. Materiales y Métodos

Los aspectos metodológicos correspondientes a esta parte del proyecto, se presentan en el Capítulo 2 (véase de las secciones 2.1, 2.2 y 2.6).

5.3. Resultados

5.3.1. Análisis iniciales del carbón

Los análisis correspondientes a las diferentes formas de azufre, análisis próximos del carbón, DRX, FTIR y SEM/EDX, se presentan en el Capítulo 3 (véase la sección 3.5.1).

5.3.2. Medios a base de sales de sulfatos y cloruro en un proceso de biodesulfurización de carbón en reactores de tanque agitado

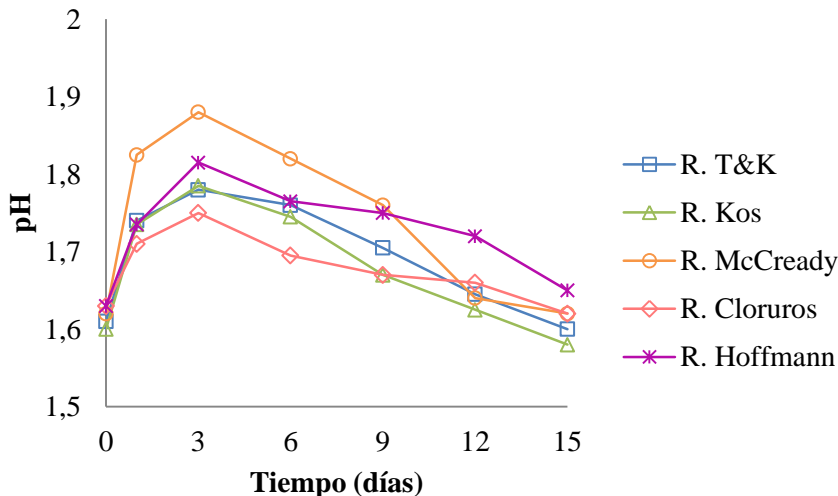
El inóculo usado para los ensayos en reactor de tanque agitado, se mantuvo en un agitador orbital por un período de 9 días, antes de finalizar la etapa exponencial. En la Tabla 5-1 se consignan los valores de pH, Eh y Concentración celular obtenidos al noveno día de crecimiento de los microorganismos y que fueron el punto de partida para los ensayos en reactor de tanque agitado.

Tabla 5-1: Inoculo usado para llevar a cabo los procesos en reactor de tanque agitado, parámetros de pH, Eh y Conteo celular al noveno día de crecimiento.

Medios de cultivo	pH	Eh	Conteo celular
T&K	1.60	637	2.5×10^7
Kos	1.60	630	3.0×10^7
McCready	1.61	631	3.3×10^7
Cloruros	1.63	627	2.2×10^7
Hoffmann	1.74	626	2.4×10^7

La Figura 5-1, presenta el seguimiento que se realizó al parámetro de pH en el tiempo. El comportamiento del pH en todas las suspensiones de los medios de cultivo estuvo determinado por una fase inicial de aumento hasta alcanzar un máximo, y una fase posterior de disminución hasta el final del proceso.

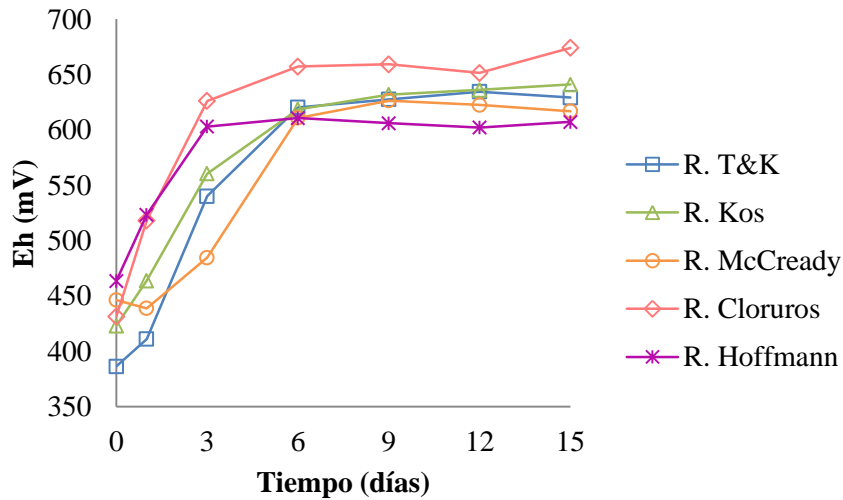
Figura 5-1: Curva de pH vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando las cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann.



El incremento máximo en este parámetro ocurrió al tercer día del proceso en todos los medios y fue mayor en el medio de cultivo McCready con un valor de 1.88, seguido por el medio Hoffmann con 1.81, los medios T&K y Kos por su parte alcanzaron un valor máximo de 1.78 y finalmente el medio de cultivo Cloruros presentó el menor aumento en este parámetro, de 1.75. Posterior a este día todos los medios mostraron una tendencia decreciente y llegaron a valores cercanos al final del proceso (día 15). El valor menor de pH fue logrado por el medio Kos con 1.58, seguido en aumento por el medio T&K con 1.60, los medios Cloruros y McCready con 1.62 y el valor final, más alto por el medio de cultivo Hoffmann de 1.65.

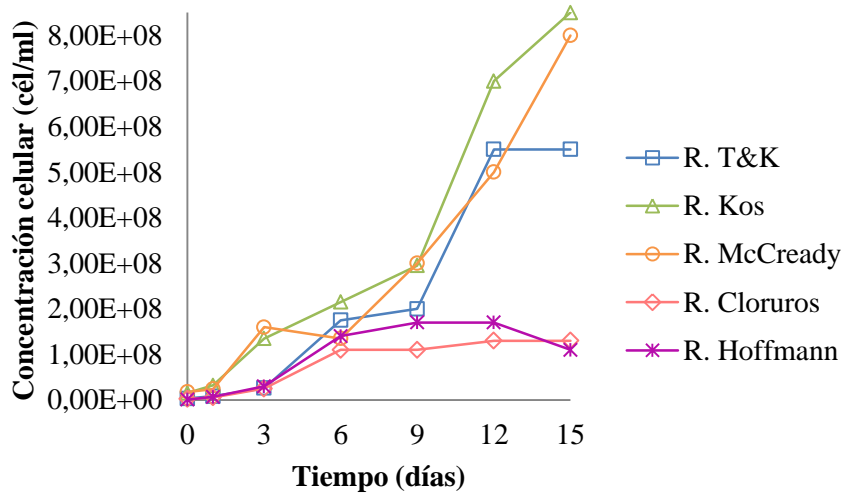
En la Figura 5-2, se presenta el comportamiento del Eh a través del tiempo. Se identificaron dos fases para el potencial redox, una inicial de incremento hasta alcanzar un máximo al tercer o sexto día del proceso y una fase de estabilización final del parámetro. Con Hoffmann y Cloruros se alcanza el máximo Eh al tercer día, mientras que T&K, Kos y McCready presentan su máximo valor al sexto día del proceso. McCready presenta una única excepción en el comportamiento debido a que se observó una leve disminución en el parámetro al primer día del proceso. Se observaron valores de Eh al día 15 de, 674mV en el medio Cloruros, 641mV en Kos, 629mV en T&K, 617mV en McCready y el más bajo valor observado fue para Hoffmann, de 609mV.

Figura 5-2: Curva de Eh vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando las cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann.



En la Figura 5-3, se observa la concentración celular durante el proceso de biodesulfurización. Aunque el comportamiento de este parámetro en todos los medios de cultivo fue distinto, la fase de acondicionamiento o *fase lag* fue similar y duró un día en todas las suspensiones.

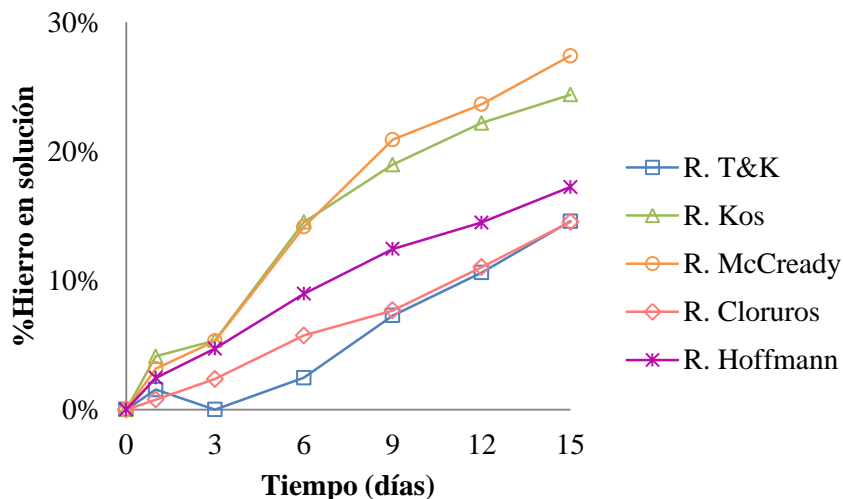
Figura 5-3: Concentración celular vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando las cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann.



Con el medio Kos se observó un crecimiento acelerado (fase exponencial) durante todo el proceso llegándose a una concentración final de 8.5×10^8 células/mL y con McCready se aunque se observó una leve disminución en la cantidad de células al sexto día, se alcanzó una concentración en solución de 8.0×10^8 células/mL. En los medios T&K, Cloruros y Hoffmann el crecimiento al inicio del proceso fue más lento. En T&K el crecimiento se acelera el tercer día, pasando por una disminución en la velocidad del día 6 al 9, una posterior aceleración hasta el día 12 (fase exponencial), para finalmente alcanzar la fase estacionaria con 5.5×10^8 células/mL. En los medios a base de cloro (Cloruros y Hoffmann) el crecimiento fue reducido. En el medio Cloruros hubo un crecimiento leve hasta el sexto día y luego, una estabilización hasta tener en solución 1.3×10^8 células/mL. En el medio Hoffmann el crecimiento exponencial fue entre el primer y tercer día, la fase estacionaria se evidenció del día 6 al 12 y finalmente hubo reducción en la concentración celular al final del proceso llegando a tener en solución 1.1×10^8 células/mL.

La Figura 5-4, presenta el porcentaje de hierro a través del tiempo del proceso. En este seguimiento se encontró una solubilización constante de hierro desde el inicio del proceso en todos los medios de cultivo, excepto por una precipitación observada en el medio T&K al tercer día.

Figura 5-4: %Hierro en solución vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando las cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann.

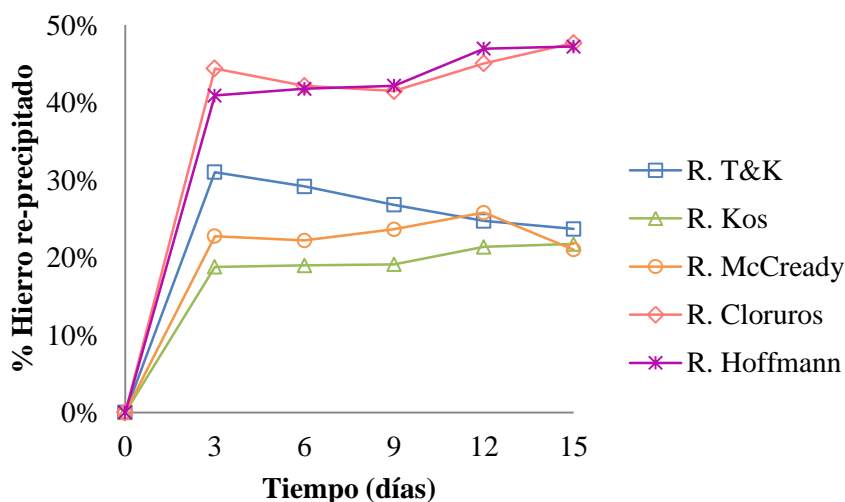


Todos los medios presentaron velocidades de solubilización diferentes y hasta el final del proceso se observó una tendencia ascendente, no se observó estabilización en dicho parámetro. El máximo

porcentaje de hierro solubilizado se alcanzó en el medio McCready de 27.4%, se obtuvo seguidamente un 24.4% en Kos, 17.2% con Hoffmann y un 14.5% usando los medios Cloruros y T&K.

En la Figura 5-5, se observa el porcentaje de hierro re-precipitado durante el proceso de biodesulfurización. El comportamiento muestra una tendencia inicial a incrementar, seguida por la estabilización del porcentaje precipitado. Al final del proceso los medios de cultivo a base de sales basales de cloro (Cloruros y Hoffmann) son las suspensiones en que re-precipita un mayor contenido de hierro. En los medios a base de sulfatos (T&K, Kos y McCready) aunque durante el proceso la precipitación es mayor en T&K, seguida por McCready y finalmente la menor en las suspensiones con Kos, al final del proceso en estos tres medios se llega a un porcentaje similar. El porcentaje de re-precipitación del hierro el día 15 fue del 47% en Cloruros y Hoffmann, 24% en T&K y 21% en McCready y Kos.

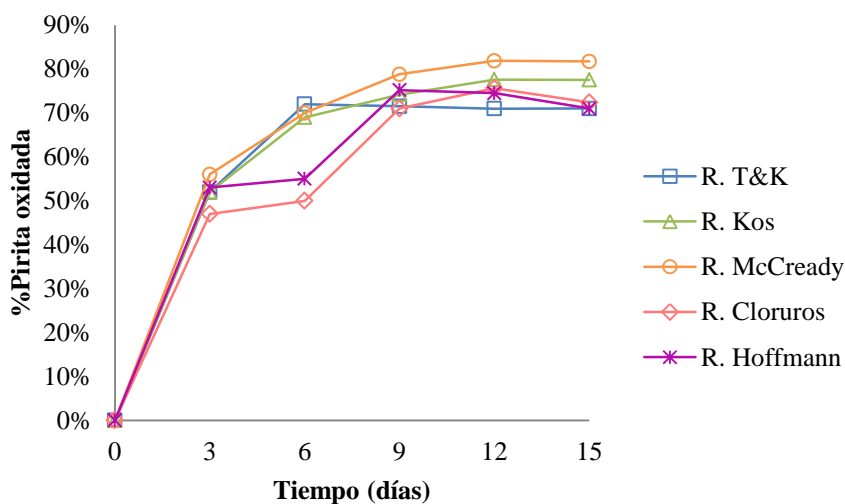
Figura 5-5: Porcentaje de hierro re-precipitado vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando las cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann.



