



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

INFLUENCIA DE LAS SALES CLORURO FÉRRICO Y SULFATO FÉRRICO COMO FUENTES DE HIERRO EXÓGENAS EN UN PROCESO DE BIODESULFURIZACIÓN DE CARBONES, MEDIADO POR LA ACCIÓN DE UNA CEPA DE *Acidithiobacillus ferrooxidans*

María Consuelo Prada Fonseca

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Materiales y Minerales

Medellín, Colombia

2015

**INFLUENCIA DE LAS SALES CLORURO FÉRRICO Y SULFATO
FÉRRICO COMO FUENTES DE HIERRO EXÓGENAS EN UN PROCESO
DE BIODESULFURIZACIÓN DE CARBONES, MEDIADO POR LA
ACCIÓN DE UNA CEPA DE *Acidithiobacillus ferrooxidans***

María Consuelo Prada Fonseca

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería de Materiales y Procesos

Director:

PhD., Marco Antonio Márquez Godoy

Asesor:

PhD., Gerardo Andrés Caicedo Pineda

Línea de Investigación:

Biohidrometalurgia

Grupo de Investigación:

Grupo de Mineralogía Aplicada y Bioprocesos (GMAB)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Materiales y Minerales

Medellín, Colombia

2015

A Dios, por permitirme vivir.

A mi madre Adela Prada, por quien siento el más profundo amor y quien me ha regalado sus enseñanzas y la motivación que necesité para culminar este trabajo. Por ser mi modelo a seguir y porque sin ella no sería lo que soy.

A mi novio Juan Esteban Jiménez, por su constante apoyo y amor incondicional, ha sido mi amigo y compañero inseparable.

Agradecimientos

A mi familia Javier, Carolina, Tilcia, Santos y Margarita, por caminar siempre a mi lado, brindarme su amor y comprensión en todos los momentos de mi vida.

A mi co-director Gerardo Caicedo, por su confianza, orientación y por el tiempo que dedico para ayudarme a culminar este trabajo.

A mi director Marco Márquez, por su paciencia e invaluable contribución.

A la empresa ARGOS S.A, por proveer el carbón empleado en este estudio.

A los laboratorios de carbones, metalografía y microscopía electrónica de barrido de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, por estar siempre dispuestos a colaborar.

Al Grupo de Mineralogía Aplicada y Bioprocesos (GMAB) por sus valiosos aportes.

Al laboratorio de Biomineralogía y Biohidrometalurgia (LBB), en donde se llevó a cabo esta investigación.

A Piedad Builes y Enrique Jiménez, por su compañía y cariño.

A polo, mi amigo fiel.

A todas aquellas personas que estuvieron a mi lado durante la realización de esta tesis.

Resumen

Este trabajo evaluó el porcentaje de remoción de azufre inorgánico presente en un carbón sub-bituminoso, con alto contenido de azufre (%S_{pirítico}: 1.06; % S_{Sulfato}: 0.14; %S_{orgánico}: 1.10), proveniente de la mina “La Guacamaya” (Córdoba- Colombia), empleando una cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Los experimentos fueron realizados tanto a nivel de erlenmeyer (500 mL) como en tanques agitados (5 L), empleando 10 %p/v de carbón. Los ensayos fueron llevados a cabo usando tres fuentes de hierro exógenas (sulfato ferroso (FeSO₄), Sulfato férrico (Fe₂(SO₄)₃) y cloruro férrico (FeCl₃)), variando las concentraciones iniciales de hierro total (200 mg/L y 1200 mg/L), así como la relación inicial de hierro Fe³⁺/Fe²⁺ (I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20). Los experimentos fueron mantenidos en un agitador orbital a 30 °C ± 1 °C y 180 rpm ± 2 rpm, por un periodo de 12 días. De acuerdo con los resultados obtenidos, el porcentaje máximo de azufre pirítico removido fue 81% (% pirita oxidada), fue alcanzado en los ensayos en los cuales se empleó sulfato férrico (SF), una menor relación inicial de hierro Fe³⁺/Fe²⁺ (I: 20: 80) y una concentración de hierro total de 200 mg/L (C1).

Palabras clave: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, sulfato ferroso, sulfato férrico, cloruro férrico, carbón, pirita.

Abstract

In this work the percentage of inorganic sulphur remove was evaluated in a sub-bituminous coal with a high sulfur content (S_{pyritic}: 1.06%; S_{sulfate}: 0.14%; S_{organic}: 1.10%), from “La Guacamaya” mine (Córdoba - Colombia), a culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* was used. The experiments was realized at the level of erlenmeyer (500 mL) and in the stirred tanks (5L) using 10 %w/v of coal. The assays were carried out using three different sources of exogenous iron (FeSO₄, Fe₂(SO₄)₃ y FeCl₃), varying the initial concentration of total iron (200 mg/L y 1200 mg/L), and the initial ratio of iron Fe³⁺/Fe²⁺ (I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20). The experiments were kept in a orbital shaker at 30 °C ± 1 °C and 180 rpm ± 2 rpm, for 12 days. According to the obtained results, the maximum percentage of pyritic sulphur removed was 81% (% oxidized pyrite) using ferric sulphate (SF), the lower initial ratio of iron Fe³⁺/Fe²⁺ (I: 20:80) and a concentration of total iron of 200 mg/L (C1).

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ferrous sulphate, ferric sulphate, ferric chloride, coal, pirite.

Contenido

| | Pág. |
|--|-----------|
| Resumen | VI |
| Lista de figuras..... | X |
| Lista de tablas..... | XVII |
| Introducción | 1 |
| 1. Generalidades y marco teórico..... | 5 |
| 1.1 Carbón..... | 8 |
| 1.1.1 Tipos de Carbón | 9 |
| 1.1.2 Formas de azufre y minerales asociados al carbón..... | 11 |
| 1.2 Métodos de desulfurización del carbón..... | 13 |
| 1.2.1 Métodos físicos | 14 |
| 1.2.2 Métodos químicos..... | 15 |
| 1.2.3 Métodos biológicos – BIODESULFURIZACIÓN | 16 |
| 1.3 Bioenergética de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | 28 |
| 1.3.1 Los iones ferrosos (Fe^{2+}) y los procesos de biolixiviación | 30 |
| 1.3.2 Iones férricos (Fe^{3+}) | 31 |
| 1.4 Evolución de los procesos de biodesulfurización de carbón, empleando la cepa <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | 33 |
| 1.5 Carbones de Córdoba – Colombia..... | 35 |
| 2. Objetivos..... | 37 |
| 2.1 Objetivo general..... | 37 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 37 |
| 3. Materiales y Métodos..... | 38 |
| 3.1 Muestra de carbón..... | 38 |
| 3.2 Preparación de la muestra | 38 |
| 3.3 Análisis químicos iniciales y caracterización mineralógica | 38 |
| 3.4 Selección de microorganismos..... | 39 |
| 3.4.1 Identificación bioquímica del aislado compatible con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | 39 |
| 3.5 Adaptación | 39 |
| 3.6 Comparación entre una cepa aislada compatible con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> vs. una cepa comercial de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (ATCC 23270), en un proceso de desulfurización de carbón en suspensión. | 41 |
| 3.7 Influencia de la relación inicial de Fe^{3+}/Fe^{2+} , empleando sulfato férrico, cloruro férrico y una cepa de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , en un proceso de biodesulfurización de carbón en suspensión..... | 42 |
| 3.8 Análisis del proceso bioquímico a mayor escala usando tanques agitados..... | 44 |
| 3.9 Análisis químicos..... | 45 |
| 3.9.1 Análisis del carbón | 45 |
| 3.9.2 Análisis de la suspensión..... | 45 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.10 | Análisis mineralógicos..... | 45 |
| 3.10.1 | Microscopia electrónica de barrido (SEM)..... | 45 |
| 3.10.2 | Difracción de rayos X (DRX)..... | 46 |
| 3.10.3 | Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) | 47 |
| 4. | Resultados | 49 |
| 4.1 | Análisis químicos y mineralógicos de la muestra..... | 49 |
| 4.1.1 | Análisis químicos | 49 |
| 4.1.2 | Caracterización mineralógica inicial..... | 51 |
| 4.2 | Adaptación | 54 |
| 4.3 | Comparación entre una cepa aislada compatible con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> vs. una cepa comercial de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (ATCC 23270), en un proceso de desulfurización de carbón en suspensión..... | 61 |
| 4.3.1 | Medidas de pH y Eh | 61 |
| 4.3.2 | Concentración celular | 64 |
| 4.3.3 | Hierro removido y pirita oxidada | 64 |
| 4.3.4 | Formas de azufre..... | 66 |
| 4.3.5 | Microscopia electrónica de barrido (SEM)..... | 67 |
| 4.4 | Influencia de la relación inicial de Fe^{3+}/Fe^{2+} , empleando sulfato férrico, cloruro férrico y una cepa de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , en un proceso de biodesulfurización de carbón en suspensión. | 71 |
| 4.4.1 | Medidas de pH y Eh | 71 |
| 4.4.2 | Crecimiento celular | 76 |
| 4.4.3 | Hierro removido y pirita oxidada | 77 |
| 4.4.4 | Formas de azufre..... | 80 |
| 4.4.5 | Análisis mineralógico del carbón al finalizar el proceso | 82 |
| 4.5 | Análisis del proceso bioquímico a mayor escala usando tanques agitados | 106 |
| 4.5.1 | Medidas de pH y Eh | 106 |
| 4.5.2 | Concentración celular | 107 |
| 4.5.3 | Hierro removido..... | 108 |
| 4.5.4 | Formas de azufre y análisis próximos | 109 |
| 4.5.5 | Difracción de rayos X (DRX)..... | 110 |
| 4.5.6 | Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) | 111 |
| 4.5.7 | Microscopia electrónica de barrido (SEM)..... | 112 |
| 5. | Discusión..... | 117 |
| 5.1 | Adaptación | 117 |
| 5.2 | Comparación entre una cepa aislada compatible con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> vs. una cepa comercial de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (ATCC 23270), en un proceso de desulfurización de carbón en suspensión..... | 120 |
| 5.2.1 | Análisis del proceso de biodesulfurización | 120 |
| 5.2.2 | Microscopia electrónica de Barrido (SEM)..... | 124 |
| 5.3 | Influencia de la relación inicial de Fe^{3+}/Fe^{2+} , empleando sulfato férrico, cloruro férrico y una cepa de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , en un proceso de biodesulfurización de carbón en suspensión. | 126 |
| 5.3.1 | Análisis del proceso de biodesulfurización | 126 |
| 5.4 | Análisis del proceso bioquímico a mayor escala usando tanques agitados | 138 |

| | |
|--|------------|
| 6. Conclusiones y recomendaciones | 142 |
| 6.1 Conclusiones | 142 |
| 6.2 Recomendaciones | 146 |
| Bibliografía | 147 |

Lista de figuras

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1-1: Clasificación y usos del carbón según sus propiedades físicas y químicas (Carbonífera de Chile, 2002). | 10 |
| Figura 1-2: Estructura química de los compuestos orgánicos de azufre, típicos en los combustibles fósiles (Kropp y Fedorak, 1998). | 13 |
| Figura 1-3: Imagen de microscopia electrónica de barrido de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> creciendo sobre pirita (Sandhuesa <i>et al.</i> , 1999). | 18 |
| Figura 1-4: Imagen de microscopía de fuerza atómica de una célula de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> adherida específicamente a un área fracturada de un cristal de pirita (Sand y Gehrke, 2006). | 19 |
| Figura 1-5: Mecanismo directo e indirecto de biolixiviación (Rodríguez, 2000), tomado de (Ballester, 2006). | 20 |
| Figura 1-6: Modelo del mecanismo de contacto indirecto e imagen de microscopia electrónica de transmisión de la capa polimérica extracelular de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (Schippers y Sand, 1999; Tributsch, 2001). | 22 |
| Figura 1-7: Esquema de los tres tipos de lixiviación indirecta (Tributsch, 2001). | 23 |
| Figura 1-8: Ciclo oxidativo de la degradación de pirita por degradación química y/o biológica (Sand <i>et al.</i> , 2001). | 24 |
| Figura 1-9: Mecanismos indirectos de biolixiviación de sulfuros metálicos. Vía tiosulfato (<i>Izq.</i>), vía polisulfuro (<i>der.</i>) (Sand y Schippers, 1999). <i>Af:</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ; <i>At:</i> <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> . MS: sulfuro metálico. | 26 |
| Figura 1-10: Transporte electrónico en <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> . (a) Modelo de oxidación de hierro ferroso en <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> . (b) Esquema de los potenciales de reducción de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ruta de transferencia de electrones. Rus: rusticianina, UQ: ubiquinona (Bird <i>et al.</i> , 2011) | 30 |
| Figura 1-11: Fotografías mina “La Guacamaya”, municipio de Puerto Libertador, Córdoba-Colombia. | 36 |
| Figura 3-1: Frente de explotación mina “La Guacamaya”. | 38 |
| Figura 3-2: Esquema general del proceso de bioquímico de desulfurización de carbón, empleando biorreactores de tanque agitado con capacidad de 5L y la adición inicial de una relación de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} | 44 |
| Figura 3-3: Pulido con algunas de las muestras de carbón de interés, para análisis con microscopia electrónica de barrido (SEM). | 46 |
| Figura 3-4: Pastillas con la muestra de carbón para análisis del carbón con difracción de rayos X (DRX). | 47 |
| Figura 3-5: Pastillas de KBr que contienen algunas muestras de carbón para el análisis con FTIR. 48 | |
| Figura 4-1: Difractograma de rayos X de la muestra de carbón inicial. Cd: cordierita, Gy: yeso, Na: nacrita, Ms: moscovita, Py: pirita, Il: ilita, Do: dolomita, Qz: cuarzo. | 51 |

| | |
|---|----|
| Figura 4-2: Formas de pirita presentes en el carbón. (a.) Framboide conformado por cristales cubicos (2500 X), (b, c.) Framboides de diferentes tamaños ubicados en las zonas de fractura del carbón (1000 X - 500 X), (d.) Framboides de diferentes tamaños (1500 X)..... | 52 |
| Figura 4-3: Pirita. (a.) Cristales diseminados de formas euedrales (500 X), (b.) Grano de pirita sobre la matriz del carbón (500 X)..... | 52 |
| Figura 4-4: Análisis microquímico EDS sobre un framboide conformado por cristales euedrales de pirita..... | 53 |
| Figura 4-5: Análisis microquímico EDS sobre un cristal de pirita de la muestra de carbón sin tratar..... | 53 |
| Figura 4-6: Comportamiento del pH vs. tiempo para las cinco primeras fases de adaptación de los microorganismos compatibles con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> al carbón (% carbón hace referencia a la cantidad de pulpa empleada; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico)..... | 55 |
| Figura 4-7: Comportamiento del pH vs. tiempo para las cinco primeras fases de adaptación de la cepa comercial ATCC 23270 al carbón (% carbón hace referencia a la cantidad de pulpa empleada; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico)..... | 55 |
| Figura 4-8: Comportamiento del pH vs. tiempo durante la adaptación de los microorganismos compatibles con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> a sulfato ferroso (% FeSO_4 hace referencia a la cantidad adicionada de una solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 33.33%; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico)..... | 56 |
| Figura 4-9: Comportamiento del pH vs. tiempo durante las cuatro etapas de adaptación de ATCC 23270 a menores cantidades de sulfato ferroso (% FeSO_4 hace referencia a la cantidad adicionada de una solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 33.33% ; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico)..... | 57 |
| Figura 4-10: Comportamiento del Eh vs. tiempo para las etapas de adaptación de los microorganismos compatibles con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> al carbón (% carbón hace referencia a la cantidad de pulpa empleada; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico)..... | 57 |
| Figura 4-11: Comportamiento del Eh vs. tiempo para las etapas de adaptación de ATCC 23270 al carbón (% carbón hace referencia a la cantidad de pulpa empleada; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico)..... | 58 |
| Figura 4-12: Comportamiento del Eh vs. tiempo durante la fase de adaptación de los microorganismos compatibles con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> a menores cantidades de sulfato ferroso (% FeSO_4 hace referencia a la cantidad adicionada de una solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 33.33% ; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico)..... | 59 |
| Figura 4-13: Comportamiento del Eh vs. tiempo durante la fase de adaptación de ATCC 23270 a menores cantidades de sulfato ferroso (% FeSO_4 hace referencia a la cantidad adicionada de una solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 33.33% ; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico)..... | 60 |
| Figura 4-14: Comportamiento del pH vs. tiempo para los microorganismos compatibles con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y ATCC 23270, en la última etapa de adaptación a 2% de FeSO_4 y 10% de carbón (% FeSO_4 hace referencia a la cantidad adicionada de una solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 33.33% y % carbón hace referencia a la cantidad de pulpa empleada). C: ensayo abiótico, N: microorganismos compatibles con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , P: cepa ATCC 23270..... | 60 |
| Figura 4-15: Comportamiento del Eh vs. tiempo para los microorganismos compatibles con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y ATCC 23270, en la última etapa de adaptación a 2% de FeSO_4 y 10% | |

de carbón (% FeSO_4 hace referencia a la cantidad adicionada de una solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 33.33% y % carbón hace referencia a la cantidad de pulpa empleada). C: ensayo abiótico, N: microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, P: cepa ATCC 23270..... 60

Figura 4-16: Comportamiento del pH vs. tiempo, para los ensayos de biodesulfurización de carbón con *Acidithiobacillus ferrooxidans* (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano nativo compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, B: control negativo. **Error! Marcador no definido.**

Figura 4-17: Comportamiento del Eh vs. tiempo, para los ensayos de biodesulfurización de carbón con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano nativo compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, B: control negativo..... 63

Figura 4-18: Concentración celular vs. tiempo, para los ensayos de biodesulfurización de carbón con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano nativo compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, B: control negativo..... 64

Figura 4-19: Porcentaje de hierro removido vs. tiempo, para los ensayos de biodesulfurización de carbón con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. (a.) Concentración de hierro 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano nativo compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L de Fe^{2+} , C2: 1200 mg/L, B: control negativo. ... 66

Figura 4-20: Porcentaje de pirita oxidada y solubilizada para los ensayos de biodesulfurización de carbón con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, variando la concentración de hierro inicial. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano nativo compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, B: control negativo..... 66

Figura 4-21: Evidencias de oxidación de pirita para el ensayo NC1, al finalizar el proceso de biodesulfurización. (a.) Grano de pirita con pozos de corrosión (2000 X), (b.) Masa de pirita parcialmente oxidada (1100 X)..... 68

Figura 4-22: Imágenes de SEM para el ensayo NC2, después de 12 días de proceso. (a.) Framboide con una disminución de los cristales que lo conforman, rodeado de precipitados (2500 X), (b.) Grano de pirita con una corrosión evidente en los límites (1000 X). 68

Figura 4-23: Micrografías de SEM correspondientes a los granos de pirita del ensayo PC1, después del proceso de biodesulfurización (1000 X). (a.) Cristal de pirita con golfos de corrosión. (b.) Masa irregular de pirita con evidencias de corrosión (1000 X)..... 69

Figura 4-24: Cristales de pirita rodeados de precipitados de jarosita, ensayo PC2, después de 12 días de proceso. (a.) Grano de pirita con signos de oxidación (1100 X), (b.) Golfos de corrosión en un cristal de pirita (2000 X)..... 69

Figura 4-25: Imágenes de SEM para los carbones correspondientes a los ensayos abióticos, sin evidencias de oxidación, al finalizar el proceso de biodesulfurización. (a.) Masa de pirita intacta (NC1) (600 X), (b.) Pirita framboidal sin evidencias de oxidación (PC1) (2500 X), (c.) Grano de pirita (NC2) (650X), (d.) Masa de pirita con bordes bien definidos (PC2) (4500X)..... 70

- Figura 4-26:** Sulfatos precipitados de hierro. (a) Framboide de pirita rodeado por jarosita (b) Grano de carbón sin pirita rodeado completamente por los precipitados y sus respectivos análisis microquímicos, obtenido de las muestras de carbón biooxidadas. 71
- Figura 4-27:** Comportamiento de pH vs del tiempo los bioensayos con relaciones iniciales de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} empleando sulfato férrico, (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. 72
- Figura 4-28:** Comportamiento de pH vs. tiempo para los bioensayos con relaciones iniciales de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} empleando cloruro férrico. (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. CF: Cloruro férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. 73
- Figura 4-29:** Comportamiento de Eh en función del tiempo para los experimentos con relaciones iniciales de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} empleando sulfato férrico. (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. 74
- Figura 4-30:** Comportamiento del Eh en función del tiempo para los experimentos con relaciones iniciales de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} empleando cloruro férrico (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. (a.) CF: cloruro férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. 75
- Figura 4-31:** Crecimiento celular de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en solución en función del tiempo, para los diferentes experimentos, variando la relación inicial de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} y la concentración de hierro total. (a.) sulfato férrico, (b.) cloruro férrico. SF: sulfato férrico, CF: cloruro férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. 77
- Figura 4-32:** Porcentaje de hierro lixiviado vs. Tiempo, para los experimentos con relaciones iniciales de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} empleando sulfato férrico. (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. 78
- Figura 4-33:** Porcentaje de hierro lixiviado vs. Tiempo, para los experimentos con relaciones iniciales de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} empleando cloruro férrico. (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. CF: cloruro férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. 79
- Figura 4-34:** Porcentaje de pirita oxidada vs. Tiempo (a.) Experimentos con sulfato férrico (b.) Bioensayos con cloruro férrico. CF: cloruro férrico, SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. 80
- Figura 4-35:** Espectros de DRX para la muestra de carbón sin tratar en comparación con las muestras biooxidadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L. Cd: cordierita, Gy: yeso, Na: nacrita, Qz: cuarzo, Ms: moscovita, Py: pirita, Il: Ilita, Do: dolomita, Ja: jarosita. 82
- Figura 4-36:** Espectros de DRX para la muestra de carbón sin tratar en comparación con las muestras biooxidadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C2: 1200 mg/L. Cd: cordierita, Gy: yeso, Na: nacrita, Qz: cuarzo, Ms: moscovita, Py: pirita, Il: Ilita, Do: dolomita, Ja: jarosita. 84

- Figura 4-37:** Espectros de DRX para la muestra de carbón sin tratar en comparación con las muestras biooxidadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. CF: cloruro férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L. Cd: cordierita, Gy: yeso, Na: nacrita, Qz: cuarzo, Ms: moscovita, Py: pirita, Il: Illita, Do: dolomita, Ja: jarosita. 85
- Figura 4-38:** Espectros de DRX para la muestra de carbón sin tratar en comparación con las muestras biooxidadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. CF: cloruro férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C2: 1200 mg/L. Cd: cordierita, Gy: yeso, Na: nacrita, Qz: cuarzo, Ms: moscovita, Py: pirita, Il: Illita, Do: dolomita, Ja: jarosita. 86
- Figura 4-39:** Espectros FTIR para el carbón sin tratar y las muestras biooxidadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y sulfato férrico. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, SO_4^{2-} : sulfatos, Ja: jarosita, Gy: yeso, Py: pirita..... 89
- Figura 4-40:** Espectros FTIR para el carbón sin tratar y las muestras biooxidadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y sulfato férrico. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C2: 1200 mg/L, SO_4^{2-} : sulfatos, Ja: jarosita, Gy: yeso, Py: pirita..... 90
- Figura 4-41:** Espectros FTIR para el carbón sin tratar y las muestras biooxidadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cloruro férrico. CF: cloruro férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, SO_4^{2-} : sulfatos, Ja: jarosita, Gy: yeso, Py: pirita..... 91
- Figura 4-42:** Espectros FTIR para el carbón sin tratar y las muestras biooxidadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cloruro férrico. CF: cloruro férrico, relación Fe^{3+}/Fe^{2+} I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C2: 1200 mg/L, SO_4^{2-} : sulfatos, Ja: jarosita, Gy: yeso, Py: pirita..... 92
- Figura 4-43:** Evidencias de oxidación en la pirita del ensayo SFIC1, después de 12 días de proceso. (a.) Reducción total y parcial de la cantidad de cristales que conforman el framboide (3300X), (b.) Cristales euedrales con evidencias de corrosión y huellas euhedrales alrededor que podrían representar espacios previamente ocupados por pirita (2000X). SF: sulfato férrico, I: 20:80, C1: 200 mg/L..... 93
- Figura 4-44:** Imágenes de SEM del ensayo SFIC1, al finalizar el proceso de biodesulfurización. (a.) Framboides con una disminución en los cristales que los conforman (100X), (b.) oxidación parcial de una masa de pirita rodeada por framboides parcial y totalmente oxidados (2300X). SF: sulfato férrico, II: 50:50, C1: 200 mg/L. 93
- Figura 4-45:** Imágenes de SEM del ensayo SFIC1, después de 12 días de experimentación. (a.) Cristales euedrales con evidencias de corrosión, rodeados de sulfatos de hierro, (b.) Grano de carbón en donde se observan granos de pirita con golfos de corrosión. SF: sulfato férrico, III: 80:20, C1: 200 mg/L. 94
- Figura 4-46:** Evidencias de oxidación en la pirita del ensayo SFIC2, después de 12 días de proceso. (a.) grano de pirita parcialmente corroído, rodeado de precipitados (1500X), (b.) Granos de pirita con golfos de corrosión (1000X). SF: sulfato férrico, I: 20:80; C2: 1200 mg/L..... 94
- Figura 4-47:** Evidencias de oxidación en la pirita del ensayo SFIC2, después de 12 días de proceso. (a.) grano de pirita parcialmente oxidado tanto en los límites como en el interior (1000X), (b.) Framboide con una disminución de los cristales que los conforman rodeado por precipitados (2500X). SF: sulfato férrico, II: 50:50, C2: 1200 mg/L. 95

- Figura 4-48:** Imágenes de SEM del ensayo SFIIC2, al finalizar el proceso de biodesulfurización. (a.) Cristal de pirita con pozos y golfos de corrosión (2500X), (b.) Framboides con espacios vacíos en su interior que indican la oxidación del sulfuro metálico (2500X). SF: sulfato férrico, III: 80:20, C2: 1200 mg/L 95
- Figura 4-49:** Evidencias de oxidación en la pirita del ensayo CFIC1, después de 12 días de proceso. (a.) grano de pirita con golfos de corrosión (2500X), (b.) Precipitados rodeando un framboide parcialmente oxidado (3000X). CF: cloruro férrico, I: 20:80; C1: 200 mg/L 96
- Figura 4-50:** Evidencias de oxidación en la pirita del ensayo CFIC1, después de 12 días de proceso. (a.) Precipitados alrededor de un grano de pirita corroído (1000X), (b.) Masa de pirita oxidada, rodeada de precipitados (1000X). CF: cloruro férrico, II: 50:50; C2: 1200 mg/L 96
- Figura 4-51:** Evidencias de oxidación en la pirita del ensayo CFIIIC1, después de 12 días de proceso. (a.) Masas de pirita oxidadas y rodeadas por precipitados (1100X), (b.) Masa de pirita oxidada (3500X). CF: cloruro férrico, III: 80:20, C2: 1200 mg/L 97
- Figura 4-52:** Micrografías de los granos de pirita para el ensayo CFIC2, al finalizar el proceso de biodesulfurización. (a.) precipitados rodeando cristales euedrales de pirita parcial o totalmente corroídos (3500X), (b.) Precipitados rodeando framboides parcial y totalmente oxidados (1700X). CF: cloruro férrico, I: 20:80, C2: 1200 mg/L 97
- Figura 4-53:** Imágenes de SEM del ensayo CFIIIC2, al finalizar el proceso de biodesulfurización. (a.) Framboide con disminución en los cristales (2500X), (b.) Masa de pirita con canales de corrosión (1000X). CF: cloruro férrico, II: 50:50, C2: 1200 mg/L 98
- Figura 4-54:** Imágenes de SEM para el ensayo CFIIIC2, al finalizar el proceso de biodesulfurización. (a.) Masas de pirita parcialmente corroídas (3700X), (b.) Masa de pirita con canales de oxidación (3000X). CF: cloruro férrico, III: 80:20, C2: 1200 mg/L 98
- Figura 4-55:** Microanálisis químico de un framboide con presencia de precipitados, muestra de carbón tratado con sulfato férrico (SFIC1). SF: sulfato férrico, I: 20:80, C1: 200 mg/L 99
- Figura 4-56:** Microanálisis químico de un framboide con presencia de precipitados, muestra de carbón tratado con sulfato férrico (SFIIIC1). SF: sulfato férrico, II: 50:50, C1: 200 mg/L 99
- Figura 4-57:** Microanálisis químico de los bordes de un cristal de pirita con presencia de precipitados, muestra de carbón tratado con sulfato férrico (SFIIC1). SF: sulfato férrico, III: 80:20, C1: 200 mg/L 100
- Figura 4-58:** Microanálisis químico de los bordes de un cristal de pirita con presencia de precipitados, muestra de carbón tratado con sulfato férrico (SFIC2). SF: sulfato férrico, I: 20:80, C2: 1200 mg/L 100
- Figura 4-59:** Análisis de microquímico de los precipitados que rodean los cristales de un framboide sin pirita, para el carbón del ensayo SFIIC2. SF: sulfato férrico, II: 50:50, C2: 1200 mg/L 101
- Figura 4-60:** Análisis de microquímico de los precipitados que rodean los cristales de un framboide sin pirita, para el carbón del ensayo SFIIC2. SF: sulfato férrico, III: 80:20, C2: 1200 mg/L 101
- Figura 4-61:** Cúmulo de pirita rodeado por sulfatos precipitados de hierro con su respectivo análisis microquímico, para el carbón del ensayo CFIC1. CF: cloruro férrico, I: 20:80, C1: 200 mg/L 102
- Figura 4-62:** Grano de pirita rodeado por sulfatos precipitados de hierro con su respectivo análisis microquímico, para el carbón del ensayo CFIIIC1. CF: cloruro férrico, II: 50:50, C1: 200 mg/L 102

| | |
|--|--------------------------------------|
| Figura 4-63: Grano de pirita rodeado por sulfatos precipitados de hierro con su respectivo análisis microquímico, para el carbón del ensayo CFIIIC1. CF: cloruro férrico, III: 80:20, C1: 200 mg/L. .. | 103 |
| Figura 4-64: Grano de pirita rodeado por sulfatos precipitados de hierro con su respectivo análisis microquímico, para el carbón del ensayo CFIC2. CF: cloruro férrico, I: 20:80, C2: 1200 mg/L. | 103 |
| Figura 4-65: Grano de pirita rodeado por sulfatos precipitados de hierro con su respectivo análisis microquímico, para el carbón del ensayo CFIIIC2. CF: cloruro férrico, II: 50:50, C2: 1200 mg/L. .. | 104 |
| Figura 4-66: Framboide rodeado por sulfatos precipitados de hierro con su respectivo análisis microquímico, para el carbón del ensayo CFIIIC2. CF: cloruro férrico, III: 80:20, C2: 1200 mg/L. | 104 |
| Figura 4-67: Mapa composicional en donde se observa la variación espacial de los precipitados formados alrededor de los cristales de pirita en el carbón tratado con sulfato férrico, después de doce días de proceso. | 105 |
| Figura 4-68: Comportamiento del pH y Eh en función del tiempo, para el ensayo SFI, SFII y sus respectivos controles abióticos. SF: sulfato férrico; I: relación $Fe^{3+}: Fe^{2+}$ (20:80), II: relación $Fe^{3+}: Fe^{2+}$ (50:50), y una concentración de hierro total de 200 mg/L..... | 107 |
| Figura 4-69: Crecimiento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> en solución en función del tiempo, para los bioensayos con sulfato férrico: SFI, SFII. SF: sulfato férrico; I: relación Fe^{3+}/Fe^{2+} (20:80), II: relación Fe^{3+}/Fe^{2+} (50:50), y una concentración de hierro total de 200 mg/L..... | 108 |
| Figura 4-70: Porcentaje de hierro lixiviado en función del tiempo, para los ensayos con sulfato férrico SFI y SFII. SF: sulfato férrico; I: relación Fe^{3+}/Fe^{2+} (20:80), II: relación Fe^{3+}/Fe^{2+} (50:50), y una concentración de hierro total de 200 mg/L..... | 108 |
| Figura 4-71: Porcentaje de pirita oxidada en función del tiempo, para los ensayos con sulfato férrico SFI y SFII. SF: sulfato férrico; I: relación Fe^{3+}/Fe^{2+} (20:80), II: relación Fe^{3+}/Fe^{2+} (50:50), y una concentración de hierro total de 200 mg/L..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Figura 4-72: Difractograma de la muestra de carbón inicial y los ensayos SFI y SFII al finalizar el proceso de biodesulfurización en reactores de 5 litros. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50. Cd: cordierita, Gy: yeso, Na: nacrita, Qz: cuarzo, Ms: moscovita, Py: pirita, Il: Ilita, Do: dolomita, Ja: jarosita. | 111 |
| Figura 4-73: Espectros de la muestra de carbón inicial y los ensayos SFI y SFII al finalizar el proceso de biodesulfurización en reactores de 5 litros. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50. SO_4^{2-} : sulfatos, NH_4^+ : amonio, Ja: jarosita, Gy: yeso, Py: pirita..... | 112 |
| Figura 4-74: Framboide completamente corroído con presencia de precipitados de hierro (jarosita) sobre la superficie del carbón, para el ensayo SFI (2000X). SF: sulfato férrico, I: 20:80. | 113 |
| Figura 4-75: Grano de carbón ensayo SFII, con evidencias de corrosión y presencia de precipitados de hierro (jarosita) sobre la superficie del mismo (2500X). SF: sulfato férrico, II: 50:50 | 114 |
| Figura 4-76: Análisis microquímico de los precipitados evidenciados en el ensayo SFI. SF: sulfato férrico, I: 20:80..... | 114 |
| Figura 4-77: Análisis microquímico de los precipitados evidenciados en el ensayo SFII. SF: sulfato férrico, II: 50:50..... | 115 |

Lista de tablas

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 1-1: Clasificación de los carbones según la American Society for Testing and Materials (ASTMD-388-777)..... | 10 |
| Tabla 1-2: Calidad del carbón en Córdoba (INGEOMINAS, 2004)..... | 35 |
| Tabla 3-1: Composición química del medio T&K empleado para el cultivo de microorganismos compatibles con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y la cepa ATCC 23270. | 39 |
| Tabla 3-2: Etapas de adaptación para los microorganismos compatibles con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y la cepa ATCC 23270. | 40 |
| Tabla 3-3: Tabla de experimentación de los ensayos propuestos empleando <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y concentraciones iniciales de hierro ferroso. P: cultivo comercialde <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (ATCC 23270); N: Microorganismos compatibles con At. ferrooxidans; C1: 200 mg/L; C2: 1200 mg/L. | 41 |
| Tabla 3-4: Tabla de experimentación de los ensayos propuestos empleando <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y relaciones iniciales de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} . CF: Cloruro férrico; SF: Sulfato férrico; C1: 200 mg/L; C2: 1200 mg/L; I: Fe^{3+}/Fe^{2+} 20:80; II: Fe^{3+}/Fe^{2+} 50:50; Fe^{3+}/Fe^{2+} 50:50. | 43 |
| Tabla 4-1: Análisis próximos y formas de azufre presentes en el carbón. | 49 |
| Tabla 4-2: Clasificación de los carbones por rango, norma ASTM D388 – 12. | 50 |
| Tabla 4-3: Valores de carbono fijo y materia volátil en base seca libre de materia mineral y poder calorífico en base libre de materia mineral, del carbón muestreado..... | 50 |
| Tabla 4-4: Formas de azufre presentes en el carbón, después de 12 días de experimentación. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano nativo compatible con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, B: control negativo, * muestra de carbón sin tratar. | 67 |
| Tabla 4-5: Formas de azufre presentes en el carbón, después del proceso de biodesulfurización. CF: cloruro férrico, SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, *muestra de carbón sin tratar. | 81 |
| Tabla 4-6: Asignación de las bandas correspondientes a los espectros FTIR. | 87 |
| Tabla 4-7: Formas de azufre y análisis próximos al finalizar el proceso de biodesulfurización en tanques agitados, para los ensayos SFI, SFII y SFIII..... | 109 |

Introducción

Las continuas alzas en el precio del petróleo, muestran la importancia del carbón como una de las principales fuentes alternativas de energía (Blázquez, 2005). La tendencia ascendente en la utilización del carbón se dio luego de la primera crisis del petróleo en 1973-1974, creciendo más rápidamente que la utilización de cualquier otra fuente de energía, incluyendo, además del petróleo, el gas natural, la hidroeléctrica y la nuclear (León, 2006). El mundo consume actualmente más de 4.050 millones de toneladas (Mt) de carbón al año en diferentes sectores industriales, incluyendo la generación de electricidad, la producción de hierro y acero, cemento, benzol, aceites, alquitrán y como combustible líquido (Gómez *et. al.*, 1999). Las reservas mundiales de este material son las más importantes entre todos los combustibles fósiles, las cuales pueden ser explotadas y refinadas a bajo costo, confiriéndole la ventaja sobre otros combustibles competitivos (World Energy Council, 2003). El protagonismo del carbón está creciendo debido a que los países en desarrollo buscan continuamente opciones para obtener energía a bajos costos y de esta manera impulsan sus economías en pleno auge (León, 2006).

Colombia es el país con mayores reservas de carbón en América latina, cuenta con recursos potenciales de 16.436 Mt; los cuales se encuentran distribuidos a lo largo del país, las mayores reservas están en los departamentos de la Guajira, Cesar y Córdoba, seguido por Antioquia, Valle del Cauca y Cundinamarca, mientras que Boyacá, Santander y Norte de Santander cuentan con menores reservas (UPME, 2012)

La calidad de los carbones está referida a las propiedades físicas y químicas tales como: humedad, cenizas, materias volátiles, carbono fijo, azufre total y poder calorífico, las cuales determinan el uso final del material. La cantidad de azufre presente en el carbón restringe su utilización debido a las regulaciones impuestas. Según la resolución 898 de 1995 - capítulo II, el carbón mineral proveniente de la región atlántica empleado como combustible en hornos y calderas de uso comercial e industrial, debe contener una cantidad de azufre total menor al 1% (% peso) (Ministerio de medio ambiente, 1995).

El mayor problema asociado con el uso del carbón es el impacto ambiental provocado por los gases altamente contaminantes que se generan durante la combustión (Ballester, 1993). La quema directa del carbón produce la emisión de dióxido de azufre (SO₂) que, al combinarse con el óxido de nitrógeno, reacciona con el agua y el oxígeno, formando una solución diluida de ácido sulfúrico y ácido nítrico, conocida como lluvia ácida, la cual provoca grandes deterioros al medio (Prayuenyong, 2002; Calkins, 1994). Además, el dióxido de azufre contribuye enormemente con el calentamiento global y el cambio climático (Acharya *et. al.*, 2001; Cara *et. al.*, 2006). El problema

de emisiones de SO₂ es complejo debido a que los depósitos con bajos contenidos de azufre se están agotando gradualmente, dejando a los carbones de baja calidad como la única fuente de energía disponible (León, 2006).

La necesidad de conseguir carbones con un contenido mínimo de azufre, a partir de otros de baja calidad, ha dado lugar al desarrollo de un amplio número de métodos de desulfurización (Blázquez et al., 2005). El tipo de método empleado depende fundamentalmente del carbón, el tipo de instalación, y el nivel restrictivo impuesto a las emisiones de SO₂. Estos diferentes métodos pueden clasificarse en tres grupos en función de que se apliquen antes, durante o después de la combustión del carbón (Prayuenyong, 2002).

La desulfuración durante la combustión incluye aquellos procesos que realizan la desulfurización en el interior de los hornos o calderas, basándose en la retención del SO₂, como sulfato cálcico por adición de caliza (CaCO₃) o dolomía (CaCO₃, MgCO₃). En este método se emplean dos formas diferentes para realizar la retención de azufre: por inyección de cal en quemadores convencionales y por combustión en lecho fluidizado. Sin embargo, la primera forma presenta problemas en el funcionamiento de los hornos y se requiere de altas cantidades de reactivos para obtener una buena eficiencia; mediante la segunda forma se reduce hasta en un 90% el contenido de SO₂, no obstante, requiere de altos costos de inversión (Podolsky, 1984; Morrison, 1981; Bortz y Flament, 1985).

La desulfurización después de la combustión es independiente de la forma en que se encuentre el azufre en el carbón, así, como del tipo de carbón utilizado, ya que se aplica sobre los gases procedentes de la combustión en donde el azufre está en forma de SO₂. Los métodos utilizados para la eliminación de SO₂ en los gases de la combustión, se clasifican en sistemas no-regenerables y regenerables, dependiendo de la capacidad de recuperar productos como azufre elemental o ácido sulfúrico. Los métodos de limpieza de gases necesitan instalaciones complejas con un seguimiento constante y por tanto, con un costo muy elevado a pesar de que es posible obtener un producto comercializable (Prior, 1977; Klingspor y Cope, 1990).

Debido a los inconvenientes que sugiere emplear técnicas de desulfurización durante y después de la combustión del carbón, los tratamientos pre-combustión son los que generan mayores eficiencias. De esta manera se distinguen entre: métodos físicos, químicos y biológicos (Blázquez et al., 2005).

Los métodos físicos se basan en las diferentes propiedades físicas de los compuestos inorgánicos de azufre con relación al carbón. Los más comúnmente usados son gravimétricos, magnéticos, eléctricos y flotación, mediante los cuales se logran buenas tasas de extracción, sin embargo, son poco eficientes cuando se trata de azufre finamente diseminado y no actúan sobre azufre orgánico (Klein, 1998; Gómez et al., 1999).

Por otra parte, los métodos químicos consisten en la solubilización del azufre orgánico e inorgánico, empleando ácidos fuertes (HNO₃, HCl, HClO₄), gases con alto potencial de oxidación (O₂, Cl₂, entre

otros.) y tratamientos con soluciones de hidróxido de sodio, los cuales remueven altas cantidades de azufre orgánico e inorgánico. No obstante requieren de altas temperaturas y presiones, instalaciones complejas, y altos consumos de energía, además, pueden afectar negativamente las propiedades coquizantes del carbón (Morrison, 1981; Prayuenyong, 2002).

En cuanto a los métodos biológicos, constituyen una alternativa eficiente en los procesos de desulfurización (Ortiz, 1992; Yannopoulos, 1990). La extracción de azufre empleando microorganismos ha sido considerada una técnica eficiente y aplicable, mediante la cual es posible extraer azufre orgánico e inorgánico, no genera contaminantes gaseosos, los desechos sólidos y líquidos son aceptables para el ambiente, e incluso pueden ser aplicables en tratamientos de aguas, se trabaja con un diseño simple y versátil lo cual hace de esta tecnología apropiada para el uso en locaciones remotas y los costos de capital, y operación son bajos (Bozdemir *et. al.*, 1996; Juszczak *et. al.*, 1995). El principio de la biodesulfurización radica en la capacidad de ciertos microorganismos para catalizar la oxidación de sulfuros metálicos insolubles y convertirlos en productos solubles en forma de sulfatos en un medio acuoso (Kodali *et. al.*, 2004.; Petersen *et. al.*, 2006).

Los microorganismos involucrados en el proceso de desulfurización dependen del tipo de azufre presente en el carbón. El azufre inorgánico (pirítico) es disuelto por las bacterias acidófilas oxidantes de hierro y/o azufre (Eligwe, 1988; Ballester, 1988). Las bacterias comúnmente usadas en este tipo de proceso, son las especies quimiolitautotróficas del género *Acidithiobacillus* (*Acidithiobacillus*) (Prayuenyong, 2002).

Estudios previos indican la efectividad de los procesos de la biolixiviación aplicada a diferentes sulfuros metálicos empleando *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* logrando reducciones de más de 90% (Hui liu, 2011; Feng, 2014; Zhiguo He, 2012; Yang, 2014; Xingyu, 2009; Zang, 2008). En Colombia, se han realizado investigaciones en el área de la biotecnología aplicada a sulfuros metálicos (Pérez y Ramírez, 1988; Duque y Noguera, 2001; Muñoz, 2002; Ossa, 2004; Zapata, 2006; Arroyave; 2008; Mejía, 2010). Sin embargo, las investigaciones sobre los procesos de biolixiviación de pirita presente en carbones colombianos, son limitadas (Cardona, 2008; Caicedo, 2008; Caicedo, 2011; Peláez, 2013).

En los procesos de biodesulfurización de carbones, el sulfato ferroso es necesario como fuente de hierro exógena para las bacterias quimiolitautotróficas involucradas, sin embargo, se ha reportado que la utilización de sales de hierro férricas puede ayudar a incrementar la oxidación química del azufre pirítico.

En este trabajo se evaluó la influencia de las sales de cloruro férrico, sulfato férrico y sulfato ferroso, sobre un proceso de extracción de azufre inorgánico de un carbón colombiano, empleando *Acidithiobacillus ferrooxidans*, teniendo en cuenta los principales factores fisicoquímicos que afectan el proceso de biodesulfurización, con el fin, de establecer nuevos parámetros que permitan un avance en la eficiencia, traducida en la cantidad y velocidad de solubilización del sulfuro de hierro. Para lograr tal fin, fue necesario evaluar periódicamente los procesos a partir de análisis

químicos (pH, Eh, concentración celular, hierro lixiviado en solución) y mineralógicos (SEM/EDX, DRX, FTIR).

1. Generalidades y marco teórico

El carbón es un recurso abundante de amplia distribución geográfica, capaz de satisfacer las necesidades energéticas del mundo, durante cientos de años y es uno de los materiales más antiguos después de la madera, empleado en la producción de energía (León, 2006). Durante 1950 a 1970, la proporción de carbón en el abastecimiento mundial disminuyó debido a la utilización del petróleo, gas natural y la fuerza hidráulica para satisfacer la demanda de energía (Seredin, 2013). Sin embargo, luego de la primera crisis del petróleo (1973-1974) el consumo de carbón aumentó considerablemente, por lo que fue la fuente estratégica para obtener energía (Gómez, 2013). Actualmente, está contribuyendo a compensar algunas presiones económicas del aumento del precio del petróleo, por lo que representa una importante alternativa para el desarrollo (Holuszko, 2014).

El carbón no solo supe más del 40% de la demanda energética mundial, si no que contribuye con la fabricación de acero, la producción de cemento, es usado en las refinerías de alúmina, en la fabricación de papel, la industria farmacéutica y otros productos son generados a partir de los subproductos del carbón como: el aceite de cresota, naftaleno, fenol, benceno, sales de amoníaco, ácido nítrico y fertilizantes agrícolas. Adicionalmente, los sub-productos del carbón son utilizados como componentes para disolventes, aspirinas, fibras (rayón, nylon), colorantes y plásticos (Gómez *et al.*, 1999). En los últimos años, el consumo mundial de carbón ha estado creciendo más rápido en comparación con cualquier otra fuente energética. Algunos países con alta demanda de energía, como China e Indonesia, le apuntan a la utilización del carbón debido a que cuentan con grandes reservas que pueden ser desarrolladas a bajo costo (León, 2006).

En Colombia, el comienzo de la explotación del carbón se dio por la aparición de los primeros ferrocarriles a vapor en el siglo XX. Posteriormente, fue empleado por la industria del cemento, los textiles, la construcción, entre otros. En ese entonces, la demanda energética (0.25 Mt) fue suplida por las minas de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Valle. En los 50's, se aumenta de manera importante la necesidad de electricidad, así, como la demanda del carbón en las industrias, dando lugar a la construcción de la siderúrgica Paz del Río (1954) y las termoeléctricas de Paipa (1956) y Yumbo (1958), proyectos que impulsaron la producción de carbón de las minas que se encontraban a sus alrededores alcanzándose una producción de carbón total de 2.00 Mt aproximadamente.

A principios de los años 60's, el carbón se posicionó como la fuente energética preferida en la industria del cemento, la construcción y en la elaboración de bienes intermedios (papel, caucho, llantas y productos químicos, entre otros) siendo esta la época de su mayor auge. Sin embargo, a finales de los 60's se presentó un estancamiento en su producción, atribuido al desarrollo de proyectos hidroeléctricos. No obstante, la crisis del petróleo de 1973, que dio lugar a incrementos significativos en el precio del combustible, fue crítico ya que la producción nacional del crudo disminuía y la demanda energética aumentaba, por lo que el carbón reaparece como una alternativa energética, dando lugar a una era de grandes explotaciones mineras, donde la producción de carbón paso de 2.50 Mt en 1970 a 4.25 Mt en 1980, destinada a atender las necesidades del país. A partir de los años 70's el sector eléctrico se consolida como uno de los principales consumidores de carbón, y se da lugar a nuevas etapas de los proyectos en Paipa (1975) y El Zipa (1976), en esta misma época entra en funcionamiento la planta de cartón de Colombia.

Adicionalmente, el carbón siguió siendo importante en la industria del cemento y los ladrillos, así, como en la industria metalúrgica. En la década de los 80's se unieron al sistema eléctrico del país "Termo Tasajero", en Paipa (unidad III), y "Termo Guajira", esta última se programó para ser utilizada con carbón pero terminó operando con gas natural, para 1990 la demanda de carbón era de aproximadamente 4.78 Mt. La industria del cemento en 1993 incrementó los niveles de producción por lo que se aumentó también, la necesidad del carbón, de esta manera mientras en 1992 se requerían 0.83 Mt para elaborar cemento, en 1993 se necesitaban más de 11.08 Mt, esta situación se derivó principalmente al crecimiento en la construcción. Finalmente, la producción del carbón como recurso energético ha presentado una importante evolución que ha pasado de suplir las necesidades del país para convertirse en uno de los principales recursos de exportación. Según la Agencia Nacional de Minería (ANM) Colombia produjo en 2013, un total de 85.5 Mt de carbón de las cuales se exportaron 94.3% y el resto se destinó al consumo interno (UPME, 2001; INGEOMINAS, 2001; Amel y Bedoya, 1999; Ayala y Millan, 2002; WCA, 2014).

El carbón Colombiano es una fuente generadora de divisas y empleo, concentra el 50% de la actividad minera nacional y representa el 1% del producto interno bruto (UPME, 2007). Por lo que, el panorama en Colombia en materia de carbón es muy bueno, ya que es considerado el primer productor en América Latina y uno de los primeros diez países productores de carbón para combustión (WCA, 2014).

A nivel mundial, el carbón colombiano es reconocido por tener bajo contenido de cenizas, azufre, ser alto en volátiles y tener un alto valor calorífico, además, el país cuenta con reservas medidas de 7063 Mt (UPME, 2007). En Colombia, el sector minero, tanto en producción como en exportación, es cada vez más grande y competitivo, en esa dinámica de crecimiento de los últimos años, Córdoba ha ocupado un lugar muy importante como distrito minero, por ser un departamento donde se ubican municipios y zonas (Planeta Rica, Puerto Libertador, Montelibano) productoras de carbón (INGEOMINAS, 2004). Se estima que cerca de 0.37 Mt de carbón al año son explotadas en la zona de Puerto Libertador por la empresa Carbones del Caribe (Minercol, 2007).

En general, la cantidad de algunos componentes presentes en el carbón le restan valor y obligan a la aplicación de tratamientos para su utilización. La ceniza es el material inorgánico inerte que acompaña al carbón, su presencia disminuye el poder calorífico y afecta el buen funcionamiento de los hornos, el carbón está compuesto además por nitrógeno, oxígeno, azufre y gases, cada uno de los cuales interviene sobre las características del mismo. Sin embargo, para efectos prácticos la cantidad de azufre presente en el carbón es el elemento que se debe controlar (Fuentes *et al.*, 1996).

El azufre en el carbón se puede presentar tanto de forma orgánica e inorgánica. El azufre orgánico hace parte de la estructura interna del carbón (Kargi, 1986). Por otra parte, el azufre inorgánico se encuentra diseminado en la matriz del carbón (Eligwe, 1988). A nivel general, el contenido de azufre total en el carbón varía considerablemente, pero es comúnmente encontrado en el rango de 0.5% y 5%. El carbón con un contenido de azufre menor al 1% se clasifica como un carbón bajo en azufre, los que contienen entre 1% y 2% son medianamente azufrados, y los que contienen más del 2%, son carbones altamente sulfurados (Lin Chou, 2012).

El dióxido de azufre es uno de los gases más tóxicos que contaminan el ambiente, es formado principalmente como un subproducto de la combustión del azufre (Lin Chou, 2012). Debido al impacto irreversible de este gas sobre la superficie terrestre, las regulaciones ambientales sobre la cantidad de azufre permitido en los carbones son cada vez más estrictas (Singh, 2013). En este sentido, la resolución 898 de 1995, reglamentó los requisitos de calidad del carbón o sus mezclas para el consumo en hornos y calderas, estableciendo que el contenido de azufre permitido en los carbones deberá ser menor del 1% en las regiones atlántica y central (MINAMBIENTE, 1995). Adicionalmente, cuando se quema carbón, las emisiones de azufre corroen los tubos de las calderas.

La necesidad de obtener carbones con bajo contenido de azufre a partir de carbones de baja calidad (azufre total > 1), ha dado lugar a una cantidad de métodos de extracción de azufre. En general, dos métodos diferentes se pueden utilizar para reducir el impacto de las emisiones de óxidos de azufre: pre-combustión y post-combustión.

El método de tratamiento pre-combustión tiene más ventajas en comparación con el método de post-combustión. Estos últimos, presentan muchas limitaciones y el monitoreo de la calidad del gas de combustión tratado es difícil, además, de no ser aplicables en todos los casos. Por otro lado, el tratamiento pre-combustión, reduce considerablemente las emisiones de óxidos de azufre, independientemente del tipo de proceso de combustión al que sean sometidos posteriormente, y la vigilancia de calidad es mucho más fácil (Reichmuth, 2002).

La desulfuración pre-combustión es comúnmente llevada a cabo mediante técnicas físicas y químicas, las cuales aunque eficientes presentan dificultades desde el punto de vista económico y tecnológico, haciendo al carbón menos competitivo en relación con otras fuentes de energía (Gómez, 1999). Los métodos físicos, resultan ineficientes en carbones que contengan azufre finamente diseminado, el cual permanece ligado a las partículas de carbón al finalizar el proceso,

en estos casos se requiere de moliendas sucesivas que incrementan los costos de operación, además estos no actúan sobre la fracción de azufre orgánica. De otro lado, los métodos químicos, alcanzan altas tasas de reducción e interactúan con el azufre orgánico e inorgánico, no obstante, su utilización requiere altos capitales de inversión, genera residuos y efluentes contaminantes (Prayuenyong, 2002).

En la actualidad, el desarrollo de procesos a nivel industrial, se enfoca en el diseño de tecnologías limpias, las cuales consisten en metodologías que permitan mejorar la eficiencia y tolerancia ambiental en los procesos de extracción, preparación y uso del carbón, evitando los efectos que perjudican el medio. Una de ellas, es la biodesulfurización la cual es eficiente para la extracción de azufre tanto orgánico como inorgánico y emplea bacterias quimiolitioautótrofas capaces de oxidar el azufre presente en el carbón. Presenta múltiples ventajas frente a los métodos físicos y químicos existentes, siendo la principal la remoción de altas tasas de azufre sin producir residuos que afecten negativamente el ambiente y en algunos casos es posible utilizarlos en otro tipo de tratamientos, además de no requerir de altos capitales de inversión (Rossi, 1993; Wang, 2011). La eficacia de este tipo de procesos ha sido estudiada por diversos autores logrando más del 80% de extracción de azufre (Zarubina *et al.*, 1959; Silverman *et al.*, 1961; Rossi, 1993; Olson *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 1994; Juszczak *et al.*, 1995; Aller *et al.*, 2001; Cardona, 2009; Caicedo, 2011).

Por otro lado, un proceso de biodesulfurización llevado a cabo para dos carbones colombianos con alto contenido de azufre, en donde se consideraron variables como el tamaño de partícula y tipo de inóculo bacteriano, obtuvo una oxidación de pirita de 85% a 95% para los carbones con un tamaño de partícula fino (#200 Tyler), tratado con un consorcio bacteriano nativo (*Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*) (Cardona, 2008).

El aumento de la velocidad de oxidación de azufre es la razón de la utilización de los métodos físicos, químicos y biológicos. Determinar los parámetros que contribuyen o afectan la cinética de reacción en los procesos de biolixiviación, aumenta las posibilidades de emplear este proceso a nivel industrial, presentándola como una alternativa competitiva y eficiente frente a otras existentes, e incluso aplicable a otro tipo de materiales y minerales.

1.1 Carbón

El carbón es un material sedimentario de naturaleza organoclástica que proviene de restos de vegetación formados en el periodo carbonífero de la Era Paleozoica, originalmente acumulados como plantas en pantanos (Thomas, 2002). La acumulación de limos y otros sedimentos, junto con movimientos tectónicos enterraron estos pantanos y turberas a diferentes profundidades (Menéndez, 2006). Los restos de vegetales sufrieron un proceso de degradación al aumentar la presión y temperatura, incluyendo complejas alteraciones en los compuestos que forman la estructura de las plantas para producir el carbón, con desprendimiento de dióxido de carbono y metano (Menéndez, 2006). Los cambios físicos incluyeron oscurecimiento en el color, solidez en la consistencia mineral, incremento de la dureza y cambio en la fractura (León, 2006; CTMA, 2014).

1.1.1 Tipos de Carbón

El rango de carbón hace referencia al grado de carbonificación sufrido por la materia orgánica (Menéndez, 2006). El carbón se clasifica en: turba, lignito, sub-bituminoso, bituminoso, y antracita (UPME, 2007). La turba es la forma menos evolucionada y su materia vegetal muestra poca alteración a diferencia de la antracita que es un carbón mineral con mayor evolución. La evolución del carbón depende de la edad, así como de la profundidad y las condiciones de presión, temperatura, entre otros, en las que la materia vegetal se transforma; en otras palabras, cuanto más altas son las presiones y temperaturas, se origina un carbón más compacto y rico en carbono y con mayor poder calorífico, que indica una mayor evolución y por tanto un mayor rango, de igual modo, más bajo será su contenido de hidrógeno y materias volátiles (Thomas, 2002; CTMA, 2014).

La clasificación del carbón se realiza de acuerdo a sus propiedades químicas y físicas. El análisis de las propiedades químicas del carbón tiene en cuenta criterios tales como su contenido en materia volátil, contenido en carbono fijo, humedad, poder calorífico, entre otros. (WCI, 2008).

Los carbones de bajo rango, son blandos, opacos y con apariencia de tierra, se caracterizan principalmente por tener altos niveles de humedad y bajo contenido de carbono, por consiguiente poca energía. Entre ellos se encuentra la turba, la cual presenta bajos contenidos de carbono, seguido por el lignito, que es usado en algunas centrales térmicas.

Los carbones de alto rango son más duros, contienen más carbono, tienen un mayor poder calorífico y tienen menos hidrogeno, humedad y materias volátiles. Se clasifican en carbón bituminoso, rico en carbono y tiene un alto poder calorífico, por lo que es ampliamente usado para generar energía. Adicionalmente, de su destilación se obtienen hidrocarburos aromáticos como creosota y cresol o cresol, y un tipo de carbón muy utilizado en siderúrgica llamado coque. La antracita es el carbón de mayor calidad, con bajas concentraciones de contaminantes y un alto poder calorífico (WCA, 2014). La clasificación del carbón según sus propiedades físicas y químicas se ilustra en la Figura 1-1.

