



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

LIXIVIACION BACTERIANA SOBRE  
MUESTRAS DE CARBON



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**T E S I S**

Que para obtener el título de

**Q U I M I C O**

p r e s e n t a

**GEORGINA TERESA HERNANDEZ CHAVEZ**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1988



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

	Página
GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....	vi
INDICE DE FIGURAS .....	v
INDICE DE GRAFICAS .....	vi
INDICE DE TABLAS .....	vii
INTRODUCCION .....	1
CAPITULO I. ANTECEDENTES .....	4
I.1 <i>Thiobacillus</i> .....	7
Características Biológicas .....	7
Mecanismos de Lixiviación .....	7
Factores que Afectan al Crecimiento- Bacteriano .....	10
I.2 Sistemas de Lixiviación .....	13
Trabajo Experimental .....	13
Aplicaciones Comerciales .....	14
I.3 El Carbón .....	17
I.4 Tratamiento del Carbón Mineral .....	19
CAPITULO II. PARTE EXPERIMENTAL. TRATAMIENTO DEL CARBON MINERAL CON <i>Thiobacillus</i> .....	23
II.1 Objetivos .....	24
II.2 Metodología .....	24
II.2.1 Materiales y Reactivos .....	24
II.2.2 Procedimiento .....	27
Determinación de Hierro .....	31
Determinación de Proteínas .....	32
Determinación Cualitativa de Aluminio .....	33
CAPITULO III. RESULTADOS Y ANALISIS .....	35
III.1 Resultados .....	36
III.2 Análisis de Resultados .....	46
Desarrollo en Matraces .....	46
Desarrollo en Columna .....	49

<b>CAPITULO IV. CONCLUSIONES .....</b>	<b>50</b>
<b>APENDICE .....</b>	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>55</b>

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

$e^-$  = electron.

$E^0$  = potencial normal estándar (comparado contra electrodo normal de hidrógeno).

Fen = 1,10 fenantrolina.

g = gramos.

mg. = miligramos.

ml. = mililitros.

$\mu\text{m}$  = 1 micrómetro =  $10^{-6}$  metros.

nm = 1 nanómetro =  $10^{-9}$  metros.

PBS = solución amortiguadora de fosfatos (pH = 7).

% p/v = por ciento peso en volumen.

rpm = revoluciones por minuto.

sol. = solución.

v = volts.

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura I .....	13
Figura II .....	14
Figura III .....	15
Figura IV .....	16
Figura V .....	29
Figura VI .....	54

## INDICE DE GRAFICAS

	Página
Gráfica 1 .....	21
Gráfica 2 .....	42
Gráfica 3 .....	42
Gráfica 4 .....	43
Gráfica 5 .....	44
Gráfica 6 .....	44
Gráfica 7 .....	48
Gráfica 8 .....	48
Gráfica 9 .....	49

## INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I .....	6
Tabla II .....	12
Tabla III .....	17
Tabla IV .....	20
Tabla V .....	20
Tabla VI .....	21
Tabla VII .....	26
Tabla VIII .....	28
Tabla IX .....	36
Tabla X .....	36
Tabla XI .....	37
Tabla XII .....	37
Tabla XIII .....	38
Tabla XIV .....	38
Tabla XV .....	39
Tabla XVI .....	39



<b>Tabla XVII</b> .....	<b>40</b>
<b>Tabla XVIII</b> .....	<b>41</b>

## INTRODUCCION

La extracción de metales por medio de microorganismos, a partir de los minerales que los contienen, ha ido cobrando gran importancia en los últimos años. La necesidad de extraer con óptimos rendimientos metales como cobre o uranio en escorias, dado el potencial económico que representa, o la reducción de contaminantes en aguas ácidas provenientes de minas y en combustibles fósiles al ser quemados (liberación de  $SO_2$  por el alto contenido de azufre), ha justificado la inversión de grandes cantidades de dinero en proyectos biohidrometalúrgicos en países desarrollados, y últimamente algunos países como Perú, Chile, o México.

Según datos de Gentina y Acevedo<sup>(1)</sup>, en 1983 se produjeron en México 193,000 toneladas de cobre. En Cananea, la lixiviación *in situ* y por terrazas (sobre escoria de cobre) utilizando *Thiobacillus ferrooxidans* generaba 9,000 toneladas, lo que significó un 4% de la producción total para ese año.

Por lo anterior, la posibilidad de utilizar microorganismos en la industria metalúrgica se ha incrementado considerablemente en lo que va de la década y tiene un futuro promisorio. Los costos para la extracción de metales a partir de minerales de baja ley por métodos bacteriológicos, disminuyen respecto a aquellos que utilizan solamente sustancias químicas. Por ejemplo, metales del grupo del oro, plata y platino, se encuentran finamente diseminados en la piritita, por lo que su recuperación por procesos convencionales, como el tratamiento con cianuro, se hace difícil. En este caso, una previa extracción microbiológica de la piritita sirve para liberar los metales preciosos de su matriz, haciéndolos más accesibles.