En la Figura 5-6, se presenta el porcentaje de oxidación de pirita a través del tiempo del proceso. En general para todos los tratamientos, se presentó la oxidación de aproximadamente el 50% en los primeros tres días del proceso, posteriormente hubo una etapa de aumento leve, seguida de una estabilización hasta el final del proceso. Particularmente, en los tratamientos T&K, Kos y McCready, después del tercer día, donde ocurrió una oxidación de cerca del 50%, hubo un aumento leve hasta el sexto día en T&K y hasta el noveno día en Kos y McCready, seguido de la estabilización hasta el decimoquinto día. Por su parte, en los tratamientos Hoffmann y Cloruros, después del tercer día, se

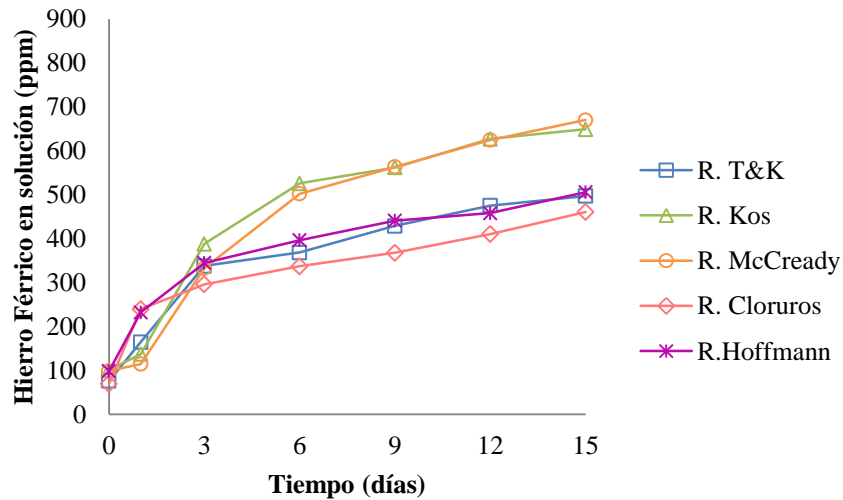
presentó una pequeña estabilización del parámetro hasta el sexto día, seguido de un leve incremento hasta el noveno día, alcanzando la estabilidad al final del proceso. Se alcanzaron porcentajes de oxidación de sulfuro de 82% con McCready, 77.5% en Kos, 72% con Cloruros y 71% con Hoffmann y T&K.

Figura 5-6: Porcentaje de pirita oxidada vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando las cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann.



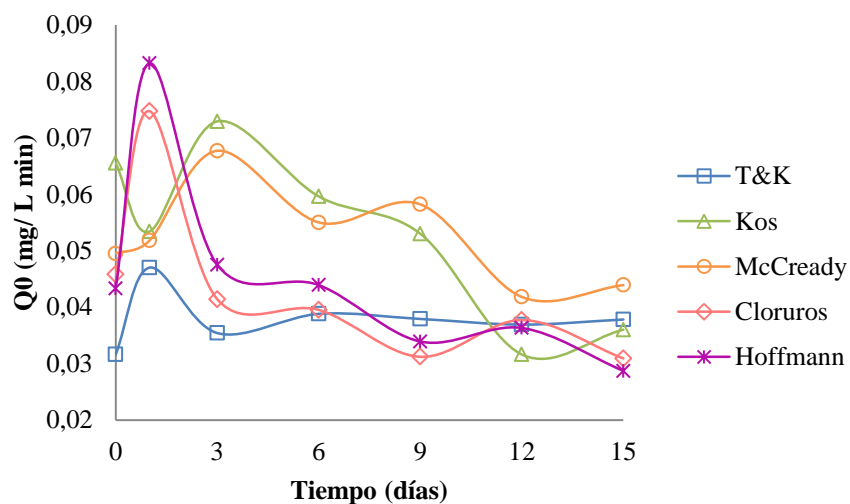
En la Figura 5-7, se observa la concentración de iones férricos en solución durante el proceso de biodesulfurización. La generación de iones en los medios Cloruros y Hoffmann inició desde el día cero del proceso, permaneció en aumento hasta el tercer día, posteriormente siguió la regeneración pero de una forma leve hasta el día 15. En los medios T&K, McCready y Kos la regeneración iónica ocurrió a partir del primer día del proceso, donde en el medio T&K se observó un comportamiento similar a los medios Cloruros y Hoffmann. Mientras que en los medios McCready y Kos se vio una regeneración iónica más dinámica hasta el sexto día, luego esta disminuyó, pero fue mayor que la que se evidenció en los demás medios. Finalmente, al último día del proceso se obtuvo en solución una concentración de iones férricos de 670ppm en McCready, 649ppm en Kos, 506ppm en Hoffmann, 497ppm en T&K y 461ppm en el medio Cloruros.

Figura 5-7: Concentración de iones férricos en solución vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando un consorcio de bacterias acidófilas y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann.



En la Figura 5-8, se presentó la velocidad de consumo de oxígeno a través del proceso de biodesulfurización de carbón en los tratamientos evaluados.

Figura 5-8: Velocidad de consumo de oxígeno vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón en tanque agitado, usando las cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann.



Todos los medios presentaron velocidades iniciales de consumo de oxígeno distintas, pero se observó una tendencia común a generar un pico de velocidad en los primeros días del proceso, al día 1 para los medios Hoffmann, Cloruros y T&K y al día 3 en los medios Kos y McCready. Las máximas velocidades de consumo de oxígeno se vieron en los medios de cultivo, Hoffmann ($0.083 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) y Cloruros ($0.075 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$), seguidos por los medios Kos ($0.073 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$), McCready ($0.068 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) y finalmente el pico más bajo de velocidad se obtiene en el medio T&K ($0.047 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Después de este pico la tendencia en las suspensiones fue a disminuir hasta el final del proceso, llegando así al día 15 a velocidades de $0.044 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ en McCready, $0.038 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ en T&K, $0.036 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ en Kos, $0.031 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ en Cloruros y $0.029 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ en Hoffmann.

5.3.3. Análisis estadísticos y Proceso comparativo entre la biodesulfurización a nivel de erlenmeyer y reactor de tanque agitado

En las Figuras 5-9, 5-10, 5-11 y en la Tabla 5-2, se presentan los resultados obtenidos durante el proceso de biodesulfurización de carbón usando el consorcio de bacterias acidófilas a nivel de reactor de tanque agitado (5000mL) y a nivel de erlenmeyer (200mL) que se presentó en los Capítulos 3 y 4 (Figuras 3-23 a 3-25 y 4-19 a 4-21, respectivamente).

En la Figura 5-9, se observa el porcentaje de hierro en solución a través del tiempo del proceso a nivel de erlenmeyer y reactor de tanque agitado. Los resultados muestran que en la escala erlenmeyer hubo una mayor solubilización de hierro y que sin importar la escala usada, con el medio de cultivo McCready se alcanzaron los más altos porcentajes. Adicionalmente, se observó que, a nivel de reactor de tanque agitado, el medio de cultivo Hoffmann presentó mayores tasas de solubilización que el medio de cultivo T&K. Al realizarse un análisis estadístico teniendo en cuenta los factores, escala (erlenmeyer y reactor) y medios de cultivo (T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann) se determinó a través de un análisis de varianzas que efectivamente existen diferencias significativas entre el cambio de escala (valor p de 1.46×10^{-8}) y entre los distintos medios (valor p de 9.7×10^{-6}).

En la Figura 5-10, se muestra el porcentaje de pirita oxidada a través del tiempo del proceso en las dos escalas evaluadas. Se observó que a nivel de erlenmeyer se presentaron mayores tasas de oxidación del mineral y estadísticamente por una prueba ANOVA se comprobó que hay diferencias significativas entre la escala (valor p de 0.018) y entre los medios de cultivo (valor p de 0.025).

Figura 5-9: Porcentaje de hierro en solución vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer (E) y reactor tanque agitado (R), usando el consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann.

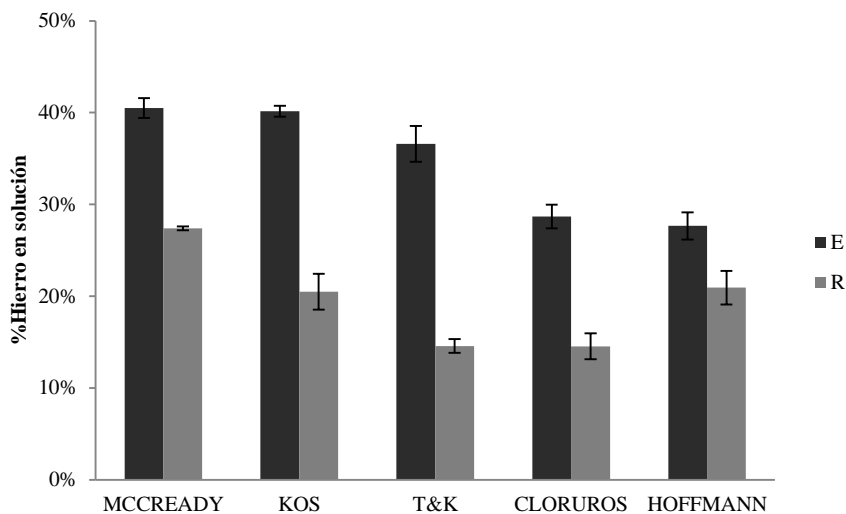
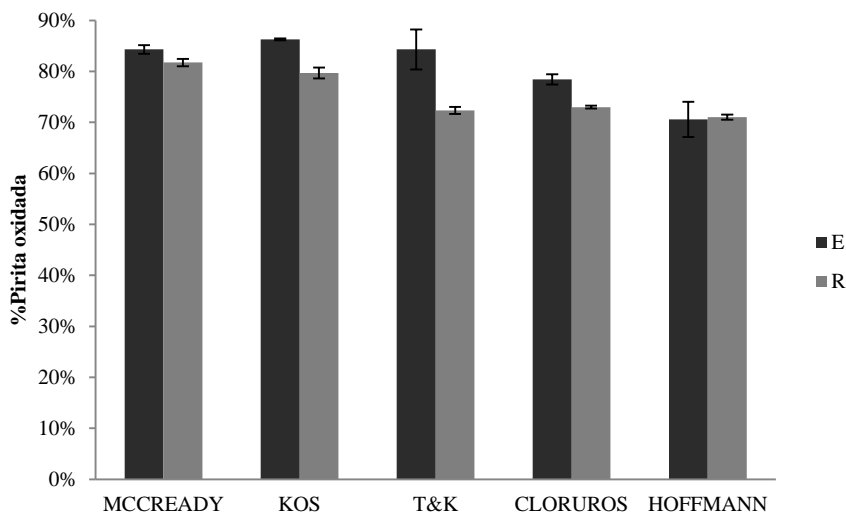
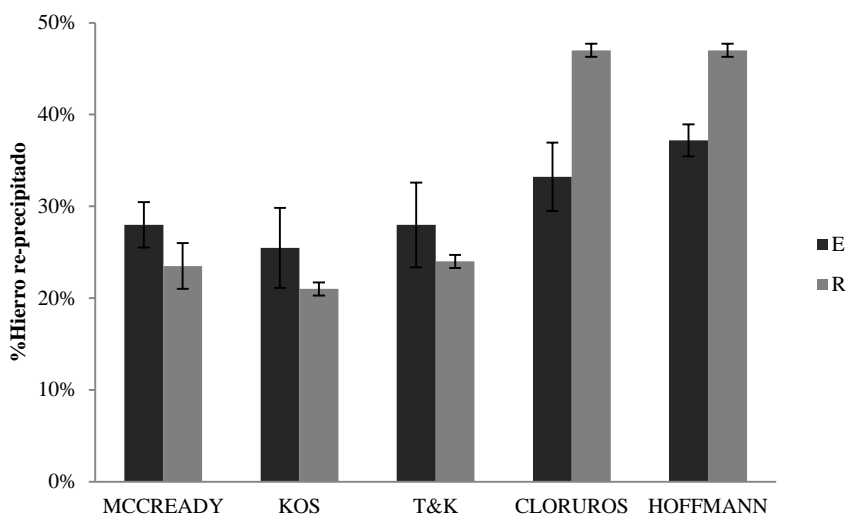


Figura 5-10: Porcentaje pirita oxidada vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización de carbón a nivel de erlenmeyer (E) y reactor tanque agitado (R), usando el consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann.



En la Figura 5-11, se presenta el porcentaje de hierro re-precipitado a través del tiempo del proceso en las dos escalas evaluadas. Se observó que para los medios a base de sulfatos (T&K, Kos y McCready) no existe diferencias estadísticas significativas para este parámetro, entre las dos escalas evaluadas, mientras que con los medios a base de sales de cloro (Cloruros y Hoffmann) a una escala más alta se generaron mayores precipitaciones en el sistema. La re-precipitación en la escala reactor aumentó para los medios de cloro en un porcentaje del 5% en Cloruros y del 9% en Hoffmann, mientras que para los medios sulfatos no se presentaron resultados que permitan determinar con cual escala se favoreció el proceso.

Figura 5-11: Porcentaje de hierro re-precipitado en el carbón vs. Tiempo, para un proceso de biodesulfurización a nivel de erlenmeyer y reactor tanque agitado, usando el consorcio de cepas comerciales, *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* 15494 y los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann.



En la Tabla 5-2, se presentan los resultados de los análisis de las diferentes formas de azufre tomadas a las muestras sólidas al final de los bioensayos a nivel de erlenmeyer y reactor. Se evidenció una reducción en el contenido de azufre pirítico durante los tratamientos de biodesulfurización en reactor de tanque agitado, siendo la suspensión con el medio McCready en donde se observó la mayor solubilización de pirita del mineral. El porcentaje de sulfatos por su parte, evidenció la re-precipitación de estos compuestos en todos los medios evaluados, excepto en el medio McCready. El porcentaje de azufre inorgánico al depender de los porcentajes de solubilización de azufre pirítico y de sulfatos,

corroboró que es con el medio de cultivo McCready con el que se lograron los más altos porcentajes de remoción de azufre inorgánico del mineral.

La comparación con los resultados a nivel de erlenmeyer que se presentaron en los Capítulos 3 y 4 (secciones 3.5.4 y 4.1.3, respectivamente), muestran que al final se generó un porcentaje de biodesulfurización de carbón mayor en la escala reactor (medios de sulfatos), a pesar de que la reducción en la precipitación no fue significativa en comparación con la escala erlenmeyer.

Tabla 5-2: Diferentes formas de azufre para los carbones tratados con los medios de cultivo T&K, Kos, McCready, Cloruros y Hoffmann a nivel de erlenmeyer y reactor de tanque agitado.