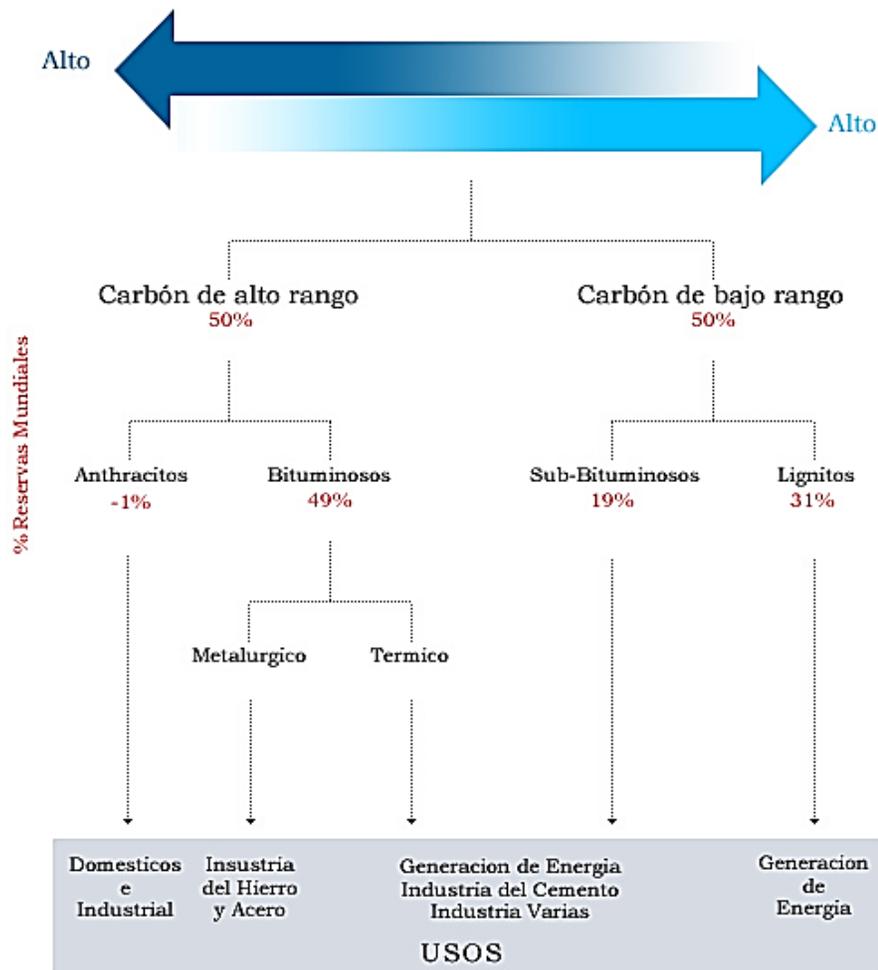


Figura 1-1: Clasificación y usos del carbón según sus propiedades físicas y químicas (Carbonífera de Chile, 2002).

Una de las clasificaciones más aceptadas para el carbón es la dada por la *American Society for Testing and Materials*, bajo la norma ASTM D-388-777, Tabla 1-1. Según la cual el carbón se distingue en cuatro clases, según las propiedades referidas a la composición de los vegetales y las condiciones de presión y temperatura (grado de metamorfismo) a que fueron sometidos durante su formación en: antracita, bituminoso, sub-bituminoso, lignito y turba.

Tabla 1-1: Clasificación de los carbones según la American Society for Testing and Materials (ASTMD-388-777).

| Tipo | Carbono fijo (%) | Materia volátil (%) | Humedad (%) | Poder calorífico (Btu/lb) |
|------------------------|------------------|---------------------|-------------|---------------------------|
| Antracita | 86 - 98 | 1 | <15 | >14.000 |
| Bituminoso | 45 - 86 | 32 | 15-20 | 10.500-14.000 |
| Sub-bituminoso | 35 - 45 | 50 | 20-30 | 7.800 - 10.500 |
| Lignito y Turba | 25 - 35 | 96 | >30 | 4.000 - 7.800 |

La calidad del carbón también depende de la cantidad de azufre total presente, debido a que es un parámetro en la definición de gases tóxicos de los procesos de gasificación y licuefacción; el azufre se encuentra en los carbones en cantidades muy variables, desde trazas hasta un 10%. No todo el azufre se encuentra de la misma forma, parte se encuentra en combinaciones orgánicas y parte en combinaciones inorgánicas (Ramón y Vargas, 2007).

1.1.2 Formas de azufre y minerales asociados al carbón

La cantidad de azufre presente en el carbón es cuantificada e identificada mediante la norma ASTM D-2492. La muestra de azufre es sometida a análisis químicos para determinar el azufre total (ASTM D-4239) y el azufre en forma de sulfatos; la cantidad de azufre pirítico es calculado del hierro pirítico, y la cantidad de azufre orgánico presente en el carbón es obtenida indirectamente por la substracción de los contenidos del azufre pirítico y el azufre en forma de sulfatos del azufre.

El azufre se encuentra en el carbón en proporciones variables que van desde 0.1% hasta más del 10% (Lin Chou, 2012; Vernon y Jones, 1993). Los carbones bituminosos usualmente tienen un más alto porcentaje de azufre comparado con los sub-bituminosos y lignitos (Blázquez, 1993). La mayor parte del azufre del carbón se incorpora en el momento de la acumulación de la turba (materia orgánica), durante la diagénesis temprana del carbón (Dai *et al.*, 2002; Staub, 2002). El contenido de azufre en la turba está estrechamente relacionado con su ambiente de depósito (Hower, 1994). En general, las turbas que se acumularon bajo la influencia de agua de mar tienen mayor contenido de azufre que aquellas que se acumularon en un ambiente de agua dulce (Lin Chou, 2012). De acuerdo a la naturaleza del azufre, este es clasificado como orgánico e inorgánico.

El azufre en el carbón se presenta de forma inorgánica y orgánica. El azufre inorgánico se presenta en forma sulfuros metálicos (principalmente pirita) o sulfatos (yeso, jarosita, baritina). Por otra parte, el azufre orgánico hace parte de la estructura interna del carbón, enlazado principalmente a estructuras alifáticas, aromáticas, o heterocíclicas (mercaptanos, tiofenoles, tioéteres, ditioéteres, etc.) (Kargi, 1986); además, una pequeña cantidad de azufre puede estar asociada con el carbón en forma elemental (Eligwe, 1988). Tanto el azufre pirítico como el orgánico, son los que se presentan en mayor cantidad en el carbón, mientras que los sulfatos suelen representar valores alrededor 0.2% y rara vez se encuentra azufre elemental (< 0.1%) (Lin Chou, 2012).

▪ Azufre inorgánico

Se presenta principalmente en forma de sulfuros, sulfatos y azufre elemental (Rossi, 1993; Blázquez, 1993).

Sulfuros: La pirita (FeS_2 , cúbica) es el sulfuro predominante en el carbón. Otras especies cristalinas de sulfuro de hierro han sido identificadas en el carbón, como la marcasita (FeS_2), pirrotita y la

troilita, esta última en su forma hidratada (hidrotroilita), puede ser considerada como el estado inicial en el proceso de formación de la pirita sedimentaria (Rossi, 1993). Trazas de otros sulfuros como calcopirita (CuFeS_2), arsenopirita (FeAsS), galena (PbS), esfalerita (ZnS) y bornita (Cu_5FeS_2), pueden encontrarse en el carbón, sin embargo, estas no contribuyen de manera significativa con el azufre inorgánico total (Eligwe, 1988; Lin, 2012). Las partículas de pirita se presentan en varias formas (framboides, cristales individuales, conjunto de cristales euedrales, en fracturas, etc.), comúnmente distribuidas aleatoriamente en el carbón (Prayuenyong, 2002).

Sulfatos: Los sulfatos se producen principalmente por la oxidación de la pirita en condiciones húmedas (Pérez *et al.*, 1982). En este grupo se encuentra la barita (BaSO_4), el yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), la anhidrita (CaSO_4) y un gran número de sulfatos de hierro dentro de los cuales predomina la jarosita (Eligwe, 1988; Calkins, 1994). El contenido del azufre en forma de sulfatos es usualmente muy bajo en el carbón raramente excede unas cuantas centésimas de porcentaje, excepto en muestras altamente oxidadas o meteorizadas (Blázquez, 1995).

Azufre elemental: Este elemento raramente se presenta en el carbón. Aunque en algunos carbones expuestos a la atmosfera se ha encontrado entre 0.03% - 0.17% (Blanco y Lee, 1980). Por lo que para efectos prácticos sólo se tiene en cuenta el azufre en sus formas pirítica, sulfatos y orgánica (Valderrama, 2000).

▪ **Azufre orgánico**

El azufre orgánico se encuentra unido covalentemente con la compleja estructura del carbón, en al menos cuatro formas principales que corresponden a los grupos funcionales que lo contienen: (i) tioles alifáticos o aromáticos (mercaptanos, tiofenoles), (ii) alifáticos, aromáticos o sulfuros mezclados (tioéteres), (iii) alifáticos aromáticos o disulfuros mezclados (ditioéteres), (iv) compuestos heterocíclicos o del tipo tiofeno (dibenzotiofenol) (Rossi, 1995). La Figura 1-2, muestra la estructura química de los compuestos orgánicos del azufre.

La presencia de cada uno de los grupos funcionales, es dependiente de las condiciones ambientales de las primeras etapas de formación del carbón en la turba, el progreso de las reacciones bioquímicas en esta etapa, y el grado de metamorfismo. Según Attar (1978), los tioles se convierten en sulfuros y luego en tiofenos, lo cual incrementa el rango del carbón, de esta manera no es posible encontrar tiofenos en el lignito. Del mismo modo, Klein (1994) estableció que en los carbones de bajo rango predomina el azufre en forma alifática, mientras que en los carbones de alto rango hay una mayor concentración de azufre heterocíclico.

El azufre orgánico proviene principalmente de materiales presentes en la materia orgánica generadora del carbón y de algunos aminoácidos azufrados como cisteína y cistina (Calkins, 1994).

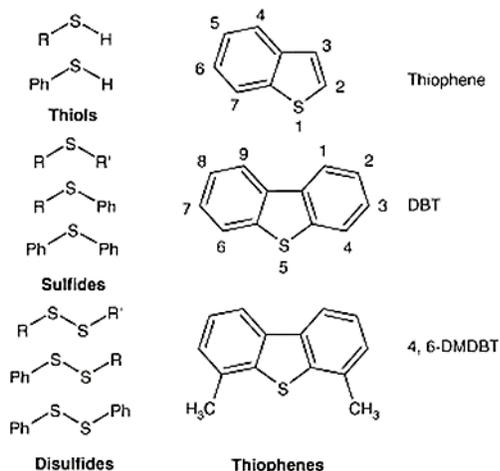


Figura 1-2: Estructura química de los compuestos orgánicos de azufre, típicos en los combustibles fósiles (Kropp y Fedorak, 1998).

▪ Minerales asociados al carbón

Además de la pirita, sulfatos y algunos sulfuros, el carbón presenta otras inclusiones minerales comunes entre las cuales pueden encontrarse carbonatos (calcita, dolomita, siderita, aragonito, entre otros.), óxidos (hematita, magnetita, rutilo, entre otros.), hidróxidos (boehmita, goethita), fosfatos (apatito, goyazita, entre otros.), arcillas (caolinita, illita, montmorillonita, halosita, entre otros.), sales (halita, silvina, entre otros.) y cuarzo, por lo tanto es importante determinar los minerales presentes en el carbón es de gran importancia, debido a que estos pueden afectar el proceso de desulfurización por formación de capas o por la disolución en iones o compuestos que afectan las condiciones del sistema ((Thomas, 2002; Blázquez, 1993; Eligwe, 1988).

1.2 Métodos de desulfurización del carbón

La necesidad de obtener carbones con bajo contenido de azufre, a partir de carbones de baja calidad (cantidad de azufre total mayor a 1.5%), ha dado lugar a una cantidad de métodos de desulfurización, por lo que la elección del método más adecuado está condicionado al carbón mismo, el tipo de instalación en la operación y las restricciones referentes a las emisiones de SO₂ (Blázquez et al., 1993).

Las técnicas de desulfurización pueden clasificarse en tres grupos en función de que se apliquen antes, durante o después de la combustión del carbón. Sin embargo, los tratamientos pre-combustión se han destacado por obtener mayores cantidades de extracción de azufre (Reichmuth, 2002).

El tratamiento pre-combustión dependen de las propiedades físicas y químicas de los compuestos de azufre presentes en el carbón y pueden ser clasificados en tres grupos: (i) físicos, (ii) químicos, y (iii) biológicos (biodesulfurización).

1.2.1 Métodos físicos

Son procesos de limpieza en los cuales se obtiene el máximo de carbón útil, eliminando los estériles (arcillas, sulfuros, etc.) (Acero *et al.*, 1996). Están basados en las diferentes propiedades físicas que poseen los compuestos inorgánicos del azufre con relación al carbón y se apoyan en parámetros tales como densidad, fuerza de gravedad, tensión superficial, dureza, entre otros.

Estos métodos son ampliamente usados para eliminar el azufre inorgánico. Sin embargo, no elimina el azufre orgánico, además, tienen limitaciones en cuanto al tamaño de partícula, cuando la pirita se encuentra finamente diseminada, por lo que el carbón debe ser sometido a varias moliendas, en donde se puede perder material energético (>40%) y se aumentan los costos de operación. Además, resultan inadecuados en carbones de baja calidad que contienen altas cantidades de azufre y cenizas, especialmente los del tipo lignitos.

Existen varias técnicas para eliminar las impurezas, basados en las propiedades físicas, como: gravimétricas, magnéticas, flotación, aglomeración, entre otras.

- **Técnicas gravimétricas**

Están basadas en las propiedades físicas de densidad del carbón y la pirita. Este método es aplicable solo si la pirita se presenta en el carbón con un tamaño mayor a 50 μm , obteniéndose buenos resultados. No obstante, si la pirita se encuentra finamente diseminada en el carbón (<40 μm), la eficiencia de esta técnica es muy baja, debido a que se necesita una trituración mayor del carbón con el fin de lograr una mayor liberación del material mineral, incrementando los costos (Atkas *et al.*, 1998). El método consiste en moler el carbón hasta lograr un tamaño en el cual libere la pirita y posteriormente este es sometido a un proceso de separación selectiva empleando tamices, tablas o cajas (Sripriya *et al.*, 2006).

- **Técnicas magnéticas**

Estos procesos presentan una desventaja debido a que al basarse en las propiedades magnéticas de los materiales, no pueden ser usados directamente sobre ningún carbón o sulfuro (excepto la pirrotita), ya que estos no son magnéticos. Para que esta técnica pueda ser utilizada es necesario un tratamiento previo para transformar la pirita en una sustancia susceptible a la transformación magnética (Blázquez, 1995). Los tratamientos previos sobre la pirita, sugieren que sea tratada con vapor de aire sobrecalentado para producir una transformación magnética sobre la superficie. De otro lado, es posible incorporar hierro pentacarbonil en los átomos superficiales de hierro de la pirita para convertirla en pirrotita. La utilización de este método genera inconvenientes de costos debido a los tratamientos previos y a que no es posible utilizarlos en sulfuros de hierro con un tamaño de partícula menor a 100 μm (Borah, 1999).

- **Flotación y aglomeración**

Estas técnicas están basadas en la diferencia entre las propiedades de la superficie y las características del carbón. La flotación es una técnica dependiente de los diferentes grados de mojabilidad diferencial del carbón y la pirita, en este, las partículas de carbón hidrofóbicas son removidas selectivamente por suspensión en agua, siendo atacadas por burbujas de aire ascendente. la principal ventaja de este método radica en que puede ser aplicado sobre partículas muy pequeñas (<50 μm), sin embargo, se basa en la capacidad natural de los carbones para flotar por lo que no es posible emplearla en carbones oxidados, ya que estos presentan baja flotabilidad, además, los carbones finamente triturados tienden a oxidarse muy rápidamente disminuyendo su capacidad para flotar (Aktas *et al.*, 1998; Meyers, 1981).

En la aglomeración, las partículas de carbón son selectivamente cubiertas y aglomeradas por aceites o hidrocarburos líquidos tales como pentano o heptano para luego ser recuperadas tamizándose en partículas no aglomeradas (Aktas *et al.*, 1998).

- **Lavabilidad en medios densos**

En este proceso, el carbón es sometido a un lavado, empleando líquidos densos (densidad intermedia entre el carbón y las formas de azufre), permitiendo que el carbón flote, debido a su menor densidad y las formas de azufre y las cenizas se hundan (Honaker *et al.*, 2000). Para poder emplear este proceso es necesario realizar pruebas previas de lavabilidad estándar, y así determinar la densidad del fluido de lavado (Acero *et al.*, 1996). Las pruebas de determinación de las características de lavabilidad de carbón se realizan bajo la norma ASTM D 4371-84, empleando soluciones acuosas a base de sales de cloruros (ej. ZnCl_2) y líquidos orgánicos, como medios de separación (Cardona *et al.*, 1994).

En años recientes, un número de métodos químicos para remover azufre orgánico e inorgánico han sido desarrollados específicamente por la incapacidad de los métodos físicos para extraer azufre altamente diseminado del carbón

1.2.2 Métodos químicos

Estos métodos tienen su fundamento en reacciones químicas selectivas que permiten convertir el azufre orgánico e inorgánico en compuestos fáciles de solubilizar. Una gran variedad de métodos químicos de desulfurización han sido desarrollados a nivel de laboratorio y están basados en la solubilización de las formas de azufre (Morrison, 1981). El más común consiste en someter al carbón a una solución altamente alcalina empleando altas temperaturas. No obstante, también puede ser aplicado a temperatura ambiente en presencia de un agente químico oxidante como oxígeno o cloruro férrico (Lojla, 1999). Otros métodos pueden ser clasificados en dos grupos dependiendo de los procedimientos químicos usados:

En un primero grupo están aquellos en los cuales se elimina azufre por oxidación usando iones férricos (Fe^{3+}), ácidos fuertes como HCl , HNO_3 y HClO_4 , y gases con un alto potencial de oxidación (ej. O_2 , Cl_2).

Un segundo grupo está basado en las reacciones en las cuales se desplaza el azufre por tratamiento con soluciones alcalinas (Blázquez *et al.*, 1993). El hidróxido de potasio es la sustancia alcalina más utilizada, por su característica de base fuerte. El potasio reacciona irreversiblemente con los minerales en el carbón, entre ellos el azufre inorgánico y en el azufre orgánico insertándose en los grupos fenoles (Ratanakandilok *et al.*, 2001; Lojla, 1999). Otros métodos utilizan cenizas de desecho, ya que estas son ricas en potasio y componentes alcalinos, que permiten eliminar grandes cantidades de azufre del carbón (Demirbas, 1999).

Aunque mediante estos procesos se eliminan altas cantidades de azufre pirítico y orgánico, operan a altas temperaturas y presiones y usan agentes corrosivos de lixiviación que genera efluentes contaminantes y pueden afectar negativamente las propiedades coquizantes del carbón (Morrison, 1981; Prayuenyong, 2002). Además, estos requieren de altos consumos de energía y equipamiento complejo. Los altos costos de los reactivos en algunos casos no justifican la aplicación de estos métodos a escala industrial.

1.2.3 Métodos biológicos – BIODESULFURIZACIÓN

Las técnicas biotecnológicas, como la biodesulfurización, han sido objeto de investigación durante las últimas décadas, debido a las múltiples ventajas frente a los métodos tradicionales (Bozdemir *et al.*, 1996; Áller *et al.*, 2000). Entre las cuales se destacan las siguientes:

- (i) Los bajos costos involucrados debido a la simplicidad de los equipos requeridos y el bajo consumo de reactivos durante el proceso, ya que los microorganismos auto-regeneran el agente oxidante (Blázquez *et al.*, 2005).
- (ii) Bajo consumo de energía, ya que el proceso se lleva a cabo a presión atmosférica y a temperaturas cercanas a la del ambiente (Ortiz, 1992).
- (iii) La posibilidad de eliminar azufre pirítico finamente diseminado sobre la superficie del carbón y parte del azufre orgánico, sin pérdidas importantes de carbón (Yannopoulos, 1990).
- (iv) No se producen contaminantes gaseosos y los desechos sólidos y líquidos pueden ser reutilizados en otro tipo de procesos, como el tratamiento de aguas residuales o ser tratados de manera simple. Además estos residuos son ambientalmente amigables (Wang *et al.*, 2011).
- (v) El diseño y las operaciones simples y versátiles hacen de esta tecnología aplicable en locaciones remotas (Bozdemir *et al.*, 1996).

De acuerdo con lo dicho, la biolixiviación se presenta como una de las técnicas biohidrometalúrgicas prometedora para el tratamiento de minerales sulfurados, dadas sus

ventajas ampliamente reconocidas. El proceso de biolixiviación se produce por la catálisis que los microorganismos ejercen durante la disolución de algunas menas minerales. El microorganismo se sirve del mineral como combustible, utilizando la transferencia de electrones con propósitos de supervivencia que permiten la liberación de metales, sin requerir aplicación externa de energía (Rodríguez *et al.*, 2001).

▪ Biolixiviación de sulfuros

La disolución bacteriana de sulfuros metálicos, denominada biolixiviación, se aplica a la recuperación de metales no ferrosos como cobre, uranio, magnesio, oro, níquel, entre otros (Ballester, 2001). Estos procesos son fundamentalmente afectados por las bacterias implícitas en el proceso, las cuales regeneran los iones férricos y/o los protones (agentes químicos oxidantes) que oxidan los sulfuros presentes. La presencia de bacterias acelera la disolución de los sulfuros debido a que incrementan rápidamente la concentración de los agentes degradativos en la interfase (Sand *et al.*, 2001). El producto final de la biolixiviación es una solución ácida que contiene el metal de forma soluble (Donati, 2006).

▪ Microorganismos implícitos en la biolixiviación de azufre

Una variedad de bacterias quimiolitautótrofas, capaces de oxidar compuestos de hierro y/o azufre contenidos en minerales, pueden ser fácilmente aisladas de drenajes ácidos de minas o de lugares donde los minerales son naturalmente expuestos al agua y la atmósfera. Las bacterias oxidantes encontradas en estos ambientes naturales son ubicuas, siendo las más comunes *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* (Kelly & Harrison, 1989) y más recientemente *Acidithiobacillus caldus* (Hallberg & Lindstrom, 1994).

Los métodos de remoción de azufre requieren fundamentalmente de bacterias capaces de catalizar la regeneración de hierro férrico a partir de compuestos reducidos de hierro, en medios ácidos. A estas bacterias se les conoce como bacterias hierro-oxidantes, entre las cuales se encuentran: *Leptospirillum ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Ferrimicrobium acidiphilum*, *Ferroplasma acidiphilum*, (Jhonson y Hallberg, 2003).

Por otro lado, los microorganismos azufre-oxidantes como *Acidithiobacillus thiooxidans*, y *Acidithiobacillus caldus*, son utilizados en consorcio con los microorganismos hierro-oxidantes por su capacidad para producir ácido sulfúrico que mantiene favorables las condiciones del medio, aumentando las tasas de eliminación de piritita (Petersen y Dixon, 2006). Otros microorganismos como *Sulfolobus spp.*, también son utilizados para remover el azufre orgánico e inorgánico, debido a su habilidad para crecer en temperaturas por encima de 50 °C (Durusov *et al.*, 1997).

La mayoría de los estudios sobre biodesulfurización se han centrado en la utilización de *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* debido a que han mostrado un buen desempeño en la oxidación de piritita (Prayuenyong, 2002; Caicedo, 2008; Cardona, 2008).

Acidithiobacillus ferrooxidans ha tenido una atención especial por su habilidad para obtener la energía y desarrollar sus funciones metabólicas de compuestos reducidos de hierro y azufre empleando oxígeno como aceptor final de electrones. Además, estos microorganismos son fácilmente aislados de drenajes ácidos de mina o lugares donde los depósitos de sulfuros están expuestos, por lo que es considerado un organismo dominante en hidrometalurgia en el proceso de biolixiviación de sulfuros metálicos (Rawlings, 1999; Gericke y Govender, 2011).

▪ ***Acidithiobacillus ferrooxidans***

Inicialmente denominado *Thiobacillus ferrooxidans*, sin embargo debido a su capacidad para adaptarse fácilmente en medio ácido fue reclasificado como *Acidithiobacillus* (*Acidithiobacillus*) *ferrooxidans* por Kelly y Wood en (2001).

Acidithiobacillus ferrooxidans se caracteriza por ser gram negativa, no esporulante, de forma alargada, con un tamaño promedio de $0.5\ \mu\text{m}$ – $0.6\ \mu\text{m}$ de ancho y de $1\ \mu\text{m}$ – $2\ \mu\text{m}$ de largo, con extremos redondeados. Se encuentran comúnmente solas o en pares, raramente formando cadenas cortas, además poseen un flagelo polar que les permite moverse o mantenerse nadando en el ambiente (células planctónicas) (Rawlings *et al.*, 1999; Jhonson, 2001; Jensen y Webb, 1994). La Figura 1-3 muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

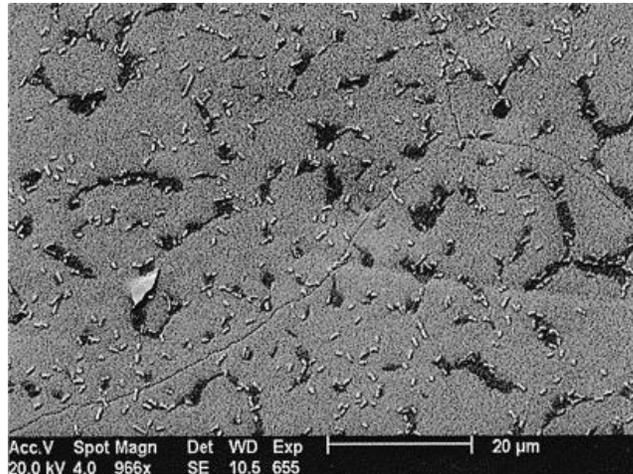


Figura 1-3: Imagen de microscopía electrónica de barrido de *Acidithiobacillus ferrooxidans* creciendo sobre pirita (Sandhuesa *et al.*, 1999).

Esta especie es generalmente caracterizada por cuatro propiedades:

(i) quimiolitotróficas, la energía requerida para el mantenimiento celular y crecimiento es obtenida de la oxidación del ion ferroso (Fe^{2+}) a férrico (Fe^{3+}) y/o compuestos reducidos de azufre (sulfuro (S^{2-}), azufre elemental (S^0), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), sulfito (SO_3^{2-}), y tetrionato (S_4O_6) a ácido sulfúrico

(H₂SO₄) (Bosecker, 1997; Brock, 1998; Kelly y Wood, 2000). La fuente de carbono para la síntesis celular es el dióxido de carbono (CO₂). Sin embargo, requieren de otros nutrientes tales como: nitrógeno (NH₄⁺), y fósforo (PO₄³⁻). Además, trazas de hierro (Fe), potasio (K), magnesio (Mg), sodio (Na), calcio (Ca) y cobalto (Co) (McIntosh *et al.*, 1997, Meruane 2002).

(ii) aeróbica, utilizan oxígeno como el aceptor final de electrones. No obstante, se ha reportado que puede ser anaerobia facultativa (Menadier, 2009)

(iii) mesófilas, a temperaturas entre los 10 °C - 45 °C promueve el crecimiento y la oxidación de hierro con un óptimo entre 28 °C – 33 °C (Nemati, 1998; Okereke y Stevens, 1991).

(iv) acidófilas obligadas, el crecimiento ocurre en un rango de 1.0 – 4.5 con un óptimo entre 2.0 – 2.3, la supervivencia generalmente no ocurre a pH < 1.0 ni a pH > 6.5 (Drobner, 1990).

La Figura 1-4 muestra una imagen de microscopía de fuerza atómica de una célula de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre un cristal de pirita, la cual indica la morfología de la bacteria y la capacidad de la misma para crecer en presencia de sulfuros metálicos como la pirita.

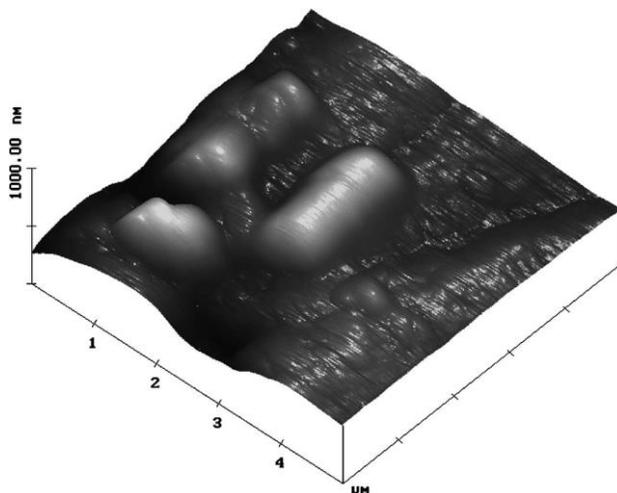


Figura 1-4: Imagen de microscopía de fuerza atómica de una célula de *Acidithiobacillus ferrooxidans* adherida específicamente a un área fracturada de un cristal de pirita (Sand y Gehrke, 2006).

▪ Mecanismos de biolixiviación

En 1964, Silverman y Ehrlich propusieron que las bacterias oxidan los minerales o sulfuros metálicos mediante un mecanismo directo o un mecanismo indirecto. Existen otros dos mecanismos que contribuyen con la biolixiviación conocidos como: lixiviación galvánica y lixiviación ácida, sin embargo, los dos primeros se consideran los más importantes (Sand, 2001). La Figura 1-5 ilustra los mecanismos directo e indirecto de lixiviación.

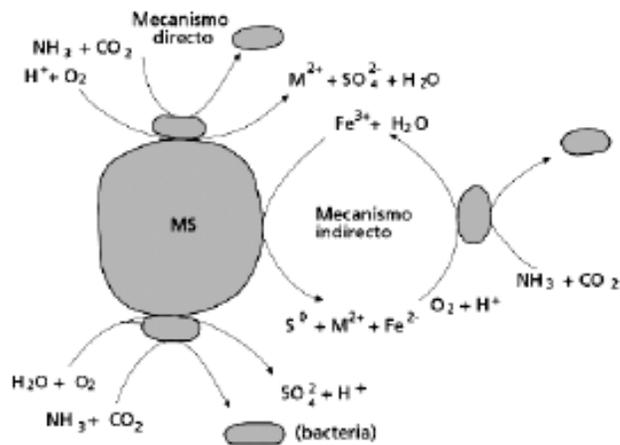
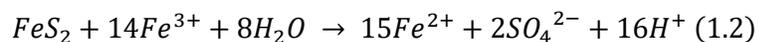
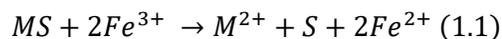


Figura 1-5: Mecanismo directo e indirecto de biolixiviación (Rodríguez, 2000), tomado de (Ballester, 2006).

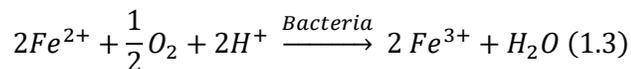
Generalmente, se explica que la bacteria obtiene la energía asociada al proceso de oxidación del hierro ferroso, con el fin de llevar a cabo sus procesos metabólicos y liberar el agente químico oxidante que disuelve el sulfuro metálico, sin requerir una aplicación externa de energía (Rodríguez *et al.*, 2001). El papel que juegan los microorganismos en el proceso de biolixiviación es controversial, y a pesar de que existen consensos en varios aspectos relacionados con el fenómeno, aún no se ha llegado a una teoría unificada (Rodríguez, 2003).

Mecanismo directo: El mecanismo directo asume que el ataque a la red cristalina del sulfuro metálico, se da mediante un sistema enzimático, que lo transforma en sulfatos y cationes metálicos en presencia de oxígeno, la fracción de azufre del mineral es biológicamente oxidada a sulfato, sin la presencia de ningún intermediario detectable (Tributsch, 2001). Para fortalecer esta definición las bacterias deben estar en contacto con el mineral que se quiere degradar. Evidencias de este mecanismo fueron presentadas por varios autores para diferentes sulfuros (Shrihari *et al.* 1991; Murthy y Natarajan 1992; Bennett y Tributsch 1978; Rodríguez y Tributsch 1988; Mustin *et al.* 1992; Edwards *et al.* 1998).

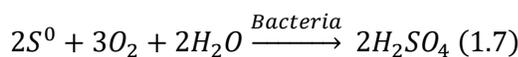
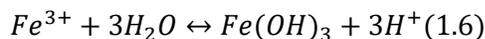
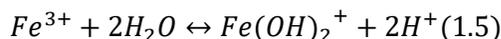
Mecanismo Indirecto: Este tiene lugar por la interacción del mineral con productos intermedios o finales del metabolismo bacteriano implicadas en el proceso. En este, no existen reacciones enzimáticas que actúen directamente sobre el sulfuro, por lo que este mecanismo sugiere básicamente que la acción oxidante de los iones férricos (Fe³⁺) son los encargados de disolver el metal sulfurado. La reacción general está expresada por las Ecuaciones (1.1) y (1.2) para el caso de la pirita (Prayuenyong, 2002; Ballester, 2006).



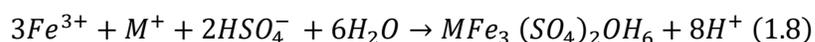
Paralelamente, la acción bacteriana cataliza la oxidación del ion ferroso, según la reacción mostrada en la Ecuación (1.3) (Ballester, 2005).



El consumo de ácido por parte de las bacterias es generalmente contrarrestado por las reacciones de hidrólisis del ion férrico, como se muestra en las Ecuaciones (1.4), (1.5) y (1.6). Adicionalmente, el azufre elemental que se genera o se puede agregar al proceso, es oxidado a ácido sulfúrico por la bacteria, Ecuación (1.7), aumentando los niveles de acidez del medio, sobretodo en presencia de *Acidithiobacillus thiooxidans*; aunque *Acidithiobacillus ferrooxidans*, debido a su metabolismo facultativo, también contribuye con este efecto (Sand, 2001; Ballester, 2001).



Una reacción que compite con la hidrólisis es la formación de jarositas de fórmula general $MFe_3(SO_4)_2(OH)_6$, donde $M = K^+, NH_4^+, Na^+, Ag^+$ o H_3O^+ , formándose precipitados en el medio de cultivo (Prayueyong, 2002; Daoud y Karamaney, 2006; Nazari, 2014). La reacción se muestra en la Ecuación (1.8).



Actualmente, el mecanismo de lixiviación indirecto es la base de los procedimientos extractivos de biolixiviación que se están empleando a gran escala, debido a que existe una descripción relativamente completa del proceso, sin embargo, también presenta vacíos relacionados con investigaciones que afirman que en ausencia de iones férricos y presencia de bacterias se da la disolución de sulfuros libres de hierro (Tao y Dongwei, 2014).

En 2006, Sand y Gehrke basados en análisis de química molecular y la ciencia de las superficies, indicaron que el mecanismo de lixiviación directa ampliamente discutido durante las últimas décadas, no existe y plantearon que el mecanismo indirecto se mantiene y comprende dos sub-mecanismos, mediante los cuales la bacteria puede efectuar la disolución del sulfuro: (i) El mecanismo de contacto y (ii) El mecanismo de no contacto (Rawlings, 2002; Sand *et al.*, 2001).

El mecanismo indirecto de contacto mecanismo requiere que las células se adhieran a la superficie del sulfuro metálico mediante una capa polimérica extracelular (CPE), en la que ocurre la

regeneración del ion férrico por acción de la bacteria y la reducción a hierro ferroso por la reacción del ion férrico con el sulfuro. Por lo tanto, la disolución de la pirita se lleva a cabo en la interfaz entre la célula bacteriana (pared celular) y la superficie del material sulfurado. Este proceso es controlado por parámetros electroquímicos (Sand y Gehrke, 2006). La Figura 1-6 ilustra mecanismo de contacto indirecto y muestra una imagen de microscopía electrónica de trasmisión de la capa polimérica extracelular.

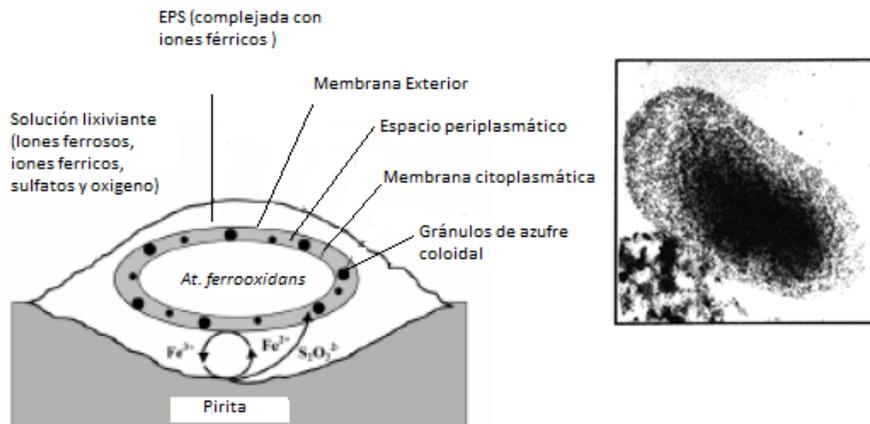


Figura 1-6: Modelo del mecanismo indirecto de contacto e imagen de microscopía electrónica de trasmisión de la capa polimérica extracelular de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Schippers y Sand, 1999; Tributsch, 2001).

En el mecanismo indirecto de no contacto, los iones ferrosos (Fe^{2+}) son oxidados por las bacterias planctónicas las cuales son microorganismos libres que se encuentran flotando y/o nadando en el medio líquido, los iones férricos resultantes entran en contacto con la superficie del mineral sulfurado, donde se reducen y vuelven a entrar al ciclo (Watling, 2006; Sand y Gehrke, 2006).

Adicional al mecanismo indirecto de contacto y al mecanismo indirecto de no contacto, se propuso un tercer mecanismo cooperativo. En este, las bacterias adheridas a la superficie del mineral liberan especies que constituyen la fuente energética de las células en solución. La Figura 1-7 ilustra los tres mecanismos de lixiviación propuestos (Tributsch, 2001).

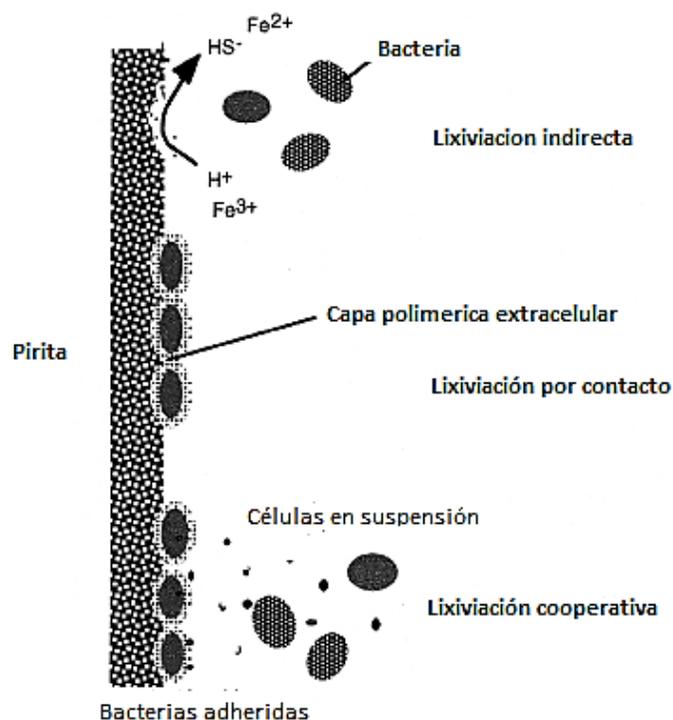


Figura 1-7: Esquema de los tres tipos de lixiviación indirecta (Tributsch, 2001).

Según Ballester (2005) la contribución de cada uno de los procesos se da durante la lixiviación de la pirita en tres etapas. En la etapa inicial el mecanismo predominante es el indirecto de contacto, en la cual las bacterias alcanzan altas velocidades de oxidación del sulfuro y liberan iones ferrosos. La segunda etapa favorece el crecimiento de las células planctónicas debido a la presencia de los iones ferrosos en disolución, generando una mayor concentración de hierro férrico que aumenta el ataque del mineral por mecanismo indirecto de no contacto. Y finalmente, en la tercera etapa se alcanza un equilibrio entre las células adheridas y las células libres dando lugar a un mecanismo de lixiviación cooperativa.

La contribución de los mecanismos no ha sido totalmente aclarada. Sin embargo, se sabe que las bacterias catalizan la formación de los iones férricos (agentes oxidantes) y mantienen una alta relación Fe^{3+}/Fe^{2+} , que favorece la oxidación de la pirita (Nemati *et al.*, 1998; Jensen y Webb, 1994).

Los modelos de biolixiviación propuestos se basan en la hipótesis que indica que los iones férricos y/o los protones, son los únicos agentes oxidantes que disuelven el sulfuro; el mecanismo es, por tanto, en sentido estricto, de naturaleza indirecta, la función principal de la bacteria dentro del proceso es (re)generar los iones férricos y concentrarlos en la interface mineral/agua o mineral/bacteria, con el fin de aumentar la degradación del material sulfurado (Ballester, 2005).

▪ Vías de reacción

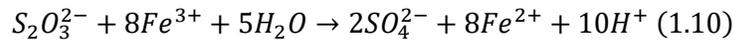
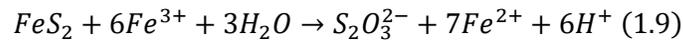
La vía de reacción por la cual se da la degradación está determinada por el tipo de sulfuro y por su solubilidad en ácido, esta última está determinada por la configuración electrónica (Sand *et al.*,

2001; Schippers y Sand 1999). Los sulfuros cuyas bandas de valencia son derivadas solamente de los átomos metálicos no pueden ser atacados por los protones y se consideran insolubles en ácido (Ej. pirita). En contraste, los sulfuros con bandas de valencia desde el orbital metálico y orbital sulfuro, son más o menos solubles en ácido (Rohwender, 2003).

De acuerdo con las diferentes rutas de oxidación seguidas por los sulfuros, se han propuesto dos mecanismos indirectos: (i) Mecanismo de biolixiviación vía tiosulfato y (ii) Mecanismo de biolixiviación vía polisulfuro (Shippers *et al.*, 1996; Shippers y Sand, 1999; Sand *et al.*, 2001).

Vía tiosulfato: Esta describe la degradación de sulfuros metálicos no solubles en ácido, tales como: pirita, molibdenita y wolframita (Schippers, 1999). En estos, el enlace químico entre el azufre y el metal no se rompe hasta que una serie de reacciones sucesivas de oxidación electrónicas se lleven a cabo y se produzca sulfato (Schippers *et al.*, 1996).

Los iones de hierro férricos generados rompen los enlaces entre el hierro y el disulfuro en la red cristalina de la pirita y producen iones ferrosos y tiosulfato, Ecuación (1.9). Los iones ferrosos resultantes son oxidados a hierro férrico. Mientras el tiosulfato es oxidado a sulfato, Ecuación (1.10), vía tetrionato, ácido disulfano – monosulfónico y tritionato (Sand *et al.*, 2001). Además, se generan pequeñas cantidades de azufre elemental y pentationato como sub-productos (Ballester, 2005).



Vale la pena mencionar que esta vía es denominada tiosulfato debido a que esta es la especie química intermedia más importante, Figura 1-8 (Sand *et al.*, 2001).

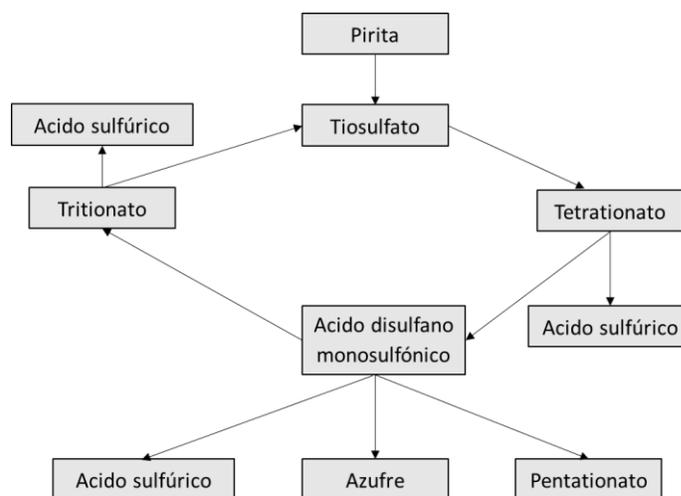
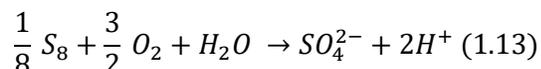
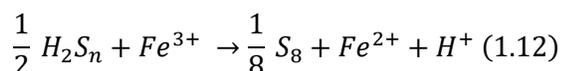
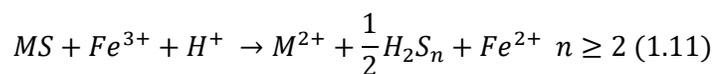


Figura 1-8: Ciclo oxidativo de la degradación de pirita por degradación química y/o biológica (Sand *et al.*, 2001).

Cabe destacar, que *Acidithiobacillus ferrooxidans* cuenta con la capacidad de (re)generar los iones férricos necesarios para continuar la degradación del sulfuro, y simultáneamente, pueden oxidar el tiosulfato y los politionatos a sulfato, por lo que su presencia es indispensable en el proceso.

Vía polisulfuro: Los sulfuros metálicos como esfalerita, calcopirita, covelita y galena poseen bandas de valencia provenientes de átomos metálicos y de azufre, que no solo son atacables mediante la acción de un agente oxidante, sino que también los protones podrían surtir el mismo efecto. La degradación de estos sulfuros está controlada por una serie de productos intermedios (polisulfuros), los cuales se descomponen en medio ácido liberando anillos de azufre elemental (S_8) (Sand *et al.*, 2001; Sand y Gehrke, 2006). Esta vía de reacción es explicada de manera simplificada en las Ecuaciones (1.11) a (1.13).



El papel de las bacterias durante la biolixiviación de sulfuros metálicos consiste en (re)generar el agente oxidante y en transformar el azufre liberado en ácido sulfúrico, con el fin de abastecer al medio de iones férricos y/o protones; los iones H^+ producidos mantienen los iones férricos solubles, lo cual favorece la oxidación de la pirita (Rodríguez *et al.*, 2001). La Figura 1-9 ilustra las vías empleadas para la biolixiviación de los sulfuros metálicos.

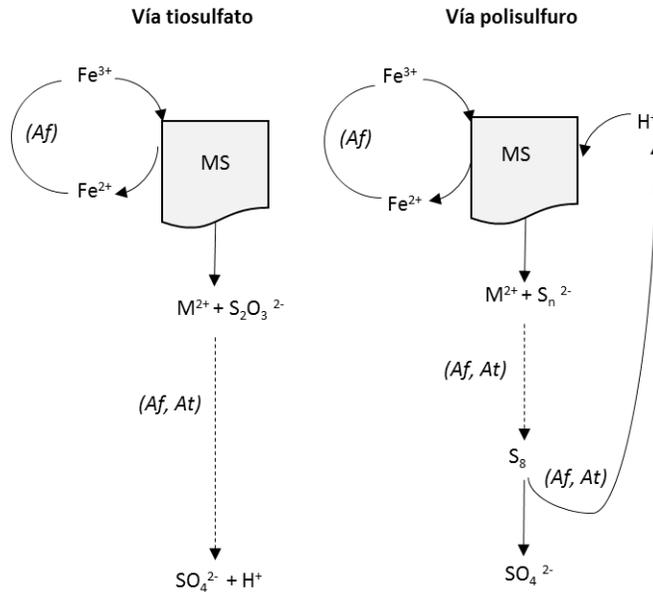


Figura 1-9: Mecanismos indirectos de biolixiviación de sulfuros metálicos. Vía tiosulfato (*Izq.*), vía polisulfuro (*der.*) (Sand y Schippers, 1999). *Af*: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; *At*: *Acidithiobacillus thiooxidans*. MS: sulfuro metálico.

▪ Factores fisicoquímicos que influyen en el proceso de biodesulfurización

La actividad oxidativa de las bacterias está relacionada con las condiciones del medio en las cuales crecen (Rossi, 2001). Además, la disolución de los sulfuros está fuertemente influenciada por la interacción de la temperatura, el pH, potencial redox, composición del medio (Gómez & Cantero, 2005; Valencia & Acevedo 2008).

En los procesos de biodesulfurización se pueden realizar monitoreos indirectos de algunos parámetros fisicoquímicos, tales como: pH, potencial redox (Eh), sulfatos disueltos entre otros. De esta manera, es posible determinar el desempeño de los microorganismos, así, como su influencia dentro del proceso de biooxidación. (Tuovinen *et al.* 1994; Morán *et al.*, 1997; Prayuenyong, 2002). A continuación, se resumen algunos de los factores fisicoquímicos comúnmente estudiados:

pH: El pH óptimo para la remoción de pirita en el carbón está en el rango de 2.0 y 2.5. Valores de pH cercanos a 1.0 muestran ser fuertemente inhibitorios para el crecimiento de las células bacterianas, debido a que podrían afectar los grupos ionizables presentes en las enzimas situadas en el citoplasma y periplasma de la célula (Karavaiko *et al.* 1985). En presencia de iones ferrosos *Acidithiobacillus ferrooxidans* es capaz de crecer a pH entre 1.0 y 5.0. No obstante, para reducir los efectos negativos de la precipitación de hierro en forma de sulfatos (jarositas), se debe manejar un $pH < 1.8$ durante el proceso de biolixiviación, debido a que el hierro férrico tiene una muy baja solubilidad a $pH > 2.0$ (Eligwe, 1988; Daoud y Karamanev, 2006; Jensen y Webb, 1994).

Temperatura: La temperatura tiene un efecto importante en la actividad oxidativa de la bacteria, tanto en la velocidad de disolución del sulfuro como en la solubilidad del oxígeno y el dióxido de carbono (Eligwe, 1988). Este parámetro es dependiente del tipo de microorganismo que se emplee en el proceso. Los microorganismos mesófilos como *Acidithiobacillus ferrooxidans* crecen óptimamente a temperatura entre 30 °C y 45 °C. Temperaturas por encima pueden inhibir o retardar el crecimiento celular (Rawling, 2004).

Potencial redox: En los sistemas de biolixiviación el Eh se encuentra definido por los pares de óxido-reducción que interactúan con el electrodo de platino. Los pares de interés son el par férrico/ferroso y el par oxígeno disuelto/agua. Sin embargo, la presencia del hierro en solución hace que la influencia del oxígeno no sea considerable y para efectos prácticos el Eh está fundamentalmente definido por la relación Fe^{3+}/Fe^{2+} , siendo que cuando esta relación aumenta se beneficia el proceso de disolución de la pirita (Meruane, 2002). Valores de Eh entre +220 y +600mV (Ag/AgCl), han sido observados durante la oxidación de minerales de sulfuro por bacterias. Un Eh > 550mV indica una buena actividad oxidativa de las bacterias (Eligwe, 1988; Gahan, 2010).

Composición del medio lixivante: Los componentes básicos como nitrógeno (amonio), potasio, calcio, fósforo y magnesio constituyen los nutrientes esenciales para el crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Estos elementos deben estar en cantidades proporcionales en el medio de cultivo en forma de sales, las concentraciones pueden variar entre medios de cultivo, esto depende en gran medida de las condiciones del medio y del tipo de cepa empleada (Gómez & Cantero, 2005). El carbono necesario para el desarrollo celular es generalmente provisto por el CO₂, no obstante, también es posible obtenerlo a partir de sales de ácido carbónico como los carbonatos presentes en el carbón (Eligwe, 1988). Adicionalmente, la energía es obtenida a partir de la oxidación de los compuestos inorgánicos como hierro ferroso y/o azufre (Acevedo & Gentina, 2005). Los medios de cultivo más utilizados para el crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* son: T&K y 9K (Silverman y Lundgren, 1959; Tuovinen y Kelly, 1973; Rossi, 1993).

Porcentaje de pulpa y área superficial: Una alta concentración de pulpa puede interferir con el transporte de nutrientes y gases (O₂ y CO₂), además, los esfuerzos cortantes que se generan por la colisión de las partículas entre sí, producen un estrés celular que limita el crecimiento (Malik *et al.*, 2004). Por otro lado, el área específica de la superficie influye sobre la velocidad de remoción y lixiviación del mineral, las cuales se incrementan cuando se dispone de una mayor área reactiva, es decir, un menor tamaño de partícula. No obstante, disminuir el tamaño de partícula puede generar efectos inhibitorios como efectos mecánicos y estrés metabólico (Prayuenyong, 2002; Valencia & Acevedo, 2008; Deveci, 2004).

Compuestos orgánicos: Los fenoles, carboxilos e hidroxilos afectan la química interfacial de la solución lixivante e influyen negativamente la actividad celular. El efecto inhibitorio de estos compuestos puede ser remediado por la utilización de microorganismos heterótrofos (*T. novellus*, *T. acidophilus* y *T. perometabolis*) en consorcio con los microorganismos autótrofos (Eligwe, 1998; Prayuenyong, 2002).

Efecto de los cationes: *Acidithiobacillus ferrooxidans* presenta una alta resistencia a los cationes metálicos y una resistencia relativa a metales pesados comunes en los ambientes naturales de crecimiento. Esta bacteria posee la capacidad de adaptarse en cortos periodos de tiempo (horas o pocos días) a concentraciones elevadas de metales como Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} (Das *et al.*, 1997). Algunas investigaciones han indicado que esta bacteria es capaz de oxidar otros cationes además de Fe^{2+} , como Cu^{2+} , Sb^{3+} , Sn^{2+} (Ingledeew, 1982).

La resistencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* a los iones metálicos ha sido ampliamente estudiada y se ha determinado que su presencia puede provocar una inhibición competitiva y/o no competitiva. No obstante, el efecto de los cationes sobre la acción oxidativa de la bacteria es variable, bajas concentraciones de los cationes Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+} no afectan la capacidad oxidativa del ion ferroso debido a que las bacterias pueden adaptarse a su presencia; otros como Sn^{2+} y Pb^{2+} la inhiben de forma parcial, disminuyendo la velocidad específica de crecimiento. Por último, pequeñas concentraciones de Hg^{2+} y Ag^+ tienen un fuerte efecto inhibitorio de las células (Eligwe, 1988; Nies, 1999).

Efecto de los aniones: El crecimiento y desarrollo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* requiere de la presencia de SO_4^{2-} , debido a que este es capaz de estabilizar el complejo de hierro ferroso hexahidratado, que sirve como sustrato directo en el sistema enzimático de oxidación (Jensen y Webb, 1995). De esta manera, los demás iones (SeO_4^{2-} , TeO_4^{2-} , AsO_4^{3-} , PO_4^{3-}) podrían desacomplejar el ion ferroso o estabilizar otros complejos no específicos para el mecanismo oxidativo, el ion F^- en un inhibidor de enzimas oxidasas importantes en el metabolismo celular. Finalmente, el ion nitrato (NO_3^{2-}), es un agente desacoplador (Ingledeew, 1982; Meruane, 2002).

1.3 Bioenergética de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

La transformación energética asociada al proceso oxidativo de Fe^{2+} puede ser resumida en dos procesos relacionados: (i) El transporte directo de electrones desde el ion ferroso al oxígeno mediante un mecanismo de quimiosmosis que produce ATP. (ii) El transporte reverso de electrones que dispone de una parte de la energía del transporte directo, y trasfiere los electrones necesarios desde el ion ferroso para la reducción de $NADP^+$ a NADPH (Amouric *et al.*, 2011; Tao & Dongwei, 2014).

La síntesis de ATP se da mediante una transferencia electrónica espontánea entre el ion ferroso en solución y el oxígeno disuelto que ingresa a la célula. Esta transferencia electrónica en *Acidithiobacillus ferrooxidans* ha sido objeto de varios estudios (Bonnefoy, 2010; Holmes & Bonnefoy, 2007; Quatrini *et al.*, 2009; Castelle *et al.*, 2008). En adición al mecanismo de síntesis de ATP en la membrana celular, se desarrolla simultáneamente un proceso de transporte reverso de electrones orientado a la reducción de NADPH a partir de $NADP^+$, esta reacción es imprescindible para la fijación de carbono y los procesos de síntesis orgánica que ocurren al interior de la estructura celular. Sin embargo, al ser esta reacción termodinámicamente desfavorable, se requiere una fuerza motriz externa para incentivar la transferencia de electrones, este proceso

utiliza una parte de la energía disponible de la oxidación del ion ferroso, la Figura 1-10 muestra un esquema que resume el transporte electrónico en *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Elbehti *et al.*, 2000; Bird *et al.*, 2011).

Según los planteamientos de algunos autores, los electrones provenientes desde el hierro ferroso y/o los sulfuros metálicos -sustrato natural de *Acidithiobacillus ferrooxidans*- son conducidos espontáneamente hacia el oxígeno, a través de una cadena electrónica que abarca tanto la membrana externa como la membrana interna. Esta cadena comienza con un *citocromo c* (proteína Cyc2) ubicado en la membrana externa, seguido por la proteína periplasmática *rusticianina*, el citocromo c4 (Cyc1), el cual se encuentra en contacto con la membrana interna, y la citocromo oxidasa (CoxBACD) integrada a la membrana citoplasmática, en donde se reduce el O₂ a H₂O (Figura 1.10 a).

De otro lado, se cree que la fuerza motriz de protones es la que provee la energía para impulsar el transporte reverso de electrones para producir NADPH. En esta vía, los electrones son transferidos desde la *rusticianina* vía el *citocromo c4* (CycA1), el complejo *citocromo bc1*, y las quinonas asociadas a la membrana hasta el complejo NADH dehidrogenasa (NADH1). La distribución del flujo electrónico a NAD⁺ u O₂, se ha propuesto que ocurre a nivel de la *rusticianina*. El flujo de electrones en el punto de ramificación (*rusticianina*), *Acidithiobacillus ferrooxidans* puede equilibrar la producción de ATP o NADPH (Figura 1-10 b). Sin embargo, la forma exacta en la que se regulan estas cadenas electrónicas no es del todo claro (Ferguson & Ingledew, 2008).

Las bacterias hierro-oxidantes deben hacer frente a una serie de desafíos, entre los cuales vale la pena resaltar: (i) ser capaces de tomar el hierro ferroso libre que se encuentra en el medio circundante, (ii) mantener un buen flujo electrónico que les permita la formación de las moléculas energéticas necesarias y (iii) sobrevivir a la acumulación de los productos de la oxidación.

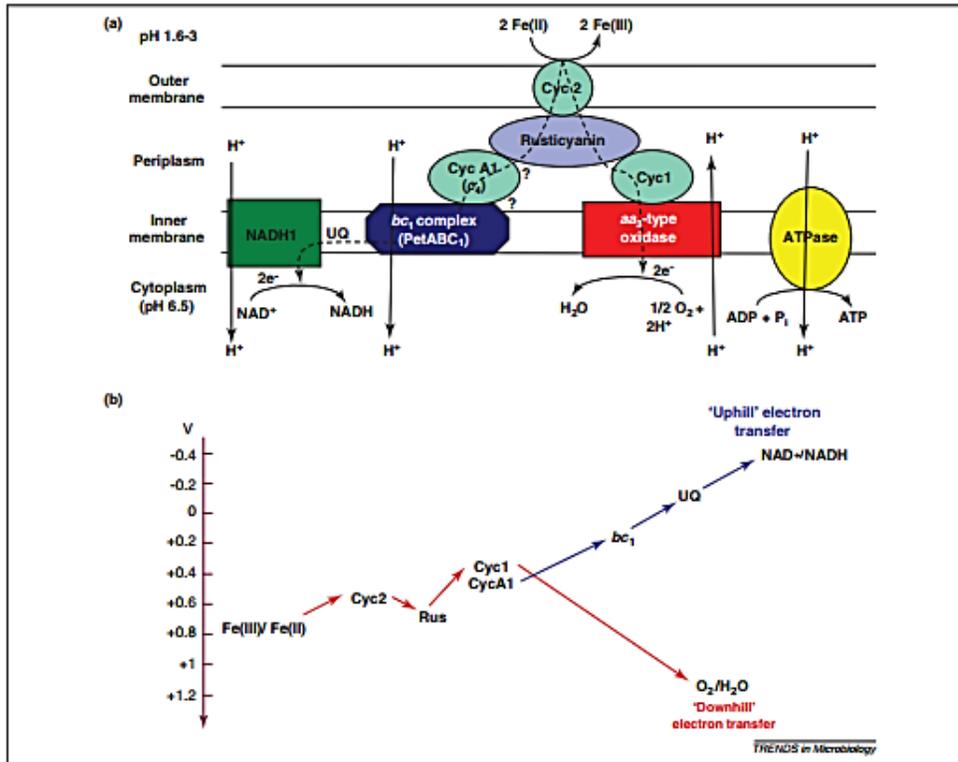


Figura 1-10: Transporte electrónico en *Acidithiobacillus ferrooxidans*. (a) Modelo de oxidación de hierro ferroso en *Acidithiobacillus ferrooxidans*. (b) Esquema de los potenciales de reducción de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ruta de transferencia de electrones. Rus: rusticianina, UQ: ubiquinona (Bird *et al.*, 2011)

1.3.1 Los iones ferrosos (Fe^{2+}) y los procesos de biolixiviación

Debido a las diferentes aplicaciones posibles de la oxidación de hierro ferroso por *Acidithiobacillus ferrooxidans*, un gran número de estudios se han llevado a cabo en relación con los aspectos o factores que influyen en el proceso. Las investigaciones se han centrado en mejorar la velocidad oxidativa del hierro ferroso, el cual constituye el principal factor involucrado en la aplicabilidad del proceso a mayor escala. La actividad oxidativa de la bacteria puede ser potenciada, atenuada o inhibida por varios factores que se encuentran involucrados en los procesos de biolixiviación, como se mencionó previamente (sección 1.2.3).