Este trabajo pretende contribuir con una alternativa a la biohidrometalurgia del carbón mineral. Hasta la fecha, en dicho campo han sido reportados solamente métodos de desulfurización y no de extracción de metales. Con los métodos aquí presentados, se propone un método de

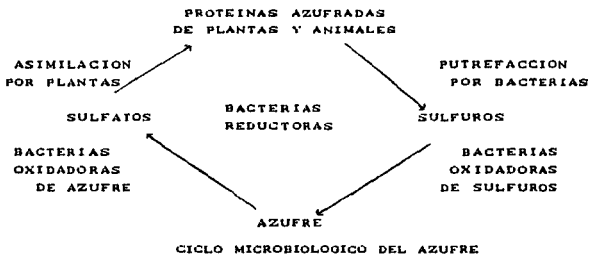
purificación del carbón, para incrementar su capacidad calorífica, y se determina el aluminio y hierro extraídos bacteriológicamente con una mezcla de *Thiobacillus* spp., en variables condiciones de cultivo, de muestras de carbón provenientes de Río Escondido, Coah., ya que éstas contienen sulfuros de varios metales, en particular hierro, que presentan la oportunidad de ser aprovechados después de recuperarse por métodos analíticos.

## **CAPITULO I: ANTECEDENTES**

Los microorganismos constituyen hoy por hoy, uno de los campos sujetos a investigación más interesantes, pues son importantes protagonistas de los procesos naturales que nos rodean. Una gran cantidad de reacciones en el agua, particularmente las que involucran procesos de óxido-reducción y transformación de materia orgánica, es regulada por bacterias.

Entre los microorganismos, existen aquellos individuos que requieren materia orgánica como fuente de carbón y energía. Estos son conocidos como heterótrofos y son muy comunes en los procesos de descomposición o putrefacción. Por otro lado, existen los microorganismos<sup>[45]</sup> que para obtener carbono, de lo único que dependen es del CO<sub>2</sub> que se encuentra en el aire. Dentro de esta división de microorganismos, llamados autótrofos, están aquellos cuya fuente de energía proviene de procesos enzimáticos de oxidación de sustratos inorgánicos reducidos, tales como compuestos de hierro y azufre. Estos microorganismos, conocidos como quimiolitótrofos, utilizan la energía de éstos procesos de oxidación para la formación de ATP<sup>[46]</sup>.

Uno de los principales elementos en la biósfera es el azufre, que dentro de ella sufre diversos cambios. Los microorganismos quimiolitótrofos, que tienen la capacidad de metabolizar el azufre, lo hacen interviniendo en un ciclo microbiológico que podría representarse como sigue<sup>[27]</sup>:



Existe una verdadera gama de microorganismos con los que se trabaja para fines metalúrgicos (tabla I);

NOMBRE DEL ORGANISMO	MINERAL	PROCESO EFECTUADO	REF.
<i>T. ferrooxidans</i>	sulfuros metálicos	Regeneración lixiviante por oxidación de Fe(II) Oxidación directa de sulfuros metálicos	30
<i>L. ferroxidans</i>	sulfuros metálicos	Regeneración lixiviante por oxidación de Fe(II)	30
<i>Sulfolobus</i> sp.	sulfuros metálicos	Regeneración lixiviante por oxidación de Fe(II) Oxidación directa de sulfuros metálicos	30
<i>Vibrio</i> spp.	Ferromanganeso.	Biorreducción de Mn(IV) a Mn(II)	34
<i>Bacillus</i> 29	Ferromanganeso	Biorreducción de Mn(IV) a Mn(II)	32
<i>Clostridium</i> spp	Goethita, FeOOH y hematita	Biorreducción de Fe(III) a Fe(II)	31
<i>Enterobacter</i> sp	Goethita, FeOOH y hematita	Biorreducción de Fe(III) a Fe(II)	35
<i>D. Chromatophila</i>	Crocoita	Biorreducción de Cr(VI) a Cr(III)	36
Hongos	Sulfuros metálicos	Quelatación y acidificación con ácidos cítrico y oxálico	30
<i>T. thiooxidans</i>	Sulfuros	Lixiviación ácida con ác. sulfúrico diluido	33

TABLA I. EJEMPLOS DE MICROORGANISMOS QUE PUEDEN PROMOVER LA SOLUBILIZACIÓN DE IONES METÁLICOS EN MINERALES Y ESCORIAS.

sin embargo, aquellos que más se han utilizado, sobre todo en escorias de cobre y uranio para una mayor extracción de dichos metales, son *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans* -el primero más generalizado-. Al occidente de Estados Unidos, una porción significativa en la producción de cobre es la biolixiviación de minerales de baja ley<sup>(2)</sup>. En cifras, dicha producción alcanza el 18% actualmente.<sup>(3)</sup>

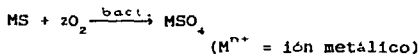
## I.1. *Thiobacillus*.