	Reactores					Erlenmeyers	
	%S _{pirítico}	%S _{sulfato}	%S _{inorgánico}	% Pirita oxidada	% S _{removido}	% Pirita oxidada	% S _{removido}
Muestra carbón	1.02	0.31	1.33	-	-	-	-
T&K	0.25	0.44	0.69	75.49	48.12	84.31	36.84
Kos	0.18	0.38	0.56	82.35	57.89	86.27	49.62
McCready	0.16	0.27	0.43	84.31	67.67	84.31	48.12
Cloruros	0.24	0.78	1.02	76.47	23.31	78.43	45.86
Hoffmann	0.25	0.56	0.81	75.49	39.10	70.59	42.11

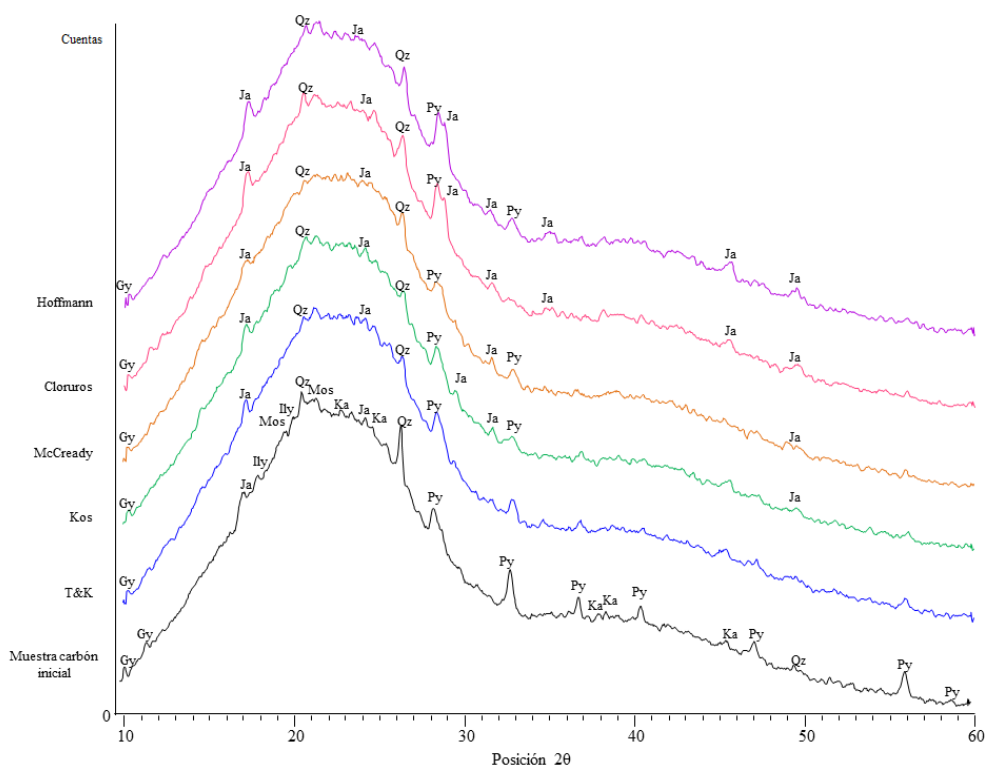
5.3.4. Caracterización de muestras de carbón tratadas

- **DRX**

La Figura 5-12, muestra los análisis de DRX realizados a las muestras tratadas de carbón en los bioensayos a nivel de tanque agitado. En los difractogramas se evidenció la reducción y/o desaparición de los picos correspondientes al mineral de pirita. Los picos asociados a la jarosita existentes en la muestra inicial de carbón, con los tratamientos se acentuaron y también se observó la formación de otros picos relacionados, especialmente en los bioensayos con los medios Cloruros y Hoffmann.

Adicionalmente, se apreció que las bandas correspondientes a minerales como el cuarzo, el yeso, illita, moscovita y caolinita especialmente en los ensayos con los medios T&K, Kos y McCready sufrieron una disminución.

Figura 5-12: Difractograma de los ensayos de biodesulfurización de carbón a nivel de reactor de tanque agitado.

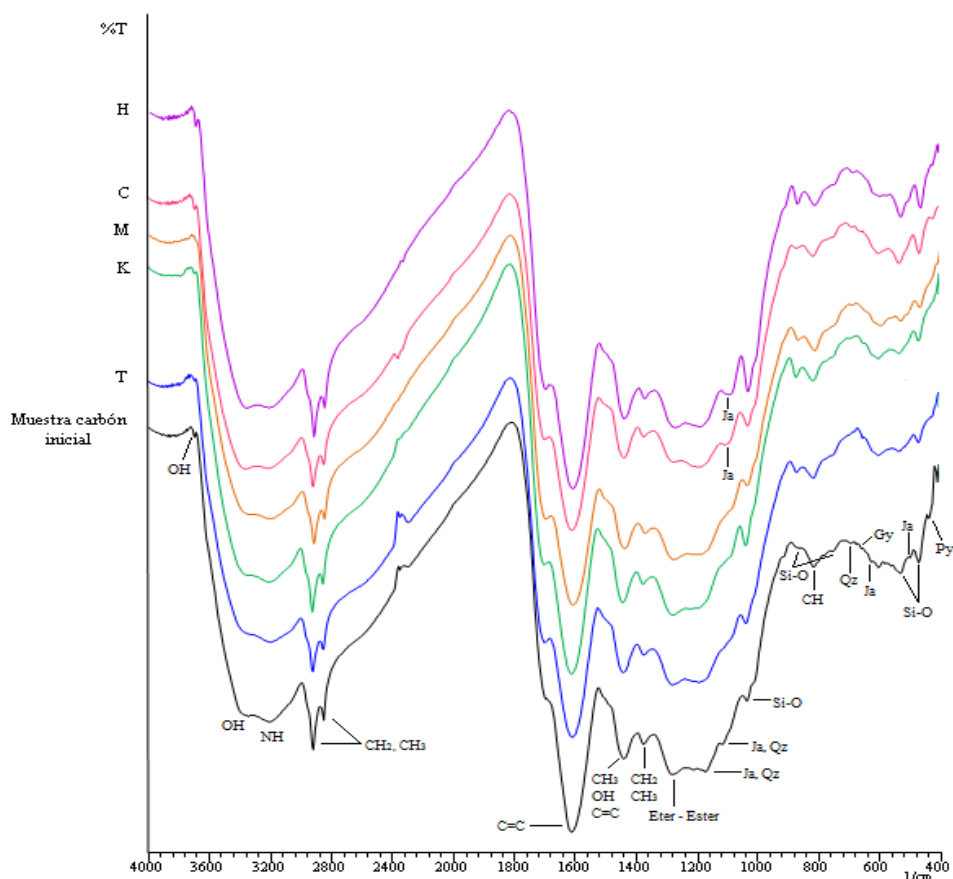


- **FTIR**

La Figura 5-13, presenta los espectros de FTIR para las muestras de carbón al final de los bioensayos. Se observó que la estructura química del carbón no se alteró con el tratamiento de biodesulfurización a nivel de tanque agitado, es decir, los enlaces correspondientes a las cadenas alifáticas, ésteres, éteres, se mantuvieron intactos a lo largo del proceso.

Algunas bandas correspondientes a la jarosita se acentuaron en todos los tratamientos y además, se presentó la aparición de nuevas bandas de jarosita en los ensayos con los medios Cloruros y Hoffmann.

Figura 5-13: Espectros de FTIR de los ensayos de biodesulfurización de carbón a nivel de reactor de tanque agitado.



- **SEM**

En la Figura 5-14, se observan las micrografías de SEM tomadas a los granos de carbón al finalizar el proceso con el medio T&K. La oxidación de pirita se evidenció en la corrosión de las estructuras y estuvo asociada mayoritariamente a las micro fracturas de los granos, la cual se presentó desde el borde del mineral hacia el centro. Y en la Figura 5-15, se presenta un mineral de aluminio y silicio precipitado en esta suspensión.

Figura 5-14: Micrografías de SEM de los granos de mineral biotratados con el medio de cultivo T&K, al finalizar el proceso de biodesulfurización en reactor de tanque agitado.

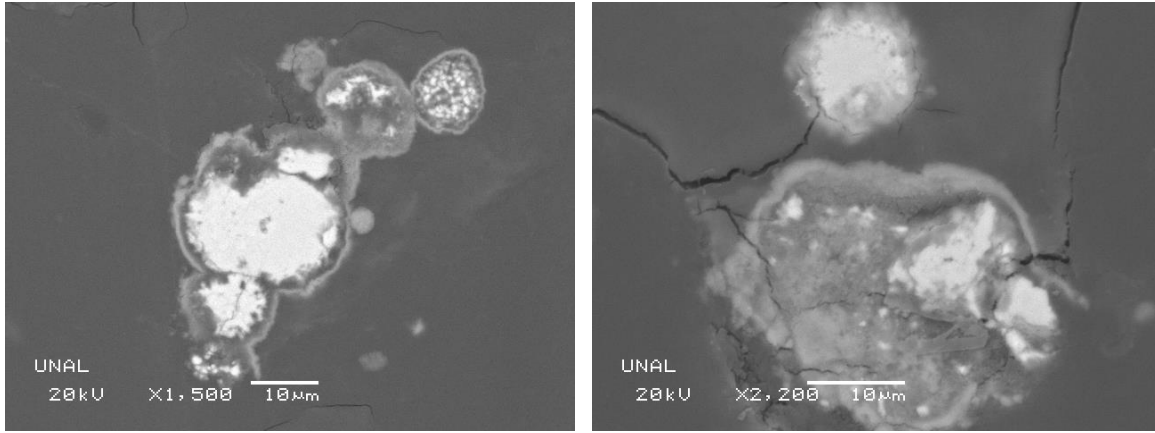
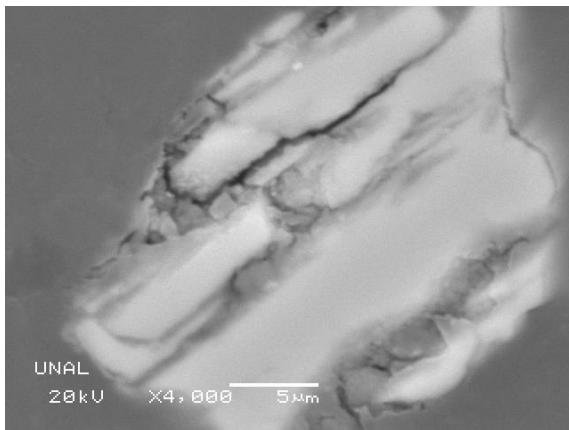


Figura 5-15: Aluminio-silicato hallado en los bioensayos con el medio de cultivo T&K, al finalizar el proceso de biodesulfurización en reactor de tanque agitado.



Elemento	%Peso	%Atómico
O	45.77	58.92
Na	7.09	6.36
Al	11.39	8.70
Si	34.90	25.59
Ca	0.85	0.43
Total	100.00	

En las Figuras 5-16 y 5-17, se observan las micrografías tomadas a los granos de carbón al finalizar el proceso en las suspensiones con el medio de cultivo Kos. Se evidenció un alto grado de corrosión en las estructuras framboidales (Figura 5-16A) y euedrales (Figura 5-16B) apoyada por la presencia de grietas en los granos de carbón. Se demuestra la presencia de arcillas, ya que se presentan agregados o capas laminadas de pequeñas partículas de una tonalidad clara sobre la superficie del grano de carbón (Figura 5-17), además el análisis micro-químico de EDS señala la presencia de los elementos químicos las componen, como el silicio, el aluminio y el oxígeno.

Figura 5-16: Micrografías de SEM de los granos de mineral biotratados con el medio de cultivo Kos. (A) Estructuras framboidales y (B) euedrales corroídas.

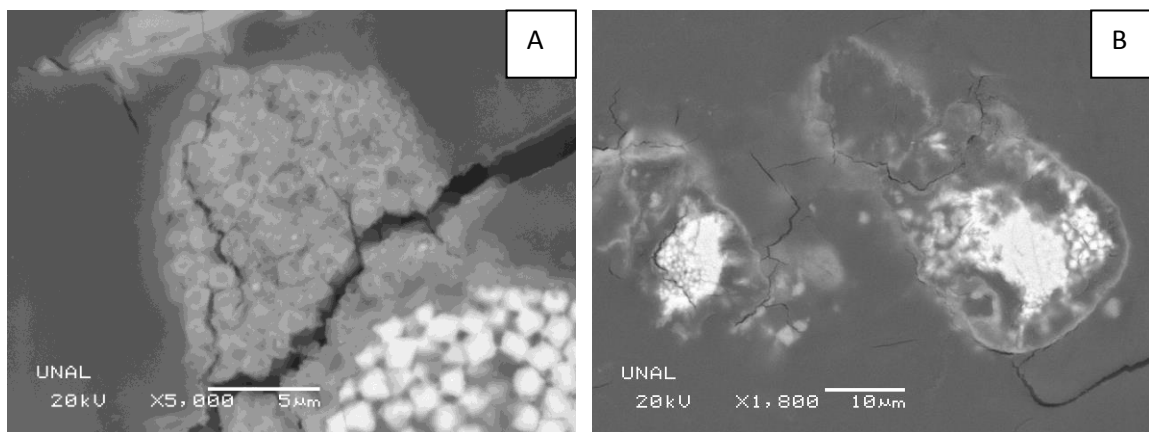
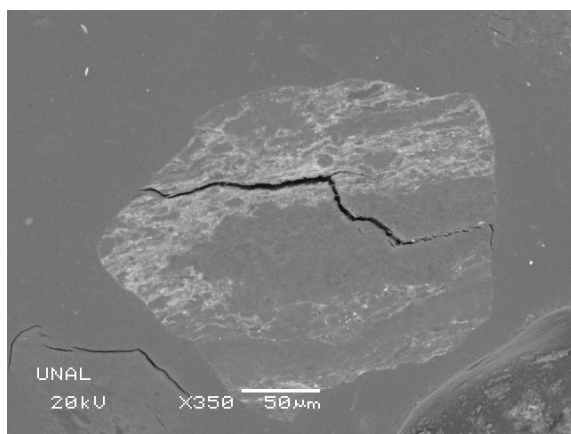