La concentración de hierro ferroso (Fe^{2+}) en el líquido lixiviante influye en los procesos de biolixiviación (Cara *et al.*, 2001). En este sentido, se ha planteado que el agotamiento del hierro ferroso puede generar un decrecimiento o muerte celular (Silverman y Lundgren, 1959). Otros estudios indican que al aumentar la concentración de hierro (5.6 g/L) se mejora la tasa de absorción de oxígeno, mientras al emplear una concentración mayor de hierro ferroso, se disminuye la tasa de oxidación de la bacteria y se induce un efecto inhibitorio en el crecimiento (Kelly & Jones, 1978). También, se ha reportado que las tasas máximas de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

se consiguen al adicionar de 2 g/L a 3g/L de sulfato ferroso. Sin embargo, estos valores varían entre investigaciones, en las que una oxidación constante se obtiene al adicionar concentraciones de hierro ferroso en el rango de 2.2g/L a 6.3 g/L (Tan *et al.*, 1996; Basson *et al.*, 2013). Estas discrepancias se deben a las diversas condiciones de los cultivos bacterianos (ej. pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno), los procedimientos empleados y las cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* utilizadas.

Según investigaciones previas, los procesos de biooxidación en los cuales se emplea *Acidithiobacillus ferrooxidans*, al adicionar concentraciones iniciales de sulfato ferroso como fuente inicial de energía, mejora considerablemente las tasas de extracción del sulfuro de hierro (pirita), debido al rápido incremento de la población celular que contribuye significativamente con el aumento de la actividad oxidativa de la células (Ossa *et al.*, 2005). Caicedo *et al.* (2011) utilizaron concentraciones iniciales de hierro ferroso en solución y un cultivo mixto de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, sus resultados evidenciaron un considerable aumento en la solubilización de los productos de la oxidación, especialmente al emplear bajas concentraciones, así mismo, comprobó que al utilizar esta fuente de energía exógena se aumenta el potencial oxidativo.

1.3.2 Iones férricos (Fe^{3+})

Los iones férricos (Fe^{3+}) y el oxígeno (O_2) han sido reconocidos como los principales agentes oxidantes responsables de la disolución de pirita y otros minerales por lo que son considerados unos de los reactivos más útiles en hidrometalurgia (Ballester, 2005; Prayuenyong, 2002; NEERI, 1993). Sin embargo, durante la disolución, los iones Fe^{3+} son reducidos a iones ferrosos (Fe^{2+}), la re-oxidación de estos iones es un paso fundamental de cual depende la eficiencia de los procesos de biolixiviación. En los procesos químicos esta reacción se da con ayuda de altas temperaturas y/o mediante la adición de reactivos (Kupka y Skvarla, 1999; Gu *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2001; Manisha *et al.*, 2000).

De otro lado, en los procesos biológicos, la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxida los iones Fe^{2+} bajo condiciones ácidas, en presencia de oxígeno, con el fin de obtener energía para su crecimiento (Gleisner *et al.*, 2006; Deveci, 2004; Sand, 2001). A pesar de las ventajas que exhiben los procesos biológicos, su aplicación se encuentra limitada especialmente por la lenta cinética de reacción. Por esta razón, es necesario implementar un proceso que opere a una velocidad aceptable y que sea capaz de competir con las tecnologías preexistentes (Cabrera *et al.*, 2005).

Por consiguiente, en este estudio se ha desarrollado un proceso bioquímico utilizando un cultivo comercial de *Acidithiobacillus ferrooxidans* para la desulfurización pre-combustión de carbón. Este proceso opera en dos etapas. En la primera, la pirita presente es disuelta por un proceso de oxidación química utilizando una solución de sulfato férrico o cloruro férrico (oxidantes). En la segunda, el oxidante reducido (sulfato ferroso o cloruro ferroso) se oxida biológicamente para reciclar a la primera etapa del proceso.

La eficiencia del proceso de oxidación bioquímica, depende de mantener las cantidades necesarias de sustrato y oxidante en el medio lixiviante. La adición de sulfato ferroso hace el medio adecuado para el crecimiento de las bacterias. Asimismo, la reacción química entre el sulfato férrico o cloruro férrico y la pirita genera iones Fe^{2+} que también provee al medio del sustrato, facilitando la obtención de energía y la recuperación del reactante (Fe^{3+}).

Las sales férricas empleadas en el proceso cooperativo químico y biológico de desulfurización de carbón fueron sulfato férrico y cloruro férrico. Estas sales se caracterizan por ser altamente selectivas para pirita, (re)generables, no reaccionar con la matriz orgánica del carbón, y ser solubles en sus formas oxidada y reducida (Meyer, 1981; Fowler, 2000; Zhang *et al.*, 2008; Srivastava, 2003; Bouffard, 2006; Meyer, 1977).

El proceso de oxidación de pirita con sulfato férrico exhibe una eficiencia máxima del 90% ($\pm 5\%$) (NEERI, 1993; Yurovskii, 1974). Por lo que se considera uno de los reactivos más importantes empleados en los procesos de disolución de sulfuros metálicos, esta sal puede ser utilizada en los procesos de biolixiviación debido a que no inhibe el crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ni modifica las propiedades del carbón, adicionalmente, no se requieren carbones con un tamaño de partícula fino ($< -\#100$ Tyler), haciéndolo aplicable a mayor escala (Pandey *et al.*, 2002; Srivastava, 2003). Bajas concentraciones de sulfato férrico son benéficas en la lixiviación indirecta de minerales. Sin embargo, altas concentraciones resultan en la producción de jarosita, un precipitado de hierro férrico que puede cubrir la superficie del mineral, y evitar que se produzca una mayor oxidación de pirita (Nazari, 2014; Harahuc *et al.*, 2000).

De otro lado, las soluciones ácidas de cloruro férrico, en donde el hierro férrico (Fe^{3+}) es oxidante y el ion cloruro (Cl^-) es acomplejante, aceleran la disolución química de los sulfuros metálicos (Wang *et al.*, 2010; Nicol *et al.*, 2013). Los efectos del cloruro en los procesos de lixiviación y biolixiviación de sulfuros metálicos se ha estudiado durante décadas, sin embargo, el mecanismo detallado del papel benéfico que juegan las bajas concentraciones de los iones Cl^- en los procesos de lixiviación no es claro, no obstante, se cree que está relacionado con el aumento de la porosidad de la capa de pasivación formada por los precipitados (Liang *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2012; Tao y Dongwei, 2014).

El impacto del cloruro sobre el crecimiento de las cepas tales como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *L. ferriphilum*, *S. metallicus* ha sido ampliamente investigado y se ha reportado que una cierta cantidad de cloruro en la solución de lixiviación, puede inhibir el crecimiento de los microorganismos hierro oxidantes (Harahuc *et al.*, 2000; Shiers *et al.*, 2005; Gahan *et al.*, 2009). En los procesos de biodesulfurización, la cantidad y la especie de cloruro empleada, debe ser probada experimentalmente con el fin, de balancear los beneficios del cloruro y la inhibición de la población microbiana.

1.4 Evolución de los procesos de biodesulfurización de carbón, empleando la cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans*

La biodesulfurización de carbón ha sido una técnica ampliamente estudiada. En general, las investigaciones se han centrado en evaluar los efectos de varios parámetros (ej. pH, temperatura, acidez, concentración de pulpa, tamaño de partícula, entre otros.) sobre la velocidad de disolución de la pirita utilizando *Acidithiobacillus ferrooxidans* como catalizador de la reacción, que genera el agente oxidante (Fe^{3+}). A continuación, se resume el origen y la evolución del proceso de biodesulfurización de carbón:

En 1947, Colmer y Hinkle realizaron uno de los primeros estudios sobre los drenajes ácidos de las minas de carbón bituminoso, debido a la contaminación y daños ambientales que éstos generaban. Las aguas se caracterizaban por tener un pH ácido, sulfatos e hierro. Uno de los intentos por resolver el problema de la acidez de los drenajes, planteaba la restricción del flujo de oxígeno y/o agua a las minas, con el fin de reducir tanto el volumen de las aguas ácidas como la cantidad de materiales disueltos. Los autores afirmaban que el color ámbar o color oxidado es una de las características más importantes de los drenajes ácidos, y es adquirido por la oxidación atmosférica de sulfato ferroso a sulfato férrico. Sin embargo, al finalizar el estudio determinaron que los microorganismos tenían un papel activo en la reacción anterior, propusieron que la formación de ácido sulfúrico dentro de la mina era debido a la acción microbiana y reportaron el aislamiento de dos microorganismos.

Posteriormente, Colmer *et al.* (1950) determinaron que uno de los microorganismos correspondía por sus propiedades morfológicas y fisiológicas con *Thiobacillus thiooxidans*, y se sugirió que este organismo era el responsable de la oxidación de azufre y compuestos reducidos de azufre a ácido sulfúrico. El segundo organismo estaba involucrado en la oxidación de sulfato ferroso a sulfato férrico, pero también se encontró que crecía en un medio carente de hierro con azufre amorfo similar a *Thiobacillus thiooxidans*, por lo que se clasificó en este género con el nombre de *Thiobacillus ferrooxidans*.

Zarubina *et al.* (1959) llevaron a cabo los primeros estudios de desulfurización de carbón empleando microorganismos e indicaron que 23% a 27% de azufre pirítico fue removido de las muestras de carbón en 30 días.

Otros investigadores encontraron una mayor eficiencia del proceso (40-50% de pirita oxidada) al disminuir el tamaño de partícula de las muestras de carbón y al adicionar pequeñas cantidades de sulfato férrico a la solución lixivante (Silverman *et al.* 1961; Lorenz y Tarpley, 1963; Clark, 1966). Silverman *et al.* (1961) removieron 43% de pirita de una muestra de carbón que contenía 4.5% de azufre total empleando *T. ferrooxidans*, en 3 días. Ford *et al.* (1971) removieron 80% de azufre pirítico después de 24 días de tratamiento. La inoculación de carbón con un cultivo de *At. ferrooxidans* redujo el contenido de azufre de 4 a 1.8% y de 5.47% a 2.47% en carbones con un tamaño de partícula -100# y -200# Tyler respectivamente.

Capes *et al.* (1973) propusieron un tratamiento físico (flotación convencional) y biológico y reportaron una remoción del 80% de azufre pirítico. Adicionalmente, indicaron que las propiedades de la superficie de la pirita y el carbón cambiaron durante la lixiviación microbiana, después de 3 días.

Myerson y Kline (1984) estudiaron la lixiviación de azufre pirítico de un carbón con 1.56% de azufre total, con *T. ferrooxidans*, empleando un reactor continuo de tanque agitado y variando la tasa de dilución (0.02 a 0.11h⁻¹) y el área de superficie del carbón (0.25 – 1 m²/mL). Sus resultados indican que la tasa de lixiviación bacteriana aumenta con el incremento de la superficie del carbón y la tasa de dilución, alcanzando 40% - 60% de pirita oxidada, en 2 días.

McCready y Zentilli (1985) realizaron un estudio de desulfurización variando el tamaño de partícula de un carbón (-325# hasta -10# Tyler), con alto contenido de azufre total (6.93%), empleando un cultivo de *T. ferrooxidans*, y obtuvieron una remoción del 96% de azufre pirítico para el menor tamaño de partícula, después de 57 días.

Beyer *et al.* (1986), evaluaron la influencia de la densidad de pulpa y el tipo de reactor sobre la desulfurización microbiana de un carbón bituminoso. Sus resultados indican que el crecimiento bacteriano y la oxidación de pirita pueden ser logrados al emplear hasta 20% de pulpa, 30°C y un reactor *airlift* modificado, y obtener una remoción de pirita de más del 94.7%, en 8 días.

Juszczak *et al.* (1995), analizaron el proceso de biodesulfurización de un carbón con alto contenido de azufre total (6.8%) empleando un cultivo de *T. ferrooxidans* variando la concentración de sulfato ferroso, la temperatura y la densidad de los sólidos, la mayor oxidación de pirita (54%) fue obtenida al emplear 2.4% p/v de carbón, 15g/L de sulfato ferroso, y 30°C, después de 7 días de experimentación.

En 2000, Kelly y Wood reclasificaron a *Thiobacillus ferrooxidans* de acuerdo con sus características en *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Aller *et al.* (2001) llevaron a cabo el proceso de biodesulfurización de carbones de diferente rango (lignito, bituminoso y antracita), empleando cepas nativas aisladas de los drenajes del mismo carbón (*Acidithiobacillus* spp. y *Leptospirillum* spp.). De acuerdo con los resultados se obtuvo una remoción de 70% a 90% de azufre pirítico, en 8 días.

Acharya *et al.* (2001) estudiaron el efecto de diferentes parámetros (porcentaje de pulpa, tamaño de partícula, temperatura y agitación) sobre el proceso de desulfurización de un carbón bituminoso (2-3% de azufre total), empleando cepas nativas compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Alcanzando 63.17% de remoción de azufre pirítico al emplear 2% p/v de sólidos, un tamaño de partícula -325# Tyler, 35 °C, y agitación de 140 r.p.m, después de 30 días.

Malik *et al.* (2002) emplearon una técnica combinada física (aglomeración) y biológica (*At. ferrooxidans*), sobre un carbón con 3.3% de azufre total. Logrando una alta remoción de azufre pirítico (82.7% - 99.1%) y un mayor poder calorífico, después de 2 horas.

Jorjani *et al.* (2004) estudiaron el proceso de desulfurización de un carbón (1.44% de azufre total) con un cultivo mixto de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *L. ferrooxidans*, tanto en erlenmeyers como en columnas empacadas, con el fin de determinar las condiciones óptimas de los procesos. En los experimento en matraces se alcanzó una remoción de azufre de 91.84% empleando un pH: 2, densidad de pulpa: 5%, temperatura: 30°C, agitación: 150 rpm, en 10 días. De otro lado, un 78% de azufre pirítico fue removido al utilizar columnas empacadas, después de 32 días de experimentación.

Cardona y Márquez (2008) llevaron a cabo un proceso de biodesulfurización empleando un cultivo nativo compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, sobre dos carbones colombianos con altos contenidos de azufre total (2.55% y 5.85%), variando el tamaño de partícula (-100# y -200# Tyler) Los resultados mostraron una reducción de azufre pirítico de (67% y 86%) y (77% y 96%) respectivamente, después de 30 días de experimentación.

Caicedo *et al.* (2012) llevaron a cabo un proceso de biodesulfurización en un tanque agitado con capacidad de 4000L, para un carbón colombiano con alto contenido de azufre (2.34%), empleando un cultivo bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, en condiciones ambientales, con un tamaño de partícula pasante 3/8". Alcanzando la máxima oxidación de pirita (59.22%), después de 4 días de proceso.

Peláez *et al.* (2013) evaluaron el proceso de biodesulfurización de carbón (2.34% de azufre total), adicionando relaciones iniciales de hierro férrico/ ferroso con sulfato férrico, empleando un cultivo de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, logrando una remoción de azufre pirítico de 65% -74% , después de 14 días.

1.5 Carbones de Córdoba – Colombia

El área carbonífera de Córdoba corresponde a la zona de San Jorge, ubicada entre los valles de los ríos San Jorge, San Pedro y Uré, limitados por las estribaciones de las serranías de San Jerónimo al oeste y Ayapel al este, comprende dos áreas que son la de la cuenca alta del río San Jorge al occidente, con una extensión de 500 Km² y la de San Pedro- Uré al oriente que tiene 265 Km². Los carbones se encuentran en las formaciones: Ciénaga de Oro y Cerritos, con presencia de 4 y 3 mantos, con espesores entre 0.80 a 3.50 metros y 0.70 a 2.80 metros respectivamente (UPME, 2008).

Córdoba es el tercer productor de carbón en el país después de la Guajira y el Cesar, con reservas probadas de 378.5 Mt (UPME, 2005). El carbón térmico explotado se considera de buena calidad (alto poder calorífico, bajo contenido de cenizas, Tabla 1-2 (INGEOMINAS, 2004).

Tabla 1-2: Calidad del carbón en Córdoba (INGEOMINAS, 2004).

| ZONA | AREA | SECTOR | BASE | HUMEDAD | Cz | MV | CF | St | PC | PC | PC | |
|---------|----------------|-----------------|------|---------|-------|------|-------|-------|--------|-------|---------|-------|
| | | | | % | % | % | % | % | BTU/Lb | MJ/Kg | Kcal/Kg | |
| Córdoba | Alto San Jorge | San Pedro Sur | BCA | HR | 14,49 | 9,24 | 37,55 | 38,73 | 1,31 | 9,280 | 21,62 | 5,160 |
| | | San Pedro Norte | BCA | HR | 14,49 | 9,24 | 37,55 | 38,73 | 1,31 | 9,280 | 21,62 | 5,160 |
| | | Alto San Jorge | BCA | HR | 14,49 | 9,24 | 37,55 | 38,73 | 1,31 | 9,280 | 21,62 | 5,160 |

En esta región sobresalen tres bloques carboníferos: Las Palmeras, la Escondía y la Guacamaya. La mina de carbón a cielo abierto “**La Guacamaya**”, propiedad de la empresa cementera ARGOS S.A, se encuentra ubicada en las coordenadas planas Norte 1.364.329 y Este 819.916, a 5 Km al oeste del casco urbano del municipio, produce alrededor de 500.000 ton de carbón anuales, de las cuales 120.000 están destinadas principalmente al proceso metalúrgico y a la fabricación de cementos (Figuroa *et al.*, 2010). La Figura 1-11 muestra los bloques carboníferos de la mina “La Guacamaya”.



Figura 1-11: Fotografías mina “La Guacamaya”, municipio de Puerto Libertador, Córdoba-Colombia.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar la influencia del cloruro férrico, sulfato férrico y sulfato ferroso como fuentes de hierro exógenas en un proceso de biodesulfurización de carbones, empleando la cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans*

2.2 Objetivos específicos

Determinar el efecto del sulfato férrico, sulfato ferroso y cloruro férrico sobre la cantidad de pirita oxidada y solubilizada.

Establecer la influencia de la proporción Fe^{3+}/Fe^{2+} sobre la cantidad de azufre inorgánico removido por la cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Explicar los cambios morfológicos de la pirita e Identificar fases minerales generadas durante el proceso, mediante técnicas de caracterización mineralógica.

Explicar los cambios que presentan algunos factores fisicoquímicos en los experimentos a mayor volumen.

3. Materiales y Métodos

3.1 Muestra de carbón

La muestra de carbón empleada en este estudio fue tomada de la mina “La Guacamaya”, propiedad de la empresa ARGOS S.A, ubicada en el municipio de Puerto Libertador, Córdoba-Colombia. El muestreo se hizo directamente del manto K, recolectándose la muestra en costales. La escogencia del manto del cual se tomó la muestra, se hizo con base en la información del porcentaje de azufre total suministrada por la empresa Argos y por análisis posteriores realizados en estudios previos (Caicedo, 2008; Cardona, 2008; Toro, 2014). En la Figura 3-1 se muestra la frente de explotación de la mina.



Figura 3-1: Frente de explotación mina “La Guacamaya”.

3.2 Preparación de la muestra

A la muestra tomada se le realizaron cuarteos sucesivos, con el fin de tener una muestra representativa para los experimentos propuestos. Posteriormente, se redujo el tamaño de grano mediante molino de bolas, hasta obtener un tamaño de partícula -60# *Tyler* (0.246 mm = 246 μ m).

3.3 Análisis químicos iniciales y caracterización mineralógica

Con el fin de evaluar las propiedades de la muestra tomada, se realizaron análisis químicos iniciales de las formas de azufre presentes en el carbón, así, como análisis próximos a la muestra (Humedad residual, cenizas, materia volátil, carbono fijo y capacidad calorífica bruta).

Para determinar los minerales presentes en los carbones, se hizo una caracterización mineralógica utilizando microscopía electrónica de barrido con analizador microquímico (SEM/EDX) y difracción de rayos X (DRX).

3.4 Selección de microorganismos

Del cepario del laboratorio de biominería y biohidrometalurgia de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, se tomó un aislado compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* proveniente del depósito de carbón de la mina “La Angostura” (Caicedo, 2008; Cardona, 2008); y un cepa comercial de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270), conservados a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los microorganismos se activaron metabólicamente en un medio de cultivo T&K (Caicedo, 2008; Cardona, 2008), adicionando 10% v/v de inóculo, con una concentración celular entre 10^7 - 10^8 células/mL, para un volumen de trabajo de 100 mL. Los ensayos se conservaron a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un agitador orbital a $180\text{ rpm} \pm 2\text{ rpm}$ (Kelly *et. al.*, 2000). La composición del medio se muestra en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1: Composición química del medio T&K empleado para el cultivo de microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y la cepa ATCC 23270.

| | Nutrientes | (g/L) |
|-------------------|--|-------|
| Medio Base | Sulfato de amonio (NH_4) SO_4 | 0.5 |
| | Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 0.5 |
| | Fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4) | 0.5 |
| Fuente de energía | Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 33.33 |

3.4.1 Identificación bioquímica del aislado compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Para corroborar la compatibilidad de la cepa escogida, se realizó una identificación bioquímica, descrita en el manual de Bergey (Staley *et al.*, 1994). Este método consiste en un monitoreo de crecimiento por oxidación de compuestos reducidos de hierro, en condiciones ácidas. Los sustratos usados para la serie bioquímica específica, con el fin de identificar el microorganismo de interés, fueron: tetratiónato, tiocianato, tiosulfato y sulfato ferroso. El concepto positivo se asume como un buen crecimiento de los microorganismos, por el cambio de color o la precipitación de compuestos insolubles.

Los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, mostraron ser positivos para tetratiónato, tiosulfato, sulfato ferroso (cambio de color a rojo) y azufre (precipitación del elemento insoluble) y negativos para el tiocianato (Cardona, 2008).

3.5 Adaptación

Después de que los microorganismos fueron activados metabólicamente, se procedió a adaptarlos al nuevo sustrato, con el fin de tener una mayor eficiencia y mejor actividad oxidativa en el proceso

de biodesulfurización, incrementando la pulpa de carbón y disminuyendo la concentración de sulfato ferroso, como se muestra en la Tabla 3-2. El carbón se pesó y se esterilizó en una autoclave a 120 °C y 1.36 atm durante 20 minutos, junto con los erlenmeyers y el medio de cultivo. Todos los ensayos se incubaron en un agitador orbital a 30 °C \pm 1 °C y 180 rpm \pm 2 rpm, por un periodo de 10 días.

Por último, se realizó un sub-cultivo en la etapa final a las mismas condiciones el cual tuvo una duración de 18 días.

Tabla 3-2: Etapas de adaptación para los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y la cepa ATCC 23270.

| Etapa | Medio base T&K (%v/v) | FeSO ₄ .7H ₂ O 33,33% (%v/v) | Carbón (%p/v) | Inóculo (%v/v) |
|-------|-----------------------|--|---------------|----------------|
| 1 | 80 | 10 | 2 | 10 |
| 2 | 80 | 10 | 4 | 10 |
| 3 | 80 | 10 | 6 | 10 |
| 4 | 80 | 10 | 8 | 10 |
| 5 | 80 | 10 | 10 | 10 |
| 6 | 82 | 8 | 10 | 10 |
| 7 | 84 | 6 | 10 | 10 |
| 8 | 86 | 4 | 10 | 10 |
| 9 | 88 | 2 | 10 | 10 |

El monitoreo de la adaptación se hizo mediante mediciones periódicas de pH y potencial de óxido-reducción (Eh), los cuales muestran indirectamente la fase de crecimiento en la que crecen dichos microorganismos (Cardona, 2008). Asumiendo que *Acidithiobacillus ferrooxidans* se encuentra en la fase exponencial cuando los valores de pH se encuentran entre 1.8 -2.0 o por debajo y el potencial redox alcanza valores por encima de los 500 mV (Caicedo, 2008). Cuando se alcanzaron valores similares se procedió a cambiar de etapa, siguiendo el mismo procedimiento. Durante el proceso de incubación cualquier pérdida de volumen se repuso añadiendo agua destilada estéril, al igual que antes de tomar la muestra para realizar los análisis.

3.6 Comparación entre una cepa aislada compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* vs. una cepa comercial de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270), en un proceso de desulfurización de carbón en suspensión.

La preparación de los ensayos se hizo en erlenmeyers de 500 mL, a un volumen de 200 mL, que contuvo medio T&K modificado (0.5 g/L de sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄], 0.5 g/L de fosfato ácido de di-potasio [KH₂PO₄], 0.5 g/L de sulfato de magnesio [MgSO₄] y sulfato ferroso [FeSO₄.7H₂O] al 33.33 % p/v), 10 % p/v de carbón y 10% v/v de inóculo (10⁷ – 10⁸ células/mL). El pH del medio se ajustó en 1.5 con ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N.

Las variables evaluadas fueron: (i) Concentración inicial de hierro en solución: 200 mg/L (C1) y 1200 mg/L (C2), mediante la adición de hierro ferroso; (ii) cultivo bacteriano: microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* (N) y la cepa ATCC 23270 (P). Los ensayos resultantes fueron: NC1, PC1, NC2, PC2. Cada ensayo se preparó por duplicado más un control negativo (abiótico) con medio de cultivo nutritivo en condiciones estériles. Los cultivos se incubaron a 30 °C ± 1 °C de temperatura, con agitación continua a 180 rpm ± 2 rpm durante 12 días, tiempo en el cual las bacterias alcanzaron la fase estacionaria. El diseño experimental empleado fue el 2^k completo con dos factores, el orden de los experimentos se muestra en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3: Tabla de experimentación de los ensayos propuestos empleando *Acidithiobacillus ferrooxidans* y concentraciones iniciales de hierro ferroso. P: cultivo comercial de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270); N: Microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans*; C1: 200 mg/L; C2: 1200 mg/L.

| Experimentos | Concentración | Microorganismos |
|--------------|---------------|-----------------|
| 1 | C1 | P |
| 2 | C2 | P |
| 3 | C1 | N |
| 4 | C2 | N |
| 5 | C1 | P |
| 6 | C2 | P |
| 7 | C1 | N |
| 8 | C2 | N |

Al finalizar el proceso, las muestras de carbón biooxidadas se sometieron a un análisis de formas de azufre y un análisis mineralógico de microscopía electrónica de barrido (SEM).

3.7 Influencia de la relación inicial de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, empleando sulfato férrico, cloruro férrico y una cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, en un proceso de biodesulfurización de carbón en suspensión.

Los ensayos se hicieron en erlenmeyers de 500 mL, con un volumen efectivo de 200 mL, compuesto de medio de cultivo T&K modificado (0.5 g/L de sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_3\text{SO}_4]$, 0.5 g/L de fosfato ácido de di-potasio $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$, 0.5 g/L de sulfato de magnesio $[\text{MgSO}_4]$ y sulfato ferroso $[\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$ al 33.33 % p/v), (el pH del medio se ajustó en 1.5), 10 % p/v de carbón y 10% v/v de inóculo bacteriano (ATCC 23270) ($10^7 - 10^8$ células/mL).

El proceso bioquímico se evaluó con base en la relación inicial $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ al medio de cultivo, variando las concentraciones de hierro total, como se describe a continuación:

- Fuentes de hierro férrico: sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 33.33%) (SF); cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 33.26%) (CF)
- Proporciones $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (empleando $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 33.33%): 20:80 (I); 50:50 (II) y 80:20 (III).
- Concentración inicial de hierro total: 200 mg/L (C1) y 1200 mg/L (C2).

De esta manera se obtuvieron los bioensayos: SFIC1, SFIIC1, SFIIC1, CFIC1, CFIC1, CFIC1 y SFIC2, SFIIC2, SFIIC2, CFIC2, CFIC2, CFIC2. Se empleó un diseño factorial completo general para llevar a cabo el proceso experimental como se muestra la Tabla 3-4. Además, de los ensayos propuestos se realizaron 12 ensayos más, correspondientes a los controles abióticos del sistema. Los cultivos se incubaron a $T^\circ\text{C}$ de $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, con agitación continua a $180 \text{ rpm} \pm 2 \text{ rpm}$ durante 12 días, tiempo en el cual las bacterias alcanzaron la fase estacionaria.

Tabla 3-4: Tabla de experimentación de los ensayos propuestos empleando *Acidithiobacillus ferrooxidans* y relaciones iniciales de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} . CF: Cloruro férrico; SF: Sulfato férrico; C1: 200 mg/L; C2: 1200 mg/L; I: Fe^{3+}/Fe^{2+} 20:80; II: Fe^{3+}/Fe^{2+} 50:50; Fe^{3+}/Fe^{2+} 50:50.

| Experimentos | Agentes químicos | Proporciones | Concentraciones |
|--------------|------------------|--------------|-----------------|
| 24 | CF | III | C2 |
| 13 | SF | I | C1 |
| 16 | SF | II | C2 |
| 14 | SF | I | C2 |
| 23 | CF | III | C1 |
| 12 | CF | III | C2 |
| 1 | SF | I | C1 |
| 5 | SF | III | C1 |
| 4 | SF | II | C2 |
| 9 | CF | II | C1 |
| 20 | CF | I | C2 |
| 15 | SF | II | C1 |
| 3 | SF | II | C1 |
| 21 | CF | II | C1 |
| 19 | CF | I | C1 |
| 17 | SF | III | C1 |
| 2 | SF | I | C2 |
| 7 | CF | I | C1 |
| 22 | CF | II | C2 |
| 10 | CF | II | C2 |
| 8 | CF | I | C2 |
| 18 | SF | III | C2 |
| 6 | SF | III | C2 |
| 11 | CF | III | C1 |

3.8 Análisis del proceso bioquímico a mayor escala usando tanques agitados

Una vez concluidos y analizados los resultados de los experimentos a nivel de erlenmeyer donde se evaluó la relación Fe^{3+}/Fe^{2+} , se seleccionó el ensayo que obtuvo mayor contenido de hierro en solución y/o mayor porcentaje de pirita oxidada, y se reprodujo en biorreactores agitados con capacidad para 5 L, Figura 3-2.

Inicialmente, se preparó un medio de cultivo T&K modificado (0.5 g/L de sulfato de amonio $[(NH_4)_3SO_4]$, 0.5 g/L de fosfato ácido de di-potasio $[KH_2PO_4]$, 0.5 g/L de sulfato de magnesio $[MgSO_4]$ y sulfato ferroso $[FeSO_4 \cdot 7H_2O]$ al 33.33 % p/v), a la cual se le adicionó 10% v/v de inóculo bacteriano ($10^7 - 10^8$ células/mL), y 10% p/v de carbón. El pH del medio fue ajustado a 1.5 con ácido sulfúrico (H_2SO_4).

Las condiciones de operación fueron 30 °C, una agitación de 400 ± 10 rpm, una aireación de 1 vvm y tiempo de proceso 12 días (Gómez y Cantero, 2002). Adicionalmente, se realizó un control (sin bacterias) bajo las mismas condiciones con fines comparativos.

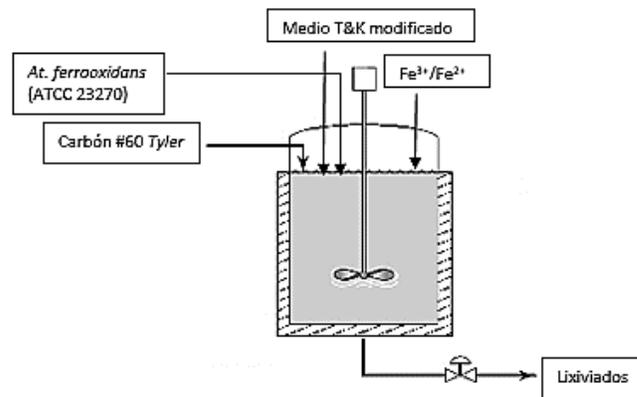


Figura 3-2: Esquema general del proceso de bioquímico de desulfurización de carbón, empleando biorreactores de tanque agitado con capacidad de 5 l y la adición inicial de una relación de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} .

Al finalizar el proceso, las muestras de carbón biooxidadas se sometieron a un análisis de formas de azufre y próximos, adicionalmente se realizó un análisis mineralógico con microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (DRX) y espectroscopía electrónica de barrido con transformada de Fourier (FTIR).

3.9 Análisis químicos

3.9.1 Análisis del carbón

Los análisis próximos iniciales fueron hechos bajo las normas ASTM D 3173- 11 (Humedad residual), ASTM D 3174 (cenizas), ISO 562 (materia volátil), ASTM D 3172-13 (carbono fijo) y ASTM D 5865 (Capacidad calorífica bruta).

Los análisis de las formas de azufre presente en el carbón al inicio y al final del proceso, se hicieron bajo la norma ASTM D 2492-02, siguiendo los pasos descritos para la medición de azufre total ASTM 4239-14. Tanto los análisis de las formas de azufre como los próximos se realizaron en el laboratorio de carbones de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

3.9.2 Análisis de la suspensión

El monitoreo de todos los ensayos se hizo a partir de mediciones de Eh, empleando un equipo SCHOTT Handylab con un electrodo ORP Schott PT6880 de Ag/AgCl, y pH, utilizando equipo HACH HQ40d, con un electrodo intelliCAL™ pH301. Adicionalmente, se hizo recuento directo en placa celular empleando un microscopio biológico marca Olympus CX 31, con objetivo 40X y una cámara de Neubaüer, con volumen 1/10 marca BOECO.

Posteriormente, las suspensiones fueron centrifugadas, en un equipo DAMON IEC DIVISION (modelo CU-5000) a 3500 rpm por 10 minutos, con el fin de separar las fracciones sólida y líquida para analizar en la solución en un espectrofotómetro marca GENESYS™ 10 UV de barrido, por el método colorimétrico o-fenantrolina (ASTM E394 – 09).

3.10 Análisis mineralógicos

Con el fin, de determinar las fases mineralógicas que tuvieron lugar durante el proceso de biodesulfurización, el carbón resultante fue sometido a un análisis mineralógico con microscopía electrónica de barrido (SEM/EDS), difracción de rayos X (DRX) y espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

3.10.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica se basa en el principio de microscopía óptica en el que se sustituye el haz de luz con un haz de electrones, con la cual se consigue una resolución muy superior a la obtenida por cualquier otro instrumento óptico (100 Å). (Zhan, 2008).

Esta técnica requiere de una muestra o “pulido”. El pulido consiste básicamente en una resina epóxica en la cual se monta la(s) muestra(s). Este se somete a un proceso de desbaste inicialmente con lijas abrasivas de carburo de silicio de grano 240, 320, 400, 600 y 1000, hasta obtener una

superficie totalmente plana. Luego, este se pasa por una serie de paños de pulido y suspensiones de alúmina de 3 μm , 1 μm y 0.5 μm , con el fin de obtener una superficie plana sin ralladuras (acabado de espejo). Este procedimiento se realizó bajo la norma ASTM D 2797.

Debido a que la muestra (carbón) no tiene propiedades conductoras, esta fue recubierta con una fina capa de oro. La técnica de recubrimiento “sputtering” o pulverización catódica, se realizó con un equipo Sputter Coater Denton Vacuum Desk III, con una intensidad de 30 mA , y un tiempo de metalización de 120 s, Figura 3-3.

Finalmente, el pulido se analizó en un microscopio electrónico de barrido (SEM: Scanning Electron Microscopy) marca JEOL JSM 5910 LV, en modo de observación BSE (Electrones retro-proyectados), con un voltaje de aceleración 15 Kv – 20Kv y un tiempo de captación de señal de 60s. Adicionalmente, se utilizó un detector EDS (Energy Dispersive X ray Spectrometer) Oxford modelo 7324 para realizar los análisis microquímicos de la muestra.



Figura 3-3: Pulido con algunas de las muestras de carbón de interés, para análisis con microscopía electrónica de barrido (SEM).

3.10.2 Difracción de rayos X (DRX)

Esta técnica es utilizada para el estudio de las fases minerales obtenidas durante el proceso de biodesulfurización de carbón (Ward y French, 2004; Lu *et al.*, 2001). Mediante ésta, es posible determinar con mayor precisión los minerales presentes debido a que los patrones de difracción son característicos para cada sustancia según la naturaleza tridimensional de los cristales y los átomos constituyentes, siempre y cuando estas se encuentren en proporciones relativamente altas y sean de carácter cristalino (Ward *et al.*, 2001; Huggins, 2002; Shao *et al.*, 2003).

Para llevar a cabo la técnica es necesario elaborar una pastilla, hechas a partir del carbón obtenido por cada experimento al finalizar el proceso de desulfurización biológica, el cual es macerado en mortero de ágata hasta obtener un tamaño de partícula -200# *Tyler* (0.075 mm), Figura 3-4.

El análisis se realizó en un difractómetro de rayos X marca RIGAKU MINIFLEX II DESKTOP. Todos los difractogramas se hicieron bajo las mismas condiciones, voltaje y corriente de 30 kV y 15 mA, respectivamente, empleando el método paso a paso. El ángulo de barrido fue de 10° - 60° , con un tamaño de paso de 0.04° , un tiempo de conteo por paso de 6 segundos, y una configuración $\theta - 2\theta$. Los difractogramas fueron analizados con el programa X'Pert High Score Plus y la base de datos PDF2.



Figura 3-4: Pastillas con la muestra de carbón para análisis con difracción de rayos X (DRX).

3.10.3 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica se fundamenta en la interacción de las radiaciones electromagnéticas y vibraciones moleculares; es útil para detectar fases minerales que por su carácter amorfo o su baja cristalinidad no son fácilmente identificadas mediante DRX. Adicionalmente, esta técnica arroja información sobre la fracción orgánica la cual no es detectable mediante las técnicas explicadas anteriormente.

Para estos análisis se fabricó una pastilla de KBr con la muestra. La pastilla está compuesta de 1 mg de la muestra previamente macerada en mortero de ágata hasta obtener un tamaño de partícula - 200# Tyler (0.075 mm) (Sobkowiak y Painter, 1995). Luego se mezcló con 100 mg de Bromuro de potasio (KBr) seco (a 120°C durante 5h, con el fin de eliminar el exceso de agua presente). La muestra homogeneizada, empleando una prensa hidráulica con una presión total de 10 toneladas, Figura 3-5.

Las pastillas obtenidas fueron utilizadas para correr los espectros, empleando un espectrómetro Advantage FTIR 8400 SHIMADZU, en modo de transmisión. El número total de *scans* fue 48, con resolución espectral de 4cm^{-1} , en un rango de longitud de onda entre $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, con corrección Happ - Henzel. Los espectros fueron tratados utilizando el software IR-Solution.



Figura 3-5: Pastillas de KBr que contienen algunas muestras de carbón para el análisis con FTIR.

4. Resultados

4.1 Análisis químicos y mineralógicos de la muestra

4.1.1 Análisis químicos

En la Tabla 4-1, están reportados cada uno de los análisis próximos y cada una de las formas de azufre presentes en el carbón objeto de estudio.

Tabla 4-1: Análisis próximos y formas de azufre presentes en el carbón.

| Análisis | Unidades | Resultados |
|-------------------------------|----------|------------|
| Azufre orgánico | % | 1.10 |
| Azufre pirítico | % | 1.06 |
| Azufre sulfatos | % | 0.14 |
| Azufre total | % | 2.30 |
| Cenizas | % | 5.50 |
| Carbono fijo | % | 40.10 |
| Materia Volátil | % | 40.20 |
| Humedad residual | % | 14.20 |
| Poder calorífico - Base bruta | cal/g | 5730 |

Por medio de los análisis próximos fue posible determinar el rango del carbón, aplicando la norma ASTM D388 – 12, con base en el porcentaje de carbono fijo y materia volátil en base seca libre de materia mineral (Imm) y del poder calorífico en base libre de materia mineral, calculados a partir de las fórmulas de Parr (Ecuaciones (4.1) a (4.3)) (ASTM, 2014). La Tabla 4-2 muestra la clasificación de los carbones por rango, según la norma ASTM D388 -12.

$$Cf_{stm} = \frac{100(Cf - 0.15S)}{100 - (H + 1.08A + 0.55S)} \quad (4.1)$$

$$Mv_{stm} = 100 - Cf_{stm} \quad (4.2)$$

$$Pc_{tm} = \frac{100(1.8Pc_b - 50S)}{[100 - (1.08A + 0.55S)]} \quad (4.3)$$

A: %Cenizas

Cf: %Carbono fijo.

Cf_{slm}: %Carbono fijo en base seca libre de materia mineral.

H: % Humedad.

Mv_{slm}: %Materia volátil en base seca libre de materia mineral

Pc_b: Poder calorífico en base bruta (cal/g).

Pc_{lm}: Poder calorífico en base libre de materia mineral (Btu/lb).

S: %Azufre total.

Tabla 4-2: Clasificación de los carbones por rango, norma ASTM D388 – 12.

| Class/Group | Fixed Carbon Limits (Dry, Mineral-Matter-Free Basis), % | | Volatile Matter Limits (Dry, Mineral-Matter-Free Basis), % | | Gross Calorific Value Limits (Moist, ^a Mineral-Matter-Free Basis) | | | | Agglomerating Character |
|---------------------------------|---|--------------|--|-----------------------|---|-----------|-----------------------------|-----------|--|
| | Equal or Greater Than | Less Than | Greater Than | Equal or Less Than | Btu/lb | | Mj/kg ^c | | |
| | | | | | Equal or Greater Than | Less Than | Equal or Greater Than | Less Than | |
| Anthracitic: | | | | | | | | | |
| Meta-anthracite | 98 | ... | ... | 2 | ... | ... | ... | ... | } nonagglomerating |
| Anthracite | 92 | 98 | 2 | 8 | ... | ... | ... | ... | |
| Semianthracite ^d | 86 | 92 | 8 | 14 | ... | ... | ... | ... | |
| Bituminous: | | | | | | | | | |
| Low volatile bituminous coal | 78 | 86 | 14 | 22 | ... | ... | ... | ... | } commonly agglom- erating ^e |
| Medium volatile bituminous coal | 69 | 78 | 22 | 31 | ... | ... | ... | ... | |
| High volatile A bituminous coal | ... | 69 | 31 | ... | 14 000 ^f | ... | 32.557 | ... | |
| High volatile B bituminous coal | ... | ... | ... | ... | 13 000 ^f | 14 000 | 30.232 | 32.557 | |
| High volatile C bituminous coal | ... | ... | ... | ... | 11 500 | 13 000 | 26.743 | 30.232 | |
| | | | | | 10 500 | 11 500 | 24.418 | 26.743 | } agglomerating |
| Subbituminous: | | | | | | | | | |
| Subbituminous A coal | ... | ... | ... | ... | 10 500 | 11 500 | 24.418 | 26.743 | } nonagglomerating |
| Subbituminous B coal | ... | ... | ... | ... | 9 500 | 10 500 | 22.09 | 24.418 | |
| Subbituminous C coal | ... | ... | ... | ... | 8 300 | 9 500 | 19.30 | 22.09 | |
| | | | | | | | | | |
| Lignitic: | | | | | | | | | |
| Lignite A | ... | ... | ... | ... | 6 300 ^g | 8 300 | 14.65 | 19.30 | } nonagglomerating |
| Lignite B | ... | ... | ... | ... | ... | 6 300 | ... | 14.65 | |

Esta clasificación es aplicable a esta muestra de carbón ya que en trabajos anteriores, se observó que se compone en su mayoría por vitrinita (69%) (Toro, 2014). Los valores obtenidos de carbono fijo y materia volátil en base seca de materia mineral y poder calorífico en base libre, se muestran en la Tabla 4-3. De acuerdo con estos valores se puede decir que el carbón empleado es de tipo sub-bituminoso A.

Tabla 4-3: Valores de carbono fijo y materia volátil en base seca libre de materia mineral y poder calorífico en base libre de materia mineral, del carbón muestreado.

| | Unidades | Carbón |
|--------------------------|----------|--------|
| Carbono fijo- seco-lmm | % | 50.58 |
| Materia volátil-seco-lmm | % | 49.42 |
| Poder calorífico- lmm | Btu/lb | 10990 |

4.1.2 Caracterización mineralógica inicial

La Figura 4-1 muestra el difractograma obtenido para la muestra de carbón, la cual evidenció principalmente pirita, así, como otros minerales del grupo de los silicatos como ilita ((K,H₃O)(Al, Mg, Fe)₂(Si, Al)₄O₁₀ [(OH)₂(H₂O)]), moscovita (KAl₂ (AlSi₃O₁₀ (OH)₂), Nacrita (Al₂Si₂O₅(OH)₄) y Cordierita ((Mg,Fe)₂(Si₅Al₄O₁₈).nH₂O). También se evidenció dolomita (CaMg (CO₃)₂) y yeso (CaSO₄. 2H₂O).

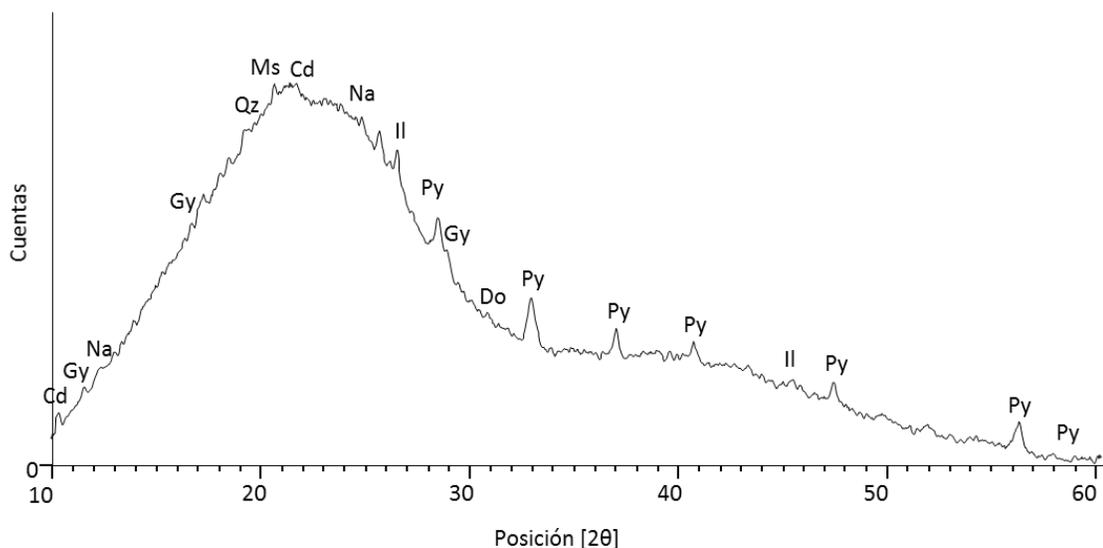
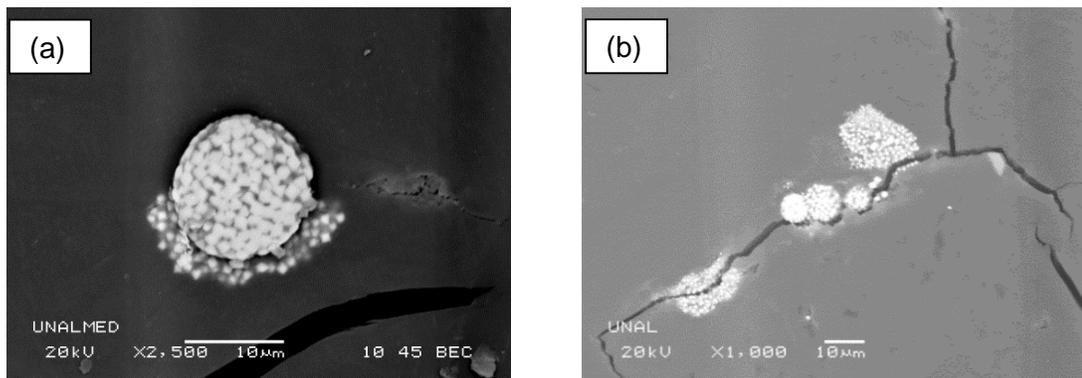


Figura 4-1: Difractograma de rayos X de la muestra de carbón inicial. Cd: cordierita, Gy: yeso, Na: nacrita, Ms: moscovita, Py: pirita, Il: ilita, Do: dolomita, Qz: cuarzo.

La Figura 4-2 muestra la morfología y distribución de la pirita en el carbón por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM).



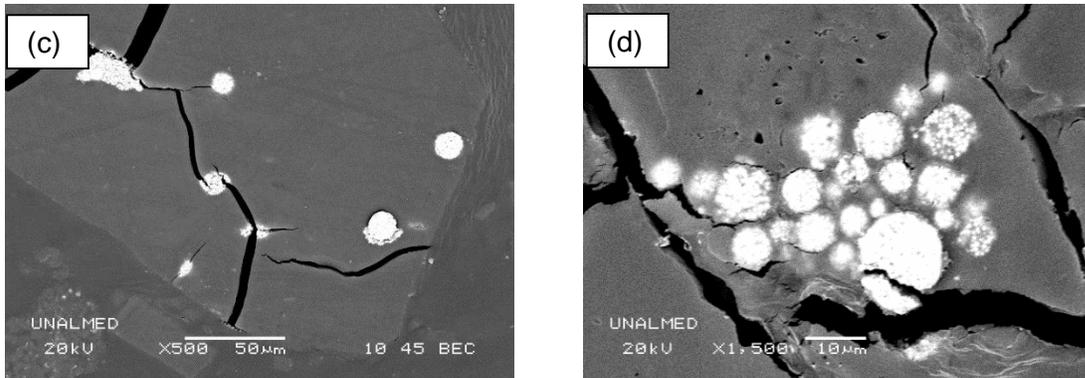


Figura 4-2: Formas de pirita presentes en el carbón. (a.) Framboide conformado por cristales cubicos (2500 X), (b, c.) Framboides de diferentes tamaños ubicados en las zonas de fractura del carbón (1000 X - 500 X), (d.) Framboides de diferentes tamaños (1500 X).

Se observó la presencia de aglomerados de pirita de hábito framboidal, los cuales se encontraron principalmente ubicados en las zonas de fractura del carbón. Los cúmulos existentes presentaron diferentes tamaños. Los cristales individuales que conforman los framboides tienen formas cúbicas y hexagonales con tamaños que oscilan aproximadamente entre $0.25\ \mu\text{m}$ y $1.20\ \mu\text{m}$ (Caicedo, 2011).

Adicionalmente, la Figura 4-3 muestra que la pirita también se presentó en forma de cristales eudrales y subdrales diseminados y relleno de la matriz del carbón.

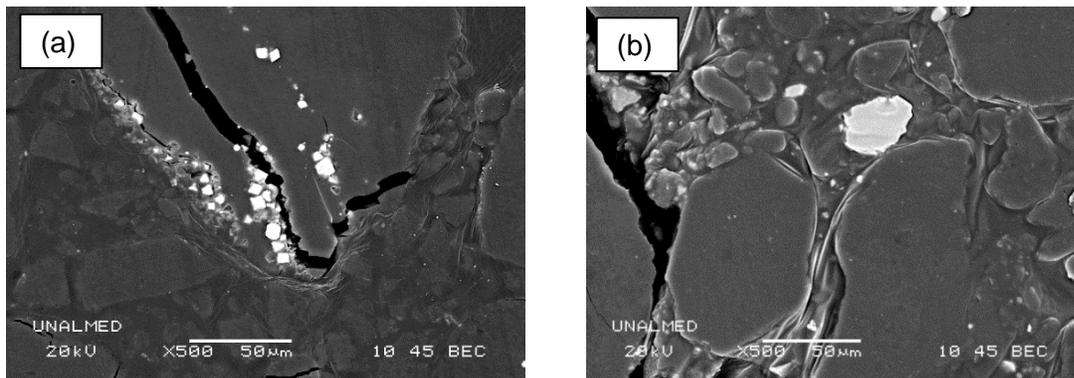


Figura 4-3: Pirita. (a.) Microcristales de pirita aislados presentes cerca de las fracturas del carbón (500 X), (b.) Grano de pirita sobre la matriz del carbón (500 X).

Las Figuras 4-4 y 4-5 muestran los microanálisis químicos de la muestra de carbón sin tratar, usando EDS. Se encontró que las piritas presentes son bastante puras, detectándose únicamente hierro y azufre en su composición, en una relación aproximada 1:2 en porcentaje atómico, de acuerdo con su forma estequiometría (FeS_2), además no se evidenció ningún otro elemento en la fase sólida mediante esta técnica.

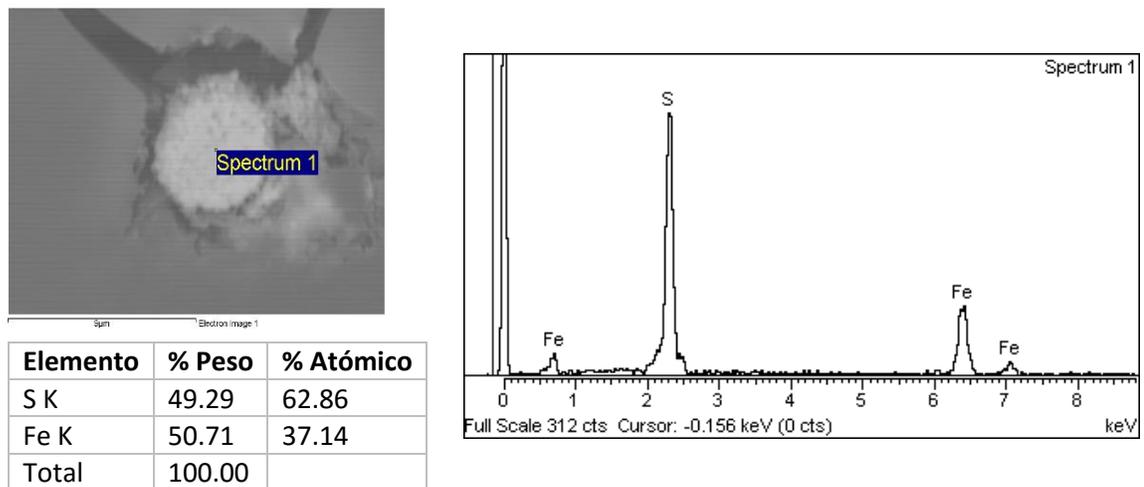


Figura 4-4: Análisis microquímico EDS sobre un framboide conformado por cristales euedrales de pirita.

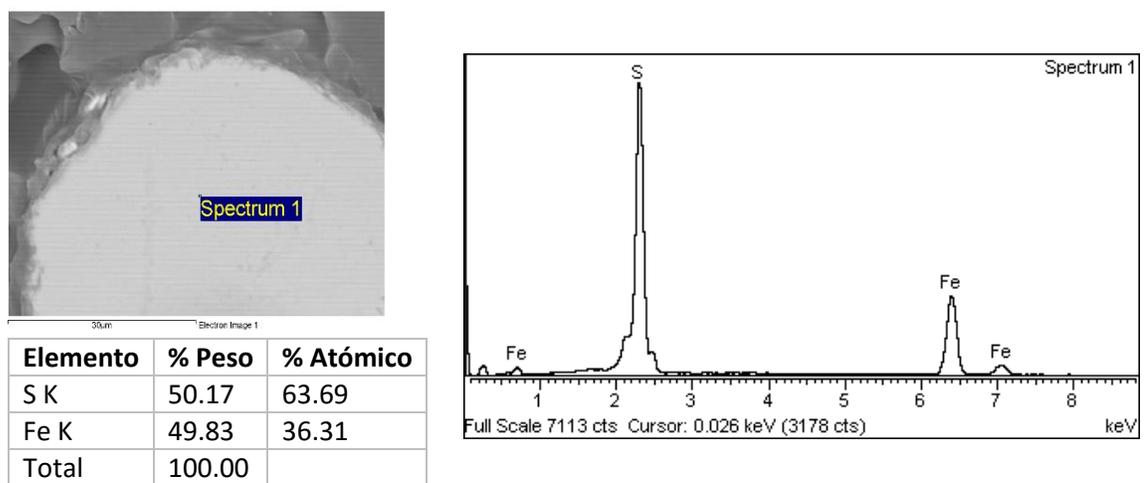


Figura 4-5: Análisis microquímico EDS sobre un cristal de pirita de la muestra de carbón sin tratar.

4.2 Adaptación

Las Figuras 4-6 a 4-9 muestran el comportamiento del pH en el tiempo para los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y la cepa comercial ATCC 23270, durante la adaptación a mayores cantidades de carbón y a la disminución gradual del sulfato ferroso soluble, de acuerdo con la metodología propuesta (Tabla 3-2). A nivel general, se evidenció un comportamiento típico de incremento en el valor en los primeros días del proceso, seguido por una disminución la cual disminuye su pendiente a partir del cuarto día.

Los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* mostraron un aumento en los valores de pH los primeros dos días, como se muestra en la Figura 4-6. El mayor valor (pH: 2.60) fue evidenciado para el bioensayo al cual se le adicionó mayor porcentaje de pulpa (E 10% carbón). Posteriormente, se presentó una caída en los valores de todos los experimentos, siendo que el ensayo con menor concentración de pulpa (E 2% carbón) mostró el menor valor de pH (pH: 1.75), tendencia que se mantuvo hasta finalizar el proceso. Vale la pena resaltar, que el aumento en los valores de pH fue directamente proporcional a la concentración de carbón disponible en el ensayo. Adicionalmente, se determinó que al suministrar bajas concentraciones de pulpa se obtiene un menor pH al finalizar el proceso. De otro lado, los controles (ensayos abióticos) también mostraron un aumento en los valores (día dos), no obstante, estos se mantuvieron constantes hasta finalizar el proceso alrededor de 2.50.

El cultivo comercial (ATCC 23270) evidenció una tendencia similar a la exhibida por los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, caracterizada por un aumento inicial en los valores de pH. Los ensayos con mayor concentración de carbón (E 8% y E 10% de carbón), mostraron los mayores valores de pH (2.5 y 2.6 respectivamente). A partir del día dos, se evidencia una caída estrepitosa en los valores de pH, principalmente, en el ensayo con menor porcentaje de pulpa (E 2% carbón) (pH: 1.78), en comparación con los bioensayos en los cuales se usó mayores concentraciones de carbón (pH: 1.90). Por otro lado, los controles mantuvieron los valores constantes durante todo el proceso a partir del segundo día (pH: 2.40).

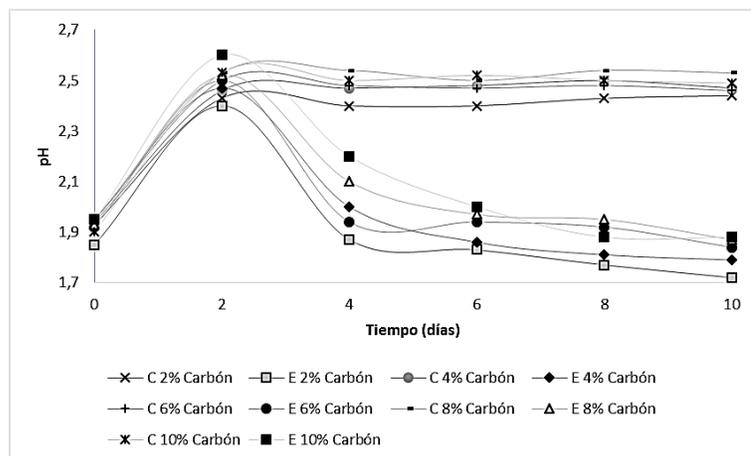


Figura 4-6: Comportamiento del pH vs. tiempo para las cinco primeras fases de adaptación de los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* al carbón (% carbón hace referencia a la cantidad de pulpa empleada; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico).