Características biológicas. - *Thiobacillus ferrooxidans* se descubrió en aguas ácidas de drenaje en minas de carbón, y fue hasta 1957 cuando se encontró una relación entre la presencia de la bacteria y la disolución de metales al efectuar operaciones de lixiviado de cobre. Es un bacilo móvil, flagelado, no esporulado, Gram negativo de aproximadamente 0.5µm de ancho y 2µm de longitud<sup>(4,5)</sup>. Es quimioautótrofo, es decir, su fuente de carbono proviene del CO<sub>2</sub> atmosférico y su fuente de energía de la oxidación de sustratos inorgánicos (Fe<sup>2+</sup> o azufre en bajos estados de oxidación); aerobio estricto, por su necesidad de O<sub>2</sub> atmosférico; acidófilo, pues se desarrolla en medios cuyo pH es aprox. 2, y termófilo moderado, por ser su intervalo de temperatura en cultivos *in vitro* de 25-45°C.<sup>(3)</sup>

Se le encuentra en terrazas utilizadas para lixiviación (*heap leaching* y *dump leaching*) junto con *Thiobacillus thiooxidans*, quien es morfológicamente similar a él<sup>(6,7,8)</sup>. La diferencia fundamental entre las dos especies es la incapacidad de *Thiobacillus thiooxidans* de oxidar Fe<sup>2+</sup> y sulfuros metálicos insolubles<sup>(4,5,9)</sup>. El azufre que oxidan puede presentarse como sulfuros insolubles, azufre elemental, tiosulfato, o tetratiónato, dando lugar a la formación de sulfatos.

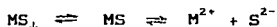
Mecanismos de lixiviación. - Existen dos mecanismos por los cuales el microorganismo puede efectuar la oxidación del sustrato mineral: el mecanismo directo y el indirecto.

En la lixiviación directa las bacterias oxidan los sulfuros presentes en los minerales:

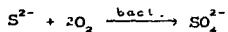




Como es lógico suponer, la bacteria debe permanecer adherida a la superficie del sustrato, donde el sulfuro presenta el siguiente equilibrio de disociación:

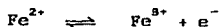


El sulfuro soluble ( $S^{2-}$ ) es inmediatamente captado por el sistema enzimático de la bacteria y oxidado a sulfato,

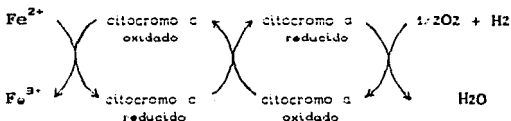


lo que facilita el desplazamiento del equilibrio de solubilidad a la derecha.<sup>(3,10)</sup>

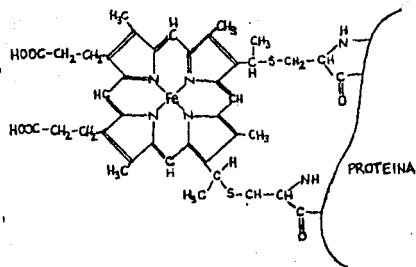
*Thiobacillus ferrooxidans* puede además oxidar hierro:



El aislamiento de los citocromos c y a de *Thiobacillus ferrooxidans*, permite proponer un mecanismo de transferencia de electrones, en el que la oxidación de hierro, con oxígeno como aceptor final, es mediado por dichos citocromos. Dicho mecanismo es el siguiente<sup>(11,12)</sup>:



Los citocromos son proteínas conjugadas que contienen una porfirina con hierro como grupo prostético y funcionan como transportadores de electrones en las cadenas respiratorias. La estructura del citocromo c se muestra a continuación:

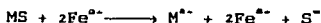


citocromo c

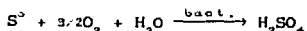
La porfirina del citocromo c se une a los residuos de cisteína del componente protéico, a través de enlaces tioéster. La porfirina del citocromo a es la porfirina A, similar a la del citocromo c, aunque su principal característica es la de poseer una larga cadena hidrofóbica isoprenoide, similar a la porfirina de la clorofila.