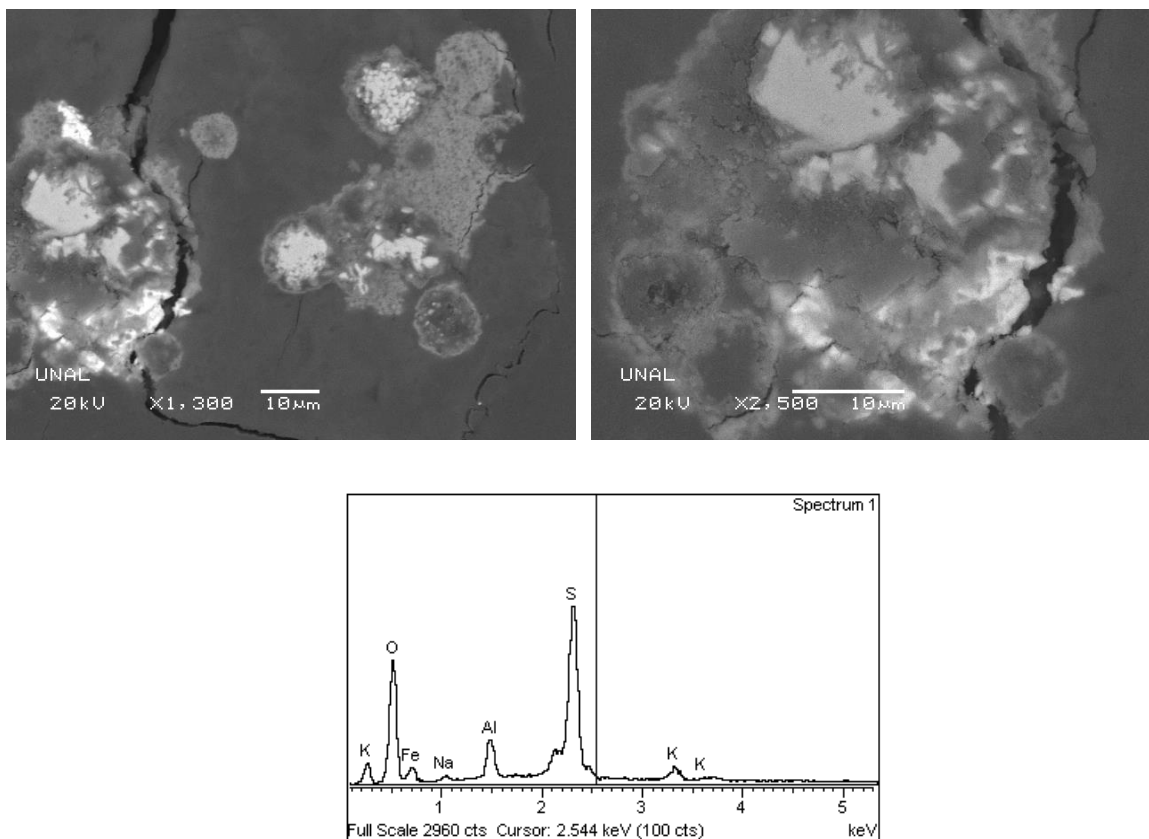
Figura 5-17: Grano de carbón asociado a arcillas en los bio-tratamientos con el medio de cultivo Kos.



Elemento	%Peso	%Atómico
O	40.95	55.55
Na	0.67	0.64
Al	14.50	11.66
Si	37.34	28.86
S	1.24	0.84
K	2.34	1.30
Fe	2.97	1.15
Total	100.00	

En la Figura 5-18, se presentan las micrografías tomadas en SEM para los granos de mineral al finalizar el proceso con el medio de cultivo McCready y se observa un alto grado de corrosión facilitado por las micro fracturas presentes en el mineral. Se evidenció en el espectro de EDS, la formación de jarosita compuesta por iones de sodio y potasio, ocupando el lugar del sulfuro solubilizado.

Figura 5-18: Micrografías de SEM de los granos de mineral bio-tratados con el medio de cultivo McCready y su respectivo espectro EDS.



En las Figuras 5-19 y 5-20, se presentan las micrografías tomadas a los granos de carbón al finalizar el proceso en las suspensiones con el medio Cloruros y Hoffmann, respectivamente. Se observó una mayor oxidación en las estructuras framboidales (Figuras 5-19B, 5-20B) que en las euedrales (Figura 5-19A, 5-20A). Se observó un menor grado de oxidación en las estructuras de los medios a base de sales de cloro.

Figura 5-19: Micrografías de SEM de los granos de mineral bio-tratados con el medio de cultivo Cloruros. Estructura eudral poco corroída (A) y framboide corroído (B)

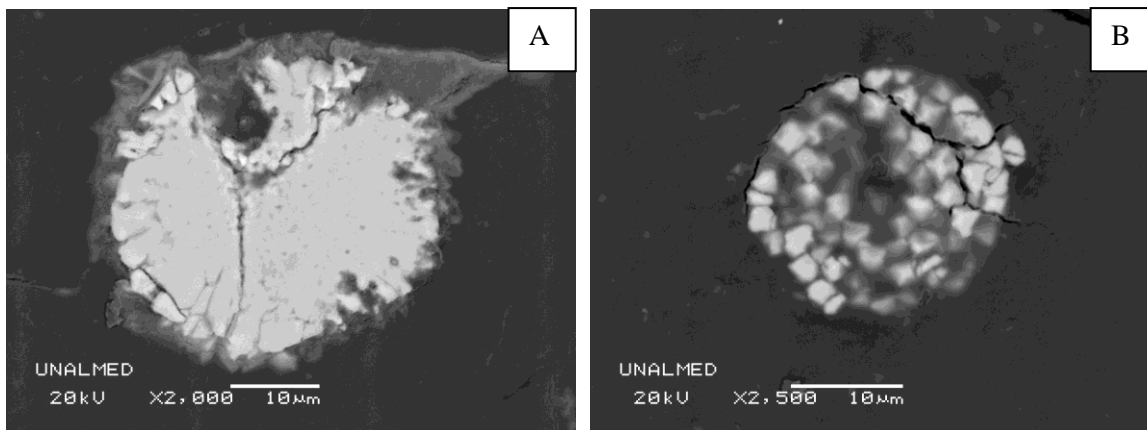
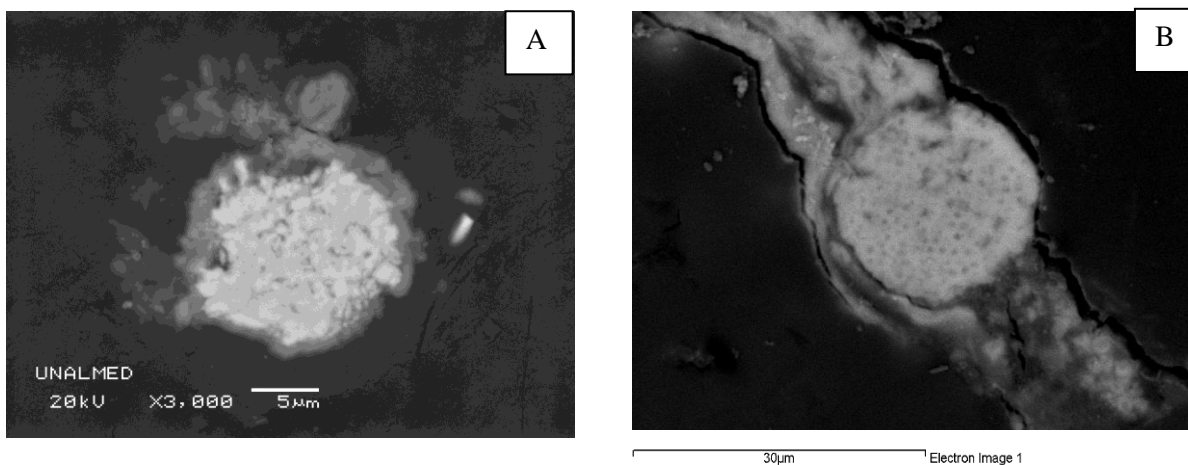


Figura 5-20: Micrografías de SEM de los granos de mineral tratados en el medio de cultivo Hoffmann. Estructura eudral poco corroída (A) y framboide corroído con formación de sulfatos precipitados en los bordes (B)



5.4. Discusión

5.4.1. Medios a base de sales de sulfatos, cloruro en un proceso de biodesulfurización de carbón en reactores de tanque agitado y Proceso comparativo entre escalas erlenmeyer vs. reactor

El objetivo de esta parte del proyecto, como se mencionó con anterioridad, fue realizar un ensayo que permitiera comparar los resultados obtenidos a nivel de erlenmeyer y a nivel de reactor de tanque agitado, usando los cinco medios de cultivo seleccionados y el consorcio de bacterias acidófilas.

En el presente trabajo de investigación usando reactores de tanque agitado en un proceso en *batch* se obtuvo con el medio McCready una oxidación de pirita del 82% y un porcentaje de remoción de azufre inorgánico del 68%. Estos resultados se encuentran dentro del rango hasta el momento obtenido en distintos trabajos de investigación para procesos de biolixiviación de sulfuros, e incluso, se lograron conclusiones satisfactorias, ya que muchos de los trabajos realizados hasta el momento se han llevado a cabo usando tamaños de partículas más pequeñas que las que se usó en este proyecto, lo que brinda un área de transferencia mayor favoreciendo el ataque químico/bacteriano (Caicedo et al., 2011; Cardona y Márquez, 2009) y además han sido operados en continuo, permitiendo recircular constantemente medio fresco e ir removiendo el material tratado, lo cual seguramente contribuye a que no haya ausencia de nutrientes en el medio y a reducir la formación de precipitados. El uso de un tamaño de partícula no tan pequeño, como el que se usó en la presente investigación ($<250\mu\text{m}$) tiene implicaciones positivas a nivel de un diseño de proceso, ya que el proceso de molienda del mineral genera costos económicos adicionales (Meshram et al., 2015; Rossi, 2013; Caicedo et al., 2012).

La mayor concentración bacteriana se observó a escala de reactor (10^8), posiblemente por el bombeo directo de una concentración de oxígeno disuelto más alta al medio de cultivo, como lo señalan Gleisner y colaboradores (2006) en su investigación. También, es posible que como indica Sun y colaboradores (2012), una mejor agitación promovida por el impulsor, impidiera la adsorción de células en la superficie del mineral, encontrándose durante el conteo una mayor concentración de células en suspensión. En contraste con lo que se presentó a nivel de erlenmeyer, una menor concentración de células (10^7), probablemente debida a que los microorganismos se depositaron con facilidad sobre la superficie de los minerales, ya que la agitación en esta escala, al realizarse en shaker rotatorio, genera un flujo circular (flujo laminar) sin turbulencias, ni mezclas perfectas (Doran, 1995).

A partir de las cinéticas de consumo de oxígeno (Figura 5-8) se observa un incremento en los primeros días del proceso y con el paso del tiempo una disminución progresiva. La velocidad de consumo de oxígeno representa la actividad metabólica bacteriana (García-Ochoa et al., 2010), el aumento inicial se debe a que la velocidad del metabolismo bacteriano es mayor durante las fases tempranas del crecimiento, en los primeros días las células requieren de altas concentraciones de oxígeno para acondicionarse al escenario ambiental impuesto e iniciar su fase exponencial (Martín, 1932), además fue el tiempo en que se produjo la oxidación del mineral. La posterior caída en este parámetro indica que el metabolismo aerobio se reduce, y esto puede estar asociado a pérdida de viabilidad por un entorno desfavorable e insuficiencia de nutrientes en el medio (Bedoya y Hoyos, 2010; Clifton, 1937).

Se observó durante el proceso a escala de reactor que parámetros fundamentales como la solubilización de hierro y la oxidación de pirita se redujeron ligeramente, en comparación con lo que obtuvo a nivel de erlenmeyer. Esto debido posiblemente a que a mayor escala se observó una mayor re-precipitación, principalmente en los medios a base de cloro. Es probable que esto se haya desencadenado, como se vió en los capítulos anteriores, debido a una actividad bacteriana deficiente y no precisamente a que hubiera en los tratamientos (de reactor) un bajo crecimiento celular.

La re-precipitación de hierro a nivel de erlenmeyer parece estar más relacionada con la reducción en la capacidad oxidativa de las bacterias, que con la influencia del pH como se observó en los capítulos anteriores. Ya que durante los ensayos con Cloruros y Hoffmann, donde se generó una mayor precipitación, no se observaron los más altos incrementos en el pH los primeros días del proceso.

Como se mencionó en el Capítulo 1, bacterias como *A. ferrooxidans* poseen la capacidad de secretar unas sustancias poliméricas extracelulares, que se agrupan generando una capsula alrededor de la superficie celular (Flemming y Wingender, 2001; Barreto et al., 2005). Se considera que la producción, cantidad y composición de las EPS varía de acuerdo a los nutrientes del medio de cultivo, iones metálicos, las condiciones ambientales (nivel de oxígeno, de nitrógeno, temperatura, pH) y fundamentalmente del sustrato que les sea suministrado a los microorganismos para su crecimiento (Aguirre, 2012; Jiao, 2010; Vu et al., 2009; Rohwerder y Sand, 2007). Algunos investigadores consideran que las EPS juegan un papel crucial durante el proceso de biolixiviación, facilitando específicamente el mecanismo indirecto de contacto, por generar un espacio de reacción en el que se concentran los iones férricos e interaccionan la superficie del mineral y las células (Sand, 1999; Pogliani y Donati, 1999; Gehrke, 1995). Y además, que las células que carecen de EPS no son capaces de oxidar y atacar la pirita (Sand, 2001). No obstante, en otras investigaciones se cree que éstas estructuras se generan bajo condiciones de estrés, que son el resultado o una respuesta de las bacterias

a ambientes desventajosos, para sobrevivir y protegerse de una posible lisis celular, cuando se encuentran en medios muy ácidos o en circunstancias de deshidratación (Yu et al., 2011; Aguirre, 2012; Brockmann et al., 2010). Sin embargo, Yu y colaboradores (2011) determinaron que una alta concentración de sustancias poliméricas extracelulares crean uniones con la jarosita, generando barreras, aumentando el potencial redox dentro y fuera de las EPS, afectando los procesos de difusión y por tanto inhibiendo la disolución de los minerales. Se encontró por otro lado que el crecimiento de las células sobre hierro ferroso produce una baja cantidad de EPS (Rohwerder y Sand, 2007).

De acuerdo a lo anterior, es posible que las condiciones de estrés a las que fueron sometidas las bacterias a nivel de reactor y específicamente los medios Cloruros y Hoffmann (por brindar toxicidad a la suspensiones con iones de cloro), hayan promovido que las células produjeran una alta cantidad de EPS que al asociarse con la jarosita, disminuyeran la posibilidad de solubilizar azufre del mineral y por tanto, se observaran en estos tratamientos los mayores niveles de precipitación.

Y probablemente la extensión de la precipitación, a su vez incrementó la viscosidad de la solución, contribuyendo a disminuir las operaciones de mezcla y transferencia de oxígeno (Roger, 2007), demandando un alto esfuerzo metabólico en las células difícil de suplir por encontrar menos asequible su fuente de energía (azufre).

Adicionalmente, al verse afectada la actividad oxidativa, se produjo una baja regeneración de iones férricos comparada con la que se observó a nivel de erlenmeyer, especialmente en los medios Cloruros y Hoffman (véase Capítulos 3 y 4, Figuras 3-22 y 4-18, respectivamente). Esta reducción en la cantidad de iones Fe^{3+} fue perjudicial en este sentido, ya que un mayor contenido de estos hace que la bacteria los concentre en sus EPS y de esta manera se acelere la disolución química de la pirita (Vu et al., 2009; Sand et al., 1999). Los iones de cloro como se mencionó en el capítulo anterior, debido a su toxicidad, producen un desequilibrio en la cadena de transporte de electrones provenientes de la oxidación del ion ferroso y por tanto una reducción en la capacidad de solubilización de la pirita.