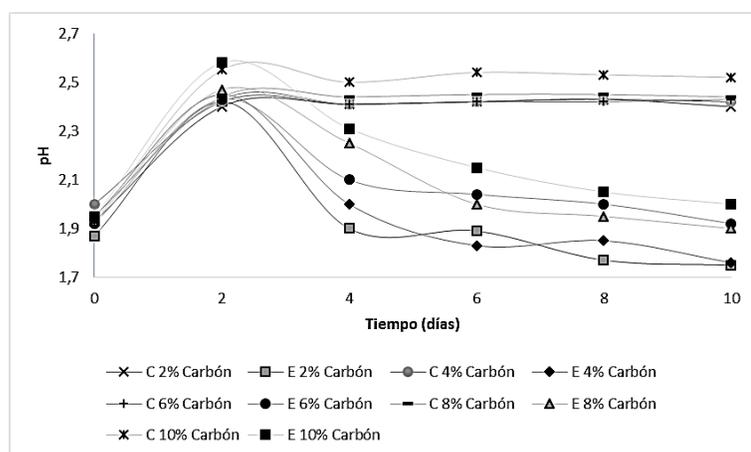


Figura 4-7: Comportamiento del pH vs. tiempo para las cinco primeras fases de adaptación de la cepa comercial ATCC 23270 al carbón (% carbón hace referencia a la cantidad de pulpa empleada; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico).

La curva de adaptación a la disminución gradual de sulfato ferroso de los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* se muestra en la Figura 4-8. En esta se puede observar un comportamiento caracterizado por un aumento en los valores de pH al segundo día, el cual fue mayor (2.40), para el ensayo con mayor porcentaje de sulfato ferroso (E 8% FeSO_4). A partir, del día cuatro, esta tendencia se invirtió y es este ensayo el que alcanzó los menores valores de pH (1.70). Es importante hacer notar, que el ensayo con menores concentraciones de sulfato ferroso (E 2% FeSO_4), evidenció un incipiente incremento en los valores al iniciar del proceso de adaptación (pH: 2.05), pero la disminución en los valores de pH a partir del cuarto día no fue tan marcada (pH: 1.90). Respecto a los controles abióticos, fue posible observar que el aumento en los

valores de pH al iniciar el proceso fue directamente proporcional al porcentaje de sulfato ferroso disponible en la solución. No obstante, estos ensayos se mantienen sin mayores cambios (tendencia constante) después del cuarto día.

La curva de pH para el cultivo comercial muestra un comportamiento similar al evidenciado por los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Sin embargo, en este caso los valores de pH alcanzados al finalizar el proceso no son tan bajos como los obtenidos por los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Al iniciar el proceso, los ensayos con mayor concentración de sulfato ferroso mostraron los mayores valores de pH, alrededor de 2.40, mientras los ensayos E 2% FeSO₄ mostraron un leve incremento en los valores durante esa misma etapa. Posteriormente, el ensayo con mayores concentraciones de sulfato ferroso (E 8% FeSO₄), finalizó el proceso con un pH 0.10 unidades por debajo del valor inicial. Por último, el ensayo con menor concentración de sulfato ferroso (E 2% FeSO₄), presentó una leve disminución en los valores de pH, estabilizándose alrededor de 1.95.

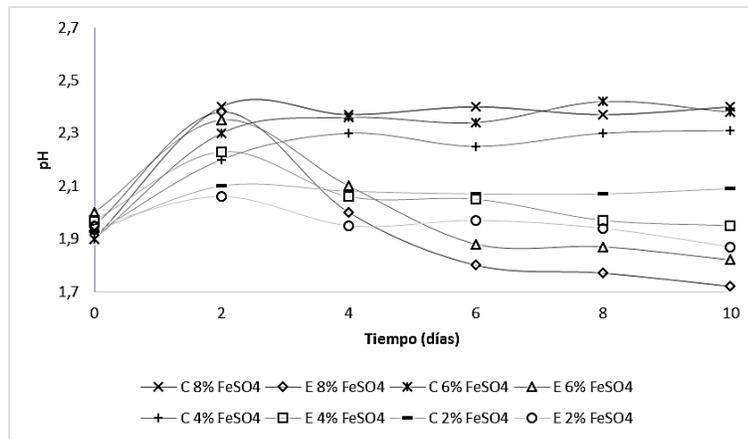


Figura 4-8: Comportamiento del pH vs. tiempo durante la adaptación de los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* a sulfato ferroso (% FeSO₄ hace referencia a la cantidad adicionada de una solución de FeSO₄ · 7H₂O al 33.33%; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico).

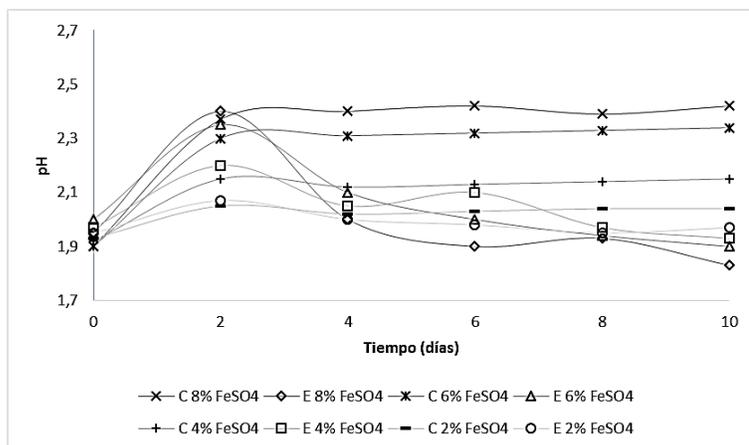


Figura 4-9: Comportamiento del pH vs. tiempo durante las cuatro etapas de adaptación de ATCC 23270 a menores cantidades de sulfato ferroso (% FeSO₄ hace referencia a la cantidad adicionada de una solución de FeSO₄·7H₂O al 33.33% ; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico).

Las Figuras 4-10 a 4-13 muestran las curvas del comportamiento del Eh en el tiempo para los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y la cepa comercial ATCC 23270, durante la adaptación a mayores cantidades de carbón y a la disminución gradual del sulfato ferroso soluble.

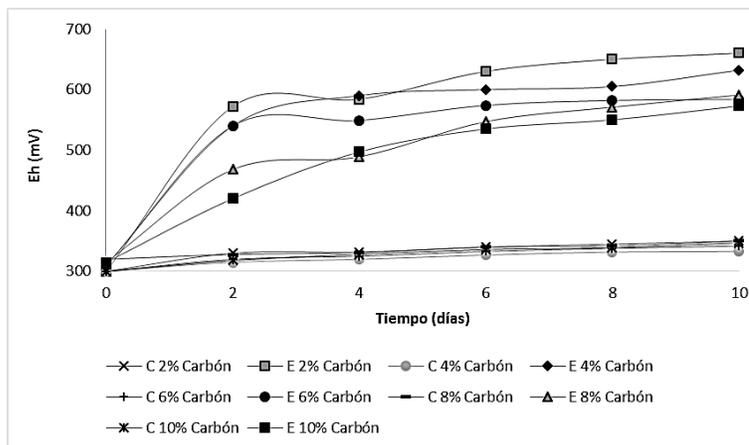


Figura 4-10: Comportamiento del Eh vs. tiempo para las etapas de adaptación de los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* al carbón (% carbón hace referencia a la cantidad de pulpa empleada; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico).

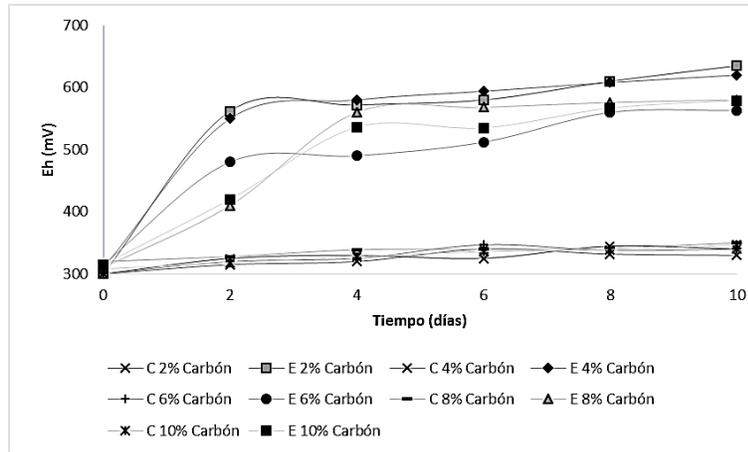


Figura 4-11: Comportamiento del Eh vs. tiempo para las etapas de adaptación de ATCC 23270 al carbón (% carbón hace referencia a la cantidad de pulpa empleada; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico).

Los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* mostraron un crecimiento exponencial en los valores de Eh, los primeros días del proceso, especialmente los ensayos en los cuales se adicionó menores porcentajes de carbón (E 2% y E 4% de carbón), lo cual se relaciona indirectamente con comportamiento del pH en el mismo periodo. En contraste, los bioensayos con mayores porcentajes de pulpa presentaron un incremento menor. Después del día cuatro los ensayos tienden a estabilizar sus valores, los cuales fueron mayores a la menor concentración de pulpa. Cabe mencionar, que el bioensayo con mayor porcentaje de pulpa (E 10% carbón), alcanzó un Eh de 573 mV, después de 8 días de experimentación. Adicionalmente, los controles no presentaron cambios significativos durante todo el proceso.

El comportamiento del Eh de la cepa comercial a mayores concentraciones de carbón es similar al obtenido para los microorganismos nativos. En este caso, los ensayos con menores concentraciones de carbón (E 2% y E4%) mostraron un rápido incremento (día dos) en los valores. En contraste, los ensayos con mayores concentraciones de pulpa (E 8% y E 10%) alcanzaron valores semejantes solo después del cuarto día de proceso. Los bioensayos mantuvieron una tendencia de crecimiento constante hasta finalizar la experimentación, la cual no sobrepasó los 580 mV, con excepción con menor porcentaje de carbón (E 2% y E 4% carbón) que alcanzaron un Eh de 610 mV. De otro lado, los controles no presentaron cambios significativos durante todo el proceso.

El comportamiento del Eh en la adaptación a la disminución gradual de sulfato ferroso de los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* se muestra en la Figura 4-12. En esta es posible observar un aumento en los valores hasta 550 mV los primeros dos días, principalmente para los ensayos con mayores concentraciones de sulfato ferroso (E 8% FeSO_4 y E 6% FeSO_4). En contraste, los ensayos E 2% FeSO_4 y E 4% FeSO_4 mostraron valores bajos de Eh en el mismo periodo (460 mV). No obstante, luego del cuarto día todos los experimentos tuvieron un comportamiento similar culminando el proceso alrededor de 580 mV. De otro lado, en los controles

se evidenció que los valores fueron inversamente proporcional a la concentración de hierro ferroso inicial, además, los valores de Eh de estos ensayos se mantuvieron sin cambios durante la experimentación.

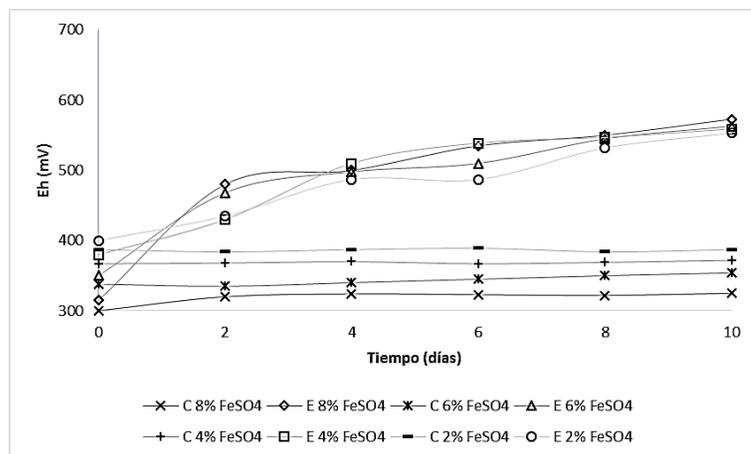


Figura 4-12: Comportamiento del Eh vs. tiempo durante la fase de adaptación de los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* a menores cantidades de sulfato ferroso (% FeSO₄ hace referencia a la cantidad adicionada de una solución de FeSO₄. 7H₂O al 33.33% ; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico).

El comportamiento del Eh del cultivo comercial a la disminución gradual de sulfato ferroso, se muestra en la Figura 4-13. Se pudo observar que los ensayos con menores concentraciones de sulfato ferroso (E 4% FeSO₄ y E 2% FeSO₄) presentaron un incremento lento en los valores del Eh. Sin embargo, todos los ensayos mostraron valores de Eh alrededor de 560 mV después del cuarto día. Los controles, se mantuvieron constantes durante el proceso de adaptación a sulfato ferroso.

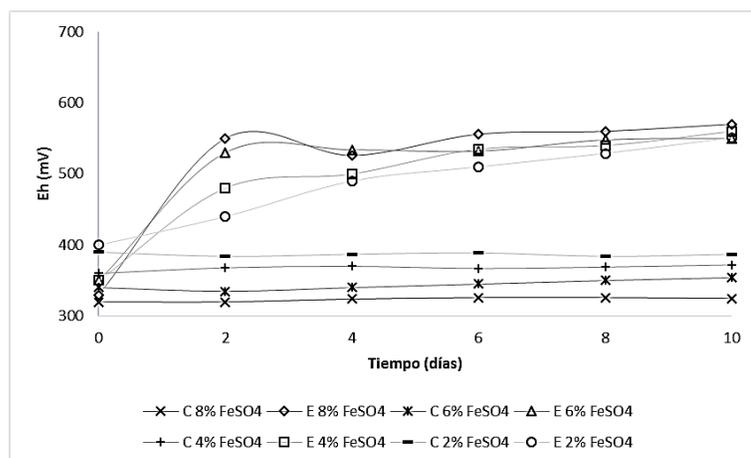


Figura 4-13: Comportamiento del Eh vs. tiempo durante la fase de adaptación de ATCC 23270 a menores cantidades de sulfato ferroso (% FeSO_4 hace referencia a la cantidad adicionada de una solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 33.33% ; C: ensayo abiótico, E: ensayo biótico).

Las Figuras 4-14 y 4-15, muestran los resultados obtenidos de pH y Eh en el tiempo, para los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y la cepa ATCC 23270, sub-cultivados en última etapa de adaptación (10% de carbón y 2% de FeSO_4) durante 18 días, con el fin de analizar el comportamiento de las bacterias en un tiempo mayor.

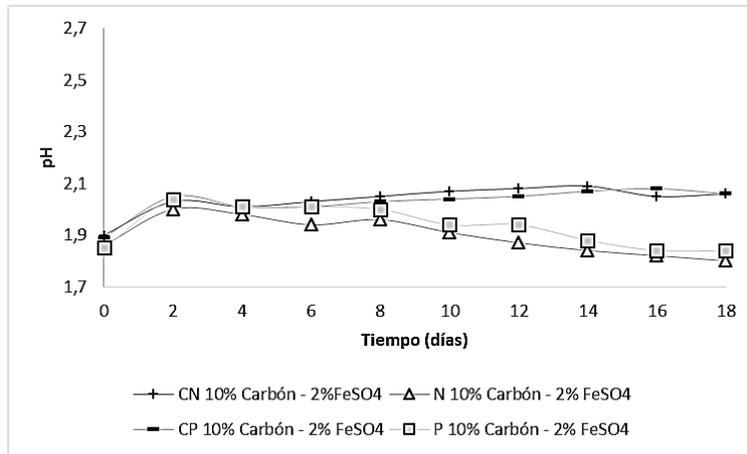


Figura 4-14: Comportamiento del pH vs. tiempo para los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y ATCC 23270, en la última etapa de adaptación a 2% de FeSO_4 y 10% de carbón (% FeSO_4 hace referencia a la cantidad adicionada de una solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 33.33% y % carbón hace referencia a la cantidad de pulpa empleada). C: ensayo abiótico, N: microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, P: cepa ATCC 23270.

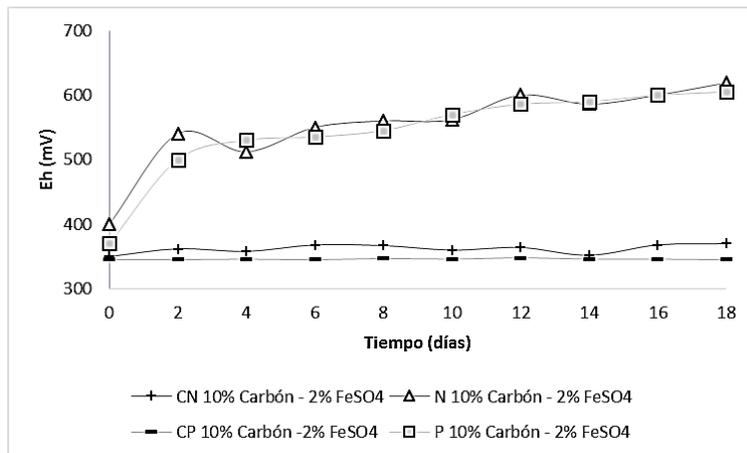


Figura 4-15: Comportamiento del Eh vs. tiempo para los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y ATCC 23270, en la última etapa de adaptación a 2% de FeSO_4 y 10%

de carbón (% FeSO_4 hace referencia a la cantidad adicionada de una solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 33.33% y % carbón hace referencia a la cantidad de pulpa empleada). C: ensayo abiótico, N: microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, P: cepa ATCC 23270.

Se evidenció que ambas cepas mostraron resultados similares tanto para el pH como para el Eh. El pH presentó un aumento incipiente los primeros días (2.08). Entre el día dos y el día cuatro, los ensayos mostraron una caída en los valores (1.95), el ensayo inoculado con los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* evidenció los menores valores de pH (1.70), al finalizar el proceso. En cuanto al Eh, este aumentó rápidamente los primeros días obteniendo valores entre 500 mV y 550 mV, el mayor valor fue alcanzado por el cultivo bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, posteriormente, los ensayos continuaron con una tendencia creciente hasta finalizar el proceso alrededor de 610 mV. Los controles abióticos no presentaron cambios significativos.

4.3 Comparación entre una cepa aislada compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* vs. una cepa comercial de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270), en un proceso de desulfurización de carbón en suspensión.

4.3.1 Medidas de pH y Eh

El comportamiento del pH vs. tiempo se muestra en la Figura 4-16. En general, los primeros dos días del proceso se evidenció un aumento en los valores de pH, los ensayos en los cuales se utilizó el cultivo comercial PC1 y PC2 alcanzaron los mayores valores de pH (2.10 y 2.20 respectivamente), frente a los ensayos en los cuales se empleó el cultivo bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* (NC1: 1.9 y NC2: 2.05). Vale la pena mencionar que al adicionar una mayor concentración de sulfato ferroso inicial (1200 mg/L), se observaron mayores valores de pH durante los primeros días, en comparación con sus respectivos análogos de menor concentración.

Entre los días dos y cuatro, la curva presenta una caída en los valores de pH en todos los bioensayos, especialmente, en los cuales se empleó una mayor concentración de sulfato ferroso inicial (1200 mg/L), este comportamiento se evidenció tanto para el cultivo comercial(PC2: 1.8), como para el aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* (NC2: 1.76), tendencia que se mantuvo hasta finalizar el proceso.

Vale la pena mencionar, que los ensayos en los cuales se utilizó el aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, presentaron los menores valores de pH en las dos concentraciones de sulfato ferroso estudiadas (NC1: 1.52 y NC2: 1.47), después de doce días de experimentación. Así pues, los menores valores de pH fueron obtenidos al emplear microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y una mayor concentración de hierro ferroso inicial.

Por otra parte, los controles presentaron un aumento en los valores de pH los primeros dos días del proceso, posteriormente, el pH se mantuvo sin mayores cambios, finalizando el proceso con un pH cercano al inicial.

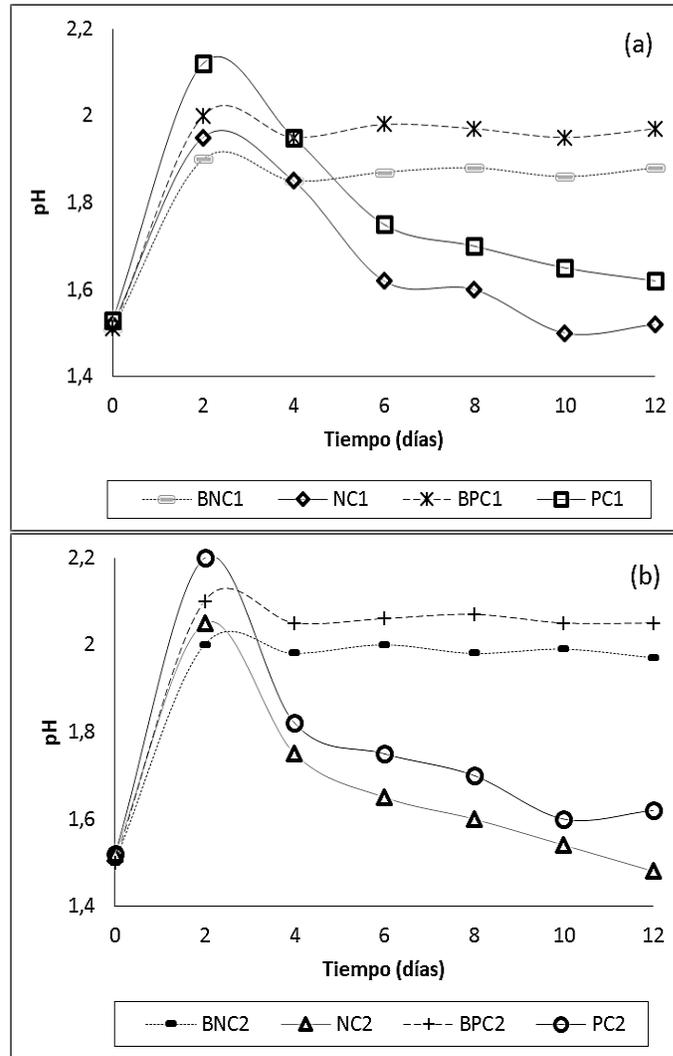


Figura 4-16: Comportamiento del pH vs. tiempo, para los ensayos de biodesulfurización de carbón con *Acidithiobacillus ferrooxidans* (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano nativo compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, B: control negativo.

La Figura 4-17 muestra el comportamiento del potencial de óxido-reducción (Eh) en el tiempo. A nivel general, los bioensayos presentaron un continuo aumento en los valores del Eh a lo largo de todo el proceso, alcanzando valores por encima de 560 mV.

Cabe mencionar que en el día cero, los ensayos a los cuales se les adicionó mayores concentraciones de hierro ferroso inicial (1200 mg/L) empezaron el proceso con menores valores

de Eh (NC2: PC2: 300 mV), en comparación con los ensayos a los cuales se les adicionó una menor concentración de hierro ferroso (200 mg/L) (PC1:NC1: 400mV). Entre el tiempo cero y el día dos, se observó una pequeña caída en la velocidad de incremento del Eh para los experimentos con mayor concentración de sulfato ferroso inicial (1200 mg/L), sin embargo, esta tendencia se invirtió después del día cuatro, a partir del cual, estos ensayos mostraron altos valores de Eh.

Vale la pena resaltar que los ensayos en los cuales se empleó la cepa compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, alcanzaron los mayores valores de Eh (NC1: 610 mV y NC2: 625 mV). En contraste, los experimentos con el cultivo comercial (PC1 y PC2) no superaron los 560mV.

Por otra parte, los ensayos abióticos se mantuvieron con una tendencia constante, alrededor de 400 mV durante el proceso.

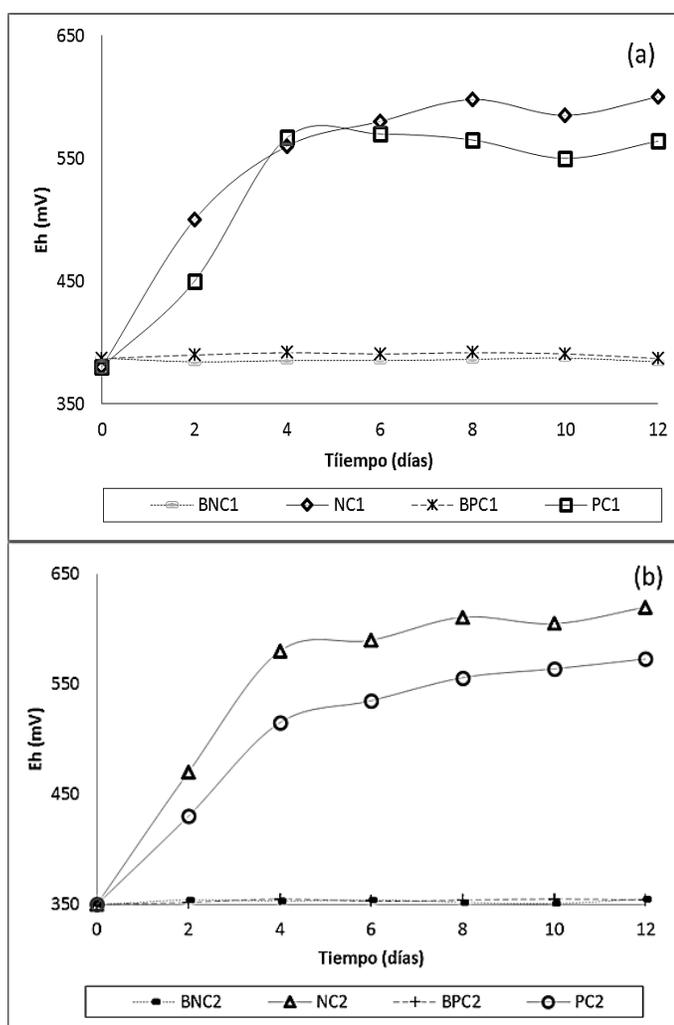


Figura 4-17: Comportamiento del Eh vs. tiempo, para los ensayos de biodesulfurización de carbón con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración

de hierro inicial 1200 mg/L. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, B: control negativo.

4.3.2 Concentración celular

La Figura 4-18 muestra el comportamiento de la concentración celular de los microorganismos estudiados en el tiempo. En general, se observó un comportamiento similar, caracterizado por una fase *lag* los primeros dos días del proceso, seguido por un crecimiento exponencial o fase logarítmica, entre el día dos y el día cuatro, alcanzando posteriormente la fase estacionaria. En este sentido, los experimentos en los cuales se empleó una mayor concentración de sulfato ferroso inicial (NC2 y PC2) presentaron menor velocidad de crecimiento celular durante los primeros dos días del proceso, en relación con sus contrapartes de menor concentración (NC1 y PC1), lo cual es coherente con el comportamiento disímil del pH y Eh en el mismo periodo, posteriormente, el ensayo NC2 alcanzó mayores tasas de crecimiento celular (6.3×10^8 células/mL) en comparación con el cultivo comercial a las mismas condiciones (5.1×10^8 células/mL).

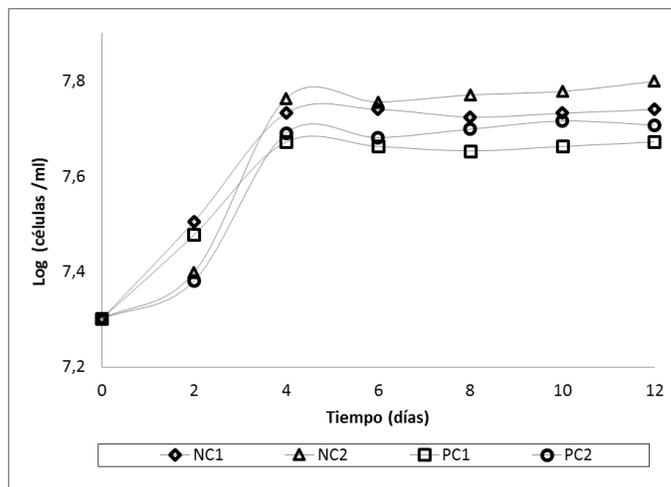


Figura 4-18: Concentración celular vs. tiempo, para los ensayos de biodesulfurización de carbón con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, B: control negativo.

4.3.3 Hierro removido y pirita oxidada

La Figura 4-19 muestra el cambio en la concentración de hierro en solución en el tiempo, para los tratamientos estudiados. Todos los ensayos presentaron una solubilización significativa de hierro a partir del cuarto día. Después de doce días de experimentación, los ensayos que utilizaron cepas nativas, NC1 y NC2, presentaron mayores porcentajes de lixiviación (51.34% y 60.45%

respectivamente), en comparación con los bioensayos realizados con el cultivo comercial PC1 y PC2 (36.51% y 45.27% respectivamente).

La Figura 4-20 muestra las curvas de pirita oxidada al finalizar el proceso. Se puede observar que los experimentos en los cuales se empleó el aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y una concentración de hierro inicial de 1200 mg/L, presentaron un mayor potencial oxidativo y obtuvieron los mejores resultados (NC2: 68%); en comparación con los ensayos en los cuales se utilizó el cultivo comercial ATCC 23270 (PC2:52%) a las mismas condiciones. De manera análoga, los experimentos con bacterias compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y menores concentraciones de hierro ferroso inicial (200 mg/L) presentaron mayores porcentajes de pirita oxidada (NC1: 57%), mientras su contraparte PC1 solo alcanzó un 44% de oxidación del sulfuro metálico.

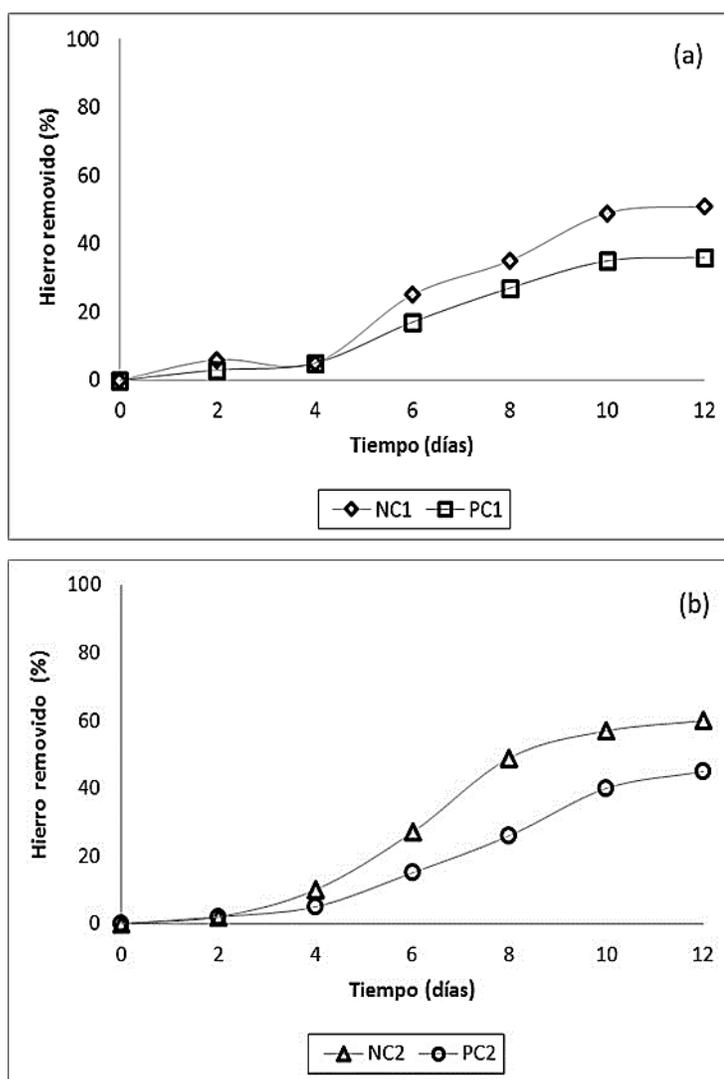


Figura 4-19: Porcentaje de hierro removido vs. tiempo, para los ensayos de biodesulfurización de carbón con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. (a.) Concentración de hierro 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L de Fe^{2+} , C2: 1200 mg/L, B: control negativo.

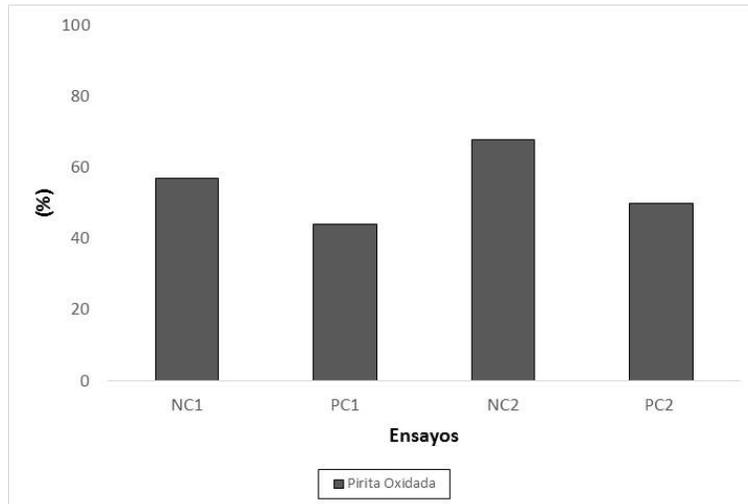


Figura 4-20: Porcentaje de pirita oxidada y solubilizada para los ensayos de biodesulfurización de carbón con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, variando la concentración de hierro inicial. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, B: control negativo.

4.3.4 Formas de azufre

En la Tabla 4-4, se puede observar los resultados de las mediciones de azufre total y las formas de azufre de las muestras de carbón después del proceso de biodesulfurización. Es posible observar que las muestras biooxidadas muestran menor cantidad de azufre pirítico en comparación con la muestra inicial de carbón. Los ensayos abióticos tampoco presentan una disminución significativa del azufre, indicando que la oxidación de la pirita está asociada a la acción de los microorganismos. Adicionalmente, la fracción de azufre orgánico se mantuvo sin cambios.

Es posible determinar que la diferencia entre el azufre total medido al comienzo y al final del proceso no es tan marcada en ninguno de los ensayos, obteniendo remociones alrededor del 20%. No obstante, se observa que los porcentajes de oxidación de pirita de los ensayos están entre 44% y 68% (Figura 4-20). De otro lado, los controles negativos BNC2 y BPC2 presentaron una mayor cantidad de azufre total al finalizar el proceso.

Tabla 4-4: Formas de azufre presentes en el carbón, después de 12 días de experimentación. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano nativo compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, B: control negativo, * muestra de carbón sin tratar.

| | * | BNC1 | NC1 | BPC1 | PC1 | BNC2 | NC2 | BPC2 | PC2 |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| S Sulfato (%) | 0.14 | 0.23 | 0.27 | 0.25 | 0.3 | 0.35 | 0.43 | 0.43 | 0.46 |
| S Pirítico (%) | 1.06 | 0.95 | 0.46 | 0.98 | 0.58 | 0.95 | 0.34 | 1.03 | 0.50 |
| S Orgánico (%) | 1.10 | 1.07 | 1.09 | 1.09 | 1.11 | 1.10 | 1.08 | 1.10 | 1.10 |
| S Total (%) | 2.30 | 2.25 | 1.82 | 2.32 | 1.99 | 2.40 | 1.85 | 2.57 | 2.06 |

4.3.5 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Se tomaron imágenes de SEM/EDX modo electrones retro-proyectados (BSE), en donde se pudo evidenciar el efecto del proceso de biodesulfurización sobre los granos de pirita.

En general, los granos de pirita analizados mostraron superficies afectadas por la oxidación microbiana de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ya que los cristales euedrales del sulfuro perdieron por completo sus caras cristalinas, tomando formas anedrales. En algunos casos, solo se observaron pequeños fragmentos del sulfuro preexistente que resultaron del ataque microbiano, lo que constituye una evidencia de la disolución de los mismos. Adicionalmente, en los controles negativos, la pirita no sufrió cambios en su morfología ni se observaron signos de oxidación, lo cual es de esperarse debido a que estos experimentos tampoco presentaron cambios en ninguno de los factores fisicoquímicos evaluados.

En la Figura 4-21 se muestra las micrografías del carbón resultante del ensayo NC1, en este se detectaron cristales individuales de pirita sin formas definidas con presencia de pozos y golfos de corrosión, los cuales constituyen signos claros del proceso de oxidación. También, fue posible evidenciar la disolución del sulfuro de hierro, se da tanto en los límites como en el interior del grano.

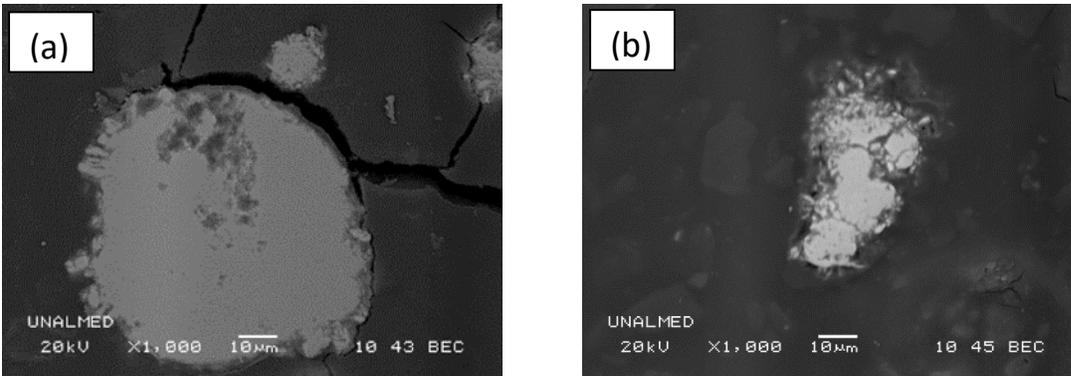


Figura 4-21: Evidencias de oxidación de pirita para el ensayo NC1, al finalizar el proceso de biodesulfurización. (a.) Grano de pirita con pozos de corrosión (2000 X), (b.) Masa de pirita parcialmente oxidada (1100 X).

La Figura 4-22 hace referencia a las microfotografías del carbón del ensayo NC2, después de 12 días de experimentación, en donde se observa una degradación de algunos de los cristales que conforman los framboides, además, fue posible detectar pseudomorfos por sustitución de los microcristales de pirita con jarosita y precipitados rodeando algunos de los cristales del cúmulo. Además, se observan cristales de pirita de mayor tamaño con golfos y pozos de corrosión especialmente en los límites, por lo tanto se puede decir que la oxidación es independiente del tamaño de los cristales, sin embargo, se infiere que debido a que los cristales que conforman los framboides tienen un menor tamaño estos se disuelven con mayor facilidad.

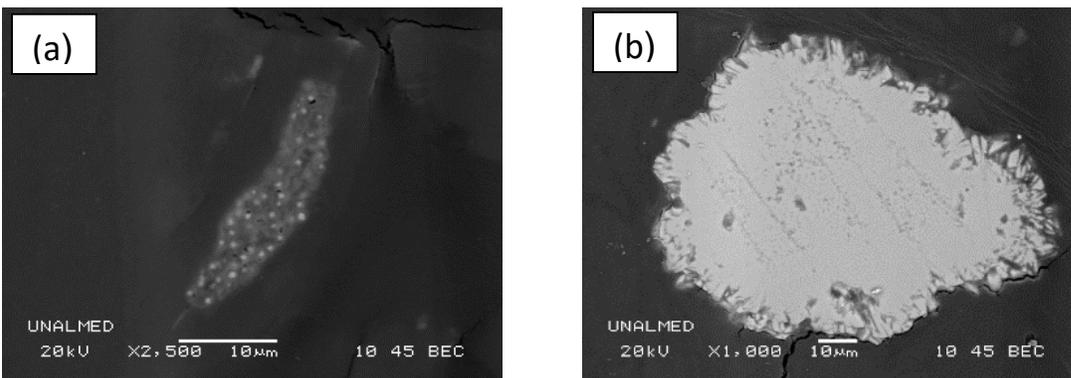


Figura 4-22: Imágenes de SEM para el ensayo NC2, después de 12 días de proceso. (a.) Framboide con una disminución de los cristales que lo conforman, rodeado de precipitados (2500 X), (b.) Grano de pirita con una corrosión evidente en los límites (1000 X).

Las imágenes de SEM del carbón del ensayo PC1 después del proceso de biodesulfurización, muestran granos de pirita oxidados, Figura 4-23. En general, los cristales de la muestra presentan golfos de corrosión, pozos de oxidación en el interior, así como, pérdida de su forma euhedral.

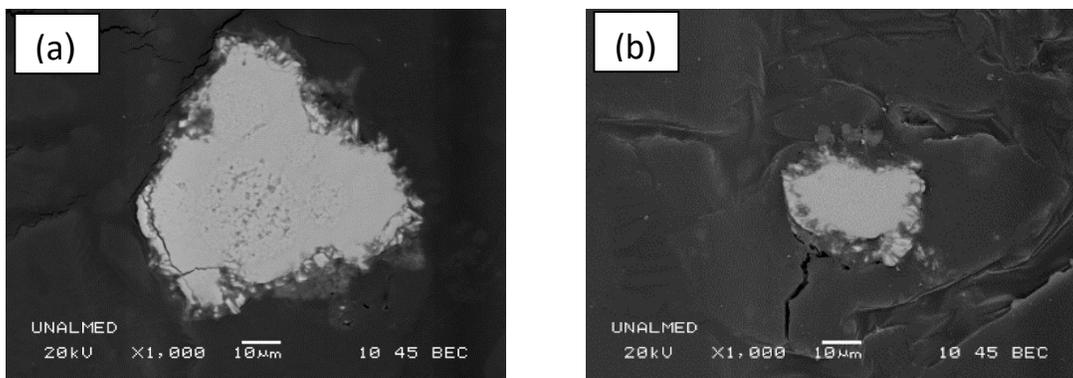


Figura 4-23: Micrografías de SEM correspondientes a los granos de pirita del ensayo PC1, después del proceso de biodesulfurización (1000 X). (a.) Cristal de pirita con golfos de corrosión. (b.) Masa irregular de pirita con evidencias de corrosión (1000 X).

La Figura 4-24 muestra las micrografías resultantes para el carbón del ensayo PC2, después de la experimentación. En estas imágenes se aprecian pozos y golfos de corrosión, además se destacan los precipitados que rodean los granos de pirita.

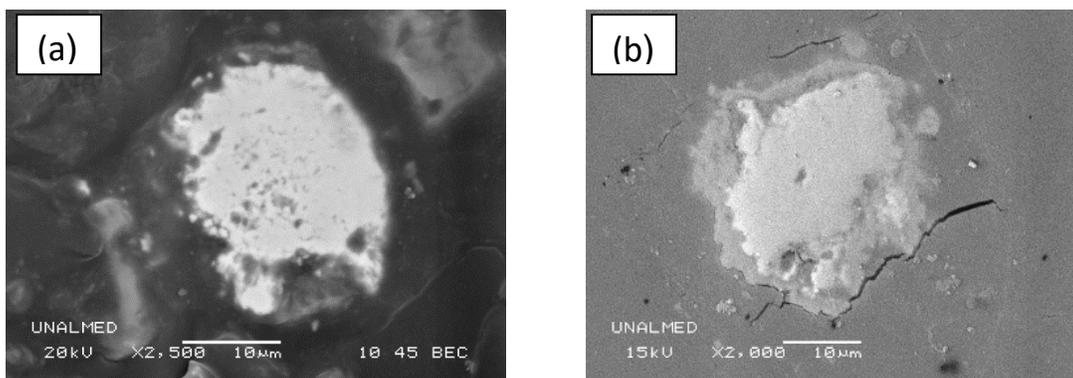


Figura 4-24: Cristales de pirita rodeados de precipitados de jarosita, ensayo PC2, después de 12 días de proceso. (a.) Grano de pirita con signos de oxidación (1100 X), (b.) Golfos de corrosión en un cristal de pirita (2000 X).

Las imágenes obtenidas para los controles negativos después del proceso de biodesulfurización se muestran en la Figura 4-25, las cuales permiten establecer que la pirita diseminada en forma de cristales individuales, masas o framboides no sufrió oxidación en ausencia de bacterias.

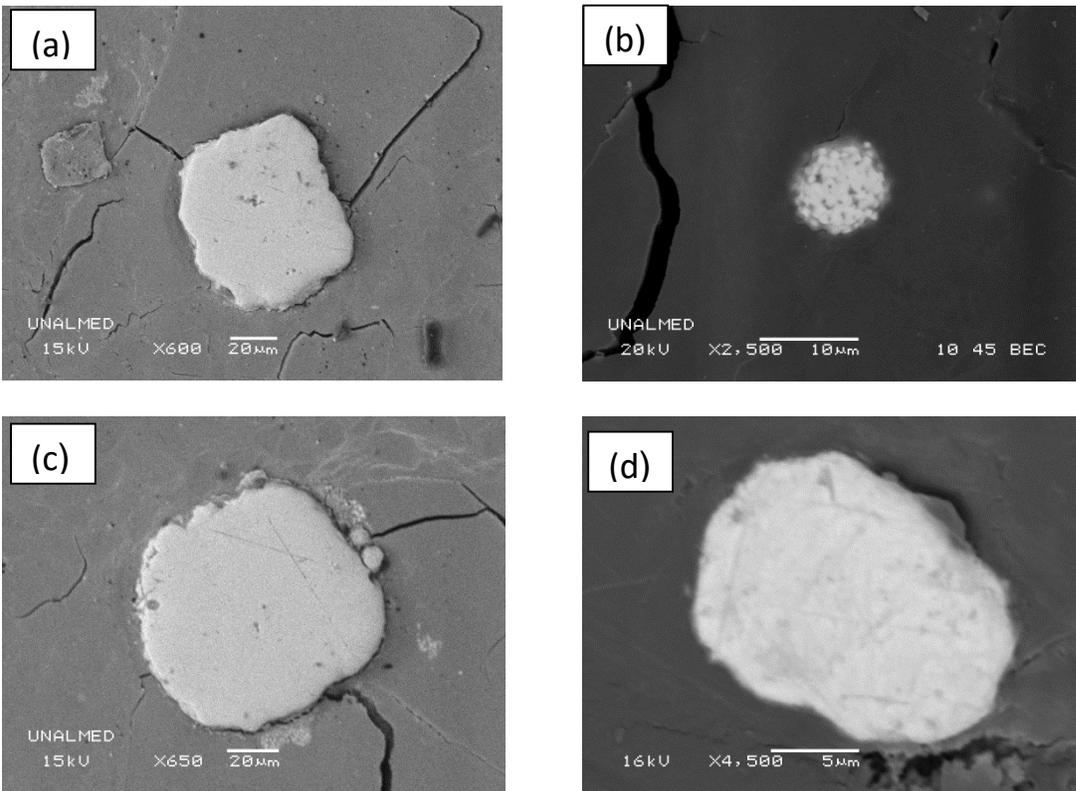


Figura 4-25: Imágenes de SEM para los carbones correspondientes a los controles, sin evidencias de oxidación, al finalizar el proceso de biodesulfurización. (a.) Masa de pirita intacta (NC1) (600 X), (b.) Pirita framboidal sin evidencias de oxidación (PC1) (2500 X), (c.) Grano de pirita (NC2) (650X), (d.) Masa de pirita con bordes bien definidos (PC2) (4500X).

Los precipitados de hierro evidenciados alrededor de algunos de los granos de pirita, fueron analizados mediante microanálisis químico, Figura 4-26. Los elementos encontrados fueron: oxígeno, azufre, e hierro.

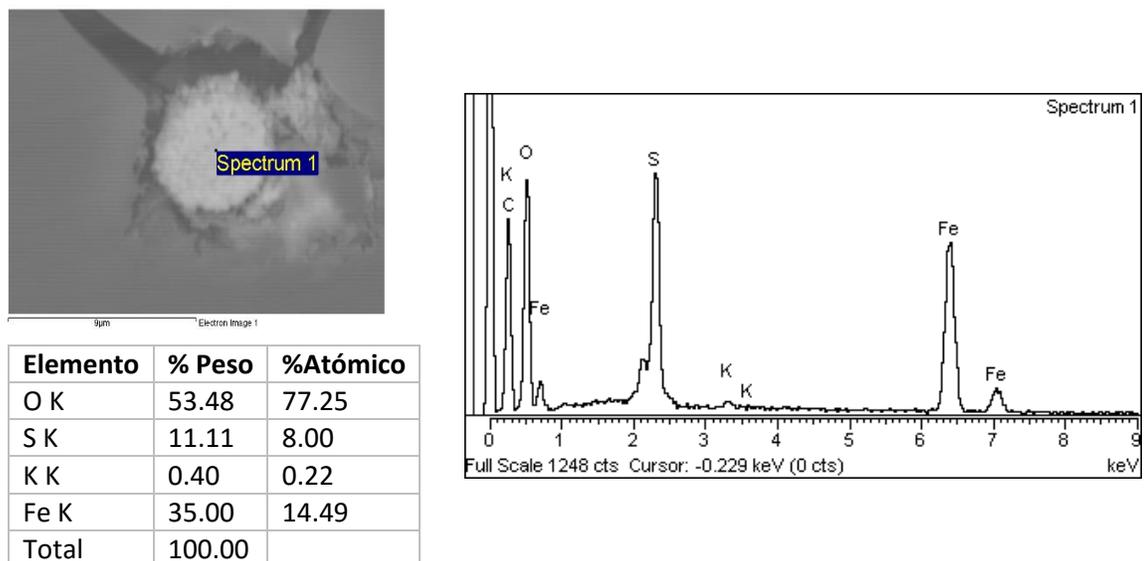


Figura 4-26: Evidencia de la presencia de sulfatos de hierro sobre un framboide de pirita con su respectivo análisis microquímico.

4.4 Influencia de la relación inicial de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, empleando sulfato férrico, cloruro férrico y una cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, en un proceso de biodesulfurización de carbón en suspensión.

4.4.1 Medidas de pH y Eh

La Figura 4-27 muestra el comportamiento del pH vs. tiempo para los experimentos a los cuales se les adicionó relaciones iniciales de hierro férrico/ferroso, empleando sulfato férrico. En general, se evidenció una caída en los valores de pH los primeros dos días del proceso, en todos los ensayos. Vale la pena mencionar que los valores de pH fueron dependientes de la relación inicial de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, así como de la concentración inicial de hierro total, de esta manera, los ensayos SFIIIC1 y SFIIIC2 mostraron los menores valores de pH el día dos (1.4 y 1.35 respectivamente).

Posteriormente, los valores de pH de todos los ensayos mantuvieron una forma descendente, con una tendencia a estabilizarse en un pH alrededor de 1.30, después de 12 días de proceso, cabe señalar que los ensayos SFIC1 y SFIC2 alcanzaron los menores valores de pH (1.28 y 1.29 respectivamente).

La Figura 4-28 muestra la gráfica de pH vs. tiempo de los ensayos con concentraciones iniciales de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, utilizando cloruro férrico. En esta se evidenció un comportamiento generalizado

caracterizado por una disminución de los valores de pH desde la medición inicial, especialmente visible en los ensayos en los cuales se empleó una mayor concentración de hierro total (1200 mg/L), tendencia que se mantuvo hasta finalizar el proceso. Los experimentos CFIC2 y CFIIIC2 alcanzaron los menores valores de pH (1.34 y 1.35 respectivamente), después de doce días de experimentación.

Por otra parte, los controles negativos no presentaron mayores variaciones, finalizando el proceso con un pH cercano al inicial en todos los casos.

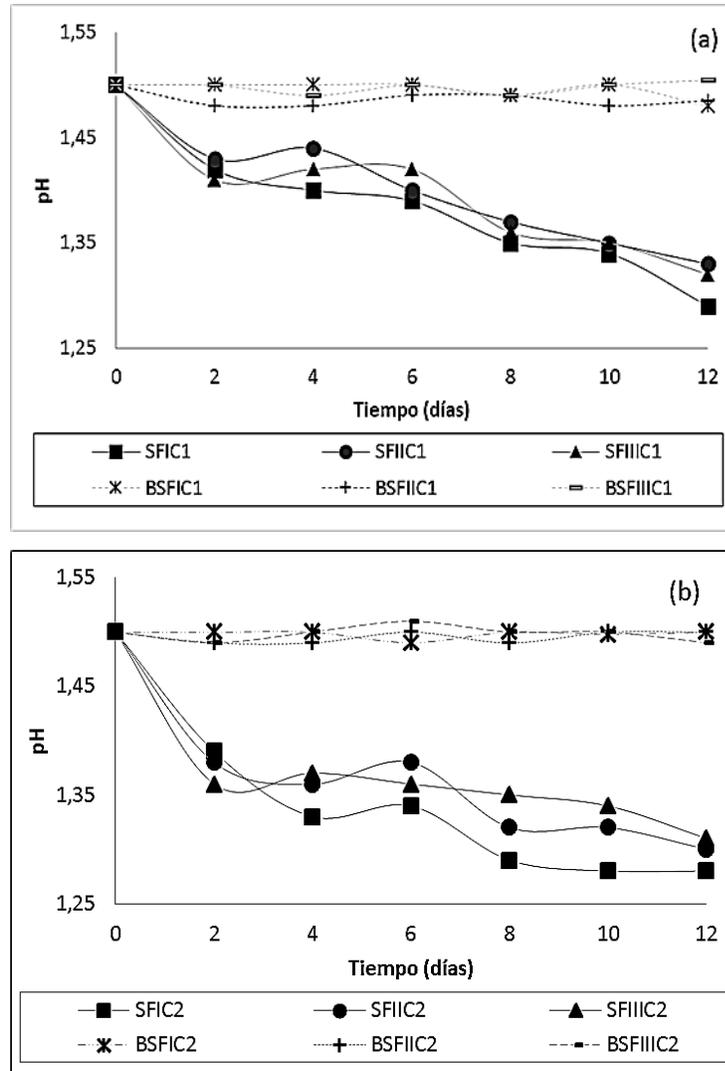


Figura 4-27: Comportamiento de pH vs. del tiempo los bioensayos con relaciones iniciales de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ empleando sulfato férrico, (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. B: controles abióticos.

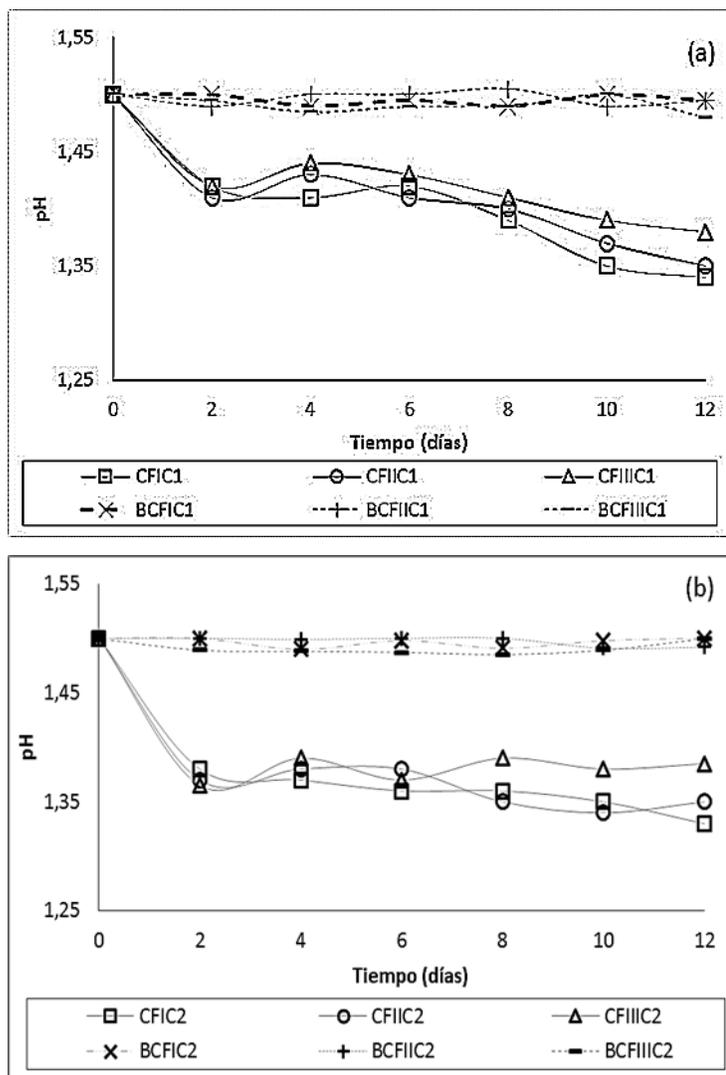


Figura 4-28: Comportamiento de pH vs. tiempo para los bioensayos con relaciones iniciales de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ empleando cloruro férrico. (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. CF: Cloruro férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. B: controles abióticos.

En las Figuras 4-29 y 4-30 se muestran las curvas de potencial de óxido-reducción (Eh) Vs. tiempo para los ensayos con relaciones iniciales de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ empleando sulfato férrico y cloruro férrico respectivamente. En general, el valor inicial dependieron de la relación $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ inicial, donde los mayores valores fueron observados en los ensayos SFIIC1 y SFIIC2 (510 mV y 550 mV).

En los ensayos con sulfato férrico, entre el día cero y el día dos, los ensayos evidenciaron una caída en los valores hasta alrededor de 450 mV y luego un posterior aumento en los días siguientes. Cabe destacar los ensayos SFIC2, SFIIC2 y SFIIC2, los cuales evidenciaron un aumento exponencial en los

valores de Eh entre el día dos y el día seis (700 mV aprox.). No obstante, a partir del día seis mostraron una tendencia constante, hasta finalizar el proceso. Por otra parte, los ensayos abióticos se mantuvieron por debajo de 450 mV durante toda la experimentación. Al finalizar los procesos, los mayores valores (alrededor de 680 mV) fueron alcanzados por experimentos SFIC1 y SFIIIC1.

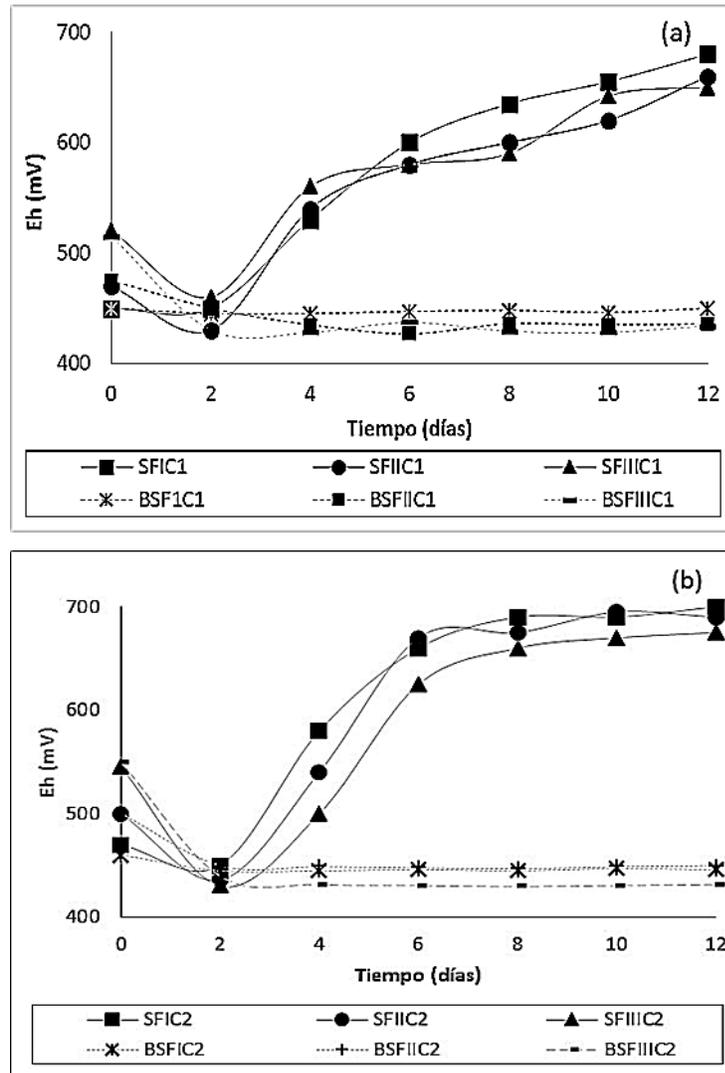


Figura 4-29: Comportamiento de Eh en función del tiempo para los experimentos con relaciones iniciales de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ empleando sulfato férrico. (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. B: controles abióticos.