Los iones metálicos no penetran a la célula bacteriana, sino que los electrones liberados por la oxidación del metal (o del sulfuro, hablando de *T. thiooxidans*) pasan por este sistema de transporte, gracias al cual la bacteria obtiene su energía. Aunque *T. ferrooxidans* crece a pH 2, su pH interno es casi neutro y el gradiente transmembranal es de 4.5. Se ha calculado para estos valores un potencial de membrana de -10mv, valor suficiente para la formación de ATP.<sup>(18)</sup>

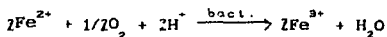
En la lixiviación indirecta no hay ataque frontal a la estructura atómica del mineral. En lugar de ello, y como anteriormente vimos, la bacteria genera  $Fe^{3+}$  por oxidación de  $Fe^{2+}$ . El ión férrico tiene un potencial de oxidación relativamente alto ( $E^{\circ} = 0.77V.$ ) y puede oxidar los metales de otros sulfuros.



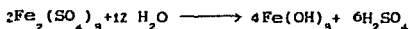
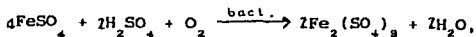
La forma oxidada soluble del metal, es generada en un medio sulfúrico



y el  $Fe^{2+}$  es reoxidado por los microorganismos



con lo cual el ciclo redox se repite<sup>(13)</sup>. Lundgren et al<sup>(13)</sup> describen el proceso de oxidación del  $Fe^{2+}$  en medio sulfúrico en 2 etapas:



El sulfato férrico, producto de oxidación, reacciona con agua para formar hidróxido férrico y ácido sulfúrico. Esta reacción es espontánea y produce un aumento en la acidez del medio. De hecho, se generan varios complejos hidroxilados y sulfatados que, según A.E. Torma<sup>(14)</sup>, provocan una disminución en la velocidad de lixiviación en el mineral, ya que dichos compuestos recubren su superficie. Estos complejos constituyen la jarosita, que aparece como precipitados amarillentos a rojizos con capacidad amortiguadora de pH, que influye en las reacciones del hierro.<sup>(15)</sup>

En solución ácida sin la bacteria, el  $Fe^{2+}$  es estable y la lixiviación mediada por  $Fe^{3+}$  sería lenta. *T. ferrooxidans* puede acelerar dicha oxidación en un factor de más de un millón, por medio de lixiviación indirecta.

Factores que Afectan el Crecimiento Bacteriano.- El conocimiento de la actividad metabólica de *Thiobacillus* en diferentes condiciones ambientales (pH, temperatura,

nutrientes, etc.), puede ayudar al biotecnólogo a determinar las condiciones óptimas para una máxima velocidad de crecimiento y por tanto, una mayor extracción del mineral. A.E. Torma<sup>(3,9)</sup> hace un estudio completo de los factores más importantes, y reporta los siguientes para *T. ferrooxidans*:

a) pH. La oxidación biológica de los sulfuros metálicos involucra movimientos de protones y electrones, por lo que el pH es determinante en el metabolismo bacteriano. Se ha encontrado que los valores óptimos de pH están entre 2.3 y 2.5 en el caso de la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), ZnS, calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ), covelita ( $\text{CuS}$ ), y hierro ferroso. Como se dijo antes, la capacidad amortiguadora de los sulfuros hidroxilados, influye en el control del pH.

b) TEMPERATURA. Se ha encontrado que la temperatura óptima oscila entre 25 y 45°C. Para la oxidación del hierro ferroso se reportan valores de 28°C, 32°C y 35°C. Para la extracción de sulfuros metálicos, 35°C. Se acepta que la actividad bacteriana se detiene en el punto de congelación del medio de cultivo. Estas bacterias pueden ser clasificadas como mesófilas (temperatura óptima de 35 a 37°C).

c) POTENCIAL REDOX. El potencial debe conservarse debajo de 500mV., para evitar la precipitación de jarosita.

d) NUTRIENTES. Silverman y Lundgren<sup>(14)</sup> informan en 1959 del desarrollo de un medio mineral para *Thiobacillus ferrooxidans* conocido como 9K, cuya composición se muestra en la tabla II.

Variaciones en la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  afectan la actividad bacteriana. La ausencia de nitratos, calcio, cloruros y potasio, no influye notablemente en el crecimiento, sobre todo si consideramos que dichos iones se encuentran los minerales a lixiviar, en cantidades suficientes para el microorganismo.

COMPONENTES	CANTIDAD EN GRAMOS
Salos basicas (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.00
KCl	0.10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.50
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.01
H <sub>2</sub> O c.b.p.	700 ml.
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 N	1 ml.
Fuente de energia FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	300 ml. de sol. al 14.74 % p/v

TABLA II. COMPONENTES DEL MEDIO 9K. REF. (14)

p/v = peso/volumen

Se ha encontrado que el crecimiento de cultivos de *J. ferrooxidans* es inhibido en medios que contienen cloruro ferroso en lugar de sulfato. Dicha inhibición se asocia a la necesidad en el microorganismo de altas cantidades de sulfato en relación al cloruro para oxidar hierro. Sin embargo, la adaptación a cloruros es factible, teniéndose un rápido desarrollo de mutantes capaces de oxidar FeCl<sub>2</sub> en medios bajos en sulfato<sup>(15)</sup>.

e) TAMAÑO Y ÁREA DE PARTICULA. Para el caso de piritita y marcasita, se ha encontrado que las muestras molidas son más susceptibles a la acción de *J. ferrooxidans* que las de partícula grande. En un mineral determinado las ganancias en la cantidad de metal extraído son función de dos alternativas: las ganancias al disminuir el tamaño de partícula contra los costos de molienda para obtener el tamaño deseado.