Además de lo anterior, es probable que a nivel de reactor se hayan generado condiciones adicionales de estrés en los microorganismos, ya que el inóculo que se usó para estos ensayos se formó en erlenmeyers con agitación rotatoria, por lo cual, podría pensarse que la agitación y aireación directa sobre el cultivo fomentaron unas condiciones ambientales ajenas y/o hostiles que afectaron la actividad bacteriana, a pesar de que se trabajó bajo parámetros que anteriormente se usaron para este tipo de procesos.

Aunque se ha hablado a cerca de la importancia que tiene la velocidad de agitación en los procesos de transferencia de oxígeno y dióxido de carbono del gas al líquido, en el proceso de mezcla para lograr el grado de homogeneidad adecuado en las suspensiones con el fin de prevenir la formación de gradientes de concentración, temperatura, pH, que a su vez impidan el correcto crecimiento celular y una buena suspensión de sólidos (Sun et al., 2012; Acevedo y Gentina, 2007; Deveci, 2004; Rossi, 1990); también se ha encontrado en diversos estudios que a elevadas velocidades de agitación se genera limitación en la productividad de la bacteria durante los procesos de biolixiviación, ya que desarrollan un ambiente altamente turbulento que inhibe el crecimiento celular, genera estrés metabólico e impide que la bacteria tenga contacto con el sustrato sólido a oxidar (Torma et al., 1991; Oolman, 1993; d'Hugues et al., 1997). Así, la velocidad de agitación interviene directamente sobre la actividad de la bacteria y además, se considera que el efecto negativo se acentúa a un mayor tiempo de circulación y es mayor en la vecindad del impulsor (Oolman, 1993). Además, datos experimentales sugieren que las colisiones con las palas del impulsor y las paredes del reactor no generan efectos muy dañinos en las células, que son las interacciones partícula-partícula las principales responsables del daño celular (Deveci, 2002), y que un incremento en la agitación y la concentración de sólidos aumenta la probabilidad de la frecuencia con que colisionen las partículas (Cherry y Papoutsakis, 1986).

Sumado al estrés generado por la agitación, se ha observado en estudios en tanques agitados la influencia negativa que tiene la presencia de minerales sobre los organismos en procesos de biolixiviación. Ya que altas concentraciones de metales, generan velocidades de consumo de oxígeno elevadas lo que lleva consigo a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, sus siglas en inglés: *reactive oxygen species*) (Cárdenas et al., 2012). Las ROS, bajo condiciones normales son metabolizadas por la célula, estas son, el radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH). Sin embargo, si se producen condiciones de estrés, estas especies reactivas, dependiendo de la intensidad del estrés, afectan directamente el DNA, RNA, las proteínas y los lípidos, lo cual se conoce como estrés oxidativo (Rodrigues et al., 2010).

De acuerdo con lo anterior, al observarse que en los medios de cultivo Cloruros y Hoffmann se originaron las mayores velocidades de consumo de oxígeno (Figura 5-8) y las más bajas concentraciones celulares (Figura 5-3), se consideró que posiblemente la presencia de iones de cloro en estos medios, que al ser tóxicos para los microorganismos (Gahan et al., 2009; Harahuc et al., 2000) contribuyeron a que se produjera una baja capacidad de metabolización de las ROS y con ello se generara estrés oxidativo en estas suspensiones. Los efectos negativos que desencadenan los iones de cloro probablemente acentúan el grado de estrés que puede generarse por otros factores (agitación y

aireación directa sobre el cultivo) e influyen negativamente sobre el crecimiento y actividad de los microorganismos en estos medios.

De otro lado, se considera que aunque en los medios de sales basales de sulfatos (Kos y McCready) también se observaron altas velocidades de consumo de oxígeno, el efecto no fue tan relevante, ya que las sales de sulfato no producen estrés significativo y son necesarias para el metabolismo de estos microorganismos (Harahuc et al., 2000; Lazaroff, 1977 y 1963). Pudo por tanto en estas suspensiones, generarse una mejor metabolización de las ROS y un menor gasto energético, que se vio reflejado en una mayor concentración y actividad celular.

Adicional a lo mencionado anteriormente, en escala de erlenmeyer al no existir tantos factores que generaran estrés, se produjo una remoción de azufre inorgánico en los medios a base de cloro muy buena, mayor incluso que la que se alcanzó con el medio de cultivo T&K. Sin embargo, a nivel de reactor, se observó que debido a la existencia de mayores condiciones de estrés impuestas sobre los microorganismos, los iones de cloro en este punto si afectaron de forma significativa el proceso, por esto fueron los medios de base de sulfatos con los que se obtuvieron los mayores porcentajes de remoción de azufre inorgánico (68%).

Así, la toxicidad del cloro, la alta velocidad de consumo de oxígeno, la baja metabolización de las ROS y concentración de iones férricos, la concentración de sólidos y la agitación directa sobre el cultivo, son factores que probablemente influyeron directamente sobre la actividad bacteriana y a pesar de que a nivel de reactor se presentaran buenos resultados, estos fueron superados por los que se observaron a nivel de erlenmeyer en los tratamientos con Cloruros y Hoffmann.

Los demás parámetros evaluados, como el pH y el potencial rédox, presentaron tendencias similares en las dos escalas.

5.4.2. Caracterización de muestras de carbón tratadas

Los análisis de caracterización del mineral una vez finalizado el proceso en reactor de tanque agitado, corroboran lo observado en los análisis de formas de azufre en el carbón y de hierro re-precipitado. Los medios Cloruros y Hoffmann, efectivamente promovieron la mayor producción de precipitados. En los análisis de DRX y FTIR se observó que, mientras que en los medios de cultivo T&K, Kos y McCready se mantuvieron los picos y bandas de jarosita que se observaron en la muestra de carbón inicial, en los análisis para los medios Cloruros y Hoffmann además se formaron nuevos picos y bandas correspondientes a este mineral.

En los análisis de DRX se observó también, la reducción de las bandas de minerales como el yeso, el cuarzo, las arcillas, en los medios de cultivo de sales de sulfatos. Posiblemente pudo haberse generado la disolución de estos minerales en esas soluciones ácidas y por esto en los análisis de SEM/EDS se encontró precipitación de elementos como Al y Si. En estudios previos, se expone que altas concentraciones de sulfatos resultantes de la oxidación de pirita en sistemas sulfato-ácidos, incrementan la liberación de Al durante la disolución de caolinita (arcilla), formándose especies de sulfato de aluminio (Nordstrom, 1982). Además, Bibi y colaboradores (2012) hablan de la capacidad de disolución de los silicatos en medios ácidos ($\text{pH} < 3$) y ricos en minerales de sulfuro, señalando que la velocidad de disolución aumenta a menor pH y que estos minerales liberan fácilmente Al de su estructura por ser estos iones fácilmente hidrolizables y además por las reacciones de intercambio iónico que ocurren entre la solución y el mineral (Bibi et al., 2012). Se ha observado también la fácil liberación de Mg, K, Ca y Na en otro tipo de silicatos (Kalinowski y Schweda, 2007; Metz et al., 2005).

Por otra parte, en los análisis de FTIR se evidencia que el proceso de biodesulfurización a nivel de tanque agitado no afecta la matriz del carbón, lo cual favorece el uso de esta tecnología, ya que no produce pérdidas en la capacidad energética del mineral (Tuovinen y Fry, 1993).

Las micrografías tomadas con SEM ratifican la intervención de la oxidación bacteriana en la superficie de los granos del mineral, debido a la presencia de golfos, hoyos y características de meteorización. La velocidad de oxidación según Gleisner y colaboradores (2006) depende de la superficie activa de la pirita y del transporte de los líquidos lixiviantes, de ahí la importancia de las microgrietas, fracturas en los granos de carbón y la porosidad de los framboides, que facilitan este proceso de difusión (Gleisner et al., 2006; Hone et al., 1987). Se observó especialmente un alto grado de corrosión en los granos de pirita de los medios de cultivo T&K, Kos y McCready. En estudios previos también se han observado características morfológicas de corrosión después de la desulfurización y la precipitación de elementos como el Fe, S, O y K (Kiani et al., 2014).

Finalmente, en distintas investigaciones se ha registrado la afinidad existente entre algunas muestras de carbón y aluminio-silicatos (arcillas), como se observó en este proyecto (Eskenazy y Valceva, 2003; Zhuang et al., 2000). La presencia de estos minerales se evidenció a través de análisis de SEM/EDS, y a pesar de presentarse en baja concentración, es importante resaltar que la presencia de estos minerales es negativa para el proceso de biodesulfurización. Estos minerales dificultan los procesos de transferencia de masa, ya que interfieren en la solubilización de oxígeno en el medio afectando el crecimiento celular y por tanto la oxidación de hierro ferroso a hierro férrico y además, producen un

efecto de impermeabilización del carbón (Garzón et al., 2010; Sarcheshmehpour et al., 2009; Olubambi et al., 2007).

5.5. Conclusiones preliminares

Debido a la toxicidad de los iones de cloro sobre los microorganismos se desencadenan una serie de consecuencias metabólicas negativas, que sumada a la aireación y agitación directa sobre el cultivo y la presencia de sólidos en suspensión, generan un alto grado de estrés y afectan la actividad oxidativa de los cultivos.

El rendimiento de la biolixiviación también se ve afectado por la presencia de minerales como las arcillas asociadas al carbón, que disminuyen la acidez, promueven la formación de jarosita y generan un efecto impermeabilizante en el carbón afectando los procesos de transferencia de masa.

A pesar del mayor grado de estrés al que fueron sometidos los microorganismos en la escala de reactor, se considera que se obtuvieron resultados de oxidación bastante satisfactorios. Se obtuvo en un proceso de reactor de tanque agitado de 5L, operando en discontinuo, con un tamaño de partícula $<250\mu\text{m}$, una concentración de sólidos del 10% w/v, por un período de 15 días y usando el medio de cultivo McCready, un porcentaje de oxidación de 82% y un alto porcentaje de remoción de azufre inorgánico (68%). Sin embargo, se considera que el proceso puede mejorarse si el inóculo se genera en un reactor similar al que será usado posteriormente o por lo menos que tenga una adaptación previa sobre todo a la hidrodinámica que conlleva el cambio de escala.

Los análisis de caracterización (DRX, FTIR, SEM) de las muestras al finalizar el proceso, corroboraron que con los medios a base de cloruros promovieron la mayor producción de precipitados.

La técnica de microscopía (SEM) es bastante útil, ya que permite observar no solamente el efecto de la biodesulfurización, generando corrosión, meteorización, golfos, entre otros, en los granos de pirita, sino también es una ayuda clave en la identificación de posibles minerales y precipitaciones en las suspensiones.

6. Conclusiones y Recomendaciones

6.1. Conclusiones

Los medios de cultivo con bajas concentraciones de sulfatos resultaron ser la mejor opción para llevar a cabo este tipo de procesos sin importar el tipo de inóculo que se use, ya que con estos se minimizan la re-precipitación y por tanto, se alcanzan mayores remociones de azufre inorgánico.

Los medios a base de sales de cloro trajeron inconvenientes a pesar de la adaptación previa de los microorganismos a estos iones. La toxicidad de los iones de cloro sobre los microorganismos desencadena una serie de consecuencias metabólicas negativas, principalmente con el aumento de escala, que sumado a el estrés hidrodinámico afectan significativamente el proceso.

Los bioensayos revelaron una alta actividad oxidativa en las dos escalas (erlenmeyer y reactor) cuando se emplearon los medios bajos en sales de sulfatos (Kos y McCready). A nivel de erlenmeyer, se alcanzó en los tratamientos con el medio Kos la máxima oxidación de pirita de 86% y un 53% de remoción de azufre inorgánico usando el medio McCready. Y en reactor de tanque agitado un 82% de oxidación de pirita y se observó la máxima remoción de azufre inorgánico de 68% en los tratamientos con el medio de cultivo McCready.

Se evidenció la gran capacidad de las bacterias evaluadas para adaptarse a medios de cultivo muy simples, con concentraciones de nutrientes mínimas, incluso en ausencia de algunas de ellas (como es el caso del magnesio y el nitrógeno) y en presencia de iones de cloro que son tóxicos para la bacteria.

La concentración de los nutrientes en los medios de cultivo y los minerales contenidos en el carbón son factores determinantes en la efectividad del proceso de biolixiviación, al incidir significativamente sobre la re-precipitación del sulfato.

Todas las técnicas de caracterización se apoyaron entre sí y los resultados que brindaron cada una por separado corroboraron los resultados de la investigación. A pesar de que la alta amorficidad del carbón impidió que algunos minerales fueran reconocidos a través de las técnicas de DRX y FTIR, con la segunda derivada del espectro de infrarrojo y la técnica de SEM se pudo comprobar la existencia de

minerales de los que no se tenía total certeza de que estuvieran presentes, como la moscovita, caolinita, illita y albita.

Se observó la importancia de las fracturas y grietas en los granos de carbón y la porosidad que se presentó en las estructuras framboidales de la pirita, ya que estas probablemente facilitaron la oxidación al ser estructuras con una mayor área superficial, y además pudieron haber proporcionado 'protección' a las bacterias ante las altas fuerzas de cizalla que se producen durante este tipo de procesos.

Se evidenció también, que la corrosión durante la biolixiviación ocurrió desde los bordes hacia el interior del sulfuro, generándose claros surcos de corrosión y la pérdida de la geometría del mineral y las estructuras euedrales de la pirita.

6.2. Recomendaciones

El proceso podría hacerse más viable económicamente si se probaran tiempos de proceso inferiores a 15 días, hasta encontrar el tiempo adecuado en la que se alcanzan buenas tasas de oxidación, ya que como se vió el proceso podría reducirse a 12 días.

Complementar esta técnica biológica (biodesulfurización) con métodos físicos podría mejorar el rendimiento y eficiencia en la solubilización de pirita y hacer más viable a nivel económico el proceso, sobre todo si se usa un carbón con alto contenido de materia mineral.

Si se desea usar medios de cultivo a base de sales de cloro, se debería tratar de involucrar bacterias con resistencia a estos iones, lo cual que podría mejorar la oxidación y solubilización de hierro en las suspensiones de biolixiviación.

Todos los minerales son altamente heterogéneos, es necesario por tanto identificar y analizar su composición a través de diferentes técnicas antes de llevar a cabo cualquier proceso de biolixiviación, ya que muchos de los nutrientes que la bacteria necesita los puede proporcionar el carbón o mineral a tratar. Esto permitiría minimizar la concentración de sales inorgánicas a adicionar en los medios, facilitando el proceso a nivel económico y contribuyendo a minimizar la formación de precipitados en el proceso.