Los ensayos en los cuales se usó cloruro férrico, se evidenciaron valores iniciales entre 450 mV y 550 mV, similar al comportamiento mostrado por los ensayos con sulfato férrico. A partir del día dos, los ensayos con una menor concentración de hierro total, mostraron un incremento en los

valores de Eh, principalmente los ensayos CFIC1 y CFIIC1 (520 mV y 530 mV). No obstante, estos valores no superaron los 550 mV. A partir del día cuatro, los ensayos continuaron incrementando los valores de potencial redox hasta alrededor de 580 mV. Vale la pena mencionar, que el bioensayo CFIIIC1 mostró un aumento en los valores (560mV), solo después de 8 días de iniciada la experimentación. Por otra parte, los ensayos con mayor concentración de hierro total (Figura 4-30 b), evidenciaron un incipiente aumento en los valores del Eh <520 mV (día cuatro), especialmente el bioensayo CFIIIC2 (500 mV). Ulteriormente, los ensayos incrementaron levemente los valores, aunque estos no superaron los 550 mV.

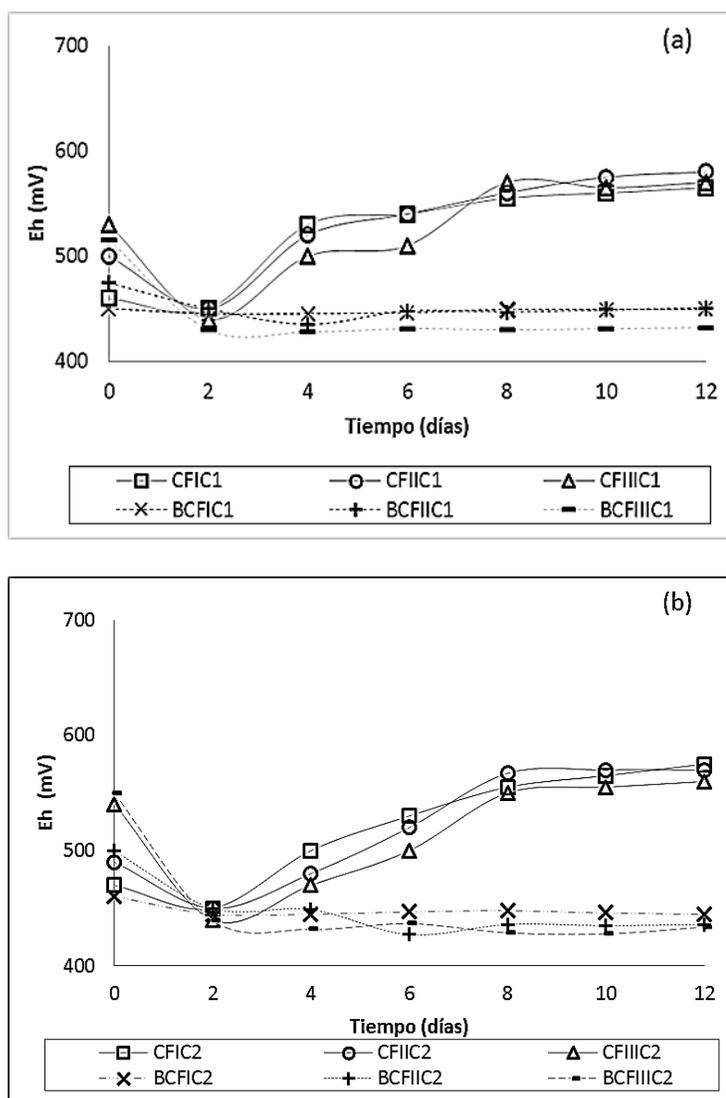


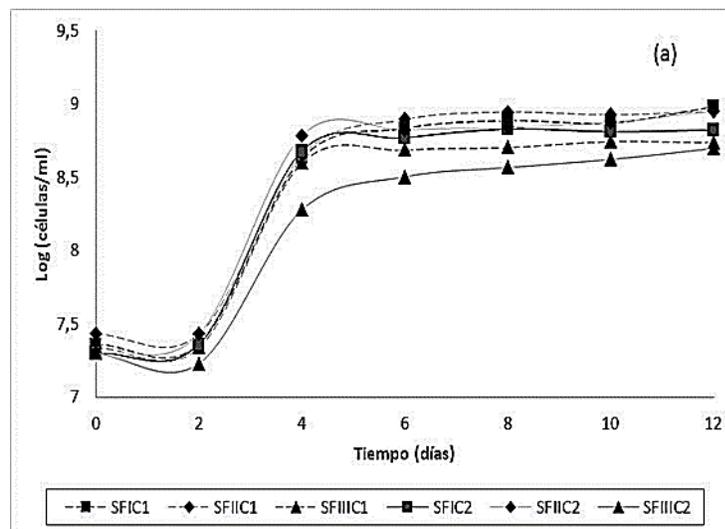
Figura 4-30: Comportamiento del Eh en función del tiempo para los experimentos con relaciones iniciales de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} empleando cloruro férrico (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. (a). CF: cloruro férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. B: controles abióticos.

4.4.2 Crecimiento celular

El comportamiento de la concentración bacteriana para los ensayos con relaciones iniciales de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ empleando sulfato férrico y cloruro férrico, se muestran en la Figura 4-31.

En general, los ensayos en los cuales se usó sulfato férrico evidenciaron una tendencia similar, caracterizada por una fase *lag*, con una leve caída para el ensayo SFIIC2 (2.1×10^7 células/mL) en los primeros días del proceso. A continuación, estos experimentos exhibieron un aumento en la concentración celular hasta el día cuatro (alrededor de 6.5×10^8 células/mL), alcanzando la fase estacionaria en los días posteriores (2.5×10^9 células/mL aproximadamente). Vale la pena resaltar, que los ensayos SFIC1 y SFIC2 alcanzaron las mayores poblaciones celulares (3.5×10^9 células/mL y 2.0×10^9 células/mL respectivamente).

Por otro lado, los ensayos en los cuales se empleó cloruro férrico, comenzaron el proceso con una concentración celular de 2.2×10^7 células/mL, al igual que los ensayos con sulfato férrico. No obstante, se observó que la población bacteriana no tuvo un mayor crecimiento, donde el ensayo CFIIIC2 evidenció la menor concentración celular (3.0×10^7 células/mL).



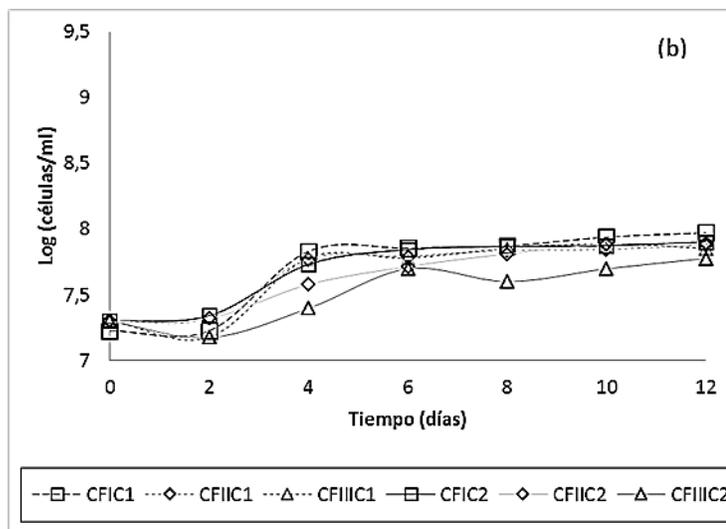


Figura 4-31: Crecimiento celular de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en solución en función del tiempo, para los diferentes experimentos, variando la relación inicial de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} y la concentración de hierro total. (a.) sulfato férrico, (b.) cloruro férrico. SF: sulfato férrico, CF: cloruro férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L.

4.4.3 Hierro removido y pirita oxidada

Las Figuras 4-32 y 4-33 muestran el porcentaje de hierro lixiviado del carbón en función del tiempo para los ensayos con sulfato férrico y cloruro férrico respectivamente. En general, los ensayos con sulfato férrico aumentaron significativamente la cantidad de hierro lixiviado. Se evidenció una tendencia generalizada, donde la mayor remoción de hierro fue alcanzada en los ensayos donde se utilizó una menor concentración de hierro inicial, especialmente los ensayos SFIC1 y SFIIIC1 (70% y 66% respectivamente). No obstante, los ensayos SFIC2 y SFIIIC2 también mostraron buenos resultados (60% y 55% respectivamente). Sin embargo, en el ensayo SFIIIC2 se observó solubilización de hierro, solo después del sexto día de experimentación.

Vale la pena resaltar que los ensayos evidenciaron una clara remoción de hierro los primeros días de la experimentación (día cero a dos), especialmente, en los ensayos en los cuales se adicionó una mayor concentración de hierro férrico total inicial (1200 mg/L) y una mayor relación de hierro férrico (80:20).

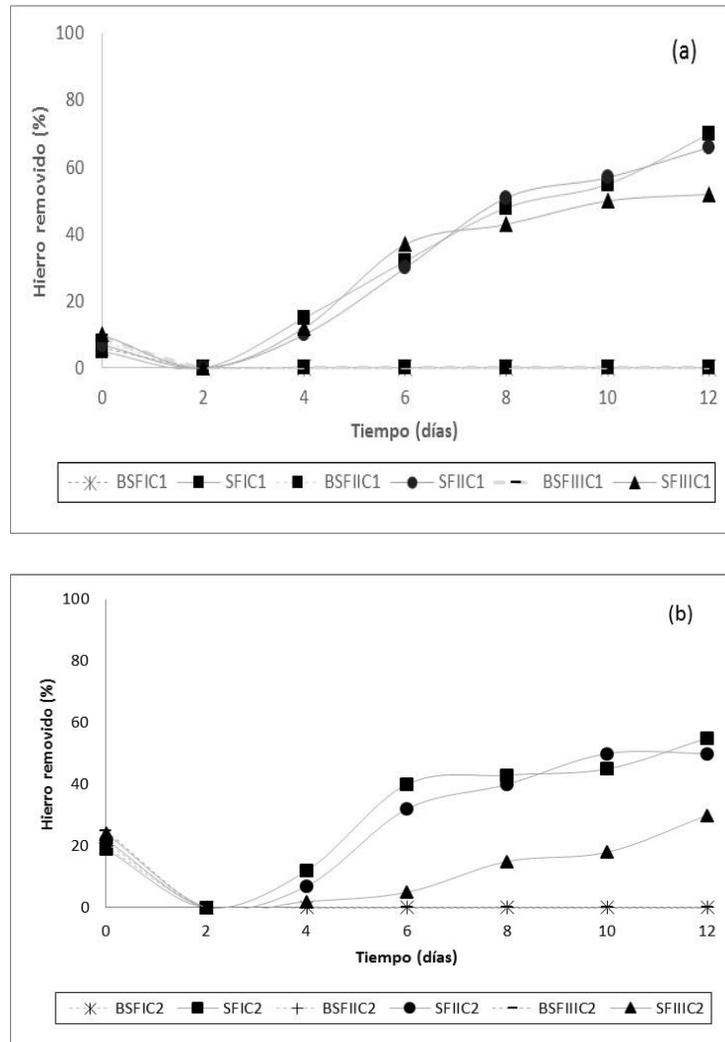


Figura 4-32: Porcentaje de hierro lixiviado vs. Tiempo, para los experimentos con relaciones iniciales de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ empleando sulfato férrico. (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. B: controles abióticos.

Los ensayos con cloruro férrico mostraron una baja solubilización de hierro, especialmente los bioensayos con una mayor concentración de hierro inicial (CFIC2, CFIIC2 y CFIIC2). Adicionalmente, en los ensayos CFIC1 y CFIIC2 se evidenció solubilización (< 20%) a partir del octavo día.

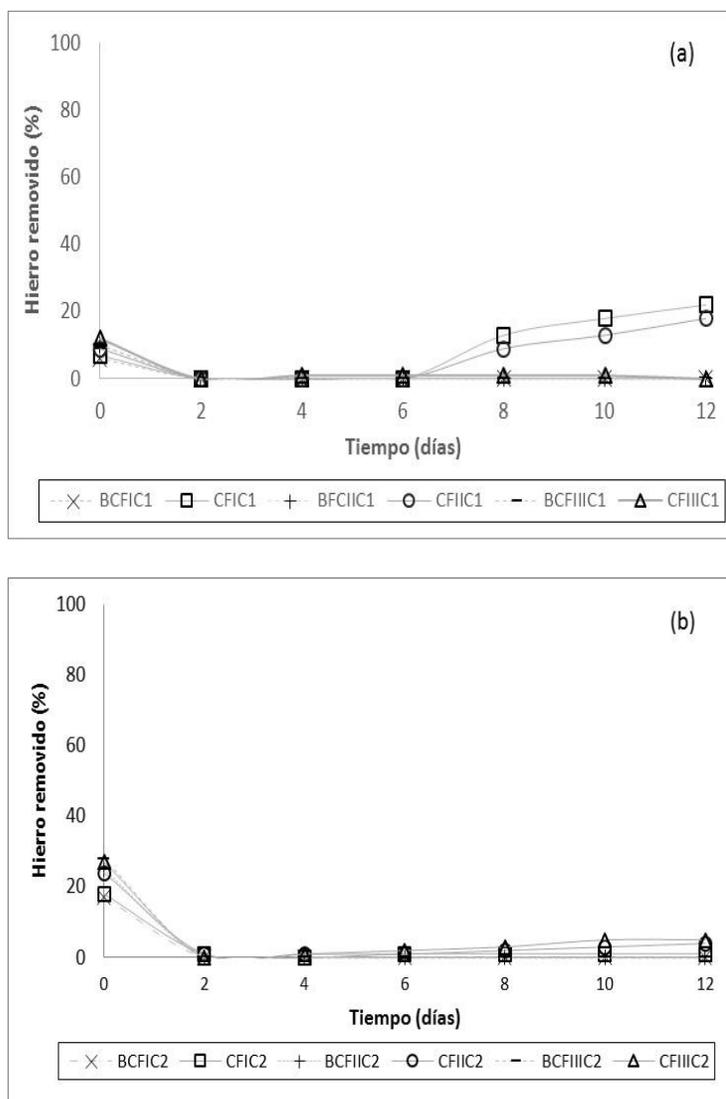


Figura 4-33: Porcentaje de hierro lixiviado vs. Tiempo, para los experimentos con relaciones iniciales de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} empleando cloruro férrico. (a.) Concentración de hierro inicial 200 mg/L (b.) Concentración de hierro inicial 1200 mg/L. CF: cloruro férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. B: controles abióticos.

Por otro lado, los controles presentaron un comportamiento similar al de sus respectivos ensayos bióticos durante los primeros dos días del proceso (día cero a día dos), sin embargo, luego del segundo día no se observó ningún cambio significativo en la remoción de hierro.

La Figura 4-34 muestra los porcentajes de pirita oxidada de los experimentos al finalizar el proceso de desulfurización bio-química propuesto. Con base en los resultados, al trabajar con sulfato férrico, la menor relación Fe^{3+}/Fe^{2+} y concentración de hierro iniciales, se obtuvieron los mejores resultados, 81% de oxidación de pirita en el ensayo SFIC1. Adicionalmente, los experimentos SFIC1

y SFIC2 mostraron resultados similares, alcanzando 75% y 78% de oxidación de pirita respectivamente.

Por otra parte, los bioensayos CFIC1 y CFIC1 mostraron un 58% y 48% respectivamente, de oxidación de pirita al finalizar el proceso de biodesulfurización. Finalmente, los experimentos con una mayor concentración de hierro total (1200 mg/L) en los cuales se empleó cloruro férrico, mostraron un porcentaje de oxidación de pirita entre 40% – 45%, este último obtenido por el ensayo CFIC1.

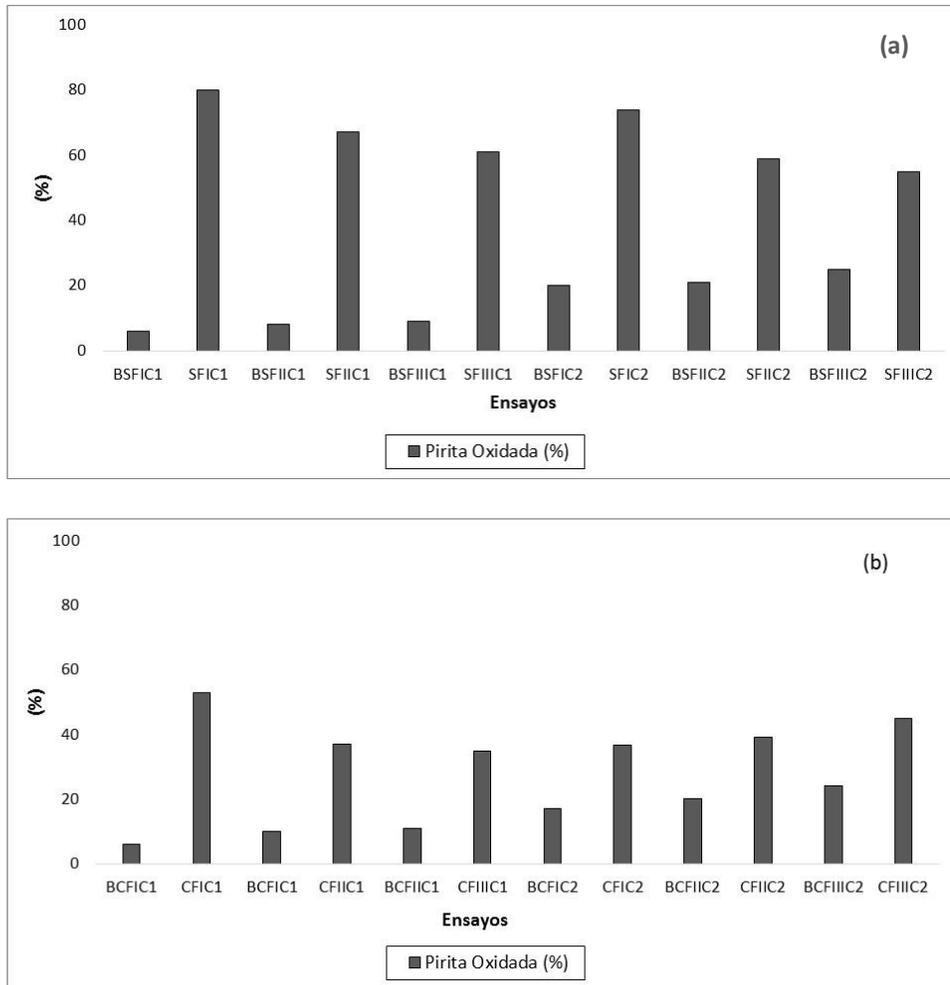


Figura 4-34: Porcentaje de pirita oxidada vs. Tiempo (a.) Experimentos con sulfato férrico (b.) Bioensayos con cloruro férrico. CF: cloruro férrico, SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L. B: Control abiótico.

4.4.4 Formas de azufre

Las mediciones de azufre total y formas de azufre en el carbón, después del proceso de biodesulfurización se muestran en la Tabla 4-5. Las muestras de carbón tratadas mostraron una

diferencia significativa en la cantidad de azufre total, en comparación con la muestra de carbón sin tratar, principalmente, en los ensayos donde se empleó sulfato férrico y bajas concentraciones de hierro total (SFIC1, SFIIC1 y SFIIC1). Estos experimentos mostraron una disminución significativa del azufre inorgánico.

Los ensayos SFIC2, SFIIC2 y SFIIC2, se observa una baja disminución de la cantidad de azufre total, sin embargo, mostraron más del 60% de extracción de azufre pirítico. La mayor disminución de azufre inorgánico, fue alcanzada por el ensayo SFIC2.

Por otra parte, los ensayos con cloruro férrico y una concentración de hierro total de 200 mg/L, evidenciaron un porcentaje de azufre total 0.4% menor, comparado con la muestra de carbón inicial, alcanzando aproximadamente un 50% de remoción de azufre total.

Por último, los ensayos con cloruro férrico y una mayor concentración de hierro total (1200mg/L) mostraron un incipiente cambio en la cantidad de azufre total al finalizar el proceso. No obstante, la cantidad de azufre pirítico disminuyó considerablemente (35% -40% aproximadamente).

Vale la pena mencionar, que los ensayos con sulfato férrico y la concentración de hierro total mayor (1200 mg/L), mostraron el mayor incremento en el porcentaje de azufre en forma de sulfatos.

Adicionalmente, la cantidad de azufre orgánico no presentó cambios significativos en las muestras de carbón sometidas al proceso de biodesulfurización. Finalmente, la cantidad de sulfatos es sustancialmente mayor en los ensayos sometidos al proceso de biodesulfurización en comparación con la muestra sin tratar.

Tabla 4-5: Formas de azufre presentes en el carbón, después del proceso de biodesulfurización. CF: cloruro férrico, SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, *muestra de carbón sin tratar.

| | S Sulfato (%) | S Pirítico (%) | S Orgánico (%) | S Total (%) |
|---------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| * | 0.14 | 1.06 | 1.10 | 2.30 |
| SFIC1 | 0.25 | 0.23 | 0.97 | 1.45 |
| SFIIC1 | 0.28 | 0.31 | 1.11 | 1.70 |
| SFIIC1 | 0.22 | 0.48 | 0.98 | 1.68 |
| SFIC2 | 0.59 | 0.27 | 1.11 | 1.97 |
| SFIIC2 | 0.61 | 0.38 | 1.10 | 2.09 |
| SFIIC2 | 0.54 | 0.42 | 1.10 | 2.06 |
| CFIC1 | 0.3 | 0.50 | 1.11 | 1.91 |
| CFIIC1 | 0.32 | 0.56 | 1.10 | 1.98 |
| CFIIC1 | 0.27 | 0.69 | 1.10 | 2.06 |
| CFIC2 | 0.25 | 0.67 | 1.10 | 2.02 |
| CFIIC2 | 0.33 | 0.65 | 1.11 | 2.09 |
| CFIIC2 | 0.49 | 0.57 | 1.10 | 2.16 |

4.4.5 Análisis mineralógico del carbón al finalizar el proceso

▪ Difracción de rayos X (DRX)

En la Figura 4-35 se muestran los análisis de difracción de rayos X tanto de la muestra de carbón sin tratar, como de los bioensayos realizados con una relación inicial de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} , utilizando sulfato férrico y una concentración de hierro total de 200 mg/L.

Al comparar los espectros de las muestras de carbón sometidas al proceso de biodesulfurización, con el espectro de la muestra de carbón inicial, estos mostraron una disminución significativa en la intensidad de los picos de pirita.

En los espectros de los ensayos con menor contenido de sulfato férrico (SFIC1), los picos de pirita se desdibujaron casi por completo. Adicionalmente, en el ensayo SFIIC1 fue posible observar picos de baja intensidad asociados a jarosita, al finalizar la experimentación.

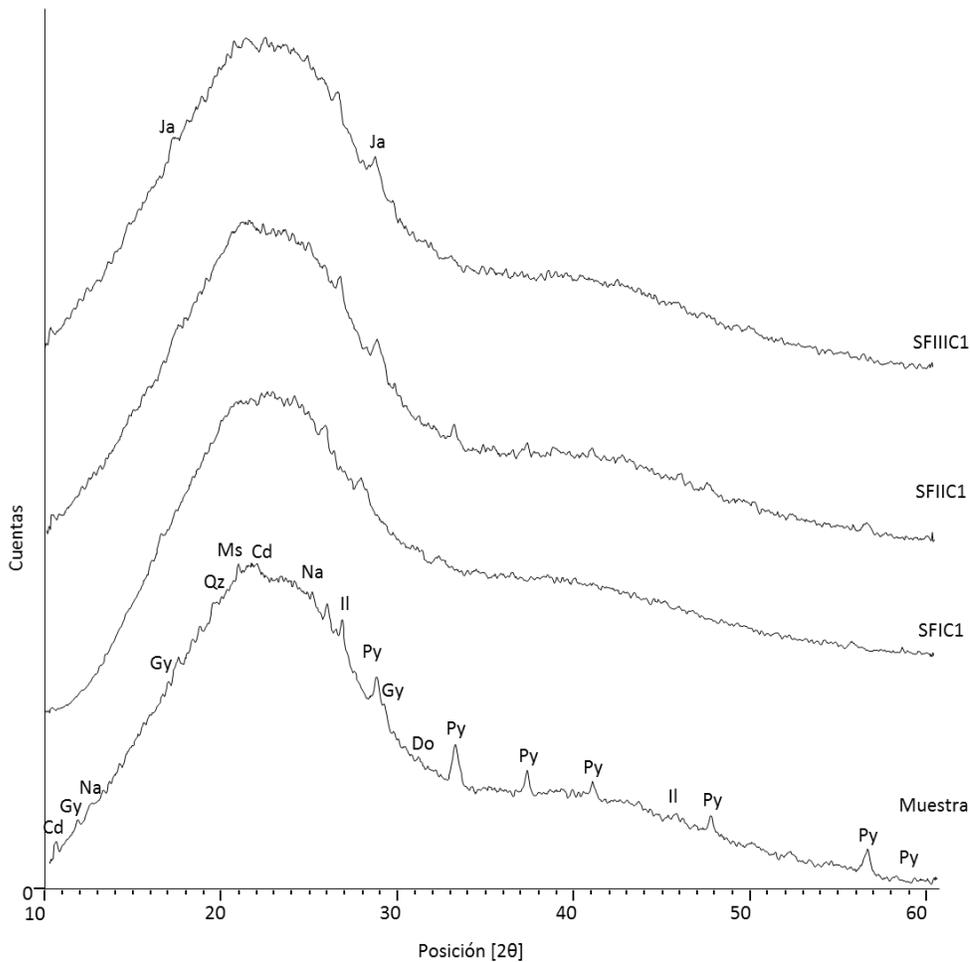


Figura 4-35: Espectros de DRX para la muestra de carbón sin tratar en comparación con las muestras biooxidadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III:

80:20, C1: 200 mg/L. Cd: cordierita, Gy: yeso, Na: nacrita, Qz: cuarzo, Ms: moscovita, Py: pirita, Il: illita, Do: dolomita, Ja: jarosita.

La Figura 4-36 muestra los resultados de los análisis de difracción de rayos X de la muestra de carbón sin tratar y los bioensayos realizados con sulfato férrico y una concentración de hierro total de 1200 mg/L. Los picos de pirita que se evidencian en la muestra inicial son prácticamente imperceptibles, luego de ser sometidas al proceso de biodesulfurización. La característica más importante de los espectros obtenidos es la aparición de picos de jarosita como amonio-jarosita (Ja). Adicionalmente, en el espectro del ensayo SFIIC2, se evidencia la aparición de yeso (Gy).

Vale la pena resaltar que la intensidad de los picos de jarosita fue similar para los tres ensayos evaluados (SFIC2, SFIIC2 y SFIIC2).

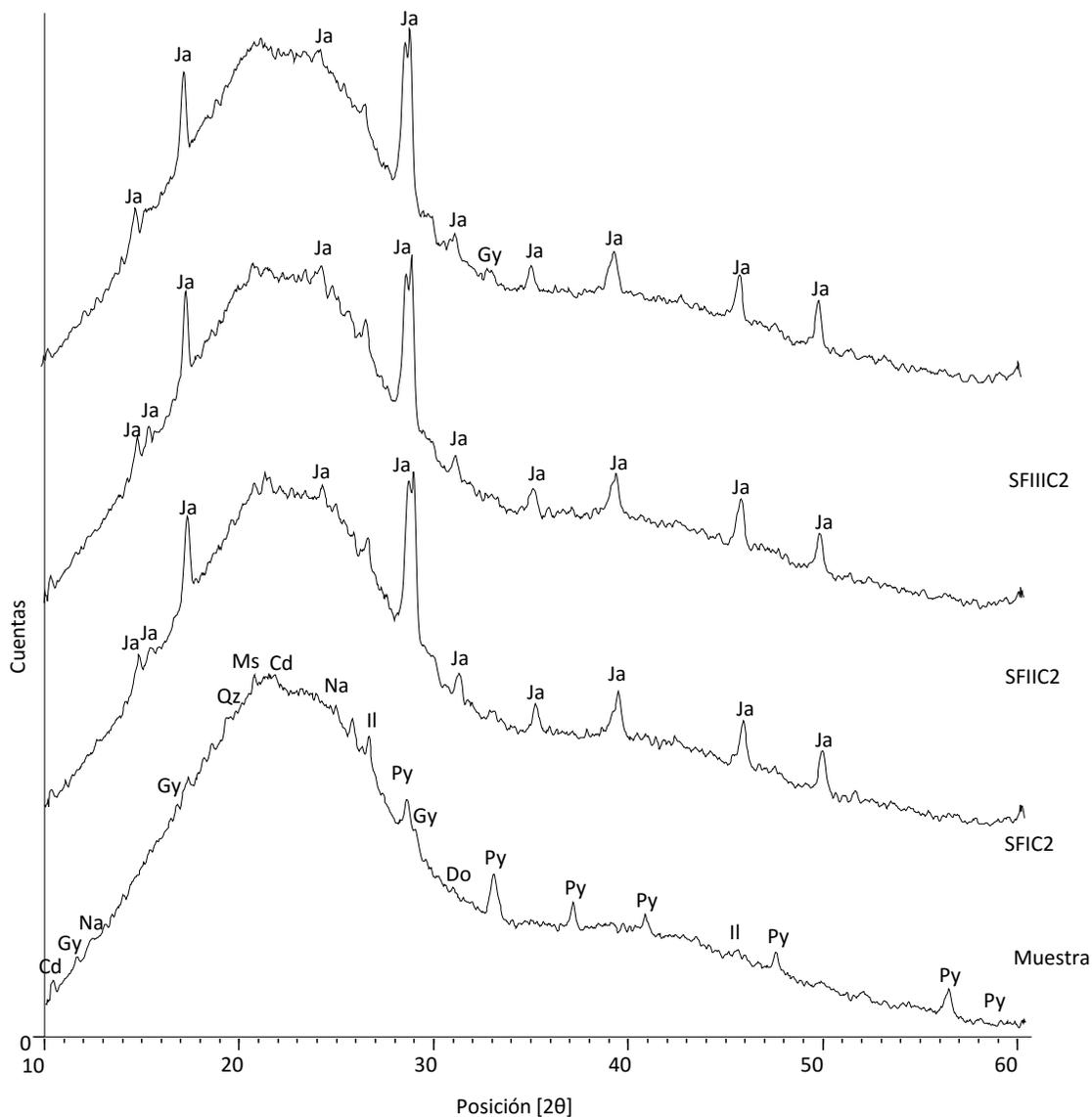


Figura 4-36: Espectros de DRX para la muestra de carbón sin tratar en comparación con las muestras biooxidadas con *At. ferrooxidans*. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C2: 1200 mg/L. Cd: cordierita, Gy: yeso, Na: nacrita, Qz: cuarzo, Ms: moscovita, Py: pirita, Il: Ilita, Do: dolomita, Ja: jarosita.

A nivel general, los ensayos en los cuales se empleó cloruro férrico, presentaron características similares a las descritas anteriormente, tanto para la menor concentración de hierro total (200 mg/L), como para los experimentos de mayor concentración (1200 mg/L). En donde, los picos asociados a la pirita disminuyeron significativamente en los experimentos en los cuales se aplicó el tratamiento, en comparación con el espectro de la muestra de carbón inicial, de igual forma, también fue evidente la formación de nuevas fases minerales como jarosita durante el proceso, como se observa en las Figuras 4-37 y 4-38.

Los espectros obtenidos para los ensayos con una menor concentración de hierro total (200 mg/L) (Figura 4-37), evidencian una disminución en la intensidad de los picos de pirita. Adicionalmente, es posible observar picos de jarosita en todos los experimentos.

Vale la pena mencionar que al aumentar la concentración de hierro total (1200 mg/L), se incrementa también la formación de la jarosita en forma de amonio- jarosita, especialmente en el ensayo en el cual se adicionó una mayor relación inicial de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} .

Por otra parte, es posible evidenciar la presencia de algunos picos de pirita en el espectro del ensayo CFIC2.

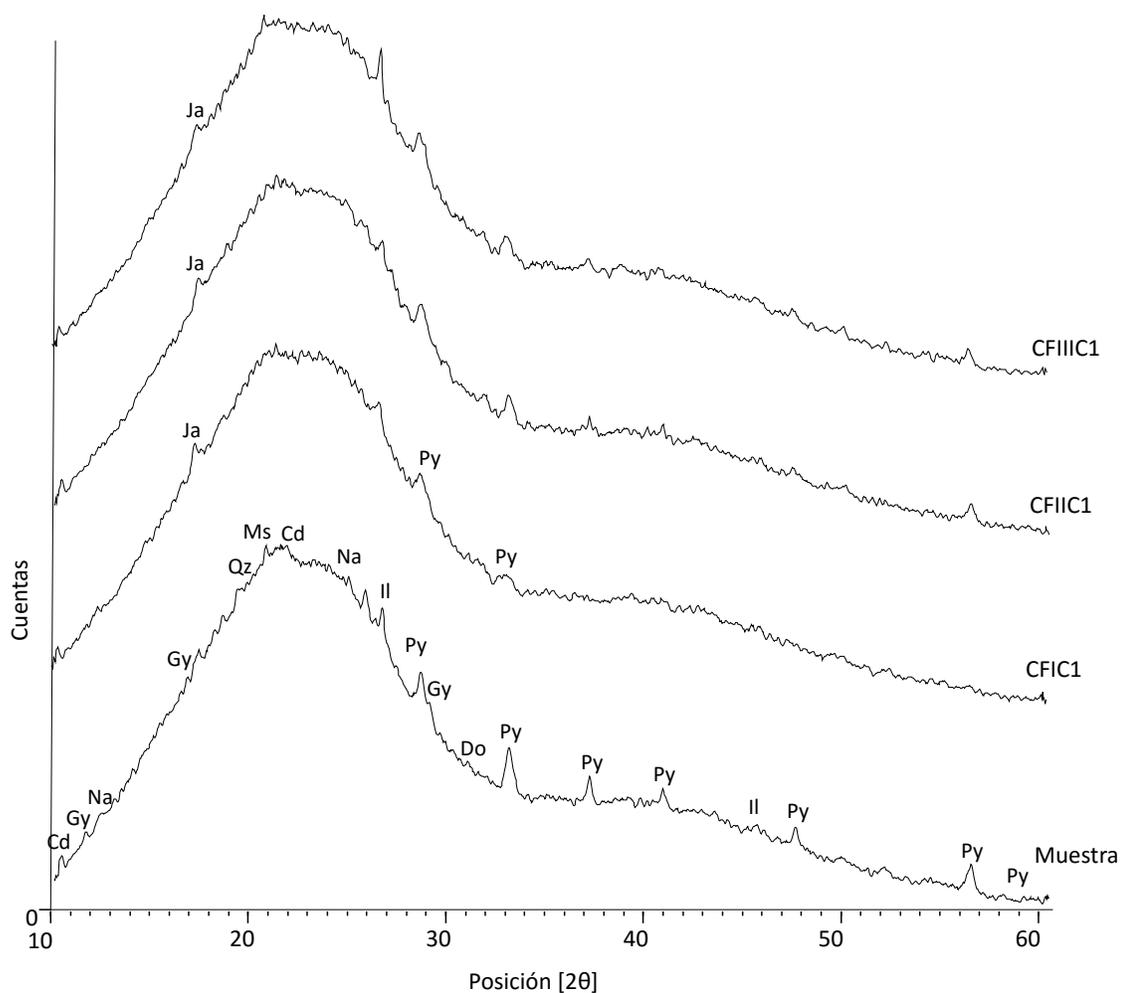


Figura 4-37: Espectros de DRX para la muestra de carbón sin tratar en comparación con las muestras biooxidadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. CF: cloruro férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L. Cd: cordierita, Gy: yeso, Na: nacrita, Qz: cuarzo, Ms: moscovita, Py: pirita, II: Ilita, Do: dolomita, Ja: jarosita.

Tabla 4-6: Asignación de las bandas correspondientes a los espectros FTIR.

| LONGITUD DE ONDA (cm ⁻¹) | ASIGNACIÓN | FUENTE |
|--------------------------------------|--|--|
| 3400 | Vibración de tensión del grupo OH | Tian <i>et al.</i> , 2010 Wang <i>et al.</i> , 2013 |
| 3200 | Vibración de tensión del enlace N-H | Sonibare <i>et al.</i> , 2010 |
| 2920 | vibración asimétrica de tensión de los grupos alifáticos CH ₂ y CH ₃ | Sonibare <i>et al.</i> , 2010 Chen <i>et al.</i> , 2012 Wang <i>et al.</i> , 2013 |
| 2850 | vibración asimétrica de tensión de los grupos alifáticos CH ₂ y CH ₃ | Sonibare <i>et al.</i> , 2010 Ahmed <i>et al.</i> , 2003 Wang <i>et al.</i> , 2013 |
| 1699 | Grupo carbonilo (C=O) | Saikia <i>et al.</i> , 2007 |
| 1610 | Núcleos aromáticos (C=C) | Wang <i>et al.</i> , 2013 Sonibare <i>et al.</i> , 2010 |
| 1500 | Grupo carbonilo (C=O) | Geng <i>et al.</i> , 2009 |
| 1400 | Deformación de NH ₄ ⁺ asociada a amonio jarosita | Sasaki y Konno, 2000 |
| 1453 | Deformación asimétrica de CH ₃ | Wang <i>et al.</i> , 2013 Sonibare <i>et al.</i> , 2010 |
| 1438 | Deformación asimétrica de CH ₃ | Saikia <i>et al.</i> , 2007 |
| 1375 | Cadenas alifáticas CH ₃ (deformación simétrica) | Wang <i>et al.</i> , 2013 Tian <i>et al.</i> , 2010 |
| 1250 | Eter – ester aromáticos del carbón | Munkhtsetseg, 2007 |
| 1196 y 1080 | Vibraciones de sulfato | Ossa y Márquez, 2010 |
| 1190 y 1085 | Vibración v ₃ asociada a la jarosita | Márquez <i>et al.</i> , 2006 |
| 1165 | Yeso | Ossa y Márquez, 2010 |
| 1160 | Vibración de flexión Si – O | Sonibare <i>et al.</i> , 2010 |
| 1117 | Yeso | Ossa y Márquez, 2010 |
| 1032 y 1008 | Vibración de tensión Si – O – Si. | Saikia <i>et al.</i> , 2007 |
| 860 | Vibración de flexión fuera del plano de enlaces aromáticos (CH) | Walker y Mastalerz, 2004 Munkhtsetseg, 2007 |
| 814 | Vibración de flexión fuera del plano de enlaces aromáticos (C-H) | Walker y Mastalerz, 2004 |
| 798 - 751 | Bandas de vibración de enlace OH para sulfato | Baruah <i>et al.</i> , 2003 |
| 750 | Vibración de flexión fuera del plano de enlaces aromáticos (C-H) | Walker y Mastalerz, 2004 Saikia <i>et al.</i> , 2007 |
| 693 | Vibración de tensión asociada a cuarzo | Nayak y Singh, 2007 |
| 692 | Vibración fuera del plano asociada a la esporinita (grupo de la liptinita) | Guo y Bustin, 1998 |
| 660 | Yeso | Ossa y Márquez, 2010 |
| 628 | Vibración de deformación v ₄ asociada a jarosita | Márquez <i>et al.</i> , 2006 |

| 600 | Yeso | Ossa y Márquez, 2010 |
|-----------|--|--|
| 533 | Vibración de flexión Si – O asociada a minerales arcillosos. | Saikia <i>et al.</i> , 2007 |
| 516 y 475 | Vibración de deformación doblemente degenerada ν_2 asociada a jarosita | Márquez <i>et al.</i> , 2006 |
| 510 | Vibración t de los grupos OH asociados a la jarosita | Lazaroff <i>et al.</i> , 1982; Addler y Kerr, 1965 |
| 469 | Vibración de flexión Si – O asociada a minerales arcillosos. | Walker y Mastalerz, 2004 |
| 420 | Pirita | Saikia <i>et al.</i> , 2007 |

Las Figuras 4-39 a 4-42, muestran los espectros de FTIR obtenidos para la muestra de carbón inicial y las obtenidas en los bioensayos luego del proceso de biodesulfurización. En general, se observa la presencia de enlaces orgánicos, propios del carbón. También se vieron enlaces que indican la presencia de sulfatos y arcillas, tanto en la muestra de carbón sin tratar, como en los bioensayos.

Los ensayos con sulfato férrico (Figuras 4-39 y 4-40) evidenciaron un incremento en la intensidad de la banda ubicada alrededor de 3400 cm^{-1} , la cual está asociada a los grupos OH de minerales como sulfatos y arcillas. Esto concuerda con la aparición de las bandas 1196 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} , 628 cm^{-1} y 510 cm^{-1} , asociadas con jarosita, característica que se acentúa más en los ensayos con una concentración de hierro total mayor (1200 mg/L), similar a los observado en los espectros de DRX (Figura 4-36). La banda a 1400 cm^{-1} en los espectros de FTIR, fue interpretada como la deformación de NH_4^+ de amonio jarosita, al igual que la banda 3200 cm^{-1} correspondiente a la vibración de NH_4^+ .

Por otra parte, las bandas a 700 cm^{-1} - 900 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1438 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} , 1699 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} y 2920 cm^{-1} , correspondientes a la fracción orgánica del carbón, no evidenciaron cambios al finalizar el proceso. La banda 420 cm^{-1} , correspondiente a pirita, presenta una disminución en los espectros de los ensayos; sin embargo, al estar tan cerca del límite de detección del equipo (4000 cm^{-1} – 400 cm^{-1}), no se considera representativa para evaluar la oxidación bacteriana. Adicionalmente, las bandas 1008 cm^{-1} y 1032 cm^{-1} , asociadas a silicatos como arcillas y cuarzo, se superponen con las bandas 1196 cm^{-1} , 1190 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} 1080 cm^{-1} de sulfatos.

Es posible apreciar que la banda que indica la formación de sulfatos y jarosita es más clara conforme se aumentó la relación inicial de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ y una mayor concentración de hierro total (1200 mg/L) (SFIC2, SFIC2 y SFIIC2), con relación a sus análogos de menor concentración. El yeso mostrado en los espectros de DRX para las muestras sin tratar y biooxidadas, aparece representado en los espectros de FTIR, en la banda a 660 cm^{-1} .

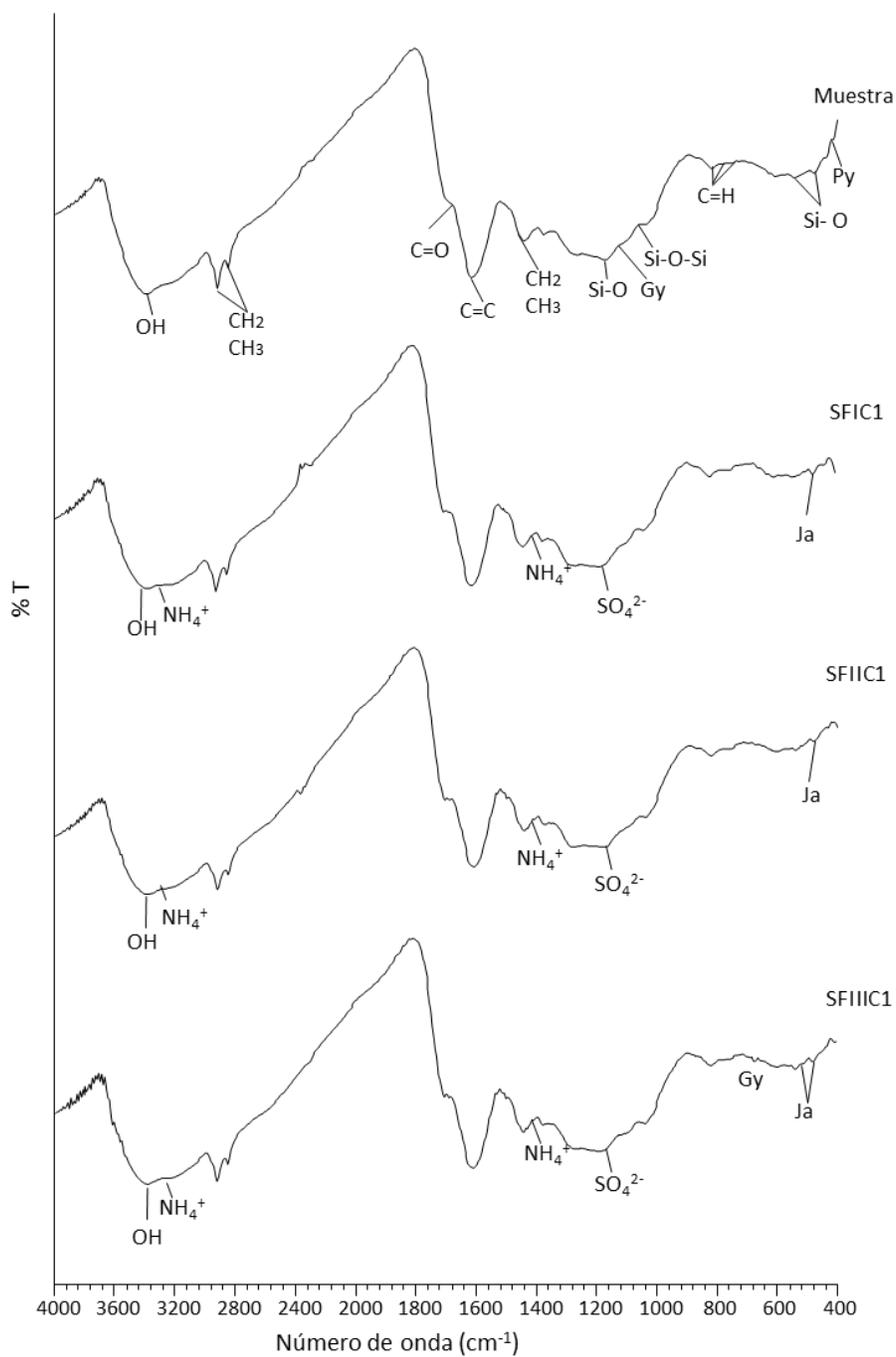


Figura 4-39: Espectros FTIR para el carbón sin tratar y las muestras biooxidadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y sulfato férrico. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, SO₄²⁻: sulfatos, Ja: jarosita, Gy: yeso, Py: pirita.

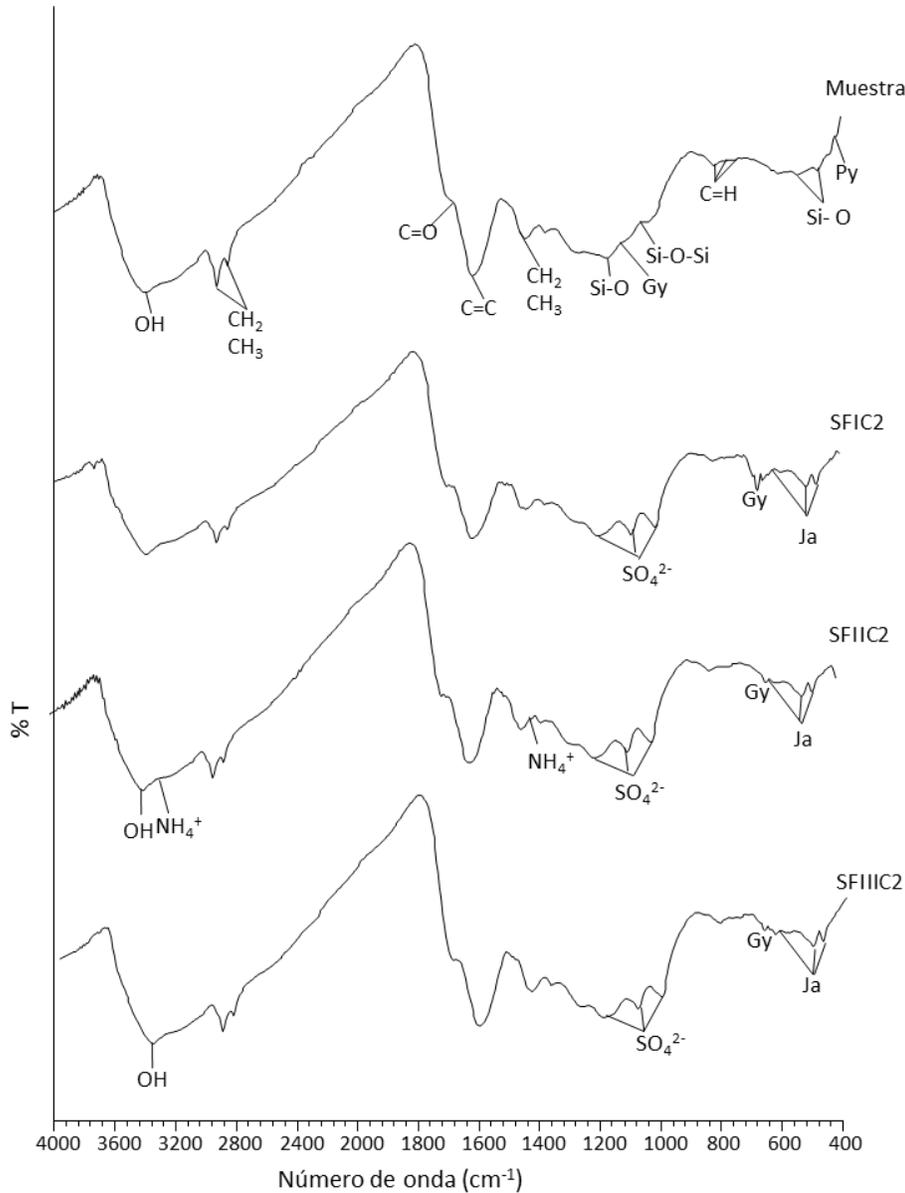


Figura 4-40: Espectros FTIR para el carbón sin tratar y las muestras biooxidadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y sulfato férrico. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C2: 1200 mg/L, SO_4^{2-} : sulfatos, Ja: jarosita, Gy: yeso, Py: pirita.

Los espectros FTIR de los experimentos con cloruro férrico (Figuras 4-41 y 4-42) evidencian cambios en las bandas asociadas a los sulfatos, especialmente, en los ensayos con una mayor concentración de hierro total. Vale la pena resaltar, que en el ensayo CFIIIC2 las bandas asociadas a sulfato y jarosita presentan mayor intensidad, en comparación con los demás experimentos. Adicionalmente, al igual que en los ensayos con sulfato férrico, las bandas asociadas al componente orgánico del carbón, no presentan cambios a lo largo del proceso.

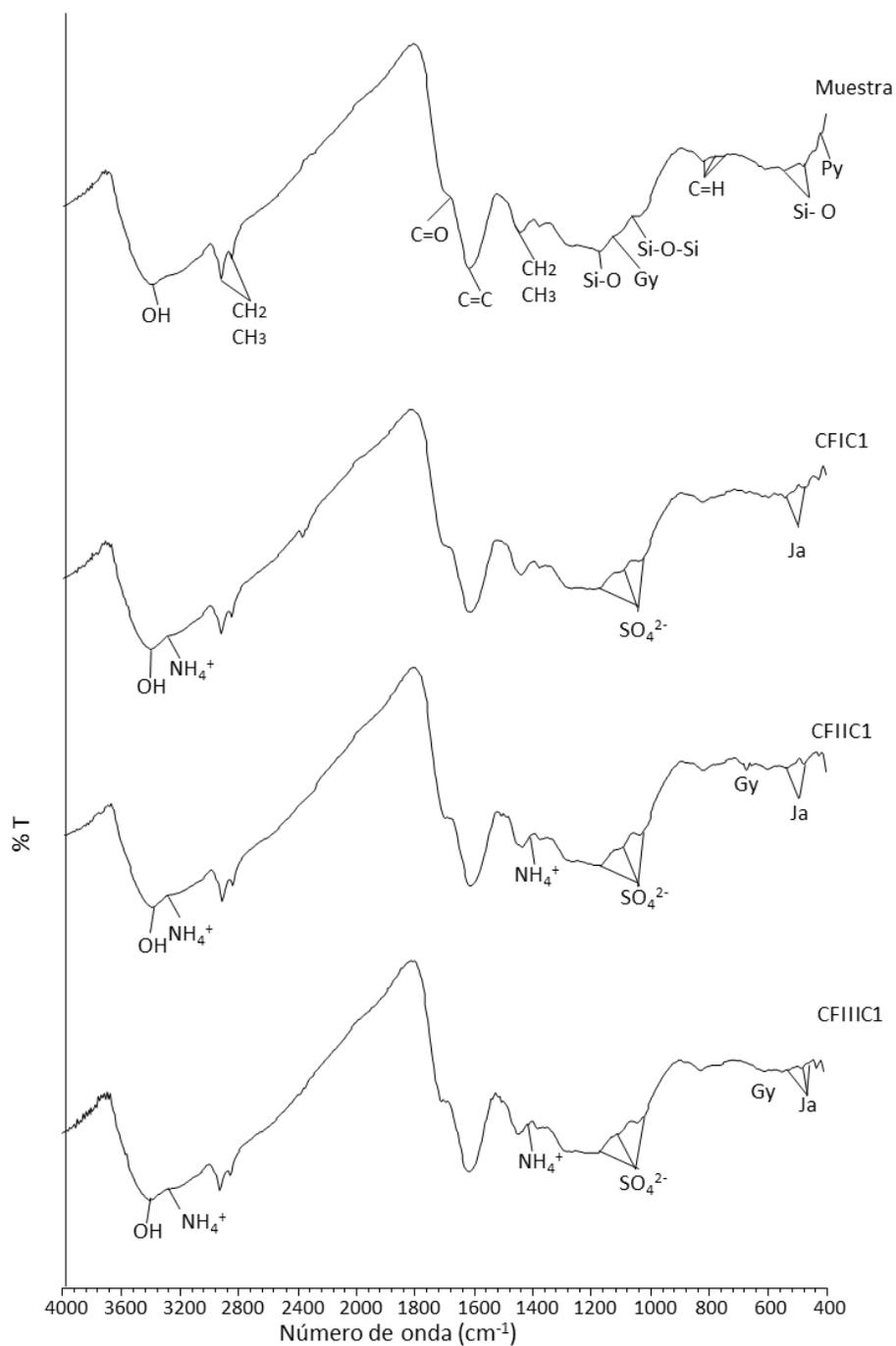


Figura 4-41: Espectros FTIR para el carbón sin tratar y las muestras biooxidadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cloruro férrico. CF: cloruro férrico, I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C1: 200 mg/L, SO₄²⁻: sulfatos, Ja: jarosita, Gy: yeso, Py: pirita.

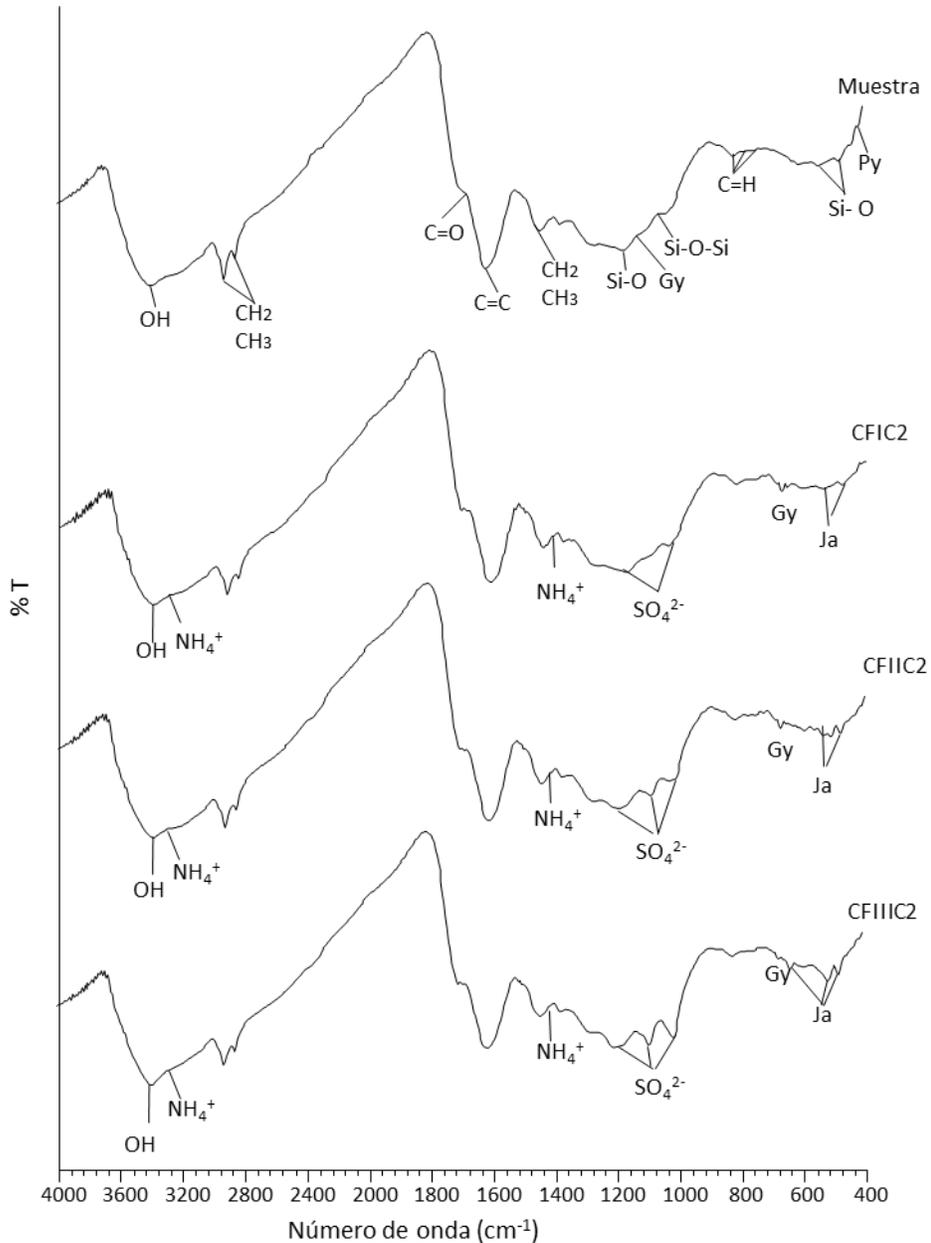


Figura 4-42: Espectros FTIR para el carbón sin tratar y las muestras biooxidadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cloruro férrico. CF: cloruro férrico, relación $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$: I: 20:80; II: 50:50; III: 80:20, C2: 1200 mg/L, SO_4^{2-} : sulfatos, Ja: jarosita, Gy: yeso, Py: pirita.

▪ **Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

Las imágenes de los ensayos con sulfato férrico y una concentración de hierro total de 200 mg/L, Figuras 4-43 a 4-45. La oxidación de los granos de pirita preexistentes es notable debido a la disminución en los cristales que conforman los framboides, asimismo, es posible apreciar los precipitados de jarosita rodeando algunos de los granos de carbón, muchos de ellos carentes del

sulfuro de hierro preexistente. También se observó la oxidación tanto de los cristales y las masas de pirita de mayor tamaño como de los framboides de menor tamaño, no obstante estos últimos se encontraron totalmente disueltos en algunos casos.