## I.2. Sistemas de Lixiviación

Trabajo Experimental. - Los trabajos de laboratorio en lixiviación microbiológica de minerales sulfurosos se efectúan en columnas (*airlift percolators*, fig 1), los llamados respirómetros de Warburg<sup>(16)</sup> y botellas para lixiviación estacionaria<sup>(17)</sup>.

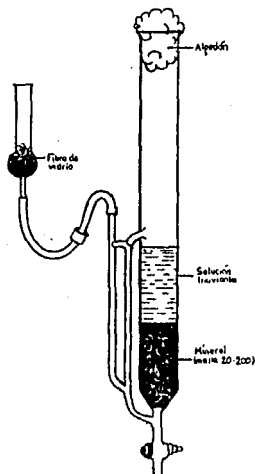


FIGURA 1. Columna para lixiviación.

Un método que provee una aereación rápida y suficiente para un crecimiento satisfactorio es el matraz en agitación<sup>(18,19)</sup>, donde comparativamente con los anteriores, se han encontrado muy buenos rendimientos (fig. 2).

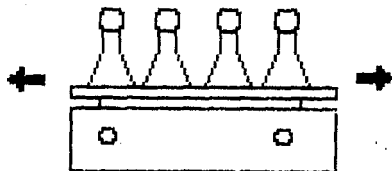


FIGURA II. Matraces en agitación

Aplicaciones Comerciales.- Desde un punto de vista industrial, la biohidrometalurgia dispone de varios métodos para la extracción de metales a partir de sus minerales. La razón de la variedad radica fundamentalmente en la ubicación y la naturaleza del sustrato, así como las necesidades del microorganismo en función de dichas características.

Entre los métodos más utilizados se mencionan la lixiviación por terrazas (*dump leaching*). Es recomendable para minerales de baja ley y sus montajes son relativamente sencillos, ya que generalmente se construyen en un valle, aprovechando sus pendientes naturales, lo que facilita la recuperación de las soluciones aplicadas. No es necesaria la inoculación, ya que microorganismos como *Faistaffus* y otras bacterias mesófilas y acidófilas son ubicuos y cuando las condiciones necesarias para el crecimiento de las bacterias en el mineral se cumplen, éstas proliferan. Las muestras minerales tomadas del tope de la terraza presentan más de un millón de bacterias por gramo (fig.3).

La terraza es rociada en su parte superior con soluciones ácidas, que se filtran a través de ella. Las soluciones impregnadas se recogen y el catión metálico es recuperado. Se reportan buenos resultados en el caso del cobre, donde el metal es recuperado por cementación, en la

que hierro ferroso toma el lugar del cobre en solución, o por extracción con disolventes. La disolución original, ya desmetalizada, se recicla en las terrazas<sup>(2.8)</sup>.

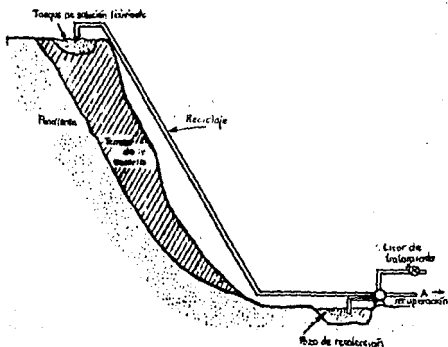


FIGURA III. Lixiviación por terrazas.

Si la terraza se construye sobre bases de material impermeable, y el sustrato es de un mineral con mayor concentración de metal, el método se conoce como *heap leaching*. Pueden instalarse sistemas de aereación para aumentar el flujo de aire en el mineral apilado (fig. 4).

La lixiviación *in situ* es una técnica prometedora en el caso de minerales que se encuentran en sitios inaccesibles como minas abandonadas. La técnica tiene un impacto mínimo en el medio y ha sido utilizada en el caso de minerales de uranio. Cuando la calidad del mineral solubilizado es demasiado baja para justificar operaciones de extracción convencionales, es posible triturarlo y lixiviarlo ya molido. El mineral es rociado en el mismo lugar con soluciones lixiviantes y el metal solubilizado se bombea hacia



afuera, (3, 20) donde se recupera.