Aunque se requiere mucha investigación sobre esta área, se considera que con base en lo observado con la investigación, el rendimiento y productividad del proceso podría mejorarse si se realizara un

proceso en continuo usando casadas de biorreactores, con un inóculo que esté previamente adaptado a una agitación mecánica y aireación directa sobre el cultivo. Adicionalmente, se podría llegar a trabajar con mayores densidades de pulpa y una posible alternativa para reducir los requerimientos de potencia, puede ser enriquecer el medio de cultivo con aire antes de que ingrese al biorreactor, así se garantiza una mayor solubilidad de los gases una vez tengan contacto con el microorganismo.

A.Anexo: Rango del Carbón

El rango del carbón indica el proceso de carbonificación del mineral. El rango del carbón debe calcularse con base en la norma ASTM D-388-77, en las cuales el carbono fijo, la materia volátil y el poder calorífico se deben calcular en base libre de agua y cenizas (UPME, 2012), de acuerdo a las ecuaciones 1-3.

Rango del Carbón. Tomada de: UPME, 2012.

Tipo	Grupo	Carbono Fijo (%)		Poder Calorífico (Cal/gramo) HImm		Carácter Aglomerante
		SImm				
		>	<	>	<	
Antracita	Meta-Antracita	98				
	Antracita	92	98			No
	Semi-Antracita ¹	86	92			
I Bituminoso	Bituminoso Bajo Volátil	78	86			
	Bituminoso Medio Volátil	69	78			
	Bituminoso Alto Volátil A		69	7.780 ²		Comunmente Aglomerante ³
	Bituminoso Alto Volátil B			7.220	7.780	
	Bituminoso Alto Volátil C			6.380	7.220	
				5.830	6.380	Aglomerante
II Subbituminoso	Sub- Bituminoso A			5.830	6.380	
	Sub- Bituminoso B			5.280	5.830	No
	Sub- Bituminoso C			4.610	5.280	Aglomerante
V Lignito	Lignito A			3.500	4.610	No
	Lignito B				3.500	Aglomerante

B.Anexo: Matriz para Componentes Principales – Sulfatos

	hierro_solución_ _dia6	hierro_removido_ _dia12	hierro_removido_ _dia15	pirita_ oxidada	relacion_ferrico_ ferroso	pH	Eh	concentracion_ celular	hierro_re precipitado	biodesulfurización
T	14,17	32,53	34,19	78,43	23,98	1,81	625,50	7,00E+07	3,57	49,85
T	11,75	28,86	27,75	78,43	21,07	1,87	630,40	3,10E+07	3,57	42,86
T	13,10	29,76	32,68	77,45	10,29	1,56	633,60	3,00E+07	3,72	40,84
T	19,36	35,88	36,58	84,31	9,36	1,55	636,90	2,20E+07	3,72	36,84
K	19,36	35,02	34,52	74,51	31,78	1,92	626,70	5,00E+07	4,34	45,09
K	23,78	36,30	35,32	86,27	27,53	1,90	623,60	2,10E+07	4,34	51,88
K	22,85	40,65	40,16	77,45	14,90	1,60	636,50	5,00E+07	3,42	48,97
K	25,06	40,29	38,98	86,27	11,28	1,58	633,40	3,85E+07	3,42	49,62
M	23,70	39,65	37,98	72,55	27,80	1,85	623,00	2,50E+07	3,72	45,02
M	22,92	36,16	34,58	85,29	25,84	1,88	624,80	1,85E+07	3,72	53,38
M	21,85	40,36	40,51	78,43	15,80	1,61	639,10	3,00E+07	3,30	46,15
M	24,84	41,36	38,36	84,31	11,91	1,59	634,20	3,70E+07	3,30	48,12

C.Anexo: Matriz para Componentes Principales – Cloruros

.	Hierro_solucion_ _dia_6	Hierro_solucion_ dia_12	Hierro_solucion_ dia_15	Pirita_oxidada	Fe(III)/Fe(II)	pH	Eh	Concentracion_celular	Biodesulfurización
T	14.17	32.53	34,19	78.43	23.98	1.81	625.5	7000000	42,86
T	11.75	28.86	27,75	78.18	21.07	1.87	630.4	3100000	36,84
T	13.1	29.76	32,68	84.31	10.29	1.56	633.6	3000000	50,49
T	19.36	35.88	36,58	78.01	9.36	1.55	636.9	2200000	42,42
H	16.87	28.83	26,16	79.41	11.24	1.80	591.50	2000000	47,37
H	16.09	27.76	22,17	80.69	7.21	1.84	584.60	1200000	42,11
H	13.03	27.83	27,67	70.59	11.02	1.73	587.00	2000000	51,54
H	11.53	25.63	24,70	69.77	6.62	1.76	582.10	2650000	52,94
C	6.19	19.86	22,70	74.51	8.11	1.82	589.20	2600000	47,37
C	3.99	18.22	17,66	76.00	6.38	1.84	578.20	1850000	45,86
C	8.83	27.90	28,68	78.43	11.84	1.64	631.20	3500000	52,81
C	7.05	24.84	26,11	76.29	7.41	1.67	620.20	4400000	50,83

Bibliografía

Acevedo F, 2000. The use of reactors in biomining processes. EJB Electronic Journal of Biotechnology 3 (3).

Acevedo F, Gentina J.C, 2007. Bioreactor design fundamentals and their application to gold mining. En: Donati E, Sand W. (Eds.), Microbial Processing of metal sulfides, Springer, 8: 151-168.

Acharya C, Kar R.N, Sukla L.B, 2001. Bacterial removal of sulphur from three different coals. Fuel 80: 2207-2216.

Acuña J, Rojas J, Amaro A.M, Toledo H, Jerez C.A, 1992. Chemotaxis of *Leptospirillum ferrooxidans* and other acidophilic chemolithotrophs: Comparison with *Escherichia coli* chemosensory system. FEMS Microbiol Lett 96: 37-42.

Aguirre M, 2012. Extracellular polymeric substances (EPS) production in *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* and its relevance on attachment to metal sulfides. Tesis para optar título de magister. Universidad Nacional de Colombia.

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.

Alpers C.N, Nordstrom D.K, Ball J.W, 1989. Solubility of jarosite solid solutions precipitated from acid mine waters, Iron Mountain, California, U.S.A. Sci. Geol. Bull. 42: 281-298.

Andrews G.F, Maczuga J, 1984. Bacterial removal of pyrite from coal. Fuel, 63: 297-302.

APHA, 1992. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

Arroyave D, Gallego D, Márquez M, 2013. Evaluation of residence time distribution and mineralogical characterization of the biooxidation of sulfide minerals in a continuous stirred tank reactor. Minerals Engineering 46–47: 128–13.

ASTM, 2007a. Standard Test Method for Forms of Sulfur in Coal. ASTM International, West Conshohocken, PA, DOI:10.1520/D2492-02R07. Disponible en: www.astm.org.

ASTM, 2007b. Standard Practice for Proximate Analysis of Coal and Coke. ASTM International, West Conshohocken, PA, DOI: 10.1520/D3172-07A. Disponible en: www.astm.org.

ASTM, 2008. Standard Test Method for Moisture in the Analysis Sample of Coal and Coke. ASTM International, West Conshohocken, PA, DOI: 10.1520/D3173-03R08. Disponible en: www.astm.org.

ASTM, 2011a. Standard Test Method for Ash in the Analysis Sample of Coal and Coke from Coal. ASTM International, West Conshohocken, PA, DOI: 10.1520/D3174-11. Disponible en: www.astm.org.

ASTM, 2011b. Standard Test Method for Volatile Matter in the Analysis Sample of Coal and Coke. ASTM International, West Conshohocken, PA, DOI: 10.1520/D3175-11. Disponible en: www.astm.org.

ASTM, 2011c. Standard Test Method for Sulfur in the Analysis Sample of Coal and Coke Using High Temperature Tube Furnace Combustion. ASTM International, West Conshohocken, PA, DOI: 10.1520/D4239-11. Disponible en: www.astm.org.

ASTM, 2001d. Standard Test Method for Gross Calorific Value of Coal and Coke. ASTM International, West Conshohocken, PA, DOI: 10.1520/D5865-11a. Disponible en: www.astm.org.

Babcan J, 1971. Synthesis of jarosite $KFe_3(SO_4)_2(OH)_6$. *Goel Zb* 22(2):299–304.

Ballester A, 2005. Mecanismo de la Biolixiviación. Fundamentos y Perspectivas de las Tecnologías Biomineras. Universidad Complutense, España.

Barral S, 1989. Precipitados de hierro en medios sulfato-ácidos que resultan de la alteración de anfibolitas ricas en sulfatos. *Cuaderno Lab. Xéoloxico de Laxe Coruña* 14: 29-42.

Baron D, Palmer C.D, 1996. Solubility of jarosite at 4-35°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60(2): 185-195.

Barreto M, Gehrke T, Harneit K, Sand W, Jedlicki E, Holmes D, 2005. Unexpected insights into biofilm formation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* revealed by genome analysis and experimental approaches.

Baruah M, Kotoky P, Borah G, 2003. Distribution and nature of organic/mineral bound elements in Assam coals, India. *Fuel*, 82: 1783–1791.

Battaglia F, d'Hugues P, Cabral T, Cezac P, García J. L, Morin D, 1998. The mutual effect of mixed *thiobacilli* and *leptospirilli*. *Miner Eng* 11: 195-205.

Bedoya J, Hoyos R, 2010. Efecto de la relación agitación-aireación sobre el crecimiento celular y la producción de *Azadiractina* en cultivos celulares de *Azadirachta indica a. juss.* *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 63 (1).

Bellenberg S, Díaz M, Noel N, Sand W, Poetsch A, Guilliani N, Vera M, 2014. Biofilm formation, communication and interactions of leaching bacteria during colonization of pyrite and sulfur surfaces. *Research in Microbiology* 165: 773-781.

Bevilaqua D, Leite A.L.L.C, Garcia O Jr, Tuovinen O.H, 2002. Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. *Process Biochem* 38: 587-592.

Bibi I, Singh B, Silvester E, 2012. A comparative study of the dissolution kinetics of kaolinite, illite and montmorillonite under acid sulfate conditions. En: *Mineralogy and acid neutralisation mechanisms in inland acid sulfate environments* 4:105-139.

Blázquez M, Ballester A, González F y Mier J, 1991. Desulfurización de carbones. La desulfurización como alternativa. *Canteras y explotaciones*.

Bosecker K, 1997. Bioleaching: metal solubilization by microbes. *FEMS Microbiol. Rev.* 20:591–604.

Brady K, Bigham J, Jaynes W.F, Logan T.J, 1986. Influence of sulfate on Fe-oxide formation: comparisons with a stream receiving acid mine drainage. *Clays and Clay Min* 34: 266-274.

- Brahmaprakash G.P, Devasia P, Jagadish K.S, Natarajan K.A, Rao G.R, 1988. Development of *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859 strains tolerant to copper and zinc. *Bulletin of Materials Science* 10: 461–465.
- Breemen N, 1976. Genesis and solution chemistry of acid sulfate soils in Thailand. *Agric Res. Rep* 848, 263.
- Brockmann S, Arnold T, Schweder B, Bernhard G, 2010. Visualizing acidophilic microorganisms in biofilm communities using acid stable fluorescence dyes. *J Fluoresc.* 20(4): 943-51.
- Brown B, 1971. Jarosite-goethite stabilities at 25 °C, 1 atm. *Min.Dep* 6: 245-252.
- Caicedo G, 2008. BIODESULFURIZACIÓN DE CARBÓN DE LA ZONA RÍO GUACHINTÉ – RÍO AZNAZÚ VALLE DEL CAUCA Y CAUCA EN BIORREACTORES DE COLUMNA UTILIZANDO MICROORGANISMOS NATIVOS. Universidad Nacional de Colombia. Tesis para optar título de magister.
- Caicedo G, Márquez M, 2010. Mecanismo de selección de consorcios bacterianos compatibles con *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* en procesos de biodesulfurización de carbón. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* 52: 88-94.
- Caicedo G, Márquez M, Moreno C, 2011. Influencia de la concentración de hierro y pH iniciales en un proceso de biodesulfurización de carbón – ensayos a nivel de laboratorio. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 13(2): 100-209.
- Caicedo G, Prada M, Pelaéz H, Moreno C, Márquez M, 2012. Evaluation of a coal biodesulfurization process (semi-continuous mode) on the pilot plant level. *Dyna* 174: 114-118.
- Caicedo G, Márquez M, 2013. Effect of chloride salts on biodesulfurization process of a colombian coal. *Rev.fac.ing.univ. Antioquia* 68.
- Calkins W, 1994. The chemical forms of sulfur in coal: a review. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/sci-hub.org/retrieve/pii/0016236194900280>.
- Cara J, Carballo M, Morán A, Bonilla D, Escolano O, Garcia Frutos F.J, 2005. Biodesulphurisation of high sulphur coal by heap leaching. *Fuel* 84(14):1905–10.

Cara J, Vargas M, Moran A, Gómez E, Martínez O, García Frutos F.J, 2006. Biodesulfurization of a coal by packed-column leaching. Simultaneous thermogravimetric and mass spectrometric analyses. *Fuel* 85:1756–62.

Cárdenas J, Moya F, Covarrubias P, Shmaryahu A, Levicán G, Holmes D, Quatrini R, 2012. Comparative genomics of the oxidative stress response in bioleaching microorganisms. *Hydrometallurgy* 127–128, 162–167.

Cardona I, 2008. Mineralogía del proceso de biodesulfurización de carbones provenientes de la zona río guachinte – río asnazú (valle del cauca y cauca). Universidad Nacional de Colombia. Tesis para optar título de magister.

Cardona I, Márquez M, 2009. Biodesulfurization of two Colombian coals with native Microorganisms. *Fuel Processing Technology*. Universidad Nacional de Colombia.

Carranza F, García M, 1990. Kinetic comparison of support materials in the bacteria ferrous iron oxidation in a packed-bed column. *Biorecovery* 2: 15-27.

Casas J.M, 2000. Modelacion cinetica de la precipitacion de hierro como jarosita en soluciones lixiviantes utilizando la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*. XIV Congreso chileno de ingeniería química.

Casas J.M, Paipa C, Godoy I, Vargas T, 2007. Solubility of sodium-jarosite and solution speciation in the system Fe(III)–Na–H₂SO₄–H₂O at 70°C. *Journal of Geochemical Exploration* 92: 111–119.

Chen Y, He Y, Ye W, Sui W, Xiao M, 2013. Effect of shaking time, ionic strength, temperature and pH value on desorption of Cr(III) adsorbed onto GMZ bentonite. *Transactions of nonferrous metals society of China*. Elsevier.