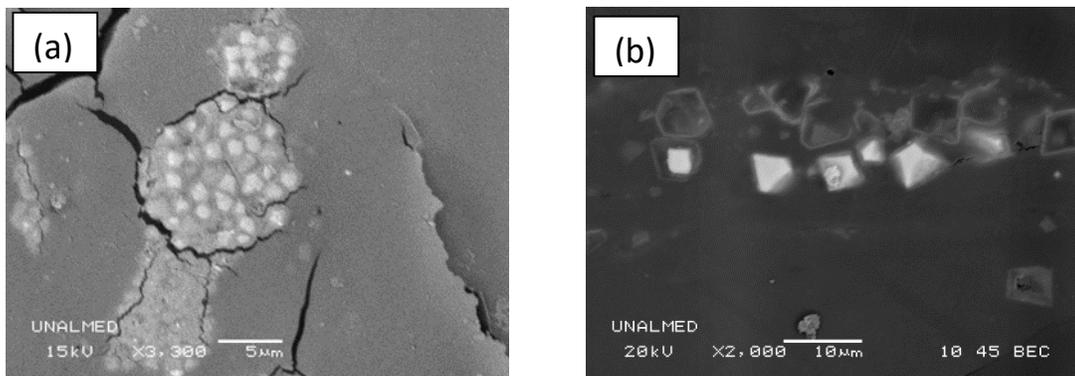


Figura 4-43: Evidencias de oxidación en la pirita del ensayo SFIC1, después de 12 días de proceso. (a.) Reducción total y parcial de la cantidad de cristales que conforman el framboide (3300X), (b.) Cristales euedrales con evidencias de corrosión y huellas euedrales alrededor que podrían representar espacios previamente ocupados por pirita (2000X). SF: sulfato férrico, I: 20:80, C1: 200 mg/L

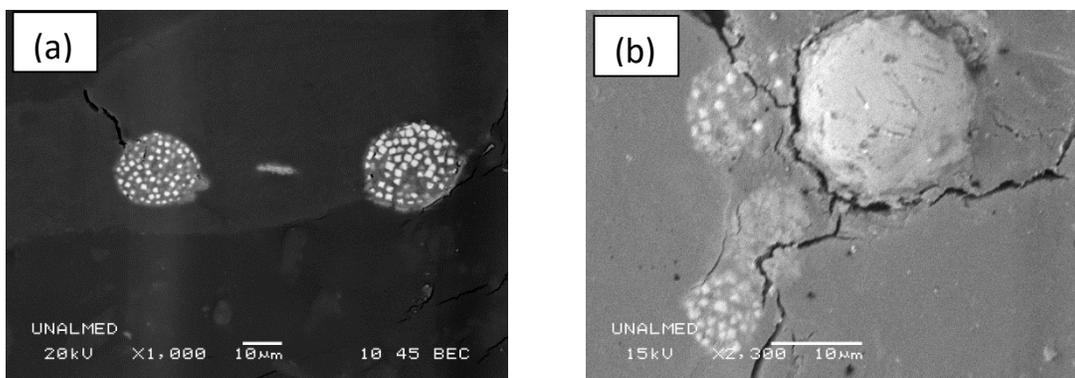


Figura 4-44: Imágenes de SEM del ensayo SFIC1, al finalizar el proceso de biodesulfurización. (a.) Framboides con una disminución en los cristales que los conforman (100X), (b.) oxidación parcial de una masa de pirita rodeada por framboides parcial y totalmente oxidados (2300X). SF: sulfato férrico, II: 50:50, C1: 200 mg/L.

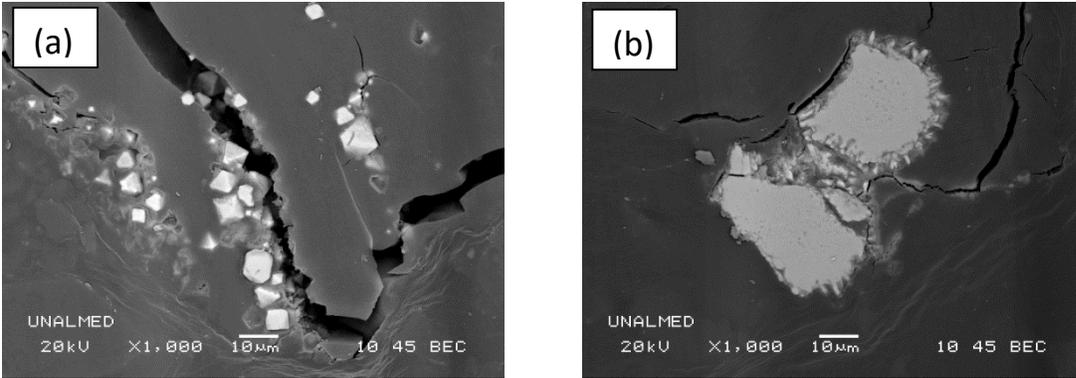


Figura 4-45: Imágenes de SEM del ensayo SFIIC1, después de 12 días de experimentación. (a.) Cristales euedrales con evidencias de corrosión, rodeados de sulfatos de hierro, (b.) Grano de carbón en donde se observaron granos de pirita con golfos de corrosión. SF: sulfato férrico, III: 80:20, C1: 200 mg/L.

Para los carbones tratados con sulfato férrico y una concentración de hierro total de 1200mg/L, también se aprecia una oxidación importante de los granos de pirita, como se muestra en las Figuras 4-46 a 4-48. Se observan golfos de corrosión de los cristales, algunos de los cuales se encuentran rodeados por precipitados. Además, se aprecia que la oxidación se da tanto dentro como en los límites del sulfuro metálico.

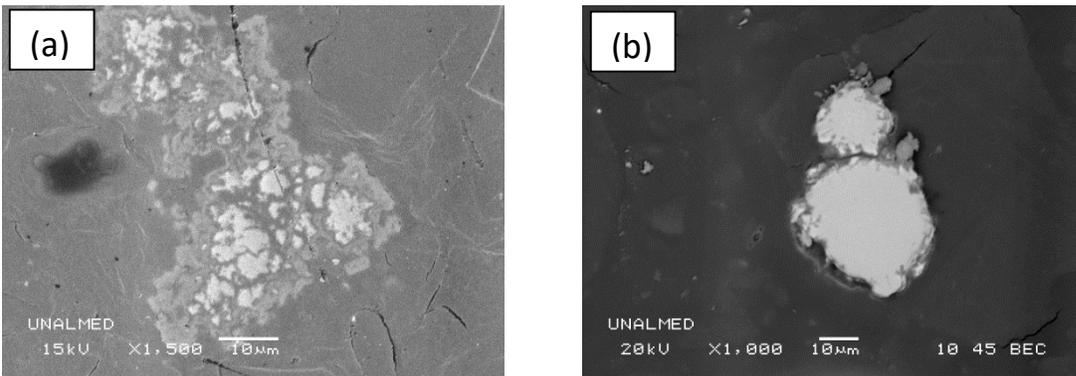


Figura 4-46: Evidencias de oxidación en la pirita del ensayo SFIC2, después de 12 días de proceso. (a.) grano de pirita parcialmente corroído, rodeado de precipitados (1500X), (b.) Granos de pirita con golfos de corrosión (1000X). SF: sulfato férrico, I: 20:80; C2: 1200 mg/L.

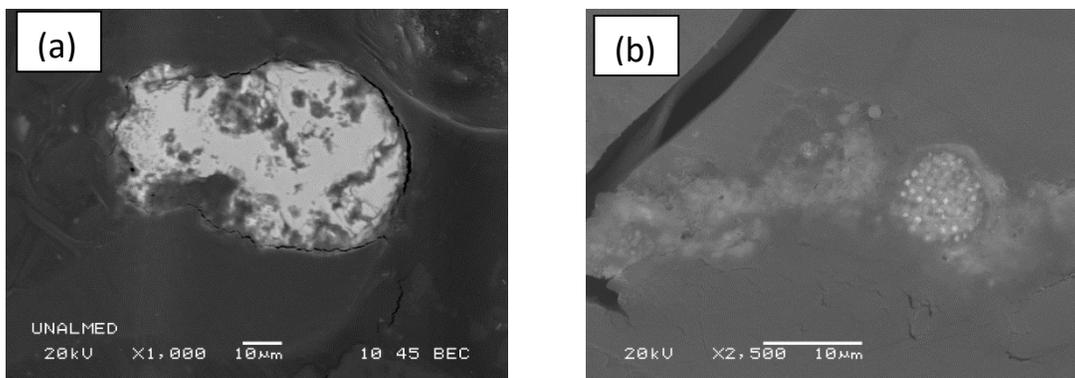


Figura 4-47: Evidencias de oxidación en la pirita del ensayo SFIIIC2, después de 12 días de proceso. (a.) grano de pirita parcialmente oxidado tanto en los límites como en el interior (1000X), (b.) Framboide con una disminución de los cristales que los conforman rodeado por precipitados (2500X). SF: sulfato férrico, II: 50:50, C2: 1200 mg/L.

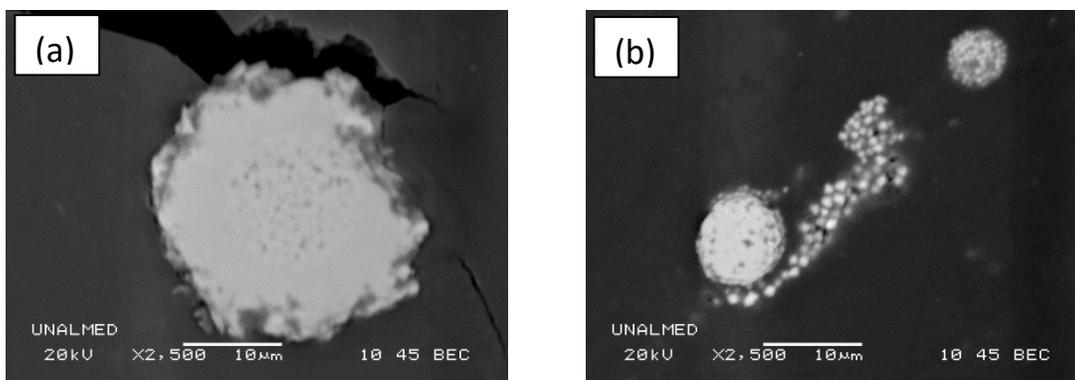


Figura 4-48: Imágenes de SEM del ensayo SFIIIC2, al finalizar el proceso de biodesulfurización. (a.) Cristal de pirita con pozos y golfos de corrosión (2500X), (b.) Framboides con espacios vacíos en su interior que indican la oxidación del sulfuro metálico (2500X). SF: sulfato férrico, III: 80:20, C2: 1200 mg/L

Las Figuras 4-49 a 4-51 presentan las imágenes obtenidas de los experimentos en los cuales se empleó cloruro férrico y una concentración de hierro total baja (200mg/L), observándose resultados similares a los obtenidos por los ensayos con sulfato férrico a las mismas condiciones, caracterizados por pozos, golfos de corrosión de los granos de pirita y disminución de los cristales que conforman los framboides.

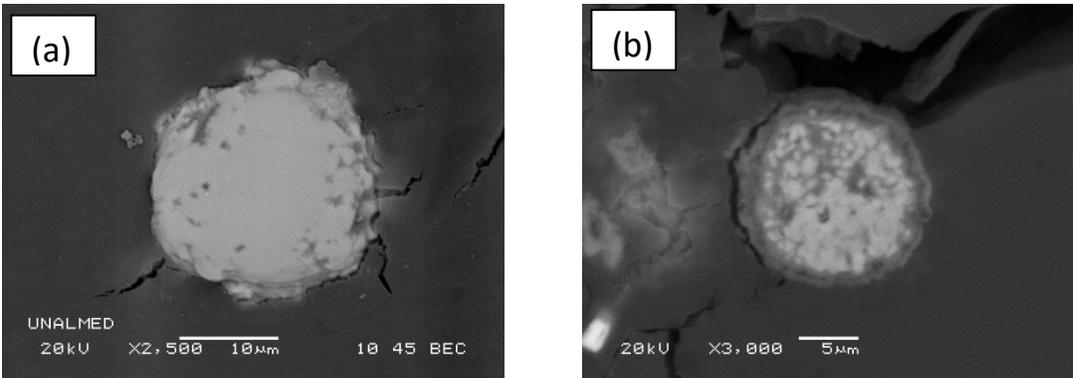


Figura 4-49: Evidencias de oxidación en la pirita del ensayo CFIC1, después de 12 días de proceso. (a.) grano de pirita con golfos de corrosión (2500X), (b.) Precipitados rodeando un framboide parcialmente oxidado (3000X). CF: cloruro férrico, I: 20:80; C1: 200 mg/L.

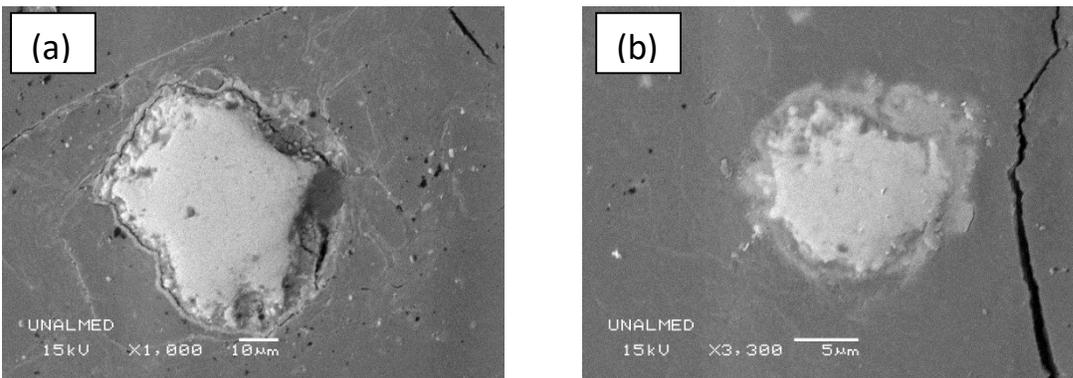


Figura 4-50: Evidencias de oxidación en la pirita del ensayo CFIC1, después de 12 días de proceso. (a.) Precipitados alrededor de un grano de pirita corroído (1000X), (b.) Masa de pirita oxidada, rodeada de precipitados (1000X). CF: cloruro férrico, II: 50:50; C2: 1200 mg/L.

En la Figura 4-51 se observaron granos de pirita parcialmente oxidados. Sin embargo, en este caso la corrosión de los granos presentó un patrón diferente comparado con los experimentos con sulfato férrico, evidenciándose canales entre los granos de pirita y remoción de parte de la pirita preexistente, además, los precipitados se encuentran no solo rodeando los granos si no sobre la superficie del carbón.

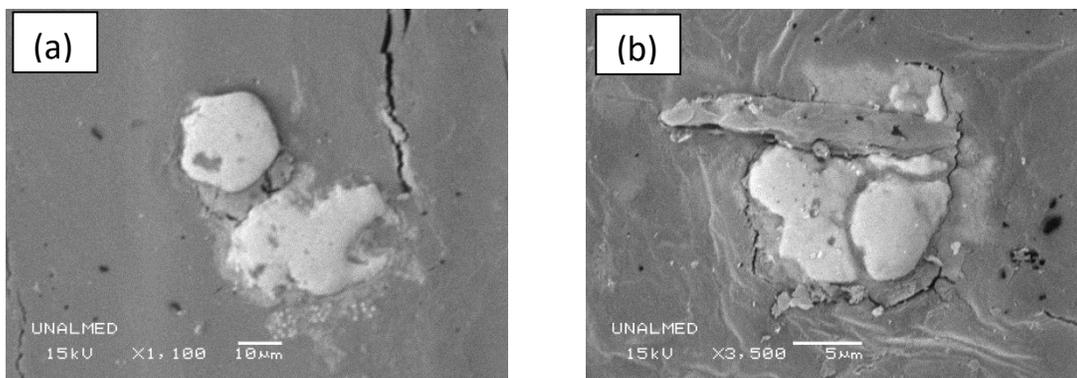


Figura 4-51: Evidencias de oxidación en la pirita del ensayo CFIIIC1, después de 12 días de proceso. (a.) Masas de pirita oxidadas y rodeadas por precipitados (1100X), (b.) Masa de pirita oxidada (3500X). CF: cloruro férrico, III: 80:20, C2: 1200 mg/L.

Las micrografías de los bioensayos con cloruro férrico y mayores concentraciones iniciales de hierro total (1200 mg/L), se muestran en las Figuras 4-52 a 4-54. Estos experimentos se caracterizaron por la presencia de precipitados. Además, se observó corrosión de los granos de pirita y la disminución de los cristales que conforman los framboides, así, como canales de corrosión que atravesaron las masas de pirita y los precipitados sobre la superficie del carbón.

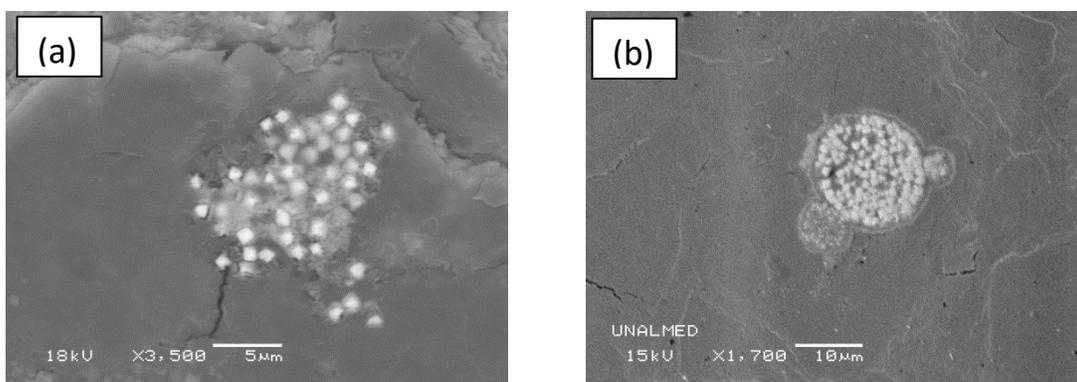


Figura 4-52: Micrografías de los granos de pirita para el ensayo CFIC2, al finalizar el proceso de biodesulfurización. (a.) precipitados rodeando cristales euedrales de pirita parcial o totalmente corroídos (3500X), (b.) Precipitados rodeando framboides parcial y totalmente oxidados (1700X). CF: cloruro férrico, I: 20:80, C2: 1200 mg/L.

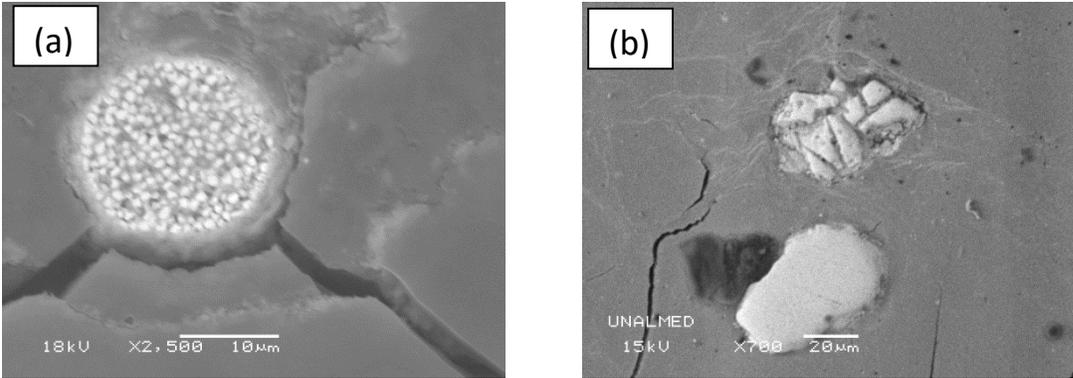


Figura 4-53: Imágenes de SEM del ensayo CFIIC2, al finalizar el proceso de biodesulfurización. (a.) Framboide con disminución en los cristales (2500X), (b.) Masa de pirita con canales de corrosión (1000X). CF: cloruro férrico, II: 50:50, C2: 1200 mg/L

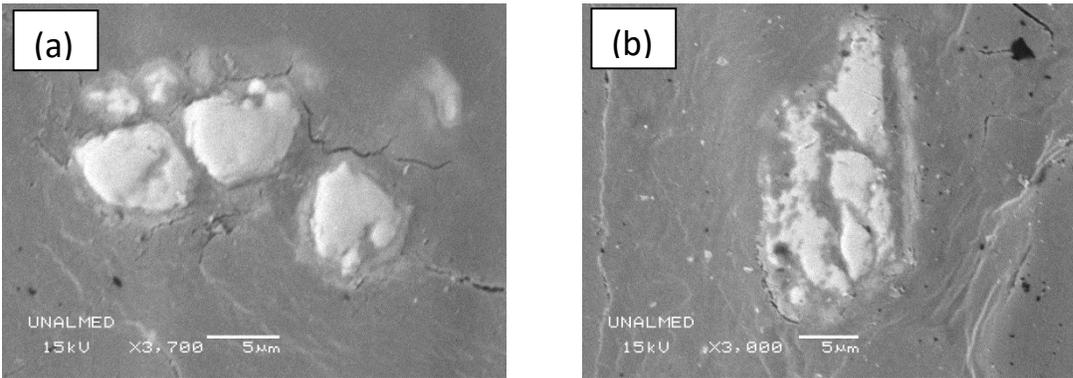


Figura 4-54: Imágenes de SEM para el ensayo CFIIC2, al finalizar el proceso de biodesulfurización. (a.) Masas de pirita parcialmente corroídas (3700X), (b.) Masa de pirita con canales de oxidación (3000X). CF: cloruro férrico, III: 80:20, C2: 1200 mg/L.

Los precipitados evidenciados en los experimentos están asociados a jarosita, cuya presencia fue detectada previamente mediante DRX y FTIR. Se puede observar que mientras el área ocupada por los cristales de pirita contuvieron hierro y azufre principalmente, los bordes de los cristales y el interior (framboides) estuvieron conformados por oxígeno, azufre y hierro, asociados a jarosita.

Las Figuras 4-55 a 4-60 muestran los microanálisis químicos de los granos de pirita de los ensayos en los cuales se adicionaron relaciones iniciales de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} empleando sulfato férrico, después de doce días de experimentación. En estas es posible observar granos de pirita rodeados principalmente de oxígeno, azufre, potasio e hierro, asociados a jarosita según los análisis de difracción de rayos X (DRX) y espectros obtenidos mediante FTIR.

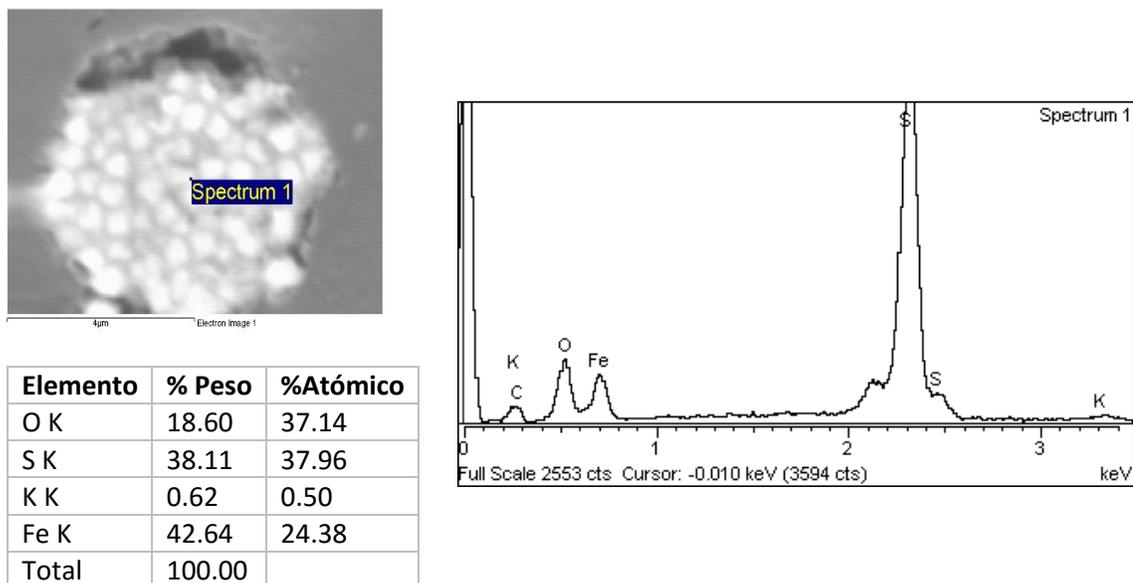


Figura 4-55: Microanálisis químico de un framboide con presencia de precipitados, muestra de carbón tratado con sulfato férrico (SFIC1). SF: sulfato férrico, I: 20:80, C1: 200 mg/L.

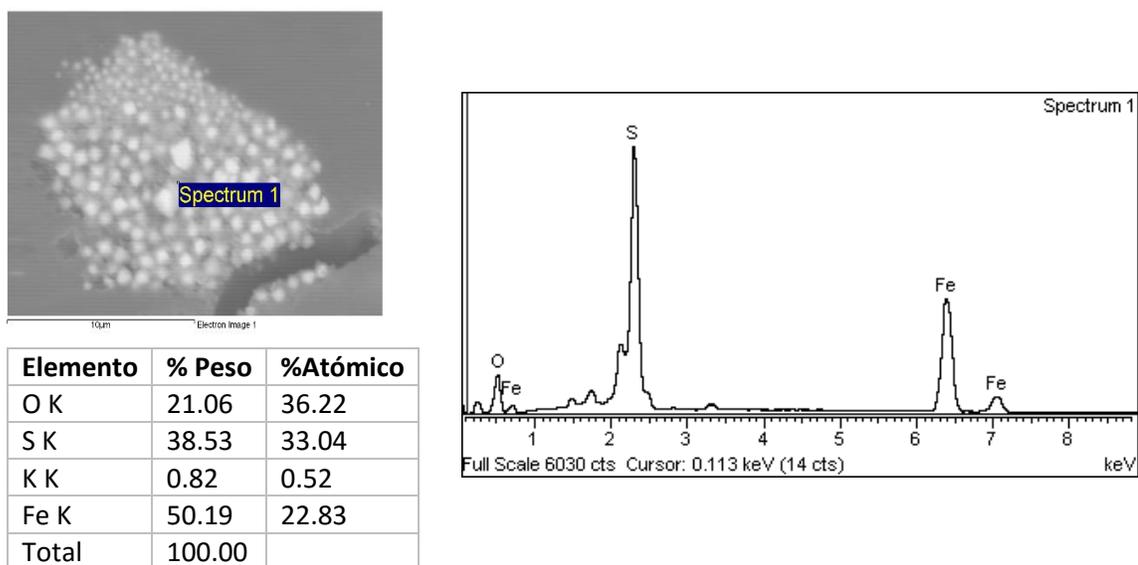
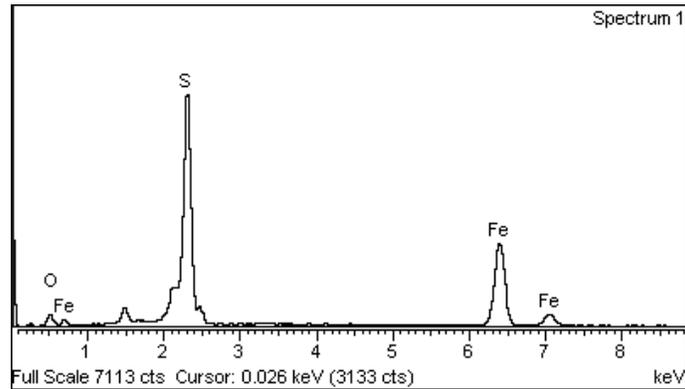
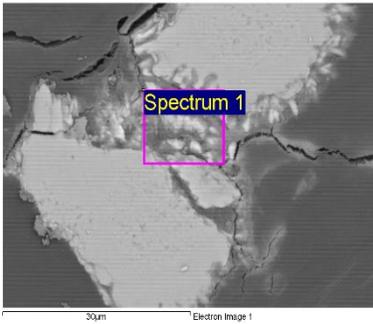
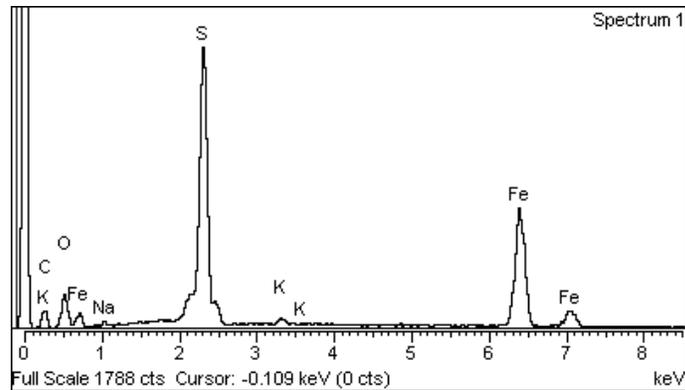
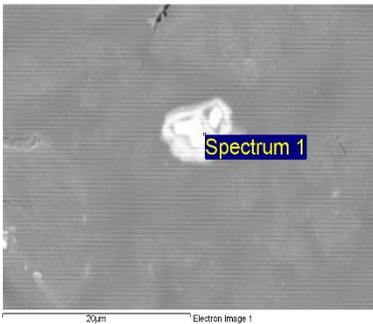


Figura 4-56: Microanálisis químico de un framboide con presencia de precipitados, muestra de carbón tratado con sulfato férrico (SFIC1). SF: sulfato férrico, II: 50:50, C1: 200 mg/L.



| Elemento | % Peso | %Atómico |
|----------|--------|----------|
| O K | 8.43 | 19.71 |
| S K | 38.27 | 44.62 |
| Fe K | 53.29 | 35.67 |
| Total | 100.00 | |

Figura 4-57: Microanálisis químico de los bordes de un cristal de pirita con presencia de precipitados, muestra de carbón tratado con sulfato férrico (SFIIC1). SF: sulfato férrico, III: 80:20, C1: 200 mg/L.



| Elemento | % Peso | %Atómico |
|----------|--------|----------|
| O K | 17.26 | 36.41 |
| S K | 30.36 | 31.94 |
| Fe K | 52.38 | 31.65 |
| Total | 100.00 | |

Figura 4-58: Microanálisis químico de los bordes de un cristal de pirita con presencia de precipitados, muestra de carbón tratado con sulfato férrico (SFIC2). SF: sulfato férrico, I: 20:80, C2: 1200 mg/L

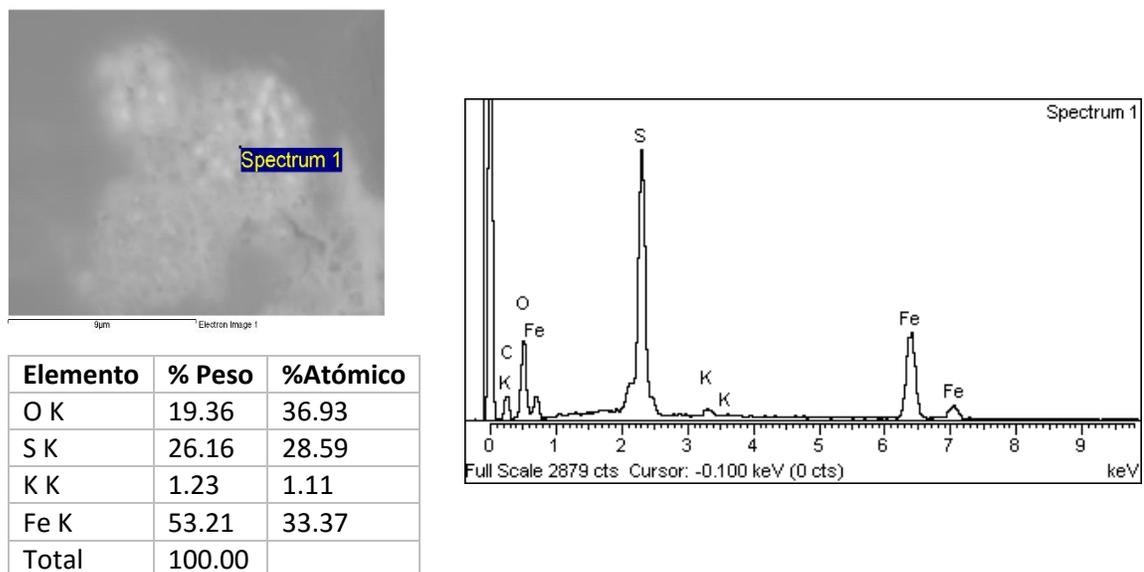


Figura 4-59: Análisis de microquímico de los precipitados que rodean los cristales de un framboide sin pirita, para el carbón del ensayo SFIIC2. SF: sulfato férrico, II: 50:50, C2: 1200 mg/L.

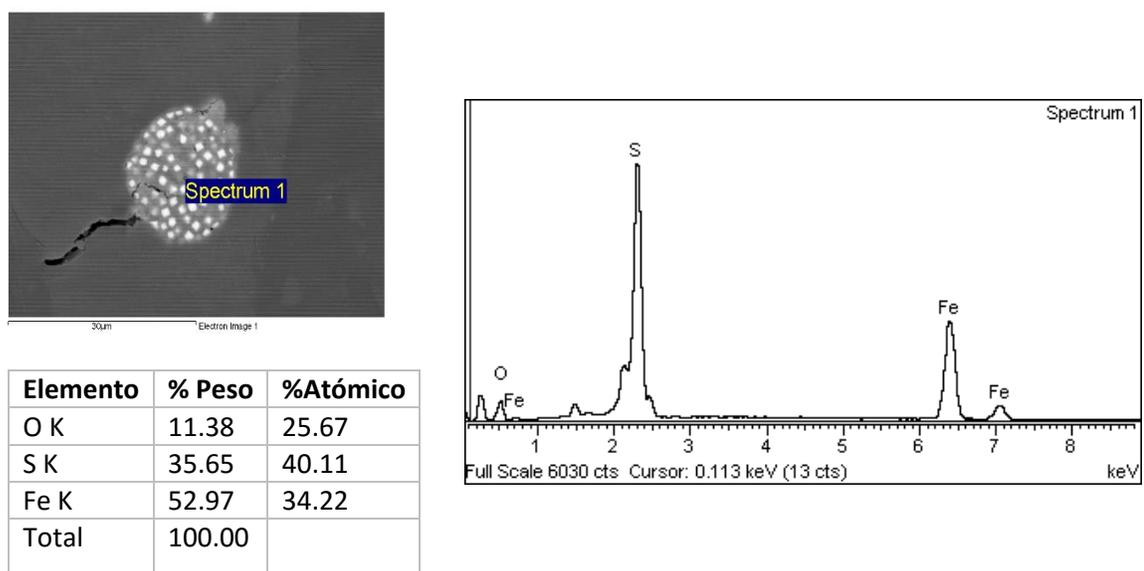
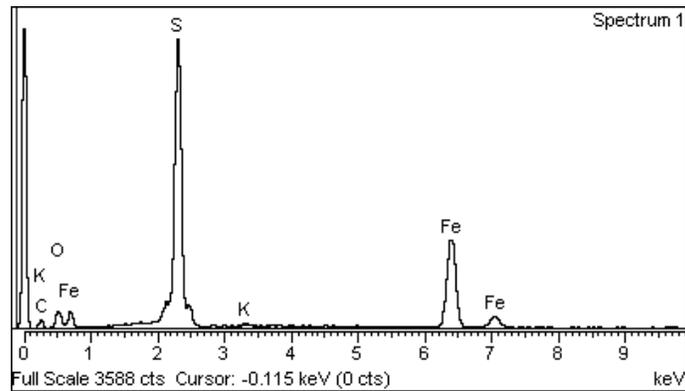
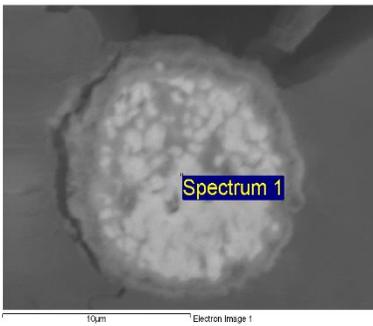


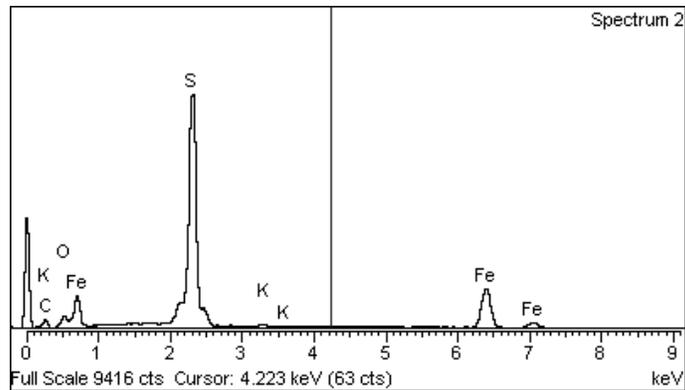
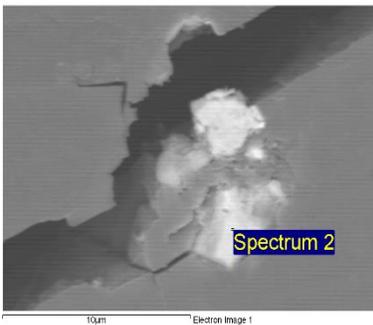
Figura 4-60: Análisis de microquímico de los precipitados que rodean los cristales de un framboide sin pirita, para el carbón del ensayo SFIIC2. SF: sulfato férrico, III: 80:20, C2: 1200 mg/L.

Las Figuras 4-61 a 4-66 muestran la composición de los precipitados de los ensayos tratados con cloruro férrico. Los cuales se encuentran rodeando los cristales de pirita y están compuestos principalmente por oxígeno, azufre y hierro, que mediante DRX y FTIR se determinó que estos correspondían a jarosita (Figuras 4-37, 4-38, 4-41 y 4-42).



| Elemento | % Peso | %Atómico |
|----------|--------|----------|
| O K | 10.69 | 23.90 |
| S K | 39.59 | 44.16 |
| K K | 0.41 | 0.37 |
| Fe K | 49.29 | 31.56 |
| Total | 100.00 | |

Figura 4-61: Cúmulo de pirita rodeado por sulfatos precipitados de hierro con su respectivo análisis microquímico, para el carbón del ensayo CFIC1. CF: cloruro férrico, I: 20:80, C1: 200 mg/L.



| Elemento | % Peso | %Atómico |
|----------|--------|----------|
| O K | 6.40 | 14.83 |
| S K | 46.17 | 53.54 |
| Fe K | 47.41 | 31.56 |
| Total | 100.00 | |

Figura 4-62: Grano de pirita rodeado por sulfatos precipitados de hierro con su respectivo análisis microquímico, para el carbón del ensayo CFIC1. CF: cloruro férrico, II: 50:50, C1: 200 mg/L.

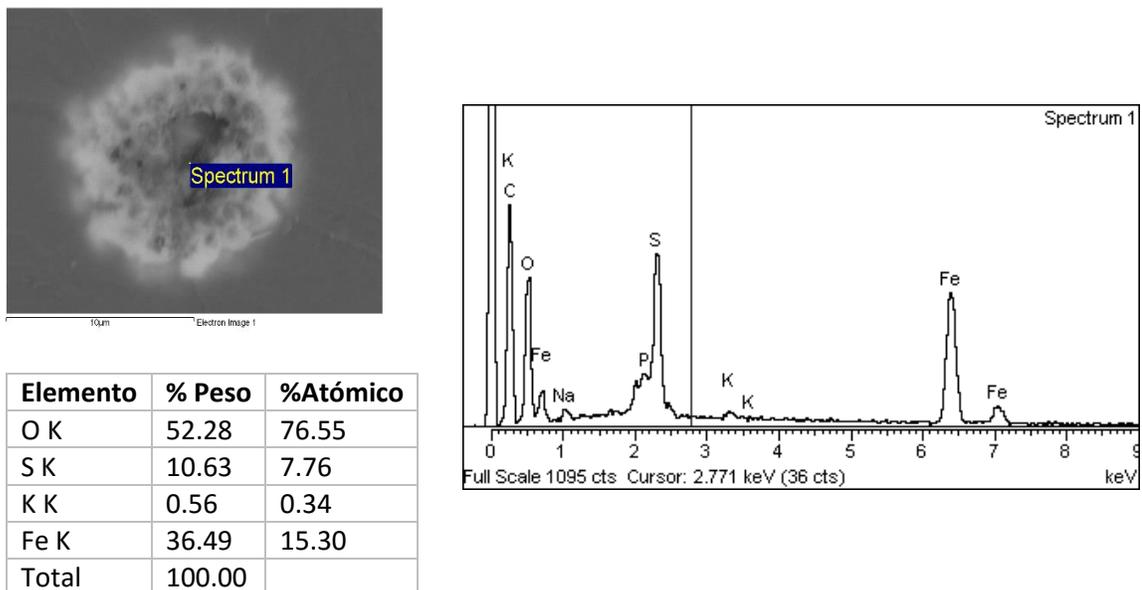


Figura 4-63: Grano de pirita rodeado por sulfatos precipitados de hierro con su respectivo análisis microquímico, para el carbón del ensayo CFIIC1. CF: cloruro férrico, III: 80:20, C1: 200 mg/L.

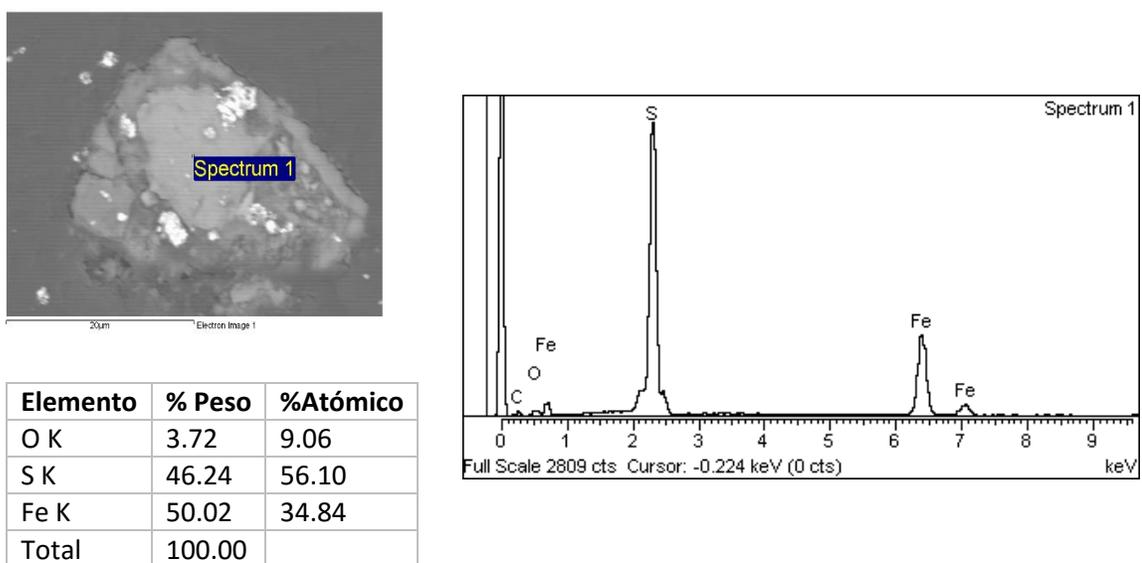
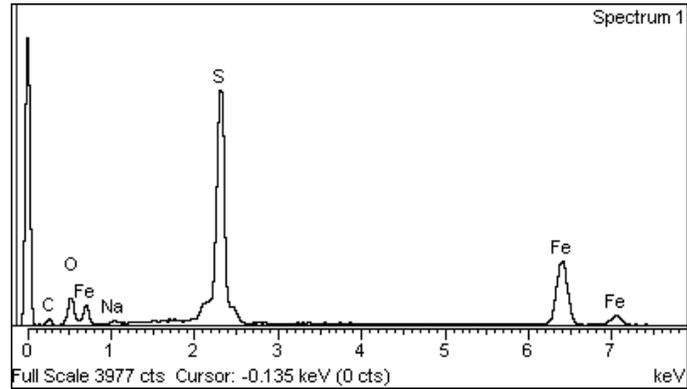
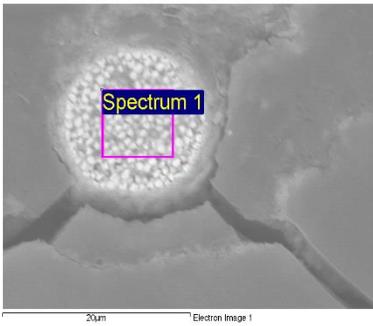
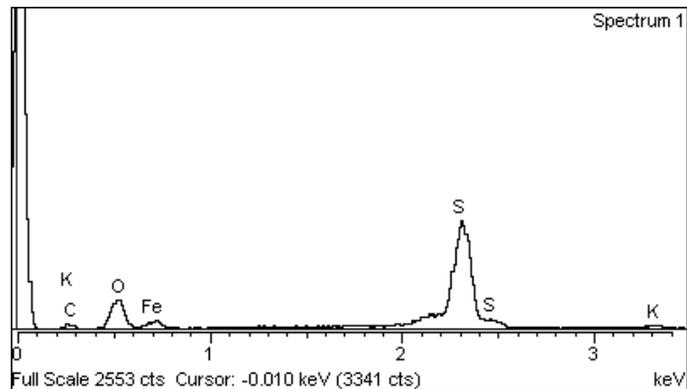
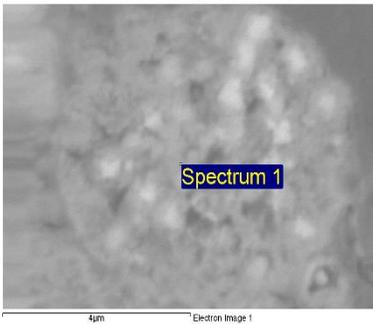


Figura 4-64: Grano de pirita rodeado por sulfatos precipitados de hierro con su respectivo análisis microquímico, para el carbón del ensayo CFIC2. CF: cloruro férrico, I: 20:80, C2: 1200 mg/L.



| Elemento | % Peso | %Atómico |
|----------|--------|----------|
| O K | 16.54 | 33.85 |
| S K | 36.95 | 37.75 |
| Fe K | 46.51 | 27.27 |
| Total | 100.00 | |

Figura 4-65: Grano de pirita rodeado por sulfatos precipitados de hierro con su respectivo análisis microquímico, para el carbón del ensayo CFIIC2. CF: cloruro férrico, II: 50:50, C2: 1200 mg/L.



| Elemento | % Peso | %Atómico |
|----------|--------|----------|
| O K | 18.92 | 39.20 |
| S K | 28.03 | 28.98 |
| K K | 1.14 | 0.96 |
| Fe K | 51.91 | 30.83 |
| Total | 100.00 | |

Figura 4-66: Framboide rodeado por sulfatos precipitados de hierro con su respectivo análisis microquímico, para el carbón del ensayo CFIIC2. CF: cloruro férrico, III: 80:20, C2: 1200 mg/L.

La Figura 4-67 se presenta un mapa composicional para un fragmento de carbón que contiene un framboide sin pirita, rodeado de sulfatos, después de doce días de proceso. A partir de él, se puede determinar la distribución espacial de elementos como S, C, O, Fe, Al.

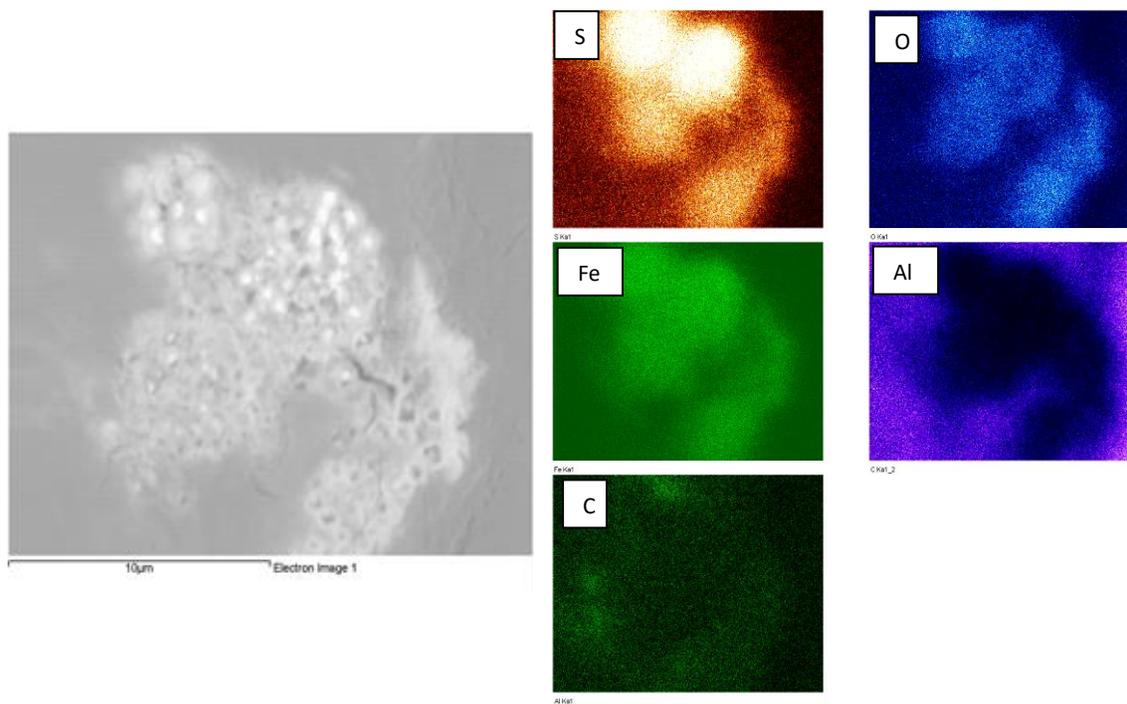


Figura 4-67: Mapa composicional en donde se observa la variación espacial de los precipitados formados alrededor de los cristales de pirita en el carbón tratado con sulfato férrico, después de doce días de proceso.

4.5 Análisis del proceso bioquímico a mayor escala usando tanques agitados

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los ensayos a nivel de erlenmeyer (véase sección 4.4), correspondientes al porcentaje de hierro removido, pirita oxidada, las formas de azufre y los análisis mineralógicos (DRX y FTIR) obtenidos al finalizar el proceso de biodesulfurización empleando sales férricas, se seleccionaron los parámetros para llevar a cabo el proceso en reactores agitados (fuente de hierro, proporción y concentración). De esta manera, la sal seleccionada fue sulfato férrico, las relación inicial Fe^{3+}/Fe^{2+} I: 20:80 y II: 50:50 y una concentración de hierro total de 200 mg/L, ya que a estas condiciones se dieron las mayores remociones de azufre pirítico y mayor solubilización de los productos de la oxidación.

4.5.1 Medidas de pH y Eh

La Figura 4-68 muestra la curva de pH y Eh para el ensayo SFI y SFII y sus respectivos controles abióticos, llevados a cabo en el reactor de tanque agitado, durante 12 días de experimentación. En general, los ensayos comenzaron con un pH de 1.50, posteriormente, se evidenció una caída en los valores alrededor de 1.40 (día dos), a partir del cual el pH continuó disminuyendo con una tendencia constante y se estabilizó alrededor de 1.27.

Por otra parte, los controles abióticos no mostraron cambios significativos en el pH, este se mantuvo estable entre 1.40 - 1.50 hasta finalizar el proceso.

En cuanto al comportamiento del potencial de óxido- reducción (Eh), el ensayo SFI inició el proceso en 550 mV. Entre el día cero y el día dos, los valores disminuyen hasta 450 mV, posteriormente, mostrando un crecimiento exponencial entre el día dos y el día cuatro, con un continuo incremento en los valores hasta finalizar el proceso en 660mV. De otro lado, El ensayo SFII mostró resultados similares, con excepción de una clara diferencia en el valor de partida (525 mV). Adicionalmente, se observó una rápida estabilización de los valores en 590 mV (día ocho).

Los controles abióticos evidenciaron una disminución en los valores entre el día cero y el día dos alrededor de 445mV-430 mV. No obstante, después del día dos, no se observaron cambios significativos, finalizando el proceso alrededor de 440 mV.

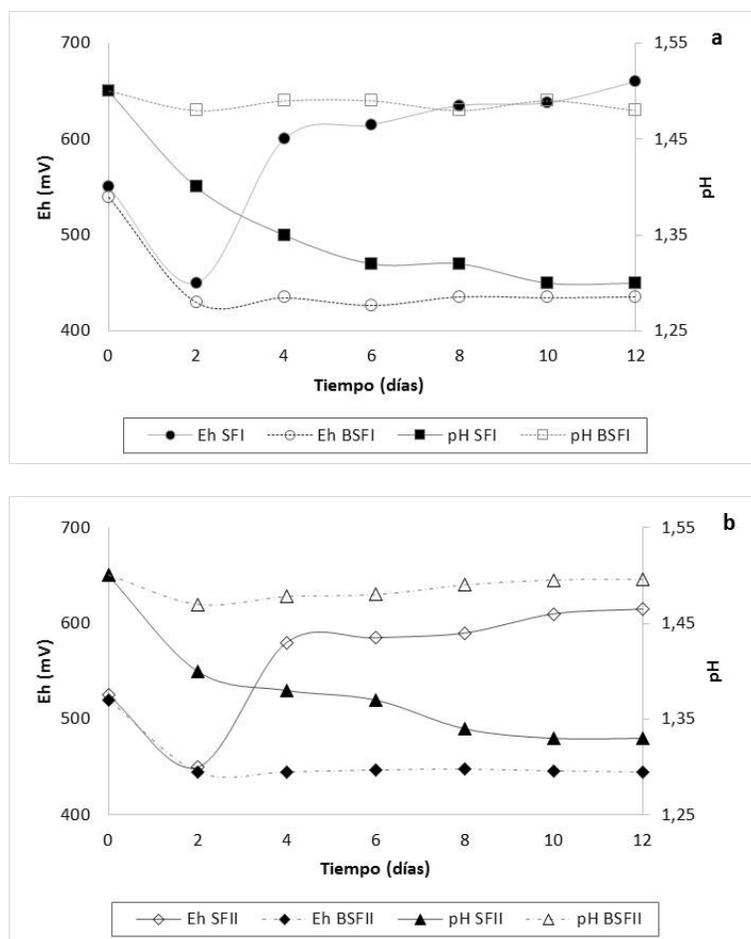


Figura 4-68: Comportamiento del pH y Eh en función del tiempo, para el ensayo SFI, SFII y sus respectivos controles abióticos. SF: sulfato férrico; I: relación $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ (20:80), II: relación $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ (50:50), y una concentración de hierro total de 200 mg/L. B: Control abiótico.

4.5.2 Concentración celular

La Figura 4-69 muestra el comportamiento de la concentración celular en el tiempo para los ensayos SFI y SFII, durante doce días de experimentación. En general, los ensayos presentaron un comportamiento similar, caracterizado por una fase *lag* los primeros dos días del proceso. Posteriormente, se evidenció un crecimiento exponencial o fase logarítmica (cuarto día), cuando se alcanzó la fase estacionaria.

En este sentido, el ensayo SFII presentó un crecimiento lento en relación con SFI, especialmente, los primeros días (2.1×10^7 células/mL). Después de esto, mantuvo una tendencia de crecimiento constante incrementando la cantidad de células en solución (6.0×10^8 células/mL). El ensayo SFI mostró las mayores tasas de concentración celular (8.8×10^8 células/mL) durante todo el proceso, este resultado es coherente con el comportamiento de pH y Eh (Figura 3-67).

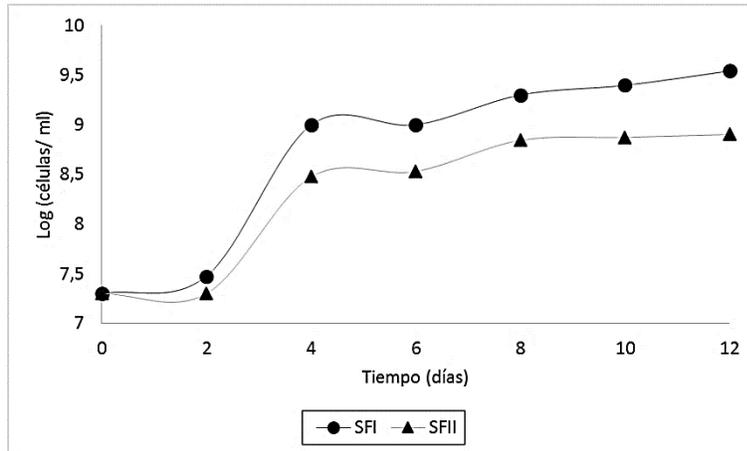


Figura 4-69: Crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en solución en función del tiempo, para los bioensayos con sulfato férrico: SFI, SFII. SF: sulfato férrico; I: relación $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (20:80), II: relación $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (50:50), y una concentración de hierro total de 200 mg/L.

4.5.3 Hierro removido

La Figura 4-70 muestra el porcentaje de hierro removido en el tiempo para los experimentos. Se observó que al aumentar la concentración de iones férricos inicial en la solución (SFII), disminuyó la tasa de lixiviación de hierro (52%). En contraste, el bioensayo SFI con menor relación de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, alcanzó mayor solubilización de los productos (72%), después de doce días de experimentación.

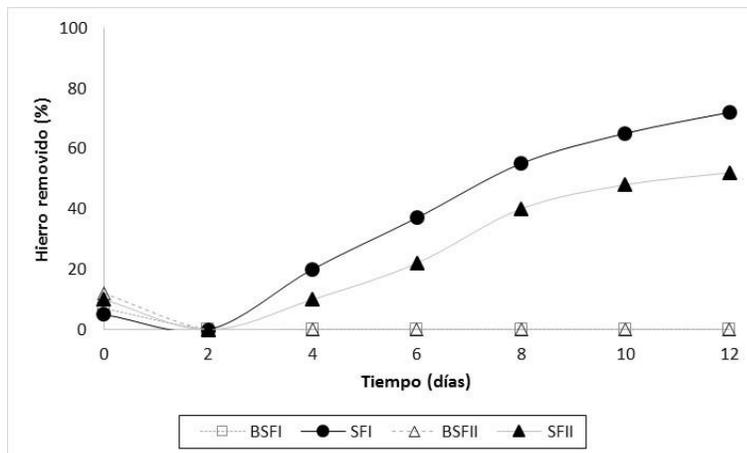


Figura 4-70: Porcentaje de hierro lixiviado en función del tiempo, para los ensayos con sulfato férrico SFI y SFII. SF: sulfato férrico; I: relación $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (20:80), II: relación $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (50:50), y una concentración de hierro total de 200 mg/L.

4.5.4 Formas de azufre y análisis próximos

Los porcentajes de pirita oxidada obtenidos en los reactores de tanque agitado se muestran en la Figura 4-71. A nivel general, al trabajar con una menor relación inicial de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (20:80), se obtuvieron los más altos porcentajes de oxidación 80% (SFI), en comparación con los ensayos a los cuales se les adicionó una mayor relación de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (50:50), los cuales solo alcanzaron un 65% (SFII) de oxidación del sulfuro metálico.

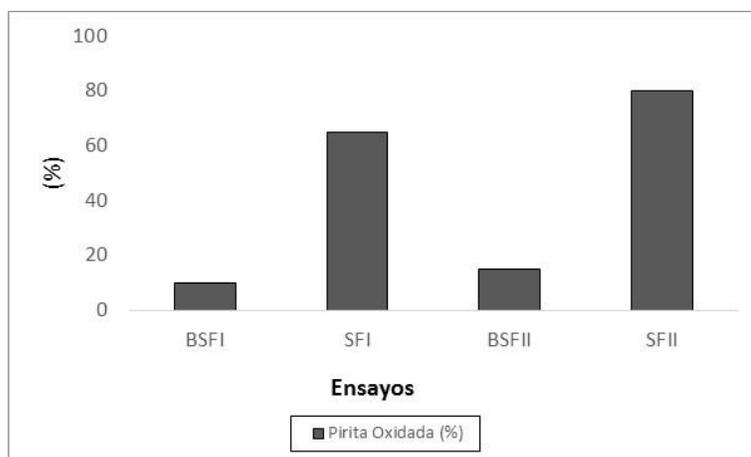


Figura 4-71: Porcentaje de pirita oxidada en función del tiempo, para los ensayos con sulfato férrico SFI y SFII. SF: sulfato férrico; I: relación $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (20:80), II: relación $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (50:50), y una concentración de hierro total de 200 mg/L. B: Control abiótico.