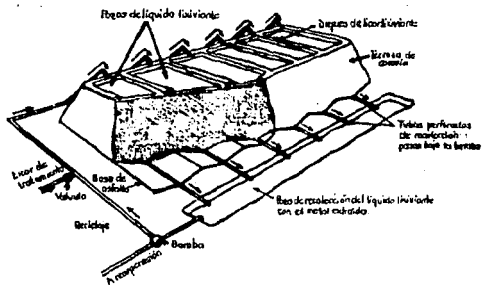


FIGURA IV. Terrazas sobre base impermeable.

### I.3. El Carbon.

El proceso de carbonización, o sea la transformación de un vegetal en un mineral, muestra la influencia de altas temperaturas y presiones, así como la acción de microorganismos. Ambos factores dan como resultado diversas especies de carbón mineral, citadas en la siguiente tabla:

ESPECIE	% CARBON	USOS
Turba y Lignito	50-59  69	Calderas domésticas, destilación a bajas temperaturas
Hulla	82-94	Producción de gas, alumbrado, operación de grandes calderas, fraguado (coque me- talúrgico).
Antracita	95-100	Calefacción domésti- ca, fraguado.

TABLA III. DATOS TOMADOS DE LA REF. [21].

Entre las numerosas aplicaciones del carbón, dos pueden considerarse fundamentales: el carbón no coquizable, que puede usarse como combustible, ya que no produce destilación de coque, y el coquizable, que se usa en la metalurgia para la producción de diversas variedades y calidades de hierro.

El carbón fué, hasta el desarrollo explosivo de la industria petrolera, el combustible comercial más importante. Sin embargo, el futuro de la producción mundial de petróleo es inseguro, ya que dicha producción declinará en 10 a 25 años. Se espera que los países, en su búsqueda de fuentes alternativas de combustible, recurran de nueva cuenta al carbón, ya que sus reservas mundiales están garantizadas para 200 años de consumo. Además, dentro de esta perspectiva, debe considerarse el notorio retraso observado hasta ahora en el mundo en los programas de expansión de las plantas nucleares.

En México existen importantes regiones carboníferas en los estados de Coahuila, Oaxaca y Sonora, así como otras de menor importancia en San Luis Potosí, Puebla, Veracruz y Chihuahua.

Se considera al estado de Coahuila como la región donde se originó la minería del carbón en México y donde actualmente tiene su mayor desarrollo. La región carbonífera de Coahuila se divide en dos grandes cuencas conocidas como la cuenca de Sabinas y la de Río Escondido o Fuente. La primera cubre un área de 10,000 km<sup>2</sup> aproximadamente y se subdivide en nueve subcuencas. El carbón localizado allí es del tipo bituminoso (de betún) de volatilidad media a baja, siendo su aplicación principal la siderurgia, una vez transformado a coque. En la segunda cuenca se han realizado trabajos de exploración que han cuantificado, hasta 1986, del orden de 600 millones de toneladas de carbón no coquizable.

Los principales sistemas de explotación en minas de carbón en México son:

- 1.- Explotación a cielo abierto (tajos). Utilizado cuando el yacimiento se encuentra a una profundidad menor a 60 metros.
- 2.- Explotación por frentes largas, que son sistemas de explotación masiva del carbón por medio de un equipo del mismo nombre.
- 3.- Salones y pilares.
- 4.- Cuartos y pilares. En estos sistemas, se van abriendo túneles o galerías a el manto y se dejan pilares gruesos carbón para sostener las capas superiores a dichos túneles<sup>(21,22)</sup>.

El interés en el tratamiento bacteriológico con carbón surge cuando, al ser dicho mineral quemado para utilizarse como fuente de energía en plantas carboeléctricas, se observa la liberación de gases que en un gran porcentaje contienen SO<sub>2</sub>. El SO<sub>2</sub> es, como se sabe, un importante contaminante

ambiental ya que reacciona con el agua para generar  $H_2SO_4$ . El carbón que contiene un 0.2% de azufre total se clasifica como carbón de alto contenido de azufre, y en los Estados Unidos, los gases liberados son tratados para eliminar el exceso de dióxido de azufre y satisfacer las condiciones que la Agencia de Protección Ambiental (EPA) establece<sup>(13)</sup>. En México, una reglamentación similar está en estudio actualmente.

Sin embargo, no solo el factor ambiental debe ser considerado para el tratamiento bacteriológico del carbón, aunque éste único sería suficiente. El carbón desulfurizado tiene también aplicaciones en la industria metalúrgica, donde el carbón no coquizable con bajo contenido de hierro puede ser de gran utilidad. Por medio de este trabajo se plantea la gran utilidad de *Thiobacillus* en dichos procesos.