Cherry R.S, Papoutsakis E.T, 1986. Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors, *Bioproc. Eng.* 1: 29-41.

Clavijo S, Vera A, Cuéllar E, Vera N, Fandiño A, 2014. Auge Minero Energético en Colombia ¿Hasta cuándo?. ANIF. Asociación Colombiana del Petróleo.

Clifton C.E, 1937. A comparison of the metabolic activities of *Aerobacter aerogenes*, *Eberthella typhi* and *Escherichia coli*. J. Bact 33: 145-162.

CONPES, 2005. Lineamientos para la formulación de la política de prevención y control de la contaminación del aire. CONPES 3344. Consejo Nacional de Política Económica y Social. Departamento Nacional de Planeación, Colombia.

Crundwell F.K, 2001. How do bacteria interact with minerals? En: Ciminelli, V.S.T, Garcia Jr., O. (Eds.), International Biohydrometallurgy Symposium, Elsevier, Amsterdam, 1: 149–157.

Cunha M.L, Gahan C.S, Menad N, Sandström A, 2008. Possibilities to use oxidic byproducts for precipitation of Fe/As from leaching solution for subsequent base metal recovery. Miner. Eng. 21: 38–47.

Cutright T.J, 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and kinetics using *Cunninghamella echinukata* var, *elegans*. International Biodeterioration and Biodegradation 397-408.

Daoud J, Karamanev D, 2006. Formation of jarosite during Fe²⁺ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Minerals Engineering 19: 960-967.

Das A, Modak J.M, Natarajan K.A, 1997. Studies on multi-metal ion tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans*. Minerals Engineering 10: 743–749.

Dave S.R, 2008. Selection of *Leptospirillum ferrooxidans* SRPCBL and development for enhanced ferric regeneration in stirred tank and airlift column reactor. Bioresource Technology 99(16):7803-7806.

Deveci H, 2001. Bacterial leaching of complex zinc/lead sulphides using mesophilic and thermophilic bacteria. Ph.D. Thesis, Cam-borne School of Mines, University of Exeter.

Deveci H, 2002. Effect of solids on viability of acidophilic bacteria. Mining Engineering Department, Karadeniz Teknik Universitesi, Turkey. Minerals Engineering 15: 1181–1189.

Deveci H, 2004. Effect of particle size and shape of solids on the viability of acidophilic bacteria during mixing in stirred tank reactors. *Hidrometallurgy*, 71 (3–4) (2004), pp. 385–396

Deveci H, Jordan M.A, Powell N, Alp I, 2008. Effect of salinity and acidity on biooxidation activity of mesophilic and extremely thermophilic bacteria. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 18: 714–721.

Din G.A, Suzuki I, 1967. Mechanism of Fe^{2+} -cytochrome c reductase of *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Can. J. Biochem.* 45:1547–1556.

d'Hugues P, Cezac P, Cabral T, Battaglia F, Truong-Meyer X.M, Morin D, 1997. Bioleaching of a cobaltiferous pyrite: a continuous laboratory-scale study at high solids concentration. *Minerals Engineering* 10, 507–527.

Donlan R, 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infect. Dis.* 8: 881-890.

Doran P, 1995. *Principios de la ingeniería de los Bioprocesos*. Editorial Acirbia S.A.

Dutrizac J.E, 1980. The physical chemistry of iron precipitation in the zinc industry. En: Cigan J.M, Mackey T.S, Okeefe T.J (Eds.) *Lead–zinc–tin 80*. New York: AIME 532–64.

Dutrizac J. E, Jambor J.L, 2000. Jarosites and their application in hydrometallurgy. *Rev. Mineral. Geochem.* 40 (1): 405–452.

Eaton A.D, Clesceri L.S, Rice E.W, Greenberg A.E, Franson M.A.H, 2005. 3500-Fe. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st Ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington DC.

Elzaky M, Attia Y, 1995. Effect of bacterial adaptation on kinetics and mechanisms of bioleaching ferrous sulfides. *Chemical Engineering Journal* 56 (2), 115–124.

Eskenazy G.E, Valceva S.P, 2003. Geochemistry of beryllium in the Mariza-east lignite deposit (Bulgaria). *International Journal of Coal Geology* 55: 47–58.

Filippou D, Demopoulos J.P, Papangelakis V.G, 1995. Hydrogen Ion Activities and Species Distribution in Mixed Metal Sulfate Aqueous Systems. *AIChE J*, 41(1): 171-184.

Fitzpatrick R.W, Shand P, 2008. Inland acid sulfate soils: Overview and conceptual models. En: Fitzpatrick R, Shand P (Eds), *Inland acid sulfate soil systems across Australia*, Perth, Australia.

Flemming H.C, Wingender J, 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. *Wat Sci Tech* 43: 1-8.

Gahan C, Sundkvist J.E, Sandstrom A, 2009. A study on the toxic effects of chloride on the biooxidation efficiency of pyrite. *Journal of Hazardous Materials* 172: 1273–1281.

Gahan C, Sundkvist J.E, Dopson M, Sandstrom A, 2010. Effect of chloride on ferrous iron oxidation by a *Leptospirillum ferriphilum*-dominated chemostat culture. *Biotechnology and Bioengineering*.

Gale N.L, Beck J.V, 1966. Competitive inhibition of phosphoribulokinase by AMP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 24: 792-796. En: Tuovinen O.H, Niemela S.I, Gyllenberg H.G (Eds.), *Effect of mineral nutrients and organic substances on the development of Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering*.

García-Ochoa F, Gomez E, Santos V.E, Merchuk J.C, 2010. Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview. *Biochem. Eng. J.* 49 (3): 289–307.

Garzón E, Sanchez-Soto P, Romero E, 2010. Physical and geotechnical properties of clay phyllites. *Applied Clay Science* 48: 307–318.

Gleisner M, Herbert R. B, Frogner P, 2006. Pyrite oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* at various concentrations of dissolved oxygen. *Chemical Geology*. 225: 16–29.

Gaboreau S, Vieillard P, 2004. Prediction of Gibbs free energies of formation of minerals of the alunite supergroup. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68: 3307–3316.

Gehrke T, Hallmann R, Sand W, 1995. Importance of exopolymers from *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* for bioleaching. En: Jerez C.A, Vargas T, Toledo H, Wiertz J.V. (Eds.), Biohydrometallurgical Processing 1: 1–11. Universidad de Chile, Santiago.

Gehrke, Telegdi, Thierry, Sand, 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching., Applied Environmental Microbiology 64: 2743-2747.

Gómez J, Cantero D, 2005. Biooxidación del ion ferroso. Fundamentos y perspectivas de las tecnologías Biomineras. 2: 25-41.

Gramp J, Jones F, Bigham J, Tuovinen O, 2008. Monovalent cation concentrations determine the types of Fe(III) hydroxysulfate precipitates formed in bioleach solutions. Hydrometallurgy, 94: 29-33.

Gray K, Mrachko G, Squires C, 2003. Biodesulfurization of fossil fuels. San Diego, USA.

Harrison A.P, 1984. The Acidophilic *Thiobacilli* and other Acidophilic bacteria that share their habitat, Ann. Rev. Microbiol. 38, 265.

Haghshenas D, Alamdari K, Torkmahalleh A, Bonakdarpour B, Nasernejad B, 2009. Adaptation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to high grade sphalerite concentrate. Minerals Engineering.

Harahuc L, Lizama H, Suzuki I, 2000. Selective Inhibition of the Oxidation of Ferrous Iron or Sulfur in *Thiobacillus ferrooxidans*. Applied and Environmental Microbiology 1031–1037.

He H, Hong F.F, Tao X.X, Li L, Ma C.Y, Zhao Y.D, 2012. Biodesulfurization of coal with *Acidithiobacillus caldus* and analysis of the interfacial interaction between cells and pyrite. Fuel Process Technol, 101:73–7.

Hiroyoshi N, Kuroiwa S, Miki H, Tsunekawa M, Hirajima T, 2007. Effects of coexisting metal ions on the redox potential dependence of chalcopyrite leaching in sulfuric acid solutions. Hydrometallurgy 87: 1–10.

Hoffmann M, Faust B.C, Panda F.A, Koo H.H, Tsuchiya H. M, 1981. Kinetics of the Removal of Iron Pyrite from Coal by Microbial Catalysis. Applied and environmental microbiology 259-271.

Hone H.J, Beyer M, Ebner H.G, Klein J, Juntgen H, 1987. Microbial desulphurization of coal–development and application of a slurry reactor. *Chem Eng Technol* 10: 173–6.

Jensen A.B, Webb C, 1995. Treatment of H₂S-containing gases: A review of microbiological alternatives. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 2-10.

Jiao Y, Cody G, Harding A.K, Wilmes P, Schrenk M, Wheeler K, Banfield J.F, Thelen M.P, 2010. Characterization of extracellular polymeric substances from acidophilic microbial biofilms, *Applied and Environmental Microbiology* 76: 2916-2922.

Jorjani E, Chehreh Chelgani S, Mesroghli Sh, 2007. Prediction of microbial desulfurization of coal using artificial neural networks. *Minerals Engineering* 20: 1285–1292.

Julia de Fatima W.M, Setti L, Lanzarini G, Pifferi P.G, 1996. Dibenzothiophene Biodegradation by a *Pseudomonas* sp. in poorly degradable organic solvents. *Process Biochemistry* 31(7): 711-717.

Kaksonen A.H, Morris C, Rea S, Li J, Wylie J, 2014. Biohydrometallurgical iron oxidation and precipitation: Part I–Effect of pH on process performance. *Hydrometallurgy*.

Kaksonen A.H, Morris C, Rea S, Li J, Usher K.M, 2014. Biohydrometallurgical iron oxidation and precipitation: Part II – Jarosite precipitate characterisation and acid recovery by conversion to hematite. *Hydrometallurgy*.

Kalinowski B.E, Schweda P, 2007. Rates and nonstoichiometry of vermiculite dissolution at 22°C. *Geoderma* 142: 197-209.

Kamimura K, Higashino E, Kanao T, Sugio T, 2005. Effects of inhibitors and NaCl on the oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by a marine acidophilic, sulfur-oxidizing bacterium, *A. thiooxidans*. *Extremophiles* 9:45-51.

Karavaiko, Zakharchuk, Bogdanova, Egorova, Tsaplina, Krasil'nikova, 2002. The enzymes of carbon metabolism in the thermotolerant bacillar strain K1, *Microbiology* 71: 651-656.

Kiani M.H, Ahmadi A, Zilouei H, 2014. Biological removal of sulphur and ash from fine-grained high pyritic sulphur coals using a mixed culture of mesophilic microorganisms. *Fuel* 13: 89–95

- Kim D.J, Pradhan D, Park K.H, Ahn J.G, Lee S.W, 2008. Effect of pH and temperature on iron oxidation by mesophilic mixed iron oxidizing microflora. *Mater Trans* 49:2389–93.
- Kinzler K, Gehrke T, Telegdi J, Sand W, 2003. Bioleaching – a result of interfacial process caused by extracellular polymeric substances (EPS). *Hydrometallurgy* 71, 83-88.
- Kos C.H, Bijleveld W, Grotenhuis T, Box P, Kuenen J.G, Poorter R.P.E, 1983. Composition of mineral salts medium for microbial desulfurization of coal. En: Rossi G, Torma A.E, (Eds.), *Recent progress in Biohydrometallurgy*.
- Kubisz J, 1970. Studies on synthetic alkali-hydronium jarosite. I. Synthesis of jarosite and natrojarosite. *Mineral. Pal.* 1: 47-57.
- Kuyucak N, 2006. Selecting suitable methods for treating mining effluents. Ontario, Canada.
- Lazaroff N, 1963. Sulfate requirement for iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 85(1): 78.
- Lazaroff, N. 1977. The specificity of the anionic requirements for iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.* 101:85–91.
- Lazaroff N, Sigal W, Wasserman A, 1982. Iron oxidation and precipitation of ferric hydroxysulfates by resting *Thiobacillus ferrooxidans* cells. *Applied Environmental Microbiology*, 1: 924-938.
- Liao Y, Zhou L, Bai S, Liang J, Wang S, 2009. Occurrence of biogenic schwertmannite in sludge bioleaching environments and its adverse effect on solubilization of sludge-borne metals. *Appl. Geochem.* 24: 1739–1746.
- Liu H, Gu G, Xu G, 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.
- Lodge R, Hinshelwood C, 1939. Physicochemical aspects of bacterial growth. Part V. Influence of magnesium on the lag phase in the growth of *Bact. Zactis aerogenes* in synthetic media containing phosphate. *J. chern. SOC.*

Loi G, Mura A, Trois P, Rossi G, 1994. Bioreactor performance versus solids concentration in coal biodepyritization. *Fuel Process Technol* 40:251–260

Loi G, Mura A, Rossi G, Trois P, 1994. The Porto Torres biodepyritization pilot plant: light and shade of one year operation. *Fuel Process Technol* 40:261–268

López A.E, 2012. Estudio experimental de permeabilidad de materiales depositados en pilas de lixiviación. Universidad de Chile. Tesis maestría.

Macho S, 2002. Metodologías analíticas basadas en Espectroscopía de Infrarrojo y calibración multivariante: Aplicación a la industria Petroquímica. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España. Tesis doctoral.

Mackintosh M.E, 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.* 105: 215-218.

Maity S, Mukherjee P, 2006. X-ray structural parameters of some Indian coals. *Current Science*, 91(3): 337-340.

Malik A, Dastidar M.G, Roychoudhury P.K, 2001. Part A: Toxic/Hazardous substances and environmental engineering. *Journal of Environmental Science and Health* 36(6): 1113-1128.

Malik A, Dastidar M.G, Roychoudhury P.K, 2004. Factors limiting bacterial iron oxidation in biodesulphurization system. Centre for Energy Studies, Indian Institute of Technology, New Delhi, India. Elsevier, 73: 13–21.

Manafi Z, 2002. Column bioleaching of agglomerated low-grade copper ore by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. Islamic Azad University of Jahrom, Iran. Tesis para optar título de magister.

Manoj B, Kunjomana A.G, 2012. Study of stacking structure of amorphous carbon by x-ray diffraction technique. *Int. J. Electrochem. Sci.* 7: 3127 – 3134.

Marhual N.P, Pradhan N, Kar R.N, Sukla L.B, Mishra B.K, 2008. Differential bioleaching of copper by mesophilic and moderately thermophilic acidophilic consortium enriched from same copper mine water sample. *Bioresource Technology* 99: 8331–8336.

Martin D.C, 1932. The oxygen consumption of *Escherichia coli* during the lag and logarithmic phases of growth. *J. Gen. Physiol* 15: 691-708.

Mason L.J, Rice N.M, 2002. The adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* for the treatment of nickel – iron sulphide concentrates. *Minerals Engineering* 15: 795-808.