La Tabla 4-7 muestra los resultados obtenidos de las formas de azufre y los análisis próximos del carbón tratado con el proceso de bioquímico de desulfurización, empleando reactores de tanque agitado, en general, es posible observar que el mayor porcentaje de hierro lixiviado (71.4%) y pirita oxidada (80%), fue obtenido por el ensayo al cual se le adicionó una relación inicial de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ menor (SFI). Vale la pena mencionar, que el ensayo SFII presentó mayor precipitación de sulfatos, los cuales se suman al porcentaje de azufre total y disminuyeron el efecto del proceso de biodesulfurización.

Según los resultados obtenidos de los análisis próximos, es posible determinar que las muestras presentaron un aumento en los valores de carbono fijo, humedad residual, materia volátil, así como, una reducción en el porcentaje de cenizas.

Finalmente, se observa un incremento en la capacidad calorífica de los carbones tratados, especialmente para el ensayo con una relación inicial $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ mayor (SFII) (5751 Cal/g).

Tabla 4-7: Formas de azufre y análisis próximos al finalizar el proceso de biodesulfurización en tanques agitados, para los ensayos SFI, SFII y SFIII

| Análisis | Unidades | Inicial | SFI | SFII |
|----------------------|----------|---------|-------|-------|
| Azufre pirítico | (%) | 1.06 | 0.27 | 0.43 |
| Azufre orgánico | (%) | 1.10 | 0.90 | 0.90 |
| Azufre sulfatos | (%) | 0.14 | 0.58 | 0.67 |
| Azufre total | (%) | 2.30 | 1.75 | 2.00 |
| Humedad residual | (%) | 14.20 | 14.62 | 14.42 |
| Cenizas | (%) | 5.50 | 4.86 | 5.01 |
| Materia Volátil | (%) | 40.20 | 41.01 | 41.10 |
| Carbono fijo | (%) | 40.10 | 42.40 | 41.80 |
| Capacidad calorífica | (Cal/g) | 5730 | 5780 | 5761 |

4.5.5 Difracción de rayos X (DRX)

Los espectros de DRX para los ensayos tratados con sulfato férrico (SFI y SFII), comparados con la muestra de carbón sin tratar, se muestran en la Figura 4-72, es posible observar que los picos asociados a la pirita desaparecen completamente en ambos experimentos. Adicionalmente, se detecta la presencia de jarosita en cantidades significativas, especialmente, para el ensayo con mayor relación inicial $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (50:50). Cabe resaltar que la formación de jarosita en estos experimentos fue muy similar a la obtenida a nivel de erlenmeyers a mayor concentración de hierro total (1200 ppm) (véase capítulo 3.4, sección 3.4.5).

En el ensayo SFI, se detectó la presencia de un pico de yeso. No se detectaron cambios notables en los picos de los minerales encontrados en la muestra de carbón inicial, a excepción de la desaparición de los picos asociados a dolomita y nacrita.

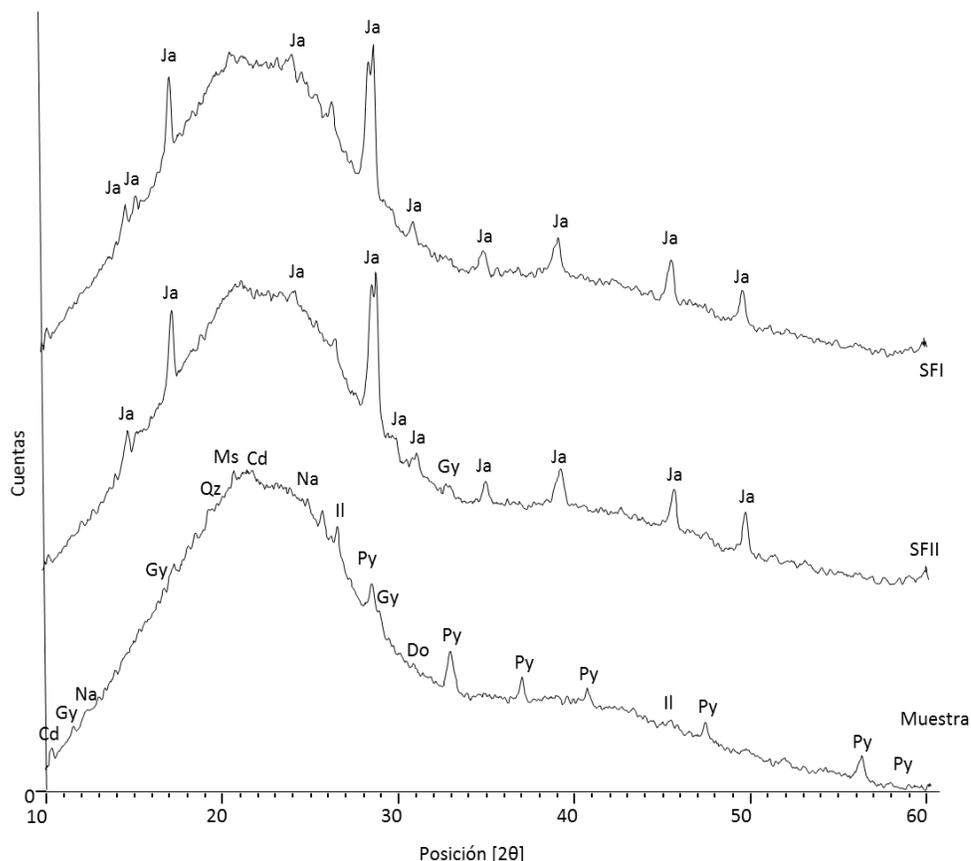


Figura 4-72: Difractograma de la muestra de carbón inicial y los ensayos SFI y SFII al finalizar el proceso de biodesulfurización en reactores de 5 litros. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50. Cd: cordierita, Gy: yeso, Na: nacrita, Qz: cuarzo, Ms: moscovita, Py: piritita, II: Ilita, Do: dolomita, Ja: jarosita.

4.5.6 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 4-73, se pueden observar los espectros de FTIR para las muestras biooxidadas en reactores de tanque agitado, en comparación con la muestra de carbón inicial. La interpretación de las diferentes bandas contenidas en los espectros, se realizó con base en la Tabla 4-6.

A nivel general, las bandas asociadas a la fracción orgánica del carbón no presentaron cambios durante los procesos. Las principales diferencias obtenidas entre las muestras de carbón tratado y la original correspondieron a las bandas de minerales como sulfatos (jarositas), las cuales aparecieron en las muestras biooxidadas y con mayor intensidad en aquella donde se usó una mayor concentración inicial de sulfato férrico (SFII). Por último, la banda asociada a los grupos OH, también se intensificó en las muestras biodesulfurizadas. Adicionalmente, se observó un incremento en la intensidad de las bandas de yeso en las muestras tratadas, especialmente en SFII.

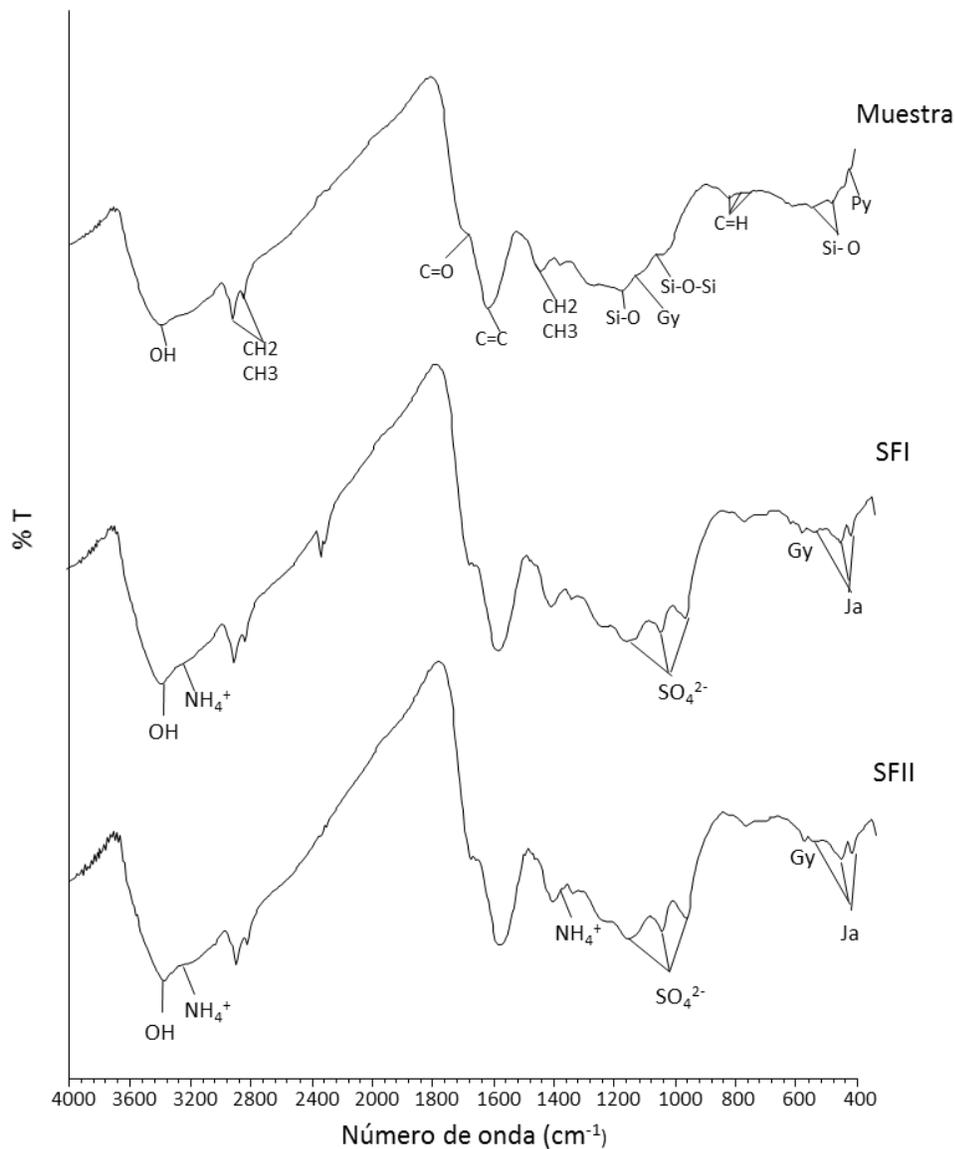


Figura 4-73: Espectros de la muestra de carbón inicial y los ensayos SFI y SFII al finalizar el proceso de biodesulfurización en reactores de 5 litros. SF: sulfato férrico, I: 20:80; II: 50:50. SO_4^{2-} : sulfatos, NH_4^+ : amonio, Ja: jarosita, Gy: yeso, Py: pirita.

4.5.7 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de microscopia electrónica de barrido para los ensayos SFI y SFII se muestran en las Figuras 4-74 y 4-75 respectivamente. Se pudo evidenciar el efecto del proceso de biodesulfurización sobre los granos de pirita, una vez finalizado el proceso de biodesulfurización.

En el ensayo SFI se apreciaron *pits* de corrosión en las áreas previamente ocupadas por cristales que conformaban el framboide, adicionalmente, se detectó la presencia de sulfatos precipitados de hierro, los cuales se encuentran formando un tipo de capa sobre la superficie del carbón.

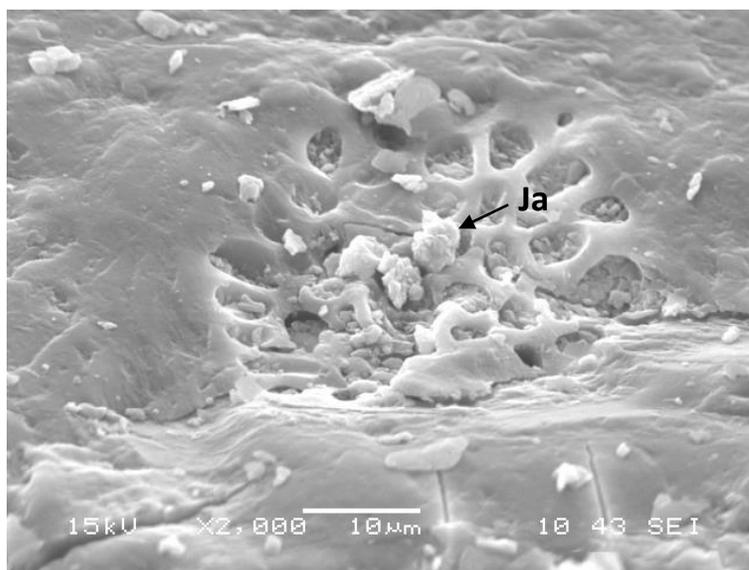


Figura 4-74: Framboide completamente corroído con presencia de precipitados de hierro (jarosita) sobre la superficie del carbón, para el ensayo SFI (2000X). SF: sulfato férrico, I: 20:80.

El carbón obtenido del ensayo SFII muestra evidencias de oxidación de pirita, se puede observar una corrosión redondeada que se extendió sobre la superficie de los granos de carbón, y que contrastó con la superficie lisa en otros puntos. Adicionalmente, se observó la formación de precipitados sobre el carbón.

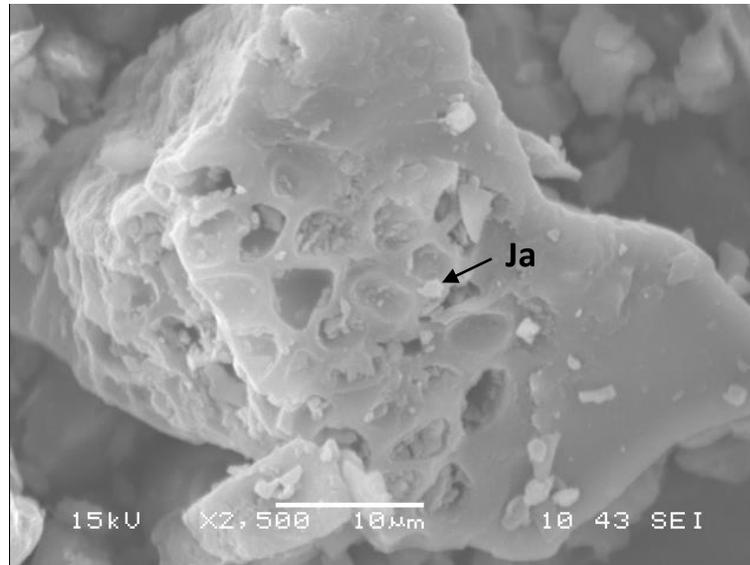
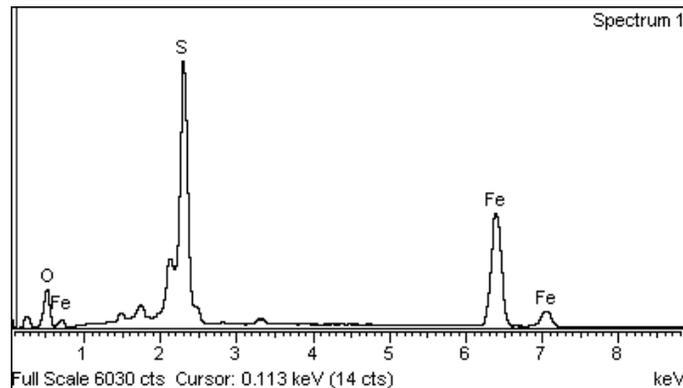


Figura 4-75: Grano de carbón ensayo SFII, con evidencias de corrosión y presencia de precipitados de hierro (jarosita) sobre la superficie del mismo (2500X). SF: sulfato férrico, II: 50:50

Las Figuras 4-76 y 4-77 muestran la composición de los precipitados detectados en la superficie de ambas muestras biooxidadas. Estos precipitados están conformados principalmente por oxígeno, hierro y azufre.



| Elemento | % Peso | %Atómico |
|----------|--------|----------|
| O K | 22.75 | 46.06 |
| S K | 18.01 | 18.19 |
| K K | 5.64 | 4.66 |
| Fe K | 53.56 | 31.05 |
| Total | 100.00 | |

Figura 4-76: Análisis microquímico de los precipitados evidenciados en el ensayo SFI. SF: sulfato férrico, I: 20:80.

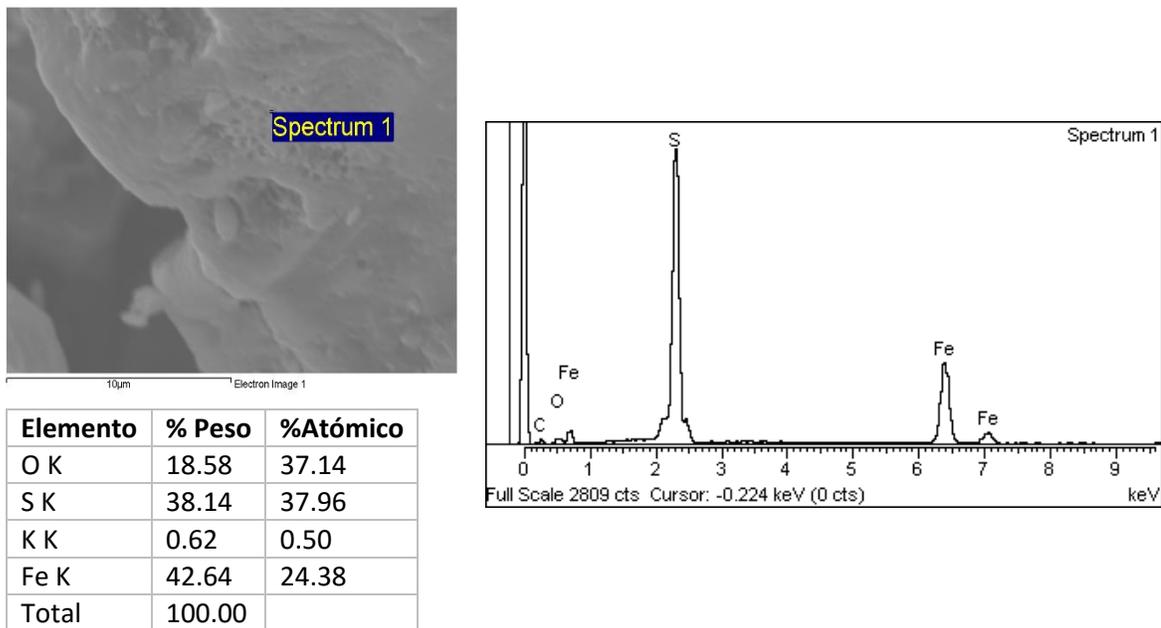


Figura 4-77: Análisis microquímico de los precipitados evidenciados en el ensayo SFII. SF: sulfato férrico, II: 50:50

5. Discusión

Todos los ensayos realizados en este estudio, exceptuando los experimentos abióticos, mostraron claras evidencias de oxidación de pirita, las cuales fueron detectadas mediante los análisis químicos y mineralógicos de las muestras de carbón resultantes del proceso de biodesulfurización. Sin embargo, se comprobó que la eficiencia del proceso está determinada por ciertos parámetros asociados al carbón (ej. formas de azufre, minerales presentes, forma de ocurrencia de la pirita) y a las condiciones del sistema (ej. pH, iones, temperatura, entre otros).

En este caso particular, se comprobó que tanto la fuente de hierro como la concentración influyeron significativamente sobre el proceso de desulfurización biológica, potenciando o inhibiendo la actividad oxidativa de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. A continuación, se presenta la discusión de los resultados obtenidos durante las etapas de evaluación del proceso.

5.1 Adaptación

▪ ***Influencia del sulfato ferroso y el porcentaje de pulpa sobre el pH y Eh***

De manera general, el proceso de adaptación tanto de los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* como del cultivo comercial de la misma especie (ATCC 23270), mostraron resultados favorables, caracterizados por la disminución del pH (Figuras 4-6 a 4-9) y el aumento en el Eh (Figuras 4-10-4-13), indicando que el proceso de adaptación que se llevó a cabo fue el más apropiado y con este se consiguió una buena respuesta de los microorganismos al sustrato impuesto.

Durante las etapas de adaptación de las cepas a las condiciones deseadas (10% carbón y 2% FeSO₄), se evidenció un comportamiento recurrente, caracterizado principalmente por el incremento inicial del pH del medio. Este incremento podría estar relacionado con la actividad oxidativa de las bacterias, es decir, con la transformación de los iones ferrosos a férricos, que implica un consumo de ácido (Ecuación 1.3) (Sampson *et al.*, 2005; Daoud y Karamanev, 2006), explicando un mayor aumento de pH cuando se tiene una mayor concentración de sulfato ferroso (Tabla 3-2).

Vale la pena mencionar, que el aumento inicial en los valores de pH también podría estar asociado posiblemente con el hecho de que el carbón empleado contiene carbonatos (dolomita), los cuales fueron detectados mediante el análisis con DRX (Figura 4-1). Estos compuestos reductores inherentes al proceso consumen los iones H^+ presentes en la solución como se muestra en la Ecuación 4.1, aumentando el pH en la solución (García *et al.*, 2007; Ingledew, 1988), esto no solo explicaría el hecho de que a pesar de que se realizó una buena adaptación, se sigan apreciando incrementos en los valores del pH en las últimas etapas de adaptación de los experimentos, sino que también explica el comportamiento de los ensayos abióticos.



Adicionalmente, el incremento del pH es probablemente un indicador del grado de adaptación al sustrato alcanzado por las bacterias, lo que sugiere que al modificar las condiciones del medio los microorganismos requieren más tiempo para poner en marcha su maquinaria metabólica y crecer activamente. Sin embargo, conforme las células se habitúan, la fase de retardo es considerablemente menor como se observa en las últimas etapas de adaptación, posiblemente debido a un incremento en la concentraciones de proteínas o enzimas que les permiten oxidar compuestos más rápido y generar rápidamente los iones H^+ (Ferguson, 2008).

La disminución en los valores del pH en los días posteriores, es un comportamiento típico en los procesos de oxidación de pirita en donde se emplea *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Esto podría ser debido a que tanto en la oxidación de pirita (Ecuación 1.2), así como en la hidrólisis de hierro (Ecuaciones 1.4 a 1.6) se pudieron generar iones H^+ que compensan el consumo de ácido en la oxidación de hierro (Ballester, 2005; Meruane, 2003; Prayuenyong, 2002; Daoud y Karamanev, 2006).

Por otra parte, el potencial redox evidenció un continuo aumento durante todas las etapas del proceso de adaptación, coherente con comportamiento del pH en los mismos periodos. El Eh se encuentra definido por los pares de óxido- reducción que interactúan sobre el electrodo de platino, en los sistemas de biolixiviación los pares de interés son: el par oxígeno (disuelto)/agua y el par ferroso/férrico. No obstante, en presencia de hierro en solución, el efecto del oxígeno no es considerable y para efectos prácticos se considera que el Eh esta fundamentalmente definido por el cambio en la relación Fe^{3+}/Fe^{2+} (Meruane, 2002). De esta manera, cuando esta relación aumenta en la solución favorece la oxidación de pirita (Arroyave, 2008; Malik *et al.*, 2001; Cardona y Márquez, 2009). Finalmente, se podría decir que los altos valores de Eh indican una buena actividad oxidativa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y es una respuesta favorable al proceso de adaptación (Prayuenyong, 2002; Ossa y Márquez, 2005).

Al correlacionar los comportamientos de pH y Eh obtenidos en las diferentes etapas de adaptación, es posible determinar que estos parámetros fisicoquímicos son inversamente proporcionales, de esta manera, cuando los valores de pH disminuyen y el potencial redox aumenta indica que los microorganismos se encuentran activos en el proceso de biodesulfurización. Así mismo, se determinó que las bacterias alcanzaron rápidamente los valores óptimos de pH y Eh a medida que consiguieron adaptarse a las condiciones impuestas como se pudo observar en las últimas etapas de acondicionamiento, lo cual favorece enormemente el proceso de biodesulfurización, en contraste, en las primeras etapas se evidenciaron importantes cambios en los factores evaluados (pH y Eh), comportamientos similares han sido reportados por otros autores (Cardona, 2008, Caicedo *et al.*, 2011, Caicedo *et al.*, 2013).

Adicionalmente, es importante resaltar la ventaja de trabajar con microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, con respecto a la cepa comercial (ATCC 23270) en el proceso de adaptación, esto se debe posiblemente a que estas primeras poseen características intrínsecas asociadas al lugar del cual fueron aisladas que favorecen su adaptabilidad a las condiciones impuestas.

Por otra parte, el comportamiento constante del pH y Eh evidenciado en los ensayos abióticos es un claro indicador de que no hubo actividad oxidativa en ausencia de bacterias (Peláez *et al.*, 2013; Caicedo *et al.*, 2011).

5.2 Comparación entre una cepa aislada compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y. una cepa comercial de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270), en un proceso de desulfurización de carbón en suspensión.

Según los factores fisicoquímicos evaluados, se determinó que la actividad oxidativa de los experimentos en las dos concentraciones de hierro evaluadas (200 mg/L y 1200 mg/L), en los cuales se empleó microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* fue mucho mayor, en comparación con la cepa comercial ATCC 23270, por lo que se infiere que la fuente energética empleada fue determinante en el proceso de biodesulfurización de carbón. No obstante, también se comprobó que la eficiencia del proceso está directamente relacionada con la capacidad oxidativa de las bacterias implícitas en el proceso. Vale la pena mencionar que las variaciones en la concentración de hierro total (200 mg/L y 1200 mg/L), adicionando sulfato ferroso, fueron basadas en los planteamientos de algunos autores, quienes indican que la concentración inicial de hierro en el líquido lixivante influye favorablemente a los procesos de biolixiviación (Cara *et al.*, 2001, Ossa *et al.*, 2005; Arroyave, 2008; Caicedo *et al.*, 2011).

5.2.1 Análisis del proceso de biodesulfurización

▪ *Sulfato ferroso y la actividad oxidativa de Acidithiobacillus ferrooxidans*

En los procesos de biolixiviación en los cuales se emplea *Acidithiobacillus ferrooxidans*, el ácido (H^+) es considerado un factor necesario para la (re)generación del ion férrico (Fe^{3+}), responsable de la disolución de pirita (Ecuación 1.2). De esta manera, el mayor incremento en los valores de pH observado en los ensayos con mayores concentraciones de hierro (NC2 y PC2) se pudo haber dado por un mayor consumo de iones H^+ ($2H^+$ por cada Fe^{2+}) (Ballester, 2005; Zhiguo *et al.*, 2012; Deveci *et al.*, 2004). Sin embargo, los ensayos abióticos también evidenciaron un aumento en los valores de pH durante este periodo, indicando que los agentes alcalinizantes presentes en la matriz del carbón también podrían influir sobre este efecto, lo cual coincide con lo reportado en investigaciones previas realizadas sobre carbones de la zona (Caicedo *et al.*, 2011; Peláez *et al.*, 2013).

La posterior disminución de los valores de pH que se observó a partir del día dos, es una evidencia de producción de iones H^+ , producto tanto de la reacción de hidrólisis de los iones férricos disueltos (Ecuaciones 1.4 a 1.6), como de la biooxidación de la pirita (Ecuación 1.2) (Kelly y Wood, 2000; Lin y Daoud & Karamanev, 2006; Giaveno *et al.* 2000). Así pues, podría sugerirse que la acidez del medio lixivante, favorece la solubilidad y disminuye la precipitación de los iones Fe^{3+} , favoreciendo las tasas de oxidación de pirita y la eficiencia de proceso, debido probablemente a que si el agente

químico oxidante, se mantiene disponible en la solución por más tiempo, puede darse posiblemente un mayor ataque oxidativo, permitiendo un incremento en las tasas de extracción del sulfuro metálico.

Vale la pena mencionar, que los microorganismos nativos evidenciaron una mayor disminución en el pH en comparación con el cultivo axénico, independientemente de la concentración de hierro ferroso adicionada a la solución. Esto se debió probablemente a que el aislado nativo logró una mejor adaptación (como se describo previamente *Capítulo 5.1*), una mayor población celular y por ende una mayor actividad oxidativa que le permitió generar mayores cantidades de ácido para compensar el consumo de iones H^+ durante el proceso. Esta ventaja podría estar relacionada con una capacidad inherente de los microorganismos asociada con el medio natural (drenaje ácido de una mina de carbón) del cual fueron aisladas.

Por otra parte, los resultados de potencial de óxido-reducción obtenidos por los experimentos (Figura 4-17), mostraron valores alrededor de los 600 mV, similar a otros procesos de biodesulfurización en suspensión (Caicedo, 2008; Cardona, 2009; Peláez *et al.*, 2013). Podría decirse que los altos valores de Eh se debieron al incremento de la concentración inicial de sulfato ferroso, la cual contribuyó con el hecho de que los microorganismos incrementaran su metabolismo, aumentando la relación Fe^{3+}/Fe^{2+} en el medio lixivante y generando un ambiente propicio para que se lleve a cabo la oxidación de la pirita (Meruane, 2002; Gahan, 2011; Malik *et al.*, 2001; Ackil *et al.*, 2007).

Adicionalmente, los mayores valores de Eh alcanzados por los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* (NC1 y NC2) indicaron que estos tuvieron una mayor actividad oxidativa en comparación con el cultivo axénico. Esto es debido probablemente a que estos mantuvieron una constante transferencia de electrones en el sistema, fundamentalmente, en lo que se refiere a la regeneración de los iones férricos (Gahan, 2011; Malik *et al.*, 2001; Ackil *et al.*, 2007). Una hipótesis que surge a partir de estos resultados, es que el cultivo compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* puede contener otro tipo de microorganismos como *Leptospirillum ferrooxidans*, el cual se caracteriza por alcanzar altos valores de Eh (>600 mV), además, esta cepa es capaz de mantener su actividad oxidativa intacta en presencia de altas concentraciones de iones férricos en el medio lixivante (Boon, 1996).

Vale la pena mencionar que los valores de Eh iniciales, están relacionados estrechamente con la concentración inicial de hierro total adicionada al sistema. De esta manera, los ensayos a los cuales se les adicionaron una mayor concentración de hierro (NC2 y PC2) mostraron valores de Eh iniciales bajos en comparación con su contraparte de menor concentración, esto es debido posiblemente, a que al iniciar el proceso, la mayor parte del hierro en solución está presente como Fe^{2+} lo cual generaría una disminución en la relación Fe^{3+}/Fe^{2+} del sistema. En este sentido, al comparar los resultados obtenidos de pH y Eh durante el periodo inicial (día cero a dos), es posible notar que el

pH de los ensayos a los cuales se les adicionó una mayor concentración de hierro inicial, es mayor por lo que se podría inferir que los microorganismos se encuentran activos o preparando la maquinaria disponible para llevar a cabo el proceso, esta afirmación, toma sentido si se tiene en cuenta que los experimentos en los cuales se empleó una menor concentración de hierro inicial mostraron un comportamiento semejante al obtenido en la última etapa de adaptación.

Así pues, la fase *lag* evidenciada en los primeros días del proceso (Figura 4-18), podría ser debida a un atrapamiento o adhesión de las bacterias al mineral o estar relacionada con la adición de los iones Fe^{2+} al sistema. El rápido incremento que exhibió la concentración celular en días posteriores, sugiere que las bacterias prosperan fácilmente en las condiciones impuestas e indica una respuesta favorable al proceso de adaptación.

Cabe resaltar, que los resultados obtenidos no indicaron la concentración real de células, debido a que se cuantificó solamente la población de células planctónicas y no se tuvo en cuenta la influencia de las bacterias sésiles. Sin embargo, estudios previos indican que al adicionar iones Fe^{2+} al medio se disminuye considerablemente la hidrofobicidad, relacionada con la adhesión de las células (mecanismo indirecto de contacto) a los sustratos insolubles tales como pirita (Deveci, 2004). Adicionalmente, algunos autores han indicado que las células no se adhieren al sustrato debido a la porosidad del sulfuro metálico, así, como al patrón de distribución de la pirita sobre el carbón (Malik *et al.*, 2002; Kargi, 1986).

Las tasas de crecimiento alcanzadas por los bioensayos podrían estar asociadas con la disponibilidad de los iones Fe^{2+} en la solución, de esta manera, al existir una mayor cantidad de sustrato soluble, las bacterias obtienen la energía necesaria para aumentar la población celular. Este comportamiento es coherente con el comportamiento de los demás parámetros evaluados (pH, Eh). Adicionalmente, se observó que al adicionar concentraciones iniciales de hierro ferroso se propicia la división celular y se evita la limitación del crecimiento por falta de sustrato (Young, 2011; Leduc y Ferroni, 1994).

Vale la pena mencionar, que los ensayos NC1 y NC2 lograron las más altas poblaciones celulares, en comparación con sus análogos realizados con la cepa ATCC 23270. Este comportamiento puede estar relacionado con el hecho de que en el aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* coexistan colonias de otro tipo de microorganismos, las cuales se sumen al conteo total de células. Según el comportamiento evidenciado es posible que en el cultivo compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* exista la presencia de bacterias como *Leptospirillum ferrooxidans* u otras células con metabolismo hierro oxidante (Boon, 1999).

El comportamiento estacionario que se evidencia a partir del día cuatro pudo ser consecuencia del agotamiento del sustrato soluble adicionado al sistema, así pues, la pirita es el único sustrato disponible, pero obtener la energía a partir de éste, es un proceso de cinética lenta que frena el

aumento exponencial del crecimiento celular (Kawabe *et al.*, 2003; Zapata *et al.*, 2007). Vale la pena resaltar que a pesar de que la población celular se encontró en fase estacionaria, la transformación de los iones ferrosos en el sistema, se mantuvieron en todos los bioensayos de acuerdo con los resultados de Eh, el pH y las medidas de hierro en solución.

En relación con el porcentaje de hierro lixiviado y piritita oxidada (Figura 4 -19), los ensayos en donde se utilizaron microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* presentaron una solubilización significativa de hierro. De esta manera, es posible inferir que el proceso de desulfurización depende principalmente de la actividad oxidativa de las bacterias empleadas, esta afirmación adquiere validez, si se tiene en cuenta que los experimentos realizados a las mismas condiciones con la cepa comercial (ATCC 23270) mostraron una menor eficiencia. Este hecho podría ser explicado probablemente porque las células compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* transformaron rápidamente los iones ferrosos y mantuvieron las condiciones favorables durante el proceso (bajo valores de pH, altos valores de Eh), lo cual pudo ser la causa del aumento en las tasas de remoción de piritita e impidió la precipitación de los productos de la oxidación respectivamente.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* mostraron una mayor eficiencia del proceso de biodesulfurización. Una hipótesis que surge a partir de estos resultados es que esta ventaja está asociada posiblemente con una capacidad intrínseca -probablemente funcional- referida a un metabolismo hierro oxidante más eficiente, sugiriendo una mayor expresión de proteínas y genes (ej. *Iro* y *rusA*), que jugaron un papel central en la cadena de transferencia electrónica de Fe^{2+} a O_2 . El mecanismo biológico que subyace a esta diferencia no es objetivo de este estudio, pero probablemente este asociado a un polimorfismo genotípico de estas células, dependiente del ambiente de evolución que les confiere una ventaja sobre el inóculo comercial (Bird *et al.*, 2011; Rawlings, 2002).

Adicionalmente, las mayores tasas de oxidación de piritita obtenidas por experimentos en los cuales se empleó el aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, podría estar relacionado con un trabajo sinérgico asociado a otro tipo de bacterias quimiolitotróficas presentes o a bacterias mutantes de la misma especie, las cuales contribuyen no solo con la disolución del sulfuro metálico, sino que permiten una mayor disminución de los valores del pH y un incremento significativo de los valores de potencial redox (Kargi, 1986). Esta hipótesis resulta probable ya que se debe tener en cuenta que aunque, se llevaron a cabo pruebas bioquímicas para corroborar la compatibilidad de la cepa escogida (*Acidithiobacillus ferrooxidans*), cualquier otra colonia de bacterias de metabolismo similar (oxidantes de hierro y azufre) podría estar presente.

A partir de los análisis de formas de azufre (Tabla 4-4), la disminución del porcentaje de azufre pirítico presente en el carbón que exhibió tanto el aislado bacteriano nativo como el cultivo comercial después del proceso, confirmó la habilidad de estas cepas para remover el azufre

inorgánico (pirita) del carbón, esto es acorde a otros estudios reportados en la literatura en procesos similares (Acharya *et al.*, 2001; Jorjani *et al.*, 2004; Cardona, 2008; Caicedo *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en este estudio, sugieren que el mecanismo indirecto de no contacto, es tal vez, el más probable para la disolución del sulfuro de hierro (pirita), debido posiblemente a que la biolixiviación de metales sulfurados insolubles en ácido esta exclusivamente basado en el ataque oxidativo de los iones Fe^{3+} (Shippers y Sand, 1999). No obstante, es posible inferir que *Acidithiobacillus ferrooxidans* juega un papel importante en la solubilización de la pirita, debido a que mantiene altas las concentraciones de Fe^{3+} en el medio lixivante producto de la actividad oxidativa de dichas células (Gleisner, 2006; Das *et al.*, 1993; Sand *et al.*, 2001).

Los resultados de las formas de azufre presentes en el carbón al finalizar el proceso, también muestran que el azufre asociado a la fracción orgánica se mantuvo sin cambios a lo largo del proceso, esto indica claramente que las cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* empleadas en este estudio no interactuaron con el componente orgánico del carbón (Aller *et al.*, 2001; Cardona, 2008; Peláez *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se determinó que la cantidad de azufre total al finalizar el proceso de biodesulfurización no tuvo cambios significativos, debido probablemente a la precipitación de hierro y azufre en la fracción sólida. En otras palabras, aunque existe una clara oxidación de pirita por parte de las bacterias, gran parte de los elementos solubilizados se reincorporaron en la fracción sólida en forma de sulfatos. No obstante, los porcentajes de pirita oxidada son significativos, lo cual confirma la eficiencia del proceso propuesto, resultados similares han sido reportados en otros estudios de biodesulfurización de carbón en suspensión (Cardona, 2008; Thripathy, 1998; Jorjani *et al.*, 2004).

El aumento en la cantidad de azufre total en los ensayos abióticos BNC2 y BPC2 al finalizar el proceso, se deben posiblemente a la precipitación de los compuestos de azufre presentes en el medio de cultivo (ej. Sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de hierro, entre otros).

5.2.2 Microscopia electrónica de Barrido (SEM)

▪ ***Morfología de la pirita y el proceso de biodesulfurización***

Esta técnica de caracterización mineralógica permitió establecer que la pirita en el carbón empleado estaba presente principalmente en forma framboidal. Según algunos autores, esta morfología es más susceptible a la oxidación por parte de los microorganismos (Jorjani *et al.*, 2004; Cardona, 2008; Peláez *et al.*, 2013). Este hecho podría ser explicado porque la pirita framboidal al estar dispuesta en la superficie del carbón como un conjunto de microcristales de alta porosidad,

que conservan cierta distancia entre sí, disponen de una mayor área reactiva que favorece su disolución (Jorjani, 2004; Gleisner, 2006).

Las micrografías electrónicas de barrido obtenidas de las muestras de carbón resultante del proceso de biodesulfurización, muestran evidentes cambios en la morfología de los granos de pirita, después de doce días de experimentación. En estas fue posible observar pozos y golfos de corrosión, las cuales modificaron completamente la forma inicialmente euhedral de los cristales de pirita. Formas y características similares de oxidación fueron observadas en otros estudios de biodesulfurización con carbones colombianos (Cardona 2009, Caicedo, 2008; Caicedo *et al.*, 2011).

Otras estructuras de corrosión reportadas para este mineral después del proceso de biodesulfurización como *pits* de tamaño y forma similar a la de las bacterias empleadas (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) y/o canales, no fueron identificados (Katrina *et al.*, 2001). Esto podría indicar que la oxidación del sulfuro metálico es llevada a cabo únicamente por la acción de los iones Fe^{3+} .

Así pues, al ser sometidos al proceso de biodesulfurización, los cristales de pirita perdieron sus caras euedrales (regulares) y adquirieron formas anedrales (irregulares). Asimismo, la densidad de los agregados esféricos de cristales framboidales disminuyó dejando espacios vacíos. A partir de esto, se puede inferir que la facilidad con que el agente químico oxidante pudo llegar a los núcleos dependió de la morfología y distribución de la pirita en el carbón, la concentración bacteriana y la capacidad oxidativa de los microorganismos.

El espectro de energía de dispersión realizado sobre las muestras de carbón tratadas (Figura 4-26), confirmó la presencia de precipitados en la superficie del carbón asociados a jarosita, al finalizar el proceso de biodesulfurización. Estos podrían ser generados por la superación del límite de solubilidad, que podría depender de varios factores tales como el pH, la concentración de hierro férrico, los sulfatos y cationes alcalinos disponibles en el sistema (Huang y Zhou, 2012). De esta manera, se podría decir, que la jarosita es una fase mineral formada a partir de los procesos de lixiviación biológica en los cuales intervienen microorganismos ácidosfilos que oxidan Fe^{2+} y sulfuros de hierro, como *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Algunos autores han reportado la precipitación de jarosita en medios con presencia de sulfatos en el rango de pH entre 1-3, lo cual es acorde con los resultados obtenidos en este estudio (Nazari *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2014).

5.3 Influencia de la relación inicial de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, empleando sulfato férrico, cloruro férrico y una cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, en un proceso de biodesulfurización de carbón en suspensión.

Aumentar las tasas de oxidación de pirita es el principal desafío de los procesos de biolixiviación; Por esta razón, se planteó la posibilidad de emplear sales de hierro férricas (agentes químicos oxidantes), variando la concentración de hierro total, con el fin de aumentar la cinética del proceso de biodesulfurización. Esta hipótesis fue basada principalmente en el mecanismo indirecto de oxidación de sulfuros metálicos. A continuación, se discuten los resultados obtenidos.

5.3.1 Análisis del proceso de biodesulfurización

- ***Oxidación del azufre inorgánico del carbón***

Cuando se da la disolución de la pirita en el medio de cultivo bacteriano se generan ciertos cambios medibles tales como la disminución en los valores del pH, el aumento de la relación de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, el aumento de la concentración celular así, como un incremento del hierro en la solución lixivante, estos parámetros podrían indicar que las bacterias se encuentran activas en el proceso de biodesulfurización según estudios previos llevados a cabo con la misma bacteria con una adaptación previa, este proceso puede tardar entre 2 y 4 días (Caicedo y Márquez, 2011; Cardona y Márquez, 2009). No obstante, cuando se adiciona al sistema una concentración inicial de iones Fe^{3+} el comportamiento del proceso cambia de tal manera que es posible lograr condiciones favorables desde el momento inicial de la inoculación.

La característica más importante que se evidencia cuando se adicionan concentraciones iniciales de sulfato férrico y cloruro férrico, es la caída inicial de pH en el medio de cultivo (Figura 4-27), el descenso, fue directamente proporcional a la concentración inicial de iones férricos adicionados al sistema.

La disminución inicial evidenciada en los valores de pH según los planteamientos de algunos autores respecto al proceso de biooxidación, es debido posiblemente a la oxidación de pirita (Ecuación 1.2), así como, a hidrólisis de hierro (Ecuaciones 1.4 a 1.6), las cuales son reacciones productoras de iones H^+ (Prayuenyong 2002, Ballester *et al.* 2005, Daoud *et al.* 2006). El hierro férrico que se hidroliza podría ser el adicionado inicialmente al sistema en forma de sales (sulfato férrico, cloruro férrico) y/o el generado por las bacterias. La disminución del pH es un comportamiento típico de los procesos de lixiviación de carbón en los que se emplea *Acidithiobacillus ferrooxidans*, y ha sido descrito en investigaciones previas (Peláez *et al.*, 2013).

Con base en lo anteriormente dicho, surge una hipótesis que podría explicarlo, y está relacionada directamente con el efecto de los iones férricos adicionados al sistema, siendo que estos “agilizan” la reacción de oxidación de pirita, es decir, el agente químico oxidante (Fe^{3+}) adicionado, disuelve los granos de pirita y genera ácido, esta hipótesis adquiere validez, si se observa el porcentaje de hierro lixiviado durante los primeros días del proceso, especialmente, en los ensayos con mayor concentración de hierro férrico total (Figuras 4-32 y 4-33), el cual va a la par con el comportamiento del pH en el mismo periodo de tiempo (día cero a dos).

Cabe resaltar que la cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* empleada en este estudio, demostró gran adaptabilidad para trabajar a valores de pH de 1.3 – 1.4, favoreciendo significativamente el proceso de desulfurización debido principalmente a que se disminuyen los efectos negativos de la precipitación de hierro y sulfatos del medio lixivante (Nazari *et al.*, 2014)

Vale la pena mencionar que el ensayo al cual se le adicionó una menor relación inicial de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (20:80) evidenció los menores valores de pH en las dos concentraciones de hierro total evaluadas (200 mg/L – 1200 mg/L). Este comportamiento podría ser explicado con base a las concentraciones iniciales adicionadas tanto de iones férricos como de iones ferrosos. De esta manera, la disminución inicial de los valores del pH es un comportamiento generalizado que se explicó anteriormente como el ataque oxidativo inicial de las sales de hierro férricas al sulfuro metálico, el cual genera iones H^+ y Fe^{2+} . Posteriormente, las células transforman los iones Fe^{2+} disponibles en el sistema en iones Fe^{3+} (Kodali *et al.*, 2004). No obstante, en los ensayos con mayores concentraciones de iones férricos es posible que este comportamiento tuviera una cinética más lenta, debido posiblemente a que las células tardaron más tiempo en realizar la oxidación.

Esta hipótesis toma sentido, si se tiene en cuenta que las células bacterianas empleadas en este estudio no fueron sometidas a un proceso de adaptación previa a las sales férricas y que algunas investigaciones sobre biooxidación han reportado disminución de la actividad oxidativa por los productos generados (Fe^{3+}), en este caso adicionados al sistema (Nemati y Webb, 1998). Cabe resaltar, que los valores de pH se mantuvieron por debajo de 1.4 en todos los experimentos por lo que se puede inferir que las células tuvieron algún tipo de actividad durante el proceso, no obstante, en los experimentos en los cuales se empleó mayor concentración de cloruro férrico, el pH es un indicador de que las células están oxidando el sulfato ferroso disponible en el medio, y que la energía obtenida es utilizada para la supervivencia celular.

Por otra parte, en las mediciones de potencial redox (Figuras 4-29 y 4-30) se evidenció un comportamiento característico en el que los ensayos con mayores relaciones de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ mostraron los mayores valores de Eh iniciales. Este hecho podría ser explicado con base a que el Eh se encuentra definido por los pares de óxido- reducción que interactúan sobre el electrodo de platino. En el caso de los sistemas de biolixiviación, en presencia de hierro en solución, el Eh esta

fundamentalmente definido por el cambio en la relación Fe^{3+}/Fe^{2+} (Meruane, 2002; Peláez *et al.*, 2013).

Otra característica importante evidenciada en la curva de Eh de todos los experimentos, fue la caída de los valores de Eh (entre el día dos y el día cuatro). Este comportamiento sugiere que a medida que se da la disolución química de la pirita, se eleva la concentración de iones Fe^{2+} en la solución (Ecuación 1.2) disminuyendo la relación Fe^{3+}/Fe^{2+} del sistema. Comportamientos similares han sido reportados en estudios previos en los cuales se emplean sales férricas y la cepa *Leptospirillum ferrooxidans* (Boon, 1999); por lo que se podría inferir que este efecto está relacionado con los agentes químicos oxidantes adicionados al sistema (sulfato férrico y cloruro férrico) y no necesariamente con el tipo de cepa empleada (*Acidithiobacillus ferrooxidans*).

El incremento en los valores de Eh a partir del día dos, indica que los microorganismos se encuentran activos en el proceso de transformar los iones ferrosos en férricos (Ecuación 1.3), lo cual favorece a la oxidación de la pirita (Ackil *et al.* 2007, Cardona *et al.* 2009). Este comportamiento es característico de los procesos de biolixiviación, en los cuales se emplea *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Cardona, 2008; Ossa y Márquez, 2009).

Por otra parte, el crecimiento celular evidenció una disminución durante los primeros dos días, la cual podría deberse a un atrapamiento o adhesión de las bacterias al mineral (Caicedo *et al.*, 2011). El rápido incremento de la concentración celular y estabilización en solución es una respuesta favorable de las bacterias al proceso previo de adaptación, por lo menos para los experimentos en los cuales se empleó sulfato férrico.

Vale la pena mencionar que los bioensayos a los cuales se les adicionó cloruro férrico mostraron un crecimiento incipiente durante toda la experimentación, lo que podría explicarse debido a la naturaleza corrosiva de los iones cloruro, que pudieron afectar la membrana celular provocando lisis y/o causando daño lo que impidió el incremento en la concentración (Gahan *et al.*, 2009; Shiers *et al.*, 2005). Otra posible explicación, puede estar relacionada con el hecho de que *Acidithiobacillus ferrooxidans* requiere de la presencia del anión SO_4^{2-} para su crecimiento y desarrollo debido a que lo utiliza para estabilizar el complejo de Fe (II) hexahidratado que sirve como sustrato directo del sistema enzimático de oxidación, y al no existir suficiente cantidad de este ión disponible, la cadena de transporte de electrones mediante la cual se obtiene la energía para aumentar la población celular, pudo ser inhibida. Adicionalmente, el ion cloruro pudo actuar en el sistema desacomplejando el ion ferroso o estabilizando otros complejos no específicos que también inhiben parcial o totalmente el crecimiento celular (Ingledew, 1982; Meruane, 2002; Xion y Guo, 2011; Lawson *et al.*, 1995).

Cabe destacar que en los experimentos en los cuales, se adicionaron concentraciones iniciales de cloruro férrico, las células no solo enfrentan el efecto adverso de los iones férricos, sino que

debieron adaptarse a la presencia de iones cloruro. A pesar de esto, algunos ensayos evidenciaron un leve crecimiento celular, esto indica que *Acidithiobacillus ferrooxidans* fueron capaces de sobrevivir a las concentraciones de cloruro férrico en presencia de mayores concentraciones de sulfato ferroso (CFIC1- CFIC2). Esto sugiere que la energía obtenida a partir del sulfato ferroso es usada primordialmente para la sobrevivencia y eventualmente para la división celular. Así pues, los experimentos en los cuales se empleó cloruro férrico presentaron una disminución significativa en la concentración celular, sin embargo, no fue posible indicar que existió inhibición total del crecimiento debido a que los valores de Eh aunque bajos indicaron actividad oxidativa.

En cuanto al hierro lixiviado también se puede decir que este parámetro fue importante para evaluar de forma cuantitativa la extracción de este compuesto del carbón. Es posible inferir que el aumento del hierro en el líquido lixivante es un indicador de la eficiencia del proceso de biodesulfurización. Sin embargo, se ve afectado por el fenómeno de precipitación de sulfatos. Este efecto ha sido reportado por otros autores en procesos de biodesulfurización de carbón en suspensión (Cardona y Márquez, 2009; Caicedo *et al.*, 2011).

Cabe aclarar que el porcentaje de hierro removido que se muestra los primeros dos días del proceso, es probablemente el resultado de la adición de las sales férricas al sistema, esto pudo haber sido principalmente, a que los iones férricos actúan como los agentes oxidantes del sulfuro metálico en una reacción puramente química que permite su disolución, lo cual se evidenció en parámetros fisicoquímicos evaluados durante este periodo de tiempo, de esta manera, en los procesos de biolixiviación en los cuales no se adicionaron sales férricas, el pH aumentó inicialmente al igual que el potencial redox (*Veasé sección 4.3*). No obstante, en este estudio entre el día cero y dos, ambos factores disminuyeron (pH y Eh), la concentración celular se mantuvo constante, es decir, no se incrementó, y adicionalmente, se observa un 10% de hierro removido, por estas razones se infiere que la disolución de la pirita durante este periodo de tiempo, podría no ser el resultado de la actividad oxidativa de las bacterias, sino estar asociada directamente con la adición del sulfato férrico o cloruro férrico al sistema. Comportamientos similares han sido reportados en estudios previos con concentraciones iniciales de iones férricos (Zhang, 2008; Boon, 1999).

A nivel general, todos los experimentos mostraron porcentajes variables de extracción de azufre pirítico, lo que podría estar relacionado con la morfología predominante del sulfuro metálico, acorde con lo reportado en estudios previos, que indican que la pirita framboidal es más susceptible a la biooxidación (Acharya *et al.*, 2001; Jorjani *et al.*, 2004; Gleisner, 2006).

Según los análisis de microscopía electrónica de barrido, se determinó que la pirita en la muestra de carbón empleada, se encontraba principalmente de forma framboidal, estos framboides o cúmulos de cristales de pirita generalmente poseen una mayor porosidad con respecto a los cristales de mayor tamaño y están conformados por cristales de tamaños variables. La razón por la que son fácilmente oxidables, puede estar relacionada posiblemente a que al tener un área abierta,

el líquido lixivante puede entrar fácilmente en contacto con la superficie reactiva aumentando su disolución. Adicionalmente, es probable que el uso de sales férricas haya potencializado este efecto, debido a su naturaleza oxidante logrando una degradación acelerada del sulfuro metálico presente en la matriz del carbón.

Los porcentajes de oxidación de pirita arrojados, podrían indicar que la eficiencia de los microorganismos en cuanto a la oxidación del azufre inorgánico fue mucho mayor de lo que se indica en las gráficas de hierro, esto se debe probablemente a que las mediciones finales se ven afectadas por la precipitación de los hidrosulfatos de hierro, principalmente jarosita, como lo confirman los análisis de DRX y FTIR Al finalizar el proceso bioquímico.

Los resultados de oxidación de pirita evidenciados por los experimentos en los cuales se adicionó cloruro férrico, son coherentes con el comportamiento de los parámetros evaluados pH, Eh y crecimiento celular. Esto indica que la presencia de iones cloruro afecta de algún modo la actividad oxidativa de las células. En estudios previos realizados empleando cloruro de potasio indican un daño de la pared celular por la presión osmótica (Watling, 2013). No obstante, este efecto no es aplicable en este caso, debido a que la presión osmótica es regulada por los iones de sodio más que por los iones cloruro. Una hipótesis que surge a partir de estos resultados, es que los iones cloruro dificultan la obtención de energía necesaria para su crecimiento y desarrollo por parte de las bacterias, y la energía que se obtiene es básicamente empleada para sobrevivir en el medio adverso, esta afirmación adquiere sentido, si se tiene en cuenta que los ensayos en los cuales se adicionó una mayor cantidad de sulfato ferroso y menor concentración de iones férricos, evidenció un mayor crecimiento celular (CFIC1) en comparación con los demás experimentos en los cuales se empleó esta sal de hierro.

Vale la pena mencionar que los porcentajes de oxidación de pirita obtenidos para los ensayos tratados con sulfato férrico y cloruro férrico mostraron claras diferencias, no solo por que estos últimos presentaron una mayor precipitación de sulfatos, sino porque la actividad oxidativa de las bacterias se vio afectada significativamente, como lo indicó la curva de Eh de dichos experimentos. Estudios previos indican que al emplear medios con cloruros se disminuye considerablemente la precipitación de sulfatos (Caicedo y Márquez, 2013). No obstante, en este estudio se comprobó que este no fue el caso, debido probablemente a la baja actividad oxidativa de las células, como lo indica el Eh, lo cual contribuyó a que el hierro y los sulfatos presentes en la solución se precipitaran en mayor cantidad.

Adicionalmente, se evidenció que el porcentaje de azufre total de los experimentos no varió significativamente, esto se debió posiblemente a la precipitación de los productos de la oxidación del sulfato ferroso (sulfatos), generados por la superación del límite de solubilidad del medio. Según estudios previos, la formación de precipitados depende de varios factores entre los que se

encuentran el pH, la temperatura y la concentración de hierro en la solución, entre otros (Daoud y Karamanev, 2006; Zhu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006). los análisis de formas de azufre confirmaron la precipitación de sulfatos en los experimentos propuestos (Tabla 4.5), de esta manera, es probable que la cantidad de azufre total no variara debido probablemente a que los sulfatos precipitados producidos durante el proceso, se sumaron a la cantidad de azufre total presente en la fracción sólida y por tanto disminuya el porcentaje de biodesulfurización, esto es acorde con lo reportado en estudios previos en los que se emplean fuentes de hierro exógenas (Caicedo *et al.*, 2011; Peláez *et al.*, 2013).

Las mayores precipitaciones de sulfato observadas en los ensayos con una mayor concentración de hierro total (1200 mg/L), son debidas probablemente a las altas concentraciones de hierro férrico disponible en la solución. Por lo que la oxidación de hierro ferroso causa precipitados que contienen varios tipos de jarosita. El tipo de jarosita formada depende primordialmente de la presencia de cationes tales como K^+ , Na^+ , NH_4^+ disponibles en el medio de cultivo en forma de sales (Nazari *et al.*, 2014).

En cuanto a la eficiencia del proceso de biodesulfurización, se tiene que las cantidades de azufre total removido, así como la oxidación de azufre pirítico, están dentro del rango reportado en estudios previos para otros tipos de carbones (Cardona, 2008; Jorjani *et al.*, 2004; Peláez *et al.*, 2013; Caicedo *et al.*, 2011). Sin embargo, existe una clara diferencia en la cantidad de hierro removido los primeros días del proceso, relacionada con la adición de las sales férricas al sistema.

La diferencia entre la cantidad de azufre total removida no es tan alta como la reportada en estudios previos (entre 80% y 95%) (Cardona, 2008; Jorjani, 2004; Aller *et al.*, 2001). Esto se debe posiblemente, a que la cantidad de azufre inorgánico presente en la muestra de carbón empleada es considerablemente menor en comparación con los carbones empleados en estudios previos, adicionalmente, se ha descrito que el tamaño de partícula juega un rol fundamental en los procesos de biooxidación, de esta manera en partículas finas (-200# Tyler) existe un mayor contacto entre el área reactiva y el líquido lixivante (Malik *et al.*, 2000; Acharya *et al.*, 2001; Aller *et al.*, 2001; Cardona, 2008). No obstante, en este estudio se empleó un tamaño de partícula (-60# Tyler), con el fin de disminuir los costos y hacer el proceso aplicable a nivel industrial.

Por otra parte, las técnicas de análisis mineralógico empleadas sobre el carbón al finalizar el proceso de biodesulfurización, fueron las indicadas para determinar tanto los cambios morfológicos del sulfuro de hierro como la formación de fases mineralógicas.

Según los análisis de formas de azufre (Tabla 4.5) y los análisis mineralógicos se confirmó que la cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270) empleada en este estudio interactuó únicamente con la fracción inorgánica del carbón, es decir, el azufre pirítico de la muestra. No

obstante, estas células no tuvieron ningún efecto sobre la fracción orgánica, acorde con otros procesos de biolixiviación (Cardona y Márquez, 2009; Caicedo, 2008; Peláez *et al.*, 2013).

▪ ***Análisis mineralógico después del proceso bioquímico de desulfurización.***

La muestra de carbón empleada se caracterizó por un predominio de la pirita en forma framboidal, morfología propia de los carbones sub-bituminosos (Chen *et al.*, 2012). A parte de los framboides se evidenciaron también cristales individuales de mayor tamaño con formas regulares, características similares fueron reportadas por otros investigadores para carbones de la zona (Caicedo *et al.*, 2011; Toro, 2014; Peláez *et al.*, 2013).