#### I.4. Tratamiento del Carbón Mineral

Los trabajos realizados por Muñoz y Alzaga<sup>(28)</sup> con métodos no microbiológicos sobre carbón, han arrojado resultados interesantes sobre las condiciones óptimas (no agresivas) para extraer aluminio.

Se efectuaron lavados variando el origen del agua de lavado, pH, tamaño del carbón, la presencia de centrifugación, y en todo caso, el tiempo de la misma. En todos los casos, la presencia de aluminio se detectó con aluminón (sal de amonio del ácido aurintricarboxílico) que forma un complejo a pH = 4 color rojo. El hierro debe ser eliminado con ácido tioglicólico<sup>(37)</sup> si la proporción de hierro a aluminio no sobrepasa 20 a 1, o con cupferrón en medio ácido, ya que la interferencia del ión ferrico es significativa en la determinación.

La determinación de aluminio se desarrolló de la manera siguiente: A 0.2 ml. de muestra se le agregaron 0.2 ml. de ácido tioglicólico de dilución 1:100, 0.2 ml. de

quinalizarina, 0.2 ml. de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 0.2 ml. de ácido acético y 2 ml. de agua destilada. Se observa la formación de color, comparada contra un blanco de agua destilada.

En cuanto a la variación del agua de lavado y el pH, se trabajó conforme a la tabla IV. Se realizaron los ensayos cualitativos sobre papel:

50 g. de C	100 ml. $\text{H}_2\text{O}$ dest.	sola	
		HCl	pH = 2 pH = 3
		$\text{H}_2\text{SO}_4$	pH = 2 pH = 3
	100 ml. $\text{H}_2\text{O}$ llave	sola	
		HCl	pH = 2 pH = 3
		$\text{H}_2\text{SO}_4$	pH = 2 pH = 3

TABLA IV. ENSAYOS CUALITATIVOS DE VARIACION DE pH Y ORIGEN DEL AGUA DE LAVADO. EL TRABAJO SE REALIZO POR DUPLICADO.

Los resultados de los ensayos se muestran en las tablas V y VI:

50 g. de C	100 ml. $\text{H}_2\text{O}$ dest.	sola (+)	
		HCl	pH = 2 (-) pH = 3 (+)
		$\text{H}_2\text{SO}_4$	pH = 2 (-) pH = 3 (+)
	100 ml. $\text{H}_2\text{O}$ llave	sola (+)	
		HCl	pH = 2 (-) pH = 3 (-)
		$\text{H}_2\text{SO}_4$	pH = 2 (-) pH = 3 (-)

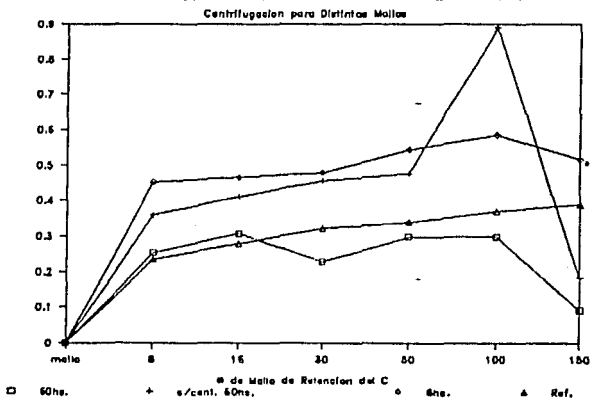
TABLA V.  
MUESTRA 1

50 g. de C	100 ml. H <sub>2</sub> O dest.	Sola (+)	
		HCl	pH = 2 (+) pH = 3 (-)
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	pH = 2 (+) pH = 3 (+)	
	100 ml. H <sub>2</sub> O llave	Sola (+)	
HCl		pH = 2 (+) pH = 3 (-)	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		pH = 2 (-) pH = 3 (+)	

TABLA VI.  
MUESTRA 2

No se encontró una variación significativa en los resultados para el origen del agua o valor de pH. Con base en esto, y debido al bajo costo que ello implicaba, se seleccionó agua destilada para la siguiente etapa, que consistió en la extracción de muestras de carbón molidas a diversos tamaños, sin y con centrifugación, y en su caso, a distintos tiempos de centrifugación. Los resultados se muestran en la gráfica 1.

### EXTRACCION DE ALUMINIO EN CARBON



GRAFICA 1

En la gráfica se observa que las mayores absorbencias se obtienen en la curva con menor tiempo de centrifugación. En general, para todos los tiempos de centrifugación, se observa que el carbón retenido en malla # 100 presenta los valores más altos de absorbencias. Se observa también que el carbón de partícula más pequeña (que pasa la malla # 100), presenta una disminución en los valores. Se puede concluir que la extracción de aluminio se favorece a menor tamaño, en presencia de centrifugación (se vio que agitando se obtenían resultados similares) y a tiempos cortos de la misma.