Mayling A.A, 1966. Bacterial leaching of ores with an alkaline matrix. En: Tuovinen O.H, Niemela S.I, Gyllenberg H.G (Eds.), *Effect of mineral nutrients and organic substances on the development of Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering*.

McCready R.G.L, Wadden D, Marchbank A, 1986. Nutrient requirements for the in-place leaching of uranium by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 17: 61–71

Mcintosh J.M, Groat L, 1997. *Biological–Mineralogical Interactions*. Mineralogical Association of Canada, Ottawa.

Meruane G, 2002. Oxidación bacteriana de sulfato ferroso con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Universidad de Chile. Tesis para optar título PhD.

Meshram P, Purohit B.K, Sinha M.K, Sahu S.K, Pandey B.D, 2015. Demineralization of low grade coal–A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41: 745–761.

Metz V, Amram K y Ganor J, 2005. Stoichiometry of smectite dissolution reaction. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 1755-1772.

Meyer G, Schneider-Merck T, Bohme S, Sand W, 2002. A simple method for investigations on the chemotaxis of *A. ferrooxidans* and *D. vulgaris*. *Acta Biotechnol* 22: 391-399.

Mojica J, 2008. Difracción de rayos X de polvo en análisis de carbones. *Memorias Seminario Internacional sobre Beneficio de Carbón usando Flotación Burbujeante*, Santiago de Cali, Colombia.

Munkhtsetseg S, Khomich A, Poklonskii N, 2007. Infrared absorption spectra of coals with different degrees of coalification. *Journal of Applied Spectroscopy*, 74(3): 338-343.

Myerson A.S, 1981. Oxygen mass transfer requirements during the growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on iron pyrite. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 1413–1416.

Natarajan K.A, Sudeesha K, Rao G.R, 1994. Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek* 66: 303–306.

Naumann D, 2006. Infrared Spectroscopy in Microbiology. Robert Koch-Institute, Berlin, Germany. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*.

Nemati M, Harrison S.T.L, Hansford G.S, Webb C, 1998. Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: a review on the kinetic aspects. *Biochem. Eng. J.* 1: 171–190.

Nordstrom D. K, 1982. Aqueous pyrite oxidation and the consequent formation of secondary iron minerals. En: *Acid Sulfate Weathering*. Kitrick J, Fanning D y Hossner L (Eds), Soil Science Society of America, Madison, 37-56.

Norris P.R, Murrell J.C, Hinson D, 1995. The potential for diazotrophy in iron-and sulfur-oxidizing acidophilic bacteria. *Arch. Microbiol.* 164: 294-300.

Nurmi P, Özkaya B, Sasaki K, Kaksonen A.H, Riekkola-Vanhanen M, Tuovinen O.H, Puhakka, J.A, 2010. Biooxidation and precipitation for iron and sulfate removal from heap bioleaching effluent streams. *Hydrometallurgy* 101: 7–14.

Ohmura N, Tsugita K, Koizumi J, Saiki H, 1996. Sulfur-binding protein of flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 178: 5776–5780.

Ohmura N, Saiki H, 1997. Desulfurization of Pittsburgh coal by microbial column flotation. *Appl Biochem Biotechnol* 61:339–49.

Oinuma K, Kodama H, 1967. Use of infrared absorption spectra for identification of clay minerals in sediments. *J Tokyo Univ General Education (Nat Sc)* 7:1-23.

- Olson G.J, 1991. Rate of pyrite bioleaching by *Thiobacillus ferrooxidans*: results of an interlaboratory comparison. Appl. Environ. Microbiol. 57 (3): 642–644.
- Olubambi P, Ndlovu S, Potgieter J, Borode J, 2007. Effects of ore mineralogy on the microbial leaching of low grade complex sulphide ores. Hydrometallurgy 86: 96–104.
- Oolman T, 1993. Bioreactor design and scale-up applications in minerals bioleaching. En: Torma A.E, Wey J.E, Lakshmanan V.I, (Eds.), Biohydrometallurgical Technologies. The Mineral Metals and Material Society, 1: 401–415.
- Oviedo J.M, 2011. Matriz de varianzas vs. Matriz de correlaciones en el análisis de componentes principales. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Pandey R.A, Raman V.K, Bodkhe S.Y, Handa B.K, Bal A.S, 2005. Microbial desulphurization of coal containing pyritic sulphur in a continuously operated bench scale coal slurry reactor. Fuel 84: 81–87.
- Pappu A, Saxena M, Asolekar S, 2006. Jarosite characteristics and its utilisation potentials. Science of the Total Environment 359: 232–243.
- Peláez H, Prada M, Caicedo G, Moreno C, Márquez M, 2013. Influencia de la relación inicial de Fe^{3+}/Fe^{2+} , en un proceso de biodesulfurización de carbones en suspensión. Rev. Int. Contam. Ambie. 29(2): 211-217.
- Pogliani C, Donati E, 1999. The role of exopolymers in the bioleaching of a non-ferrous metal sulphide. J. Ind. Microbiol. Biotech. 22, 88–92.
- Prayuenyong P, 2002. Coal biodesulphurization processes. Journal Science Technology, 24: 493-507.
- Prescott M.L, Harley J.P, Klein D.A, 2004. Microbiología. McGraw – Hill Interamericana 100, 167, 1085.
- Qiu Y, Zhang Q, Tian Y, Zhang J, Cao J, Xiao T, 2011. Composition and structure of luxing coal with different particle sizes. Petroleum and Coal.

Ramirez P, Guiliani N, Valenzuela L, Beard S, Jerez C, 2004. Differential Protein Expression during Growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on Ferrous Iron, Sulfur Compounds, or Metal Sulfides. *Applied and environmental microbiology*, 4491–4498.

Rawlings D.E, 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annual Rev. Microbiol.* 56, 65–91.

Razzell W.E, Trussell P.C, 1963. Isolation and properties of an iron-oxidizing *Thiobacillus*. *J. Bacteriol.* 85: 595–603.

Redacción portafolio, 2011. Carbón destronaría al petróleo en 10 años. Portafolio.co. Disponible en: <http://www.portafolio.co/economia/carbon-destronaria-al-petroleo-10-anos>

Redacción portafolio, 2012. En carbón, el país es exportador de talla mundial. Especiales Portafolio.co. Disponible en: <http://www.portafolio.co/negocios/carbon-el-pais-es-exportador-talla-mundial>.

Ribeiro J, Ferreira da Silva E, Flores S, 2010. Burning of coal waste piles from Douro Coalfield (Portugal): Petrological, geochemical and mineralogical characterization. *International Journal of Coal Geology* 81: 359–372.

Rivadeneira J, 2001. Challenges in practicing the bioleaching process. En: Sobral L, Oliveira D, Souza, C.E. (Eds.), *Biohydrometallurgical processes: A practical approach*, CETEM/MCTI, 1: 2-19.

Rodriguez-Leiva M, Tributsch H, 1988. Morphology of Bacterial Leaching Patterns by *Thiobacillus ferrooxidans* on Synthetic Pyrite. *Archives of Microbiology*, 149: 401-405.

Rodrigues V, Martins P, Gaziola S, Azevedo R., Ottoboni L, 2010. Antioxidant enzyme activity in *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR maintained in contact with chalcopyrite. *Process Biochemistry* 45: 914-918.

Roger D, 2007. Bioleaching of sulfide minerals in continuous stirred tanks. En: Donati E, Sand W. (Eds.), *Microbial Processing of metal sulfides*, Springer, 7: 133-150.

Rohwerder T, Sand W, 2007. Mechanisms and biochemical fundamentals of bacterial metal sulfide oxidation. *Microbial Processing of metal sulfides* (2): 35-58.

Rossi G, 1990. Biohydrometallurgy. McGraw – Hill Book Company.

Rossi, G,1999. The design of bioreactors. En: Amils R, Ballester A, (Eds.), Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century, Part A. Elsevier, Amsterdam, 61-80.

Rossi G, 2001. The design of bioreactors. Hydrometallurgy 59: 217–231.

Rossi G, 2013: The Microbial Desulfurization of Coal. Adv Biochem Engin/Biotechnol.

Saikia B, Boruah R.K, Gogoi P.K, 2007. FT-IR and XRD analysis of coal from Makum coalfield of Assam. J. Earth Syst. Sci.116 (6): 575–579.

Sampson M.I, Phillips C.V, Ball A.S, 2000. Investigation of the attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* to mineral sulfides using scanning electron microscopy analysis. Minerals Engineering, 13 (6): 643-656.

Sand W, Gehrke T, Jozsa P.G, Schippers A, 1999. Direct versus indirect bioleaching. En: Amils, R., Ballester, A. (Eds.), Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21st Century, Part A. Elsevier, Amsterdam, 27–49.

Sand W, Gehrke T, Jozsa P.G, Schippers A, 2001. (Bio)chemistry of bacterial leaching - direct vs. indirect bioleaching. Hydrometallurgy 59: 159-175.

Sarcheshmehpour Z, Lakzian A, Fotovat A, Reza B.A, Hosain H.G, Seyed- Bagheri S.A, 2009.The effects of clay particles on the efficiency of bioleaching process. Hydrometallurgy 98: 33-37.

Schiavon N, 2007. Kaolinisation of granite in an urban environment. Environmental Geology, 52: 399–407.

Schippers A, Sand W, 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. Appl. Environ. Microbiol. 65: 319–321.

Schippers A, 2007. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. Microbial processing of metal sulfides.1: 3-34.

- Seeger M, Jerez C.A, 1992. Phosphate limitation affects global gene expression in *Thiobacillus ferrooxidans*. Geomicrobiol. J. 10: 227–237.
- Sharma P.K, Das A, Hanumantha Rao K, Forsberg K.S.E, 1999. *Thiobacillus ferrooxidans* interaction with sulfide minerals and selective chalcopyrite flotation from pyrite. En: Parekh B.K, Miller J.D. (Eds.), Advances in Flotation Technology 147–165.
- Shiers D.W, Blight K.R, Ralph D.E, 2005. Sodium sulphate and sodium chloride effects on batch culture of iron oxidising bacteria, Hydrometallurgy 80: 75–82.
- Silverman M.P, Lundgren D.G, 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. J Bacteriol 77(5): 642–647.
- Sonibare O, Haeger T, Foley S.F, 2010. Structural characterization of Nigerian coals by X-ray diffraction, Raman and FTIR spectroscopy. Energy 35: 5347-5353.
- Subramanian A, Saona L, 2009. Fourier Transform Infrared (FTIR). Spectroscopy Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control.
- Sun L.X, Zhang X, Tan W. S, Zhu M, 2012. Effect of agitation intensity on the biooxidation process of refractory gold ores by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Hydrometallurgy 127-128: 99–103.
- Suraj G, Iyer C.S.P, Rugmini S, Lalithambika M, 1997. The effect of micronization on kaolinites and their sorption behavior. Appl Clay Sci 12:111-30.
- Suzuki I, Lee D, Mackay B, Harahuc L, Oh J.K, 1999. Effect of various ions, pH, and osmotic pressure on oxidation of elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. Appl Environ Microbiol 65:5163–5168.
- Tang K, Baskaran V, Nemati M, 2009. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. Biochemical Engineering Journal 44: 73-94.
- Thomas C.R, 1990. Problems of shear in biotechnology. En: Winkler M.A, (Ed.), Chemical Engineering Problems in Biotechnology. Elsevier, Barking, 23–93.

Torma A.E, Walden C.C, Branion R.M.R, 1970. Microbiological leaching of a zinc sulfide concentrate. *Biotechnology and Bioengineering* 12: 501-517.

Torma M. K, Ruklisha M. P, Vanags J. J. , Zeltina, M.O. , Leite, M. P. , Galinina, N. I, Viesturs, U. E, Tengerdy R. P, 1991. Inhibition of microbial growth and metabolism by excess turbulence. *Biotechnology and Bioengineering*. 38: 552-556

Toro L, Paponetti B, Cantalini C, 1988. Precipitate Formation in the Oxidation of Ferrous Ions in the Presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 20: 1-9.

Toro N, 2014. Proceso de Biodesulfurización del azufre orgánico presente en un carbón colombiano, mediante uso de una cepa pura de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. Tesis para optar título de Magíster. Departamento de Materiales y Minerales. Universidad Nacional de Colombia.

Tremolada P.J, 2011. Caracterización, influencia y tratamiento de arcillas en procesos de cianuración de pilas. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.

Tuovinen O.H, Niemela S.I, Gyllenberg H.G, 1971. Effect of mineral nutrients and organic substances on the development of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering* 13: 517-527.

Tuovinen O, Kelly D, 1972. Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ores.

Tuovinen O.H, Panda F, Tsuchiya H, 1979. Nitrogen Requirement of Iron-Oxidizing *Thiobacilli* for Acidic Ferric Sulfate Regeneration. *Applied and Environmental Microbiology*, 33 (5): 954-958.

Tuovinen O.H, Fry I.J, 1993. Bioleaching and mineral biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 4: 344-355.

Tyson G.W, Lo I, Baker B.J, Allen E, Hugenholtz P, Banfield J, 2005. Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an acidophilic microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 6319–6324.

UPME, 2012. Cadena del carbón. Unidad de Planeación Minero Energética. Ministerio de Minas y Energía, Colombia. Disponible en: <http://www1.upme.gov.co/principales-indicadores>

- Vu B, Chen M, Crawford R.J, Ivanova E.P, 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation, review. *Molecules*. 14: 2535-2554.
- Wang W, Qin Y, Sang S, Jiang B, Guo Y, Zhu Y, Fu X, 2006. Partitioning of minerals and elements during preparation of Taixi coal, China. *Fuel*, 85:57–67.
- Webb M, 1949. The Influence of Magnesium on Cell Division. *Journal of General Microbiology*, 2(3): 275–287.
- Willis B, 2007. Downstream processing options for nickel laterite heap leach liquors. ALTA Conference Ni/Co, Proceedings.
- World Coal Association, 2005. El carbón como recurso, una visión general del carbón. Disponible en: <http://www.worldcoal.org/resources/wca-publications>
- Xia L, Liu X, Zeng J, Yin C, Gao J, Liu J, Qiu G, 2008. Mechanism of enhanced bioleaching efficiency of *Acidithiobacillus ferrooxidans* after adaptation with chalcopyrite. *Hydrometallurgy* 92: 95–101.
- Yu R.L, Zhong D.L, Miao L, Wu F.D, Qiu G.Z, Gu G.H, 2011. Relationship and effect of redox potential, jarosites and extracellular polymeric substances in bioleaching chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 21: 1634-1640.
- Zhuang X, Querol X, Zeng R, Xu W, Alastuey A, Lopez-Soler A, Plana F, 2000. Mineralogy and geochemistry of coal from the Liupanshui mining district, South China. *International Journal of Coal Geology* 45: 21–37.