Las imágenes obtenidas por microscopia electrónica indicaron que los cristales de pirita sometidos al proceso de desulfurización, mostraron pozos y golfos de corrosión especialmente, en los límites de los cristales de pirita, los cuales modificaron completamente la forma euédrica evidenciada en la muestra de carbón inicial. Otras estructuras de corrosión identificadas, como canales también fueron observadas, especialmente, en los ensayos en los cuales se empleó cloruro férrico; según lo observado, esta morfología es típica de un ataque químico ya que este tipo de oxidación no fue observada en los experimentos en los cuales se emplearon las mismas cepas bacterianas en presencia de sulfato ferroso (Figuras 4-21 a 4-26). Sin embargo, investigaciones previas indican que la oxidación lineal es la forma inicial o precursora de oxidar la pirita y esta constituye un tipo de patrón de oxidación propia de la oxidación biológica (Muñoz *et al.*, 2003).

No obstante, no fue posible identificar *pits* del tamaño y forma similar al de los microorganismos como ha sido reportado en estudios previos para oxidación de pirita por mecanismo directo (Sand y Gehrke, 2006; Sandhuesa *et al.*, 1999). Por lo tanto, se puede inferir que la oxidación del sulfuro metálico se lleva a cabo en el sistema principalmente por la acción de los iones férricos adicionados al sistema y/o generados por la acción oxidativa de la cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* empleada, según lo indica el mecanismo indirecto, con lo cual los *pits* (orificios) de oxidación de la pirita puede darse de forma regular o irregular como se muestra en este estudio (Figuras 4-43 a 4-54)(Katrina *et al.*, 2001).

Según las imágenes obtenidas de los cristales de pirita al finalizar el proceso de desulfurización, se infiere que la oxidación del sulfuro metálico se da principalmente de afuera hacia adentro debido a que en los límites se observaron las mayores evidencias de corrosión, esto se debe probablemente a que en los límites del grano se acumula el agente químico oxidante principal responsable de la disolución de pirita (Kargi, 1986). No obstante, en algunos granos también fue posible observar huellas de oxidación en su interior, las cuales pueden estar relacionadas con la porosidad del mineral.

Mediante el análisis de la muestra con difracción de rayos X, se determinó que la pirita es el único sulfuro presente en la muestra de carbón empleado, este hecho pudo beneficiar el proceso, ya que estudios previos han demostrado que por interacciones galvánicas la oxidación de otros minerales de la misma especie (ej. esfalerita, galena) es mucho más rápida en comparación con la pirita (Wang *et al.*, 2007; Arroyave, 2007, Cardona, 2008).

Los demás minerales presentes en la muestra de carbón tales como silicatos ($\text{Si}_2\text{O}_5^{2-}$)_n y pequeñas trazas de carbonatos (CO_3^{2-}), no sufrieron transformaciones en el sistema o estas fueron imperceptibles. Vale la pena mencionar que en el espectro de la muestra de carbón inicial, los picos asociados a carbonatos y silicatos presentaron baja intensidad por lo que no fue posible diferenciar cambios significativos en estas fases minerales.

Adicionalmente, los picos de dolomita no fueron evidenciados en los espectros de las muestras tratadas con mayores concentraciones de sulfato férrico y cloruro férrico, esto podría ser explicado con base a que en presencia de ácido, este mineral se disuelve fácilmente (Cardona 2008).

La reacción de dolomita en presencia de ácido sulfúrico, implica la formación de sulfatos de calcio y magnesio, como lo indica la Ecuación 4.2 (Evangelou, 2005). Para la muestra de carbón resultante de los ensayos tratados con sulfato férrico e incluso para los ensayos con mayor concentración hierro total empleando cloruro férrico, se detectó la presencia de yeso.



Según el comportamiento evidenciado en el pH por los experimentos en los cuales se adicionó sales férricas, la dolomita es más difícil de disolver respecto a otros carbonatos como la calcita, esto podría indicar que la disolución de la dolomita depende del nivel de pH alcanzado y del tiempo de acción del ácido (Cardona, 2008).

▪ ***Productos del proceso bioquímico de desulfurización.***

Los principales productos del proceso bioquímico de desulfurización biológica son jarosita (amoniojarosita, hidroniojarosita y potasiojarosita) y el yeso. Similar a otros procesos de biodesulfurización de carbón (Cardona y Márquez 2009; Ossa y Márquez, 2009, Caicedo, 2008).

La generación de jarosita fue mayor en los ensayos en los cuales se emplearon mayores concentraciones de hierro total (1200 mg/L) como se observa en los análisis de formas de azufre (Tabla 4.5). Este hecho podría ser explicado porque al existir una mayor concentración de iones férricos, estos se precipitan fácilmente sobre la superficie del carbón debido posiblemente a una

baja solubilidad de los mismos a diferentes variaciones de las condiciones como el pH, la temperatura, entre otros (Córdoba *et al.*, 2008).

La formación de esta fase mineral ha sido reportada en estudios previos de biodesulfurización en las que no se adicionaron fuentes de hierro férricas, esto indica que su origen está asociado principalmente con el proceso biológico y no necesariamente con las sales de hierro férricas adicionadas (Caicedo *et al.*, 2011; Peláez *et al.*, 2013). No obstante, se podría inferir que al agregar una mayor cantidad de iones férricos al iniciar el proceso estos se precipiten con mayor facilidad

La formación de yeso en los procesos de biolixiviación ha sido reportada por varios autores. Existe un acuerdo en afirmar que su generación está asociada con la descomposición de los carbonatos presentes en el sustrato –en este caso dolomita- (Márquez, 1999; Ossa y Márquez, 2009).

La Jarosita detectada como amonio-jarosita por difracción de rayos X , generada durante el proceso de bioquímico de desulfurización, se pudo formar a partir de los iones NH_4^+ presentes en el medio de cultivo en forma de sulfato de amonio.

De otro lado, la K- jarosita se genera posiblemente cuando los iones K^+ son liberados de algunas arcillas presentes en la muestra de carbón como illita $[(\text{K}, \text{H}_3\text{O}) (\text{Al}, \text{Mg}, \text{Fe})_2 (\text{Si}, \text{Al})_4 \text{O}_{10} [(\text{OH})_2, (\text{H}_2\text{O})]]$ y moscovita $[\text{KAl}_2 (\text{AlSi}_3\text{O}_{10}) (\text{OH})_2]$, por la acción ácida del medio. Aunque, la formación de k- jarosita ha sido comúnmente relacionada con el medio de cultivo 9K, se comprobó que su formación también está asociada al medio de cultivo T&K en presencia de minerales arcillosos que contengan potasio (Liu *et al.*, 2007).

▪ **Relación entre la formación de jarosita y los iones Fe^{3+}**

La jarosita es la fase mineral detectada en mayor abundancia durante el proceso bioquímico de desulfurización, es una fase mineral común, producida por la oxidación de hierro ferroso durante el proceso de remoción de sulfuros metálicos (Katrina *et al.*, 2001). Las fases específicas producidas en el proceso son amonio-jarosita, y potasio-jarosita. Investigaciones previas han asociado su formación principalmente con el pH del medio lixivante ($1.8 \leq \text{pH} \leq 2.3$) (Barral, 1989; Wagner *et al.*, 1982). No obstante, en este estudio mediante las técnicas de DRX y FTIR realizadas, se comprobó que los minerales de jarosita son fácilmente precipitados en medios ricos en sulfato (sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato ferroso, sulfato férrico) a un rango de pH entre 1.3 y 1.5. Los precipitados como la jarosita y el yeso son adversos para los procesos de desulfurización debido a que evitan la completa oxidación de la pirita (Cara *et al.*, 2006).

Adicionalmente, según las micrografías de SEM (Figuras 4-53 a 4-54), se observó que la jarosita forma un tipo de película o barrera sobre la superficie del carbón que impide la interacción entre la superficie reactiva y el líquido lixivante (Daoud y Karamanev, 2006). De esta manera, en este

estudio se infiere que si la jarosita se forma en etapas tempranas del proceso - debido a la cantidad de iones férricos presentes- se podría afectar significativamente la eficiencia del proceso. No obstante, se obtuvieron buenas tasas de extracción de azufre pirítico como se muestra en los análisis de formas de azufre (Tabla 4-5). Esto además, se sustenta principalmente, en los difractogramas de DRX. Precipitaciones similares fueron identificadas en estudios previos empleando *Acidithiobacillus ferrooxidans*, en los cuales se monitoreo el proceso de biooxidación (Cardona, 2008; Caicedo, 2008).

Vale la pena mencionar que la precipitación de sulfatos de hierro, disminuye los iones férricos (Fe^{3+}) disponibles en la solución, en otras palabras, se disminuye la cantidad del agente oxidante en el sistema de acuerdo con el mecanismo indirecto, contribuyendo con el hecho de que no se obtuvieran mayores tasas de oxidación de pirita (Ahonen y Tuovinen, 1994).

En los espectros de difracción de rayos X, se observó que la intensidad de los picos asociados a pirita disminuyeron su intensidad considerablemente, después de doce días de experimentación, esto indica que el proceso de biooxidación no se frena a pesar de la formación de la capa pasivante.

Teniendo en cuenta que los experimentos en los cuales se adicionó sulfato férrico y una menor concentración de hierro total (200 mg/L) obtuvieron los mayores porcentajes de oxidación de pirita y la menor cantidad de sulfatos de hierro precipitados como se observa no solo en los análisis de formas de azufre (Tabla 4-5) sino en los espectros de DRX y FTIR (Figuras 4-35 y 4-39). Es posible concluir que mayores concentraciones de hierro total estimulan la formación de los sulfatos de hierro precipitados disminuyendo la efectividad del proceso bioquímico de desulfurización.

Adicionalmente, los ensayos realizados con sulfato férrico y una mayor concentración de hierro total (1200 mg/L), son los que presentaron la mayor cantidad de formación de jarosita y a la vez altas tasas de biooxidación del azufre inorgánico. Este comportamiento sugiere que en estos experimentos la oxidación de la pirita es mayor y por lo tanto, se incrementa la disposición de hierro y sulfatos en el líquido lixiviante del sistema, lo cual favorece la generación de dicha fase mineral. Este hecho podría indicar que a pesar de los efectos negativos que sugieren la presencia de jarosita en el medio, la biooxidación continúa satisfactoriamente hasta finalizar el proceso. Sin embargo, se infiere que al incrementar la cantidad de precipitados en el medio, eventualmente se inhibirá el proceso, lo cual resulta negativo debido principalmente a que al re-precipitarse el azufre como sulfato (jarosita), la eficiencia en la biodesulfurización se disminuye, pues el azufre no sale del carbón. Sin embargo, vale la pena mencionar que algunos autores han sugerido y demostrado que el azufre como sulfato de hierro (principalmente jarosita), se retira en muy buena proporción mediante un lavado con agua acidulada.

Por otra parte, en los experimentos en los cuales se adicionó cloruro férrico y una menor concentración de hierro total (200 mg/L) los espectros de DRX (Figura 4-37) evidenciaron bajas

tasas de oxidación de pirita y baja precipitación de jarosita, lo cual indica que la formación de jarosita no fue la responsable de la baja biooxidación de pirita. Por lo que podría inferirse que existió una inhibición celular debida posiblemente a la fuente de hierro exógena empleada (cloruro férrico).

Según los planteamientos de algunos autores, el aumento en la concentración de hierro férrico es uno de los factores principales por el cual se genera mayor cantidad de jarosita (Nazari *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2014). En este estudio, se avala esta hipótesis ya que en los experimentos con una mayor concentración de hierro total (1200 mg/L) evidenciaron mayor precipitación de sulfatos, no obstante, se resalta que este por sí solo, éste, no es el factor limitante del proceso, por lo menos no durante el tiempo que duró la experimentación, ni para las sales férricas empleadas.

Vale la pena resaltar, que en los ensayos en los cuales se adicionó cloruro férrico y una mayor concentración de hierro total (1200 mg/L), se evidenció una menor precipitación respecto a los ensayos con sulfato férrico a las mismas condiciones (Tabla 4-5), lo cual era de esperarse debido a que la cantidad de sulfatos en el medio de cultivo empleando cloruro férricos, es considerablemente menor en comparación con los ensayos en los cuales se adicionó sulfato férrico, además, es posible inferir que en presencia de los iones cloruro se disminuye la precipitación de jarosita, posiblemente debido a la menor cantidad de sulfatos disponibles en el sistema (Gahan, 2010). Aunque este hecho podría favorecer el proceso de oxidación de pirita, en este caso también se observó que los iones cloruro podrían actuar de manera adversa sobre las células limitando el crecimiento y desarrollo celular, afectando de manera directa la actividad oxidativa y por ende la cinética de oxidación.

Acerca del fenómeno de precipitación de sulfatos de hierro en el sistema analizado, vale la pena discutir los factores que conducen a su formación. Es bien sabido que el pH afecta de manera directa la generación de esta fase mineral (jarosita), especialmente, en los ensayos donde el pH se estabiliza alrededor de 1.6 -1.7 (Daoud y Karamanev, 2006). En este estudio, los experimentos mantuvieron valores de pH por debajo de 1.4, en donde hay mayor solubilidad de los iones férricos, por lo tanto no debería existir precipitación de jarosita, esto se cumple para los ensayos con una menor concentración de hierro total (200 mg/L), como se muestra en las imágenes de SEM (Figuras 4-43 a 4-45) y en los difractogramas de DRX (Figura 4-35). No obstante, los ensayos con una mayor concentración de hierro total (1200 mg/L) en los cuales se adicionó sulfato férrico, sí, se presentaron grandes cantidades de estos precipitados como se observa en los espectros de DRX (Figura 4-36), esto se debió posiblemente a que la jarosita es fácilmente generada en medios ricos en sulfato a pH de 1 -3 (Nazari *et al.*, 2014). Adicionalmente, se puede inferir que cuando hay una saturación de hierro férrico en el sistema, aún a pH controlado se da la precipitación de estos compuestos (Arroyave, 2007; Alpers *et al.*, 1989).

Además del pH, la presencia de los iones como el amonio (NH_4^+) y el potasio (K^+) que se encontraban presentes en las sales del medio de cultivo como sulfato de amonio y fosfato ácido de potasio, juegan un papel importante en la formación de jarosita, debido a que se requieren bajas cantidades de estos iones para generarla (Nazari *et al.*, 2014).

La temperatura es otro factor que afecta la solubilidad de los iones férricos. Bigham *et al.* (2010) investigaron el efecto de la temperatura en un rango entre 2 °C y 40 °C, sobre la formación de jarosita y encontraron que la tasa de precipitación se incrementa con la temperatura. Este parámetro se mantuvo constante en 30 °C durante la experimentación debido al carácter mesófilo de los microorganismos empleados, sin embargo, mantener las condiciones óptimas del cultivo celular, pudo favorecer la precipitación de las sales férricas.

Por último, es importante anotar que después de doce días de experimentación es posible extraer la mayor parte de la pirita del carbón, empleando sulfato férrico, con bajas tasas de precipitación de jarosita. Esto es de gran importancia si se pretende desarrollar este tipo de procesos a mayor escala, pues el tiempo requerido para extraer la mayor cantidad de azufre posible del carbón afecta directamente los costos y puede determinar la viabilidad de los procesos de biodesulfurización a escala industrial.

5.4 Análisis del proceso bioquímico a mayor escala usando tanques agitados

La elección de los ensayos para llevar el proceso de biodesulfurización en reactores de tanque agitado con un volumen de 5 litros, dependió de los resultados obtenidos tanto en la evaluación de los factores fisicoquímicos (pH, Eh, hierro removido) como de los análisis de formas de azufre y mineralógicos de las muestras de carbón obtenidas al finalizar el proceso, en los ensayos a escala erlenmeyer. De esta manera, se determinó que los ensayos con una relación inicial de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} menor (20:80 y 50:50), con una menor concentración de hierro total (200 mg/L) mostraron los mejores resultados en lo que se refiere a extracción de azufre pirítico en el sistema e incluso evidenciaron bajas precipitaciones de jarosita según los espectros de DRX y FTIR obtenidos al final de la experimentación.

Los resultados obtenidos para estos ensayos a mayor volumen tienen gran similitud con los observados a escala de erlenmeyer, en lo que tiene que ver con los factores fisicoquímicos (pH, Eh, concentración celular), los porcentajes de oxidación de la pirita, así, como la cantidad de hierro removida y la reducción de azufre total, los cuales presentan magnitudes similares.

Según los planteamientos de varios autores, iniciar el proceso a pH de 1.5 y mantener los valores menores a 1.6 puede ser favorable para evitar la precipitación de jarosita, fundamentalmente porque este valor de pH está dentro del óptimo de operación para la oxidación de sulfato ferroso por la cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* con la mínima precipitación de sulfatos de hierro (Gómez y Cantero, 2005; Daoud y Karamanev, 2006; Caicedo *et al.*, 2011). Sin embargo, aún a bajos valores de pH como los obtenidos en este estudio (1.35) se observa la precipitación de estos compuestos (Alpers *et al.*, 1989; Gramp *et al.*, 2008). La razón por la que se da la precipitación no es clara, sin embargo, puede estar relacionada con la temperatura, la presencia de iones de Na^+ , K^+ o NH_4^+ presentes en el medio de cultivo en forma de sales de fosfato ácido de potasio y sulfato de amonio, entre otros. o con la cantidad de hierro y sulfato presente en la solución ya que al existir una mayor remoción de pirita, se aumenta la cantidad de hierro y sulfatos en la solución que se suma a los adicionados inicialmente al sistema.

Adicionalmente, lo anteriormente dicho indica que la precipitación de jarosita es un subproducto “obligado” generado en el proceso de biodesulfurización o difícilmente controlable, sin embargo, también es cierto que este factor por sí solo no es limitante para que el proceso de desulfurización continúe satisfactoriamente durante la mayor parte de la experimentación, debido probablemente a que en una partícula de carbón la tasa de remoción de azufre inorgánico está básicamente controlada por la tasa de reacción intrínseca, teniendo en cuenta que es el mecanismo indirecto el que controla la reacción (Kargi, 1986). Además, los precipitados de jarosita y otros sulfatos de

hierro, generan películas muy porosas que permiten que el proceso de biooxidación continúe pero de manera más lenta (Tuovinen *et al.*, 2014).

Los valores de los pH de los experimentos realizados alcanzaron valores similares, sin embargo, el ensayo con menor concentración de hierro férrico (SFIC1) extrajo los mayores porcentajes de azufre inorgánico. Esto se debió probablemente a la relación de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (20:80) adicionada al sistema, lo que sugiere que menores cantidades de iones férricos contribuyen con las tasas de extracción química del azufre pirítico, mientras que los iones ferrosos ayudan a que las bacterias aumenten rápidamente la población celular, disminuyendo los efectos de la precipitación de sulfatos de hierro.

Un punto importante que debe tenerse en cuenta es la cantidad de hierro ferroso adicionada al sistema, en el caso de SF1 la cantidad de sulfato ferroso es mayor en comparación con los demás ensayos (SFIC1 y SFIIIC1), por lo cual podría sugerirse que la fuente de energía exógena es capaz de suplir las necesidades energéticas de la bacteria y no se necesitará oxidar la pirita presente en el carbón. Sin embargo, según los resultados obtenidos indican que la cantidad de iones ferrosos adicionados al sistema suplen parcialmente las necesidades energéticas y aumentan la concentración celular, las cuales requieren de mayores cantidades de energía que solo pueden ser obtenidas a partir de la pirita presente en el carbón.

Cabe resaltar que se evidenció crecimiento celular durante toda la experimentación para los ensayos planteados tanto a nivel de erlenmeyer como a nivel de biorreactores, posiblemente porque las concentraciones de hierro férricas empleadas no interfirieron con el crecimiento celular o porque las células se adaptaron a las concentraciones de hierro empleadas. Este hecho es de gran importancia, ya que lo que se pretende es implementar el proceso a escala industrial (Kawabe *et al.*, 2003; Nemati y Webb, 1998). Estudios previos realizados en biorreactores de capacidad similar (5L) así, como a mayor volumen (4000 L) sobre procesos de biodesulfurización de carbón, muestran porcentajes similares de hierro lixiviado (Figura 4-70) como de pirita oxidada (Figura 4-71), por lo que se podría inferir que emplear sulfato férrico en procesos de biolixiviación de carbón a mayor escala podría contribuir con la oxidación de la pirita sin afectar negativamente a las células implicadas en el proceso (Cardona, 2008; Caicedo *et al.*, 2012). No obstante, vale la pena tener en cuenta que mayores concentraciones de hierro férrico en solución podría resultar inhibitorio para las bacterias como se ha reportado en investigaciones previas para este tipo de bacterias (Kawabe *et al.*, 2003; Nemati y Webb, 1998).

Vale la pena mencionar que la concentración de sulfatos para los carbones resultantes fue sustancialmente mayor a la encontrada inicialmente y a la evidenciada en los ensayos a nivel de erlenmeyer, esto se relacionó con la adición de los iones de hierro en forma de sulfatos al medio y con las sales de hierro empleadas en la experimentación (sulfato ferroso y sulfato férrico). Además,

el sulfato es el principal producto de la disolución de pirita, el cual pudo precipitarse y depositarse y/ o ser absorbido por el carbón.

Aunque, el objetivo principal de los procesos de biodesulfurización es reducir la cantidad de azufre tanto pirítico como el total, los resultados de los análisis próximos (Tabla 4-7) evidenciaron un cambio en las propiedades del sustrato especialmente respecto a la cantidad de azufre en forma de sulfatos, el cual aumentó más de 0.4% en los dos ensayos realizados, en comparación con la muestra de carbón sin tratar (0.14%), esto se debió posiblemente a las condiciones del medio generadas durante la experimentación.

Los análisis próximos realizados al carbón al finalizar el proceso de biodesulfurización mostraron que los niveles de cenizas se redujeron durante el tratamiento, esto se pudo dar posiblemente por la acidez del medio lixivante ($\text{pH} < 1.4$), que contribuyó con la disolución de un número de minerales comunes (silicatos) presentes en el carbón y/o con la reducción del componente inorgánico (Acharya *et al.*, 2001, Aller *et al.*, 2001; Jorjani *et al.*, 2004; Cardona y Márquez, 2009). No obstante, mediante DRX no fue posible evidenciar dichos cambios, debido a la baja intensidad de los picos, es decir, a que estos minerales se encontraban en baja cantidad en las muestras analizadas.

El aumento en la materia volátil y el carbono fijo, así, como la disminución del contenido de cenizas después de proceso de biodesulfurización con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, está acorde con lo reportado en estudios previos (Detz y Barvinchak, Acharya *et al.*, 2001, Aller *et al.*, 2001; Jorjani *et al.*, 2004; Cardona, 2008).

El incremento del contenido de la materia volátil en el carbón durante los procesos de biolixiviación, se ha relacionado con la precipitación de minerales como la jarosita (Acharya *et al.*, 2001). Esto concuerda con los resultados obtenidos en los análisis próximos, pues las muestras de carbón del ensayo SFII precipitaron mayor cantidad de sales férricas y a su vez posee mayor contenido de materia volátil al finalizar la experimentación.

Uno de los cambios más importantes evidenciados en las muestras de carbón resultantes del proceso bioquímico de desulfurización fue el incremento en el poder calorífico, lo cual está directamente relacionado con la remoción del azufre inorgánico del carbón. Esto es un beneficio adicional del proceso de biodesulfurización ya que mejora las características del material.

Las micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, muestran una clara oxidación de las muestras de carbón después del proceso de biodesulfurización posiblemente asociada al ataque del agente oxidante (Fe^{3+}), tanto adicionado (químico) como generado (biológico). Vale la pena mencionar que los tamaños de los pozos evidenciados no son comparables con el tamaño de las bacterias, debido a que son más grandes, por lo que pueden relacionarse con las huellas dejadas por la pirita al ser extraída. No obstante, estas estructuras de corrosión son

características de los procesos de biolixiviación de acuerdo con investigaciones previas (Mustin *et al.*, 1992; Kanungo, 1999; Gleisner *et al.*, 2006).

Por otra parte, los microanálisis químicos (EDS) realizados sobre la muestra del carbón al finalizar el proceso de desulfurización, confirman la presencia de precipitados de hierro (Figuras 4-76 y 477). La formación de jarosita es de esperarse fundamentalmente por la concentración de hierro presente en el sistema. Adicionalmente, los espectros de DRX y FTIR confirman la formación esta fase mineral.

Vale la pena mencionar que al comparar los espectros de DRX y FTIR correspondientes a los experimentos en los cuales se empleó una relación inicial de hierro $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (20:80), obtenidos en los ensayos a nivel de erlenmeyer (Véase sección 4.4.5, Figuras 4-35 y 4-39) y los realizados a nivel de biorreactores (Figuras 4-72 y 4-73), estos últimos se observó un incremento en la formación de jarosita, esto se debe probablemente a que al aumentar el volumen del sistema, también se incrementa la cantidad de iones de K^+ , Na^+ , NH_4^+ disponibles en el sistema, lo cual favorece la precipitación de sulfatos de hierro.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

El proceso de adaptación tanto de los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* como del cultivo comercial de la misma especie (ATCC 23270), mostraron resultados favorables, indicando que el proceso de adaptación propuesto, fue el más apropiado y con este se consiguió una buena respuesta de las células al sustrato impuesto.

Al modificar las condiciones del medio de cultivo se generó en los microorganismos un impacto, evidenciado principalmente por la fase *lag*. No obstante, conforme las células se habitúan a las variaciones del medio de cultivo, la fase de retardo es menos evidente posiblemente debido a un cambio fisiológico que les permite prosperar como el incremento en las concentraciones de proteínas o enzimas oxidantes (Ferguson, 2008).

Los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* lograron una mejor adaptación a la disminución del sulfato ferroso y al aumento progresivo del carbón. Esto indica que estas células poseen una capacidad inherente asociada con el medio natural (drenaje ácido de una mina de carbón) del cual fueron aisladas.

Adicionar concentraciones iniciales de hierro ferroso (200mg/L -1200 mg/L) al sistema resultó ser benéfico para el proceso de biodesulfurización. Debido principalmente a que tanto los microorganismos compatibles como la cepa comercial de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, se encontraron activos en el proceso como lo indicaron las mediciones de pH y Eh, logrando la disolución del sulfuro metálico. También, se observó que adicionar concentraciones iniciales de hierro ferroso propicia la división celular y evitan la limitación del crecimiento por falta de sustrato

De acuerdo con las diferentes condiciones analizadas en el proceso de biodesulfurización, en donde se consideraron variables como el tipo de inóculo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (cultivo nativo vs. cultivo axénico) y la concentración de hierro total (200 mg/L y 1200 mg/L), empleando sulfato ferroso. Los mejores resultados en términos de oxidación de pirita fueron obtenidos por los ensayos en los cuales se emplearon microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y una mayor concentración de hierro total (1200 mg/L), obteniéndose altos porcentajes de oxidación de pirita (68%). Esto quiere decir que adicionar una mayor concentración de sulfato ferroso promueve el crecimiento y desarrollo de las células, mejorando la efectividad del

proceso oxidativo. Adicionalmente, los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* ayudan a potencializar este efecto.

Los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* mostraron una ventaja sobre el cultivo axénico, independientemente de la concentración de hierro ferroso adicionada a la solución. Esto es porque estas células mantuvieron una constante transferencia de electrones en el sistema, fundamentalmente en lo que se refiere a la regeneración de los iones férricos, y mantuvieron las condiciones favorables durante el proceso que permitió una solubilización significativa de hierro y limitó la precipitación de los productos de la oxidación.

La disminución del porcentaje de azufre pirítico presente en el carbón que exhibió tanto los microorganismos compatibles como *Acidithiobacillus ferrooxidans* así como el cultivo comercial después del proceso, confirmó la habilidad de estas cepas para remover el azufre inorgánico (pirita) del carbón.

El azufre asociado a la fracción orgánica se mantuvo sin cambios a lo largo del proceso, esto indica claramente que las cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* empleadas en este estudio no interactuaron con el componente orgánico del carbón.

El mecanismo indirecto de no contacto es el más probable para la disolución de pirita, debido posiblemente a que la biolixiviación de metales sulfurados insolubles en ácido esta exclusivamente basada en el ataque oxidativo de los iones Fe^{3+} . *Acidithiobacillus ferrooxidans* también juega un papel importante en la solubilización de la pirita, debido principalmente a que mantiene altas las concentraciones de Fe^{3+} en el medio.

La pirita presente en el carbón de la mina “La Guacamaya” se encontraba principalmente como framboides, esta morfología favoreció el proceso de biodesulfurización fundamentalmente, porque la pirita al estar dispuesta en la superficie del carbón como un conjunto de microcristales de alta porosidad, facilita el contacto entre el área reactiva y el líquido lixivante permitiendo su rápida disolución.

La jarosita generada a partir de los procesos de lixiviación en los cuales intervienen microorganismos acidófilos que oxidan iones Fe^{2+} y sulfuros de hierro, como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, es una fase mineral no deseada que disminuye la cinética del proceso de biooxidación.

El proceso bioquímico de desulfurización llevado a cabo para el carbón de la región norte de Colombia, constituye un trabajo pionero en el país, pues si bien se han llevado a cabo estudios sobre la biodesulfurización de carbón, la implementación de un proceso bioquímico empleando sales de hierro férricas (sulfato férrico y cloruro férrico) variando las concentraciones de hierro

total y empleando una cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* no han sido comúnmente utilizadas (Cardona y Márquez, 2009; Caicedo et al., 2011; Caicedo, 2008, Peláez et al., 2013).

El proceso bioquímico de desulfurización en donde se analizó el efecto de la adición de las sales férricas (cloruro férrico y sulfato férrico), la concentración de hierro total (200 mg/L y 1200 mg/L), y la relación inicial de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} (I: 20: 80; II: 50:50; III: 80:20); el mayor porcentaje de oxidación de pirita (80%) fue obtenido por los ensayos en los cuales se empleó sulfato férrico, una menor relación de hierro Fe^{3+}/Fe^{2+} (I), así como, la menor concentración de hierro total (200 mg/L). Esto indica que una baja concentración de hierro férrico inicial, favorece la oxidación química de la pirita y genera los iones ferrosos necesarios para el crecimiento de la bacteria, contribuyendo con la eficiencia total del proceso debido a que se logró una mayor remoción de la fracción inorgánica del carbón y bajas cantidades de sulfatos de hierro precipitados.

El proceso de desulfurización empleando cloruro férrico tanto a bajas (200 mg/L) como a altas (1200 mg/L) concentraciones de hierro total, demostró ser adverso para la cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC23270), por una afectación de la actividad oxidativa de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Esto es porque el microorganismo requiere de la presencia del anión SO_4^{2-} para su crecimiento y desarrollo debido a que la célula lo utiliza para estabilizar el complejo de Fe (II) hexahidratado que sirve como sustrato directo del sistema enzimático de oxidación. Adicionalmente, el ion cloruro pudo actuar en el sistema desacomplejando el ion ferroso o estabilizando otros complejos no específicos que también inhiben parcial o totalmente el crecimiento celular (Gahan et al., 2010).

Los experimentos realizados con sulfato férrico y una mayor concentración de hierro total (1200 mg/L), presentan mayor precipitación de jarosita y a la vez altas tasas de biooxidación del azufre inorgánico, podría concluirse que en estos experimentos la oxidación de la pirita es mayor y por lo tanto se aumenta la disposición de hierro y sulfatos en el sistema, favoreciendo la generación del mineral.

Es posible concluir que mayores concentraciones de hierro total estimulan la formación de los sulfatos de hierro precipitados disminuyendo la efectividad del proceso bioquímico de desulfurización.

Los análisis fisicoquímicos demostraron que el proceso de biodesulfurización está influenciado fundamentalmente por el pH, el tipo de medio de cultivo, la concentración de hierro inicial, la morfología de la pirita y la presencia de silicatos y carbonatos en el carbón.

Se comprobó que el pH del medio lixivante determinó el grado de solubilidad del hierro y los sulfatos, por lo que mantener valores de pH entre 1.4-1.3 mitiga la precipitación de las sales generadas durante el procesos a menor concentración de hierro total (200 mg/L) y disminuyeron

considerablemente los efectos negativos asociados con la presencia de fases minerales como la jarosita. Sin embargo, al aumentar la concentración de hierro total (200 mg/L) la formación de jarosita es inminente a pesar de los bajos valores de pH.

El proceso bioquímico de desulfurización que se propone requiere valores de pH bajos antes y durante el proceso para evitar la precipitación prematura de los iones férricos adicionados al sistema. Adicionalmente, los componentes del medio de cultivo (sulfato de amonio, fosfato ácido de potasio) facilitan la formación de fases minerales (NH_4^+ -Jarosita y K-Jarosita). Estos precipitados afectaron negativamente la eficiencia de los ensayos debido a que se depositan en la estructura del carbón, y disminuyen los porcentajes de extracción de azufre total.

A partir de las técnicas de análisis mineralógico empleadas, se pudo establecer que la precipitación de jarosita evidenciada especialmente en los ensayos con una mayor concentración de hierro total, no impidió la oxidación de pirita o sugiere que se formó en las etapas finales del proceso de biodesulfurización.

En los espectros de difracción de rayos X se observó que la intensidad de los picos asociados a pirita disminuyeron su intensidad considerablemente, después de doce días de experimentación, esto indica que el proceso de biooxidación no se frena a pesar de la formación de la capa pasivante.

La presencia de sulfatos de hierro (jarosita) solo fue evidenciada en las muestras de carbón tratadas, por lo que su origen está relacionado fundamentalmente con el proceso de desulfurización biológico. No obstante, la precipitación de sulfatos evita la oxidación completa del sulfuro metálico debido a que forman una barrera que impide el contacto entre el mineral y el líquido lixivante. Adicionalmente, disminuye la concentración de hierro presente en el sistema.

El uso de sales férricas es beneficioso para el proceso debido a que aumenta la efectividad del proceso de desulfurización biológica, no obstante, se genera una cantidad importante de precipitados de hierro.

Mediante los análisis de formas de azufre realizados sobre las muestras de carbón resultante, se determinó que las bacterias empleadas (*Acidithiobacillus ferrooxidans*), solamente son útiles para extraer el azufre inorgánico contenido en el carbón y no tienen ningún efecto sobre el azufre orgánico presente.

Los porcentajes de biooxidación de pirita y lixiviación de azufre total fueron muy similares en los procesos llevados a cabo a escala de erlenmeyer y en los reactores de tanque agitado. Vale la pena mencionar que el proceso de biodesulfurización aumentó la capacidad calorífica del carbón y redujo el contenido de cenizas.

Según los resultados obtenidos es posible inferir que el proceso bioquímico de desulfurización puede ser llevado a cabo a mayores volúmenes, manteniendo su eficiencia. No obstante, es imprescindible controlar los factores fisicoquímicos de medio.

6.2 Recomendaciones

Teniendo en cuenta que los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* exhibieron una mayor eficiencia en este estudio, se recomienda implementar el proceso bioquímico de desulfurización a mayor escala, empleando este tipo de bacterias, con el fin de oxidar mayores cantidades de pirita y mantener los iones férricos solubles por más tiempo.

Adicionalmente, como las cepas empleadas en el proceso de biodesulfurización solo son aptas para extraer el azufre inorgánico del carbón, se recomienda realizar un tratamiento previo con *Rhodococcus rhodochrous* con el fin disminuir significativamente la fracción de azufre orgánico presente (Toro, 2014).

Debido a que los ensayos con cloruro férrico, mostraron baja efectividad durante el proceso y limitación el crecimiento celular no se recomienda emplearlo en ensayos de biodesulfurización a mayor escala.

Con el fin de evitar y/o reducir la precipitación de sulfatos y en vista de que las cepas estudiadas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, mostraron actividad oxidativa a pH ácidos, se recomienda evaluar el proceso de biodesulfurización a pH constante ($1.2 < \text{pH} < 1.3$).

Adicionalmente, se evidenció que emplear un medio de cultivo T&K convencional generó sales precipitadas tales como yeso y jarosita. Por lo tanto, con el fin de reducir los precipitados se recomienda emplear un medio de cultivo en donde las sales de sulfato, utilizadas como fuente de nitrógeno y magnesio, se sustituyan por sales de cloruro (Caicedo y Márquez, 2013).

Adicionalmente, se recomienda realizar un análisis molecular a los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que permita establecer con claridad las diferencias frente al cultivo axénico, lo cual puede ser un punto clave a la hora de establecer su influencia sobre el proceso de biodesulfurización.

Por último, realizar seguimiento al proceso bioquímico de desulfurización mediante análisis mineralógicos, podría ser beneficioso para determinar la etapa de formación de los precipitados de hierro, con el fin de limitar sus efectos perjudiciales.

Bibliografía

Acharya, C., Kar, R., Sukla, L. (2001). Bacterial removal of sulphur from three different coals. *Fuel*, 80, 2207-2216.

Acharya, C., Sukla, L., Misra, V. (2005). Biological elimination of sulphur from high sulphur coal by *Aspergillus*-like fungi. *Fuel*, 84, 1597–1600.

Ahonen, L., Tuovinen, O.H., (1989). Microbiological oxidation of ferrous iron at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(2). 312–316.

Akcil, A., Koldas, S. (2006). Acid mine drainage (AMD): causes, treatment and case studies. *Journal of Cleaner Production*, 14(12-13): 1139-1145.

Aller, A., Martínez, O., de Linaje, J., Méndez, R., Morán, A. (2001). Biodesulphurization of coal by microorganisms isolated from de coal itself. *Fuel Processing Technology*, 69: 45- 57.

Andrews, F., Noah, K. (1997). The slurry-column coal beneficiation process. *Fuel Processing Technology*. 52: 247-266.

Atkas, Z., Karacan, F., Olcay, A. (1998). Centrifugal float–sink separation of fine Turkish coals in dense media. *Fuel Processing Technology*, 55(3): 235-250.

Bacelar-Nicolau P., Johnson D. (1999). Leaching of pyrite by acidophilic heterotrophic ironoxidizing bacteria in pure and mixed cultures. *Applied And Environmental Microbiology*, 65(2): 585-590.

Ballester, A. (2005). Mecanismo de la biolixiviación. En: *Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras*, 9-24.

Bauer, J. (1986). Lixiviación bacteriana: Introducción a la parte microbiológica de la biohidrometalurgia con Sp. de *Thiobacillus*. *Revista de la ANBIOP* 3, 53-60.

Basson, P., Gericke, M., Grewar, T., Dew, D., Nicol, M. (2013). The effect of sulphate ions and temperature on the leaching of pyrite. III. Bioleaching. *Hydrometallurgy* 133, 176–181.

- Bastias, M., Gentina, J. (2010). Variables affecting the growth and ferrous oxidation capacity of *L. Ferrooxidans* in continuous culture. *Hydrometallurgy* 104, 351–355
- Bhatnagar, A., Dastida, M., Roychoudhury, P. (1998). Integrated technique for pyritic sulphur reduction in Indian (Assam) coal. *Energy convers. Mg.* 39, 1121- 1126.
- Barron, J., Luecking, D. (1992). Growth and maintenance of *Thiobacillus ferrooxidans* cells. *Appl Environ Microbiol.*, 58: 1853–1856.
- Baruah, M., Kotoky, P., Borah, G. (2003). Distribution and nature of organic/mineral bound elements in Assam coals, India. *Fuel*, 82: 1783–1791.
- Blake, R., Shute, E., Howard, G. (1994). Solubilization of minerals by bacteria: electrophoretic mobility of *Thiobacillus ferrooxidans* in the presence of iron, pyrite, and sulfur. *Applied And Environmental Microbiology*, 60(9): 3349-3357.
- Blázquez, A. (1993). Coal biodesulphurization, review. *Biorecovery* 2, 155-177.
- Bennett, J., Tributsch, H. (1978). Bacterial leaching patterns on pyrite crystal surfaces. *J. Bacteriol.*, 134: 310-317.
- Bigham, J., Schwertmann, U., Carlson, L. (1992). Mineralogy of precipitates formed by the biogeochemical oxidation of Fe(II) in mine drainage. Biomining processes of iron and manganese. *Catena Supplement*, 21: 219-232.
- Bigham, J. (1994). Mineralogy of ochre deposits formed by sulfide oxidation. p. 103-132. In: D.W. Blowes and J.L. Jambor (ed.) The environmental geochemistry of sulfide minewastes. Short Course Handbook. *Mineral. Assoc. Canada* Vol. 22.
- Bigham, J., Schwertmann, U., Pfab, G. (1996). Influence of pH on mineral speciation in a bioreactor simulating acid mine drainage. *Applied Geochemistry*, 11: 845-849.
- Bird, L. J., Bonnefoy, V., & Newman, D. K. (2011). Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. *Trends in Microbiology*, 19(7), 330–340.
- Blight, K., Ralph, D., Thurgate, S. (2000). Pyrite surfaces after bio-leaching: a mechanism for bio-oxidation. *Hidrometallurgy*, 58, 227-237.
- Blight, K., Candy, M., Menzel, M., Ralph, D. (2012). Total dissolved solids and their effects on iron oxidation by chemolithotrophic cells. *Hydrometallurgy* 125–126, 109–114.
- Boon, M. (2001). The mechanism of “direct” and “indirect” bacterial oxidation of sulphide minerals. *Hydrometallurgy*, 62(1), 67–70.

Boon, M., Heijnen, J. (2001). Solid–liquid mass transfer limitation of ferrous iron in the chemical oxidation of FeS at high redox potential. *Hydrometallurgy*, 57–66

Bozdemir, T., Durusoy, T., Erincin, E., Yürüm, Y. (1996). Biodesulfurization of Turkish lignites. *Fuel*. 75 (13): 1596-1600.

Bond, P., Druschel, G., Banfield, J. (2000). Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Applied And Environmental Microbiology*, 66(11): 4962-4971.

Bosecker, K. (1997). Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. FEMS. *Microbiology Reviews*, 20: 591 – 604.

Bozdemir, T., Durusoy, T., Erincin, E., Yürüm, Y. (1996). Biodesulfurization of Turkish lignites. *Fuel*, 75(13): 1596-1600.

Butler, I., Rickard, D. and Grimes, S. 2000. Framboidal Pyrite: Self Organisation in the Fe-S System. *Journal of Conference Abstracts*, 5(2): 276-277.

Butler, I., Rickard, D. 2000. Framboidal pyrite formation via the oxidation of iron (II) monosulfide by hydrogen sulphide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(15): 2665–2672.

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. Tesis M. Sc. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

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. Biotec.* 7, 199-209.

Caicedo, G., Márquez, M. (2013). Efecto de sales cloruros en un proceso de biodesulfurización de un carbón colombiano. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, 68, 115-123.

Cara, J., Carballo, M., Morán, A., Bonilla, D., Escolano, O., García, F. (2005). Biodesulphurization of high sulphur coal by heap leaching. *Fuel* 84, 1905-1910.

Calkins, H. (1994). The chemical forms of sulfur in coal: a review. *Fuel*. 73 (4): 475-484.

Capes, C., McIlhinney, A., Sirianni, I., Puddington I. 1973. Bacterial oxidation in upgrading pyritic coals. *Can Inst. Mining Met Bull.* 66: 88–91.

Cara, J., Morán, A., Carballo, T., Rozada, F., Áller, A. (2003). The biodesulphurization of a semianthracite coal in a packed-bed system. *Fuel*. 82: 2065-2068.

Cara, J., Vargas, M., Morán, A., Gómez, E., Martínez, O., García, F. (2006). Biodesulphurization of a coal by packed-column leaching. Simultaneous thermogravimetric and mass spectrometric analyses. *Fuel*. 85: 1756-1762.

Cardona, C., y Márquez, M. (2009). Biodesulfurization of two Colombian coals with native microorganisms. *Fuel Process. Technol.* 82, 95-105.

Cartmell, L., Lancaster, J. (1983). A microbial study of an artificial coal spoil. *Proc. Okla. Acad. Sci.* 63: 21-24.

Chaudhuri, S., Ghose, S., Chandra, D. (1992). Origin and mode of occurrence of pyrite in Assam coals. *Fuel Sci. Techn.* 1, 41-46.

Chandra, A., Gerson, A. (2010). The mechanisms of pyrite oxidation and leaching: A fundamental perspective. *Surface Science Reports* 65, 293–315.

Córdoba, M., Muñoz, A., Blázquez, L., González, F., Ballester, A. (2008). Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part I: General aspects. *Hydrometallurgy* 93, 81–87.

Colmer, A., Hinkle, M. (1947). The Role of Microorganisms in Acid Mine Drainage: Preliminary Report. *Science*, 106: 253-256.

Chou, C. (2012). Sulfur in coals: A review of geochemistry and origins. *International Journal of Coal Geology*, 100, 1–13.

Cwalina, B., Chrostowaka, D., Buszman, E. (1983). Bacterial desulfurization of coal, II. Laboratory scale microbial leaching of high S coal. *Prozgel Gorn*, 39: 459–470.

Daoud, J., Karamanev, D. (2006). Formation of jarosite during Fe²⁺ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Mineral. Eng.* 19 (9), 960-967.

Detz, C., Barvinchak, G. 1979. Microbial desulfurization of coal. *Am. Mining Congress J.*, 65: 75-86.

Deveci, H., Akcil, A., Alp, I., (2004). Bioleaching of complex zinc sulphides using mesophilic and thermophilic bacteria: comparative importance of pH and iron. *Hydrometallurgy*, 73, 293-303.

Durusoy, T., Bozdemir, T., Erincin E., Yürüm, Y. 1997. Biodesulfurization of Turkish lignites. *Fuel*, 76(4): 341-344.

Edwards, K., Hu, B., Hamers, R., Banfield, J. 2001. A new look at microbial leaching patterns on sulfide minerals. *FEMS Microbiology Ecology*, 34: 197-206.

Eligwe, C. (1988). Microbial desulphurization of coal. *Fuel*, 67, 451-458.

Elzeky, M., Attia, Y. 1995. Effect of bacterial adaptation on kinetics and mechanisms of bioleaching ferrous sulfides, *The Chemical Engineering Journal*, (56): 115-124.

Falco, L., Pogliani, C., Curutchet, G., Donati, E. (2003). A comparison of bioleaching of covellite using pure cultures of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* or a mixed culture of *Leptospirillum ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Hidrometallurgy* 71, 31-36.

Fowler, T., Holmes, P., Crundwell, F. (2001). On the kinetics and mechanism of the dissolution of pyrite in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 59(23): 257-270.

Fowler, T., Crundwell, F. 1999. Leaching of Zinc Sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans*: bacterial oxidation of the sulfur product layer increases the rate of zinc sulfide dissolution at high concentrations of ferrous ions. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12): 5285-5292.

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

García, O., Bigham, J., Tuovinen, O. (2007). Oxidation of isochemical FeS₂ (marcasite–pyrite) by *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Mineral. Eng.* 20, 98-101.

Ghuri, A., Okibe, N., Jhonson, B. (2007). Attachment of acidophilic bacteria to solid surfaces: The significance of species and strain variations. *Hidrometallurgy*. 85, 72-80.

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

Gleisner, M., Herbert, R., Kockum, P. (2006). Pyrite oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* at various concentrations of dissolved oxygen. *Chem. Geol.* 225, 16-29.

Grishin, S., Bigham, J., Touvinen, O. (1988). Characterization of jarosite formed upon bacterial oxidation of ferrous sulfate in a packed-Bed reactor. *Applied and Environmental microbiology*, 3101-3106.

Gómez, F., Amils, R., Marín, I. (1999). Bioremoval of organic and inorganic sulphur from coal samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 118-121.

Gómez, J., Cantero, D. (2005). Biooxidación del ion ferroso. Fundamentos y perspectivas de las tecnologías mineras. Valparaíso, Chile: Ediciones Universitarias de Valparaíso, 25-43.

- Gu, G., Sun, X., Hu, K., Li, J., Qiu, G. (2012). Electrochemical oxidation behavior of pyrite bioleaching by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 22, 1250-1254.
- Gupta, A., Saroj, K., Thakur, D. (1977). Microbial desulfurization of coal. *Chem Era*, 13: 238–243.
- Harneit, K., Göksel, A., Kock, D., Klock, J., Gehrke, T., Sand, W. (2006). Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 83: 245–254.
- He, Z., Yin, Z., Wang, X., Zhong, H., & Sun, W. (2012). Microbial community changes during the process of pyrite bioleaching. *Hydrometallurgy*, 125-126(3), 81–89.
- Holmes, P., Fowler, T., Crundwell, F. (1999). The mechanism of the bacterial leaching of pyrite: an electrochemical study. *Journal of the Electrochemical Society*, 146: 2906- 2912.
- Holmes, P., T., Crundwell, F. (2000). The kinetics of the oxidation of pyrite by ferric ions and dissolved oxygen: an electrochemical study. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(2): 263-274.
- Hu, G., Johansen, K., Wedel, S., Hansen, J. (2006). Decomposition and oxidation of pyrite. *Progress in Energy and Combustion Science* 32, 295–314.
- Huan, T., Dongwei, L. (2014). Presentation on mechanisms and applications of chalcopyrite and 2 pyrite bioleaching in biohydrometallurgy – a presentation. Biotechnology reports.
- Ingledeu, J. (1986). Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* No 16: 23-33.
- Johnson, D., & Hallberg, K. (2003). The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology*, 154(7), 466–473.
- Jones, S., Bigham, M., Gramp, J., Tuovinen, H. (2014). Synthesis and properties of ternary (K, NH₄, H₃O)-jarosites precipitated from *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures in simulated bioleaching solutions. *Materials Science and Engineering C* 44, 391–399.
- Jorjani, E., Rezai, B., Vossoughi, M., Osanloo, M. 2004. Biodesulfurization of the Tabas deposit coal by microorganisms. *Journal of Mining Science*, 40(3): 310-320.
- Juszczak, A., Domka, F., Kozłowski, M., Wachowska, H. (1995). Microbial desulfurization of coal with *Thiobacillus ferrooxidans* bacteria. *Fuel*. 75 (5): 725-728.
- Kaksonen, A., Morris, C., Rea, S., Li, J., Wylie, J., Usher, K., Ginige, M., Cheng, Y., Hilario, F., Plessis, C. (2014). Biohydrometallurgical iron oxidation and precipitation: Part I — Effect of pH on process performance. *Hydrometallurgy* ,255–263.

Kalin, M., Fyson, A., Wheeler, W. (2006). The chemistry of conventional and alternative treatment systems for the neutralization of acid mine drainage. *Science of the Total Environment*, 366 (2-3): 395-408.

Karamanev, D.G., Nikolov, L.N., (1988). Influence of some physicochemical parameters on bacterial activity of biofilm: ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering*, 31(4): 295–299.

Kargi, F. 1986. Microbial methods for desulfurization of coal. *Trends in Biotechnology*, 4(11): 293-297.

Kawabe, Y., Inque, C., Suto, K., Chida, T. (2003). Inhibitory Effect of High Concentrations of Ferric Ions on the Activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 96(4), 375 – 379.

Kodali, B., Rao, B., Narasu, L., Pogakub, R. (2004). Effect of biochemical reactions in enhancement of rate of leaching. *Chemical Engineering Science*. 59: 5069-5073.

Kelly, D., Wood, A. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 50, 511-516.

Klein, J., Van Afferden, M., Pfeifer, F. Schacht, S. (1994). Microbial desulfurization of coal and oil. *Fuel Processing Technology*, 40 (2-3): 297-310.

Klein, J. (1998). Technological and economic aspects of coal biodesulfurization. *Biodegradation*, 9(3-4): 293-300.

Kodali, B., Rao, B., Narasu, L. and Pogaku, R. (2004). Effect of biochemical reactions in enhancement of rate of leaching. *Chemical Engineering Science*, 59: 5069 – 5073.

Kinzler, K., Gehrke, T., Telegdi, J., Sand, W. (2003). Bioleaching—a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS). *Hydrometallurgy*, 71 (1-2): 83-88.

Lazaroff, N.; Sigal, W. and Wasserman, A. (1982). Iron oxidation and precipitation of ferric hydroxysulfates by resting *Thiobacillus ferrooxidans* cells. *Applied Environmental Microbiology*, 1: 924-938.

León, E. (2006). La importancia del carbón mineral en el desarrollo. *Revista Del Instituto de Investigaciones FIGMMG*, 9(18), 91–97.

Lengke, M., Southam, G. (2005). The effect of thiosulfate-oxidizing bacteria on the stability of the gold-thiosulfate complex. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 69 (15): 3759–3772.

Liu, H., Gu, G., Xu, Y. (2011). Surface properties of pyrite in the course of bioleaching by pure culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and a mixed culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Hydrometallurgy* 108, 143–148.

Malik, A., Dastidara, M., y Roychoudhuryb, P. (2001). Biodesulphurization of coal: effect of pulse feeding and leachate recycle. *Enzyme Microb. Tech.* 28, 49-56.

Malik, A., Dastidara, M., Roychoudhuryb, P. (2004). Factors limiting bacterial iron oxidation in biodesulphurization system. *Int. J. Miner. Process.* 73: 13-21.

Marcello, R., Galato, S., Peterson, M., Riella, H., Bernardin, M. (2008). Inorganic pigments made from the recycling of coal mine drainage treatment sludge. *Journal of environmental management.* 88: 1280-1284.

Martínez, O., Díez, C., Miles, N., Shah, C., Morán, A. (2003). Biodesulphurization as a complement to the physical cleaning of coal. *Fuel.* 82: 1085-1090.

May, N., Ralph, D. E., & Hansford, G. S. (1997). Dynamic redox potential measurement for determining the ferric leach kinetics of pyrite. *Minerals Engineering, 10(11), 1279–1290.*

Mejía, E., Ospina, J. 2007. Mecanismos de transformación de la galena (PbS) en procesos de biolixiviación-biooxidación. Tesis Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia (Medellín), 85.

Menadier, A. (2009). Biolixiviación de piritas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cepas nativas (tesis pregrado). Universidad de Chile, Santiago de Chile. Chile

Meruane, G. (2002). Oxidación bacteriana de sulfato ferroso con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Tesis de Doctorado en Ciencias de la Ingeniería. Mención Química. Universidad de Chile. Chile, 102.

Mishra, A., Chandra. D., Prasad, N., Roy, P. (1980). Removal of sulfur from coal by *T.ferrooxidans* and by mixed acidophilic bacteria present in coal. *Fuel*, 59: 249–252.

Naresh, R., Nagendran, R. (2007). Influence of initial pH on bioleaching of heavy metals from contaminated soil employing indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Chemosphere.* 66:1775–1781.

Nazari, B., Jorjani, E., Hani, H., Manafi, Z., Riahi, A. (2014). Formation of jarosite and its effect on important ions for *Acidithiobacillus ferrooxidans* bacteria. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 24, 1152–1160.

Nemati, M., Webb, C. (1998). Inhibition effect of ferric iron on the kinetics of ferrous iron. *Biotechnology Letters*, 20(9), pp. 873–877.

Nematí, M., Harrison, S., Handsford, G., Webb, C. (1998). Review -Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: a review on the kinetic aspects. *Biochemical Engineering Journal*. 1: 171-190.

Nicol, M., Miki, H., Zhang, S., Basson, P. (2013). The effects of sulphate ions and temperature on the leaching of pyrite. 1. Electrochemistry. *Hydrometallurgy* 133, 188–196.

Nies, D. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol Biotechnol* 51, pp. 730-750.

Ossa, M., Márquez, M. (2005). Biooxidación de sulfuros mediante cepas nativas de acidófilos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *thiooxidans*, Mina de Oro el Zancudo, Titiribí, Colombia. *Rev. Colomb. Biotec.* 7, 55-66.

Prayuenyong, P. (2002). Coal biodesulphurization processes. *J. Science Tech.* 24, 493-507.

Peláez, H., Prada, M., Caicedo, G., Moreno, C., & Marquéz, M. (2013)., Influencia de la relación inicial de Fe^{2+}/Fe^{3+} , en un proceso de biodesulfurización de carbones en suspensión. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29(2), 211–217.

Petersen, J., Dixon, D. (2006). Competitive bioleaching of pyrite and chalcopyrite. *Hydrometallurgy*. 83: 40-49.

Porro, S., Ramirez, S., Reche, C., Curutchet, G., Romanowsky, A., Donati, E. (1997). Bacterial attachment: its role in bioleaching process. *Process Biochemistry*, 32(7), 573 – 578.

Rawlings, D. (2005). Characteristics and adaptability of iron- and sulfur- oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb. Cell Fact.* 89, 4-13.

Rimstidt, D., Vaughan, J. (2003). Pyrite oxidation: A state-of-the-art assessment of the reaction mechanism. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67 (5), 873–880.

Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., Sand, W. (2003). Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 239-248.

Rossi, G. (1993). Biodepyritization of coal: achievements and problems. *Fuel*, 72, 1581-1592.

Rodriguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M., Gonzalez., Muñoz, J. (2003). New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperatura. *Hydrometallurgy* 71 (2003) 37–46.

Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M., González, F., Muñoz, J. (2003). New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy*. 71: 37–46.

- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K. and Sand W. (2003). Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 63:239–248.
- Saikia, B., Boruah, R., Gogoi, P. (2007). FT-IR and XRD analysis of coal from Makum coalfield of Assam. *J. Earth Syst. Sci.* **116** (6), 575–579.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P., Schippers, A. (2001). Biochemistry of bacterial leaching - direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* 59, 159-175.
- Sand, W., Gehrke, T. (2006). Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. *Rev. Microbiol.* 157, 49-56.
- Silverman, M., Rogoff, M., Wender, I. (1961). Bacterial oxidation of pyritic materials in coal. *Appl. Microbiol.* 9, 491-496.
- Silverman, M., Ehrlich, H. 1964. Microbial formation and degradation of minerals. *Adv. Appl. Microbiol.*, 6: 181–183.
- Shiers, D., Blight, K., Ralph, D. (2005). Sodium sulphate and sodium chloride effects on batch culture of iron oxidising bacteria. *Hydrometallurgy* 80, 75–82.
- Shiers, W., Ralph, D., Watling, H. (2010). A comparative study of substrate utilisation by *Sulfobacillus* species in mixed ferrous ion and tetrathionate growth médium. *Hydrometallurgy* 104, 363–369.
- Temple, K., Colmer, A. (1951). The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, (62): 605-611.
- Tributsch, H. (2001). Direct versus indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*. 59: 177–185.
- Tripathy, S., Kar, R., Mishra, S., Twardoska, I., Sukla, L. (1998). Effect of chemical pretreatment on bacterial desulfurization of Assam coal. *Fuel*, 77, 859-864.
- Tuovinen, O., Kelly, D. (1973). Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*: I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable numbers, and comparison with CO₂ fixation and iron oxidation as measure of growth. *Arch. Microbiol*, 88: 285–298.
- Valderrama, G. (2000). Estudio de la Distribución del Azufre en Regiones Carboníferas Nacionales y su Impacto Ambiental. Memorias V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Carbón. Valledupar.
- Wang, M., Zhou, L. (2012). Simultaneous oxidation and precipitation of iron using jarosite immobilized *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its relevance to acid mine drainage. *Hydrometallurgy* 152–156.

Watling, H. (2013). Chalcopyrite hydrometallurgy at atmospheric pressure: 1. Review of acidic sulfate, sulfate–chloride and sulfate–nitrate process options. *Hydrometallurgy* 140 (2013) 163–180.

Weber, P., Stewart, W., Skinner, W., Weisener, C., Thomas, J., Smart, R. (2004). Geochemical effects of oxidation products and framboidal pyrite oxidation in acid mine drainage prediction techniques. *Applied Geochemistry* 19, 1953–1974.

Yu, J., Mc Genety, T., Coleman, L. (2001). Solution chemistry during the lag phase and exponential phase of pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Chemical Geology* 175, 307–317.

Zapata, D. (2006). Mineralogía del proceso de oxidación bacteriana de esfalerita, proveniente del distrito minero de Marmato (Caldas). Tesis magíster en Ingeniería – Área Materiales y Procesos, Universidad Nacional de Colombia (Medellín).

Zhang, L., Qiu, G., Hu, Y., Sun, X., Li, J., & Hu, G. (2008). Bioleaching of pyrite by *A. ferrooxidans* and *L. ferriphilum*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 18(6), 1415–1420.

Zhu, J., Gan, M., Zhang, D., Hu, Y., Chai, L. (2013). The nature of Schwertmannite and Jarosite mediated by two strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* with different ferrous oxidation ability. *Materials Science and Engineering C* 33, 2679–2685.