**CAPITULO II:**  
**PARTE EXPERIMENTAL. TRATAMIENTO DEL**  
**CARBON MINERAL CON *Thiobacillus*.**



## II.1. Objetivos.

I.- Determinar las condiciones de máximo crecimiento para una mezcla de *Thiobacillus* spp., modificando las siguientes variables:

- a) Presencia de carbón en la muestra.
- b) Presencia de medio de cultivo.
- c) Forma de cultivo (matraces y columna).

Se pretende evaluar el comportamiento de los sistemas, midiendo la cantidad de proteínas y hierro presentes en las muestras.

Este estudio tratará de ser un modelo para un método industrial económicamente factible.

II.- Cuantificar el aluminio extraído del carbón como posible producto de la lixiviación bacteriana.

## II.2. Metodología.

### II.2.1. Materiales y Reactivos.

Se emplearon dos cultivos, no puros, de *Thiobacillus* spp., proporcionadas por el Dr. Sergio Palacios, del Instituto de Geología de la UNAM. Estas mezclas, que se diferencian por las fechas de recolección y siembra, se denominan 3 y X.

En todas las etapas del trabajo, el material de vidrio que se manejó, incluyendo los matraces y la columna con el carbón previamente pesado, fué esterilizado en el autoclave a  $1\text{b/in}^2$ . El medio 9K se esterilizó por filtración con un equipo Millipore y membranas tipo HA.

Durante el manejo y la toma de muestras se trabajó en área estéril, proporcionada por la llama de dos mecheros.

Los reactivos para la preparación del medio 9K, descrito en los antecedentes, son marca Merck. El carbón proviene de muestras molidas en y otorgadas por el Instituto de Ingeniería de la UNAM, tomadas de la mina de Río Escondido, Coah. El reporte de análisis del carbón proveniente de MICARE (Minera Carbonífera Río Escondido) está en la tabla VII.

Para el análisis de hierro<sup>(23,24)</sup> se utilizaron reactivos Merck. Las soluciones fueron preparadas de acuerdo con la bibliografía citada, utilizando clorhidrato de hidroxilamina al 10%. El pH se ajustó a 3.5 con ácido sulfúrico cuando fue necesario.

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Lowry<sup>(25,26)</sup>, con soluciones de albúmina sérica bovina para la curva estandar. Tanto para la determinación de hierro como para la de proteínas, se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 552.

En cuanto a la determinación de aluminio, se utilizaron reactivos Merck, en las disoluciones de cupferron y aluminón, así como en los amortiguadores de pH.

DETERMINACIONES BASE SECA	CARBON RIO ESCONDIDO	PARAMETROS DE DISEÑO
<b>I. ANALISIS PRIMARIO O PROXIMO</b>		
% Humedad total muestra bruta		
% Ceniza	38.16	39.50
% Materia volátil	32.36	39.50
% Carbón fijo	29.48	33.10
<b>II. PODER CALORIFICO SUPERIOR (BTU/LB)</b>		
	8,327	8,361
<b>III. ANALISIS ELEMENTAL O ULTIMO</b>		
% carbono	38.59	44.69
% hidrógeno	2.76	3.33
% nitrógeno	1.17	0.92
% cloro		0.02
% azufre	0.77	1.20
% oxígeno	8.50	6.84
% ceniza	38.16	37.00
% humedad muestra p/análisis		6.00
<b>IV. ANALISIS MINERAL DE LA CENIZA</b>		
% hierro ( $Fe_2O_3$ )	3.62	4.20
% calcio ( $CaO$ )	1.18	1.78
% magnesio ( $MgO_2$ )	0.80	0.36
% sodio ( $Na_2O$ )	0.49	0.30
% potasio ( $K_2O$ )	1.08	0.46
% silicio ( $SiO_2$ )	65.27	60.30
% aluminio ( $Al_2O_3$ )	25.86	29.90
% titanio ( $TiO_2$ )	0.81	0.94
% fósforo ( $P_2O_5$ )		0.05
% azufre ( $SO_3$ )		1.46
% otros		2.50

TABLA VII. Analisis de las muestras de carbón. Las muestras tratadas y su análisis fueron proporcionados por MICARE.

## II.2.2. Procedimiento.

El trabajo experimental se dividió en tres etapas:

ETAPA I: Activación en carbón de una mezcla de *Thiobacillus thiooxidans* y *Thiobacillus ferrooxidans* cultivada exclusivamente en medio 9K, por medio de resiembras sucesivas en dicho medio, con 0-5 g. de carbón.

ETAPA II: Trabajo con matraces en agitación en distintas condiciones de cultivo, a 30°C.

ETAPA III: Trabajo en una columna de lixiviación a temperatura ambiente, utilizando el microorganismo que mejor crecimiento haya tenido.

A continuación se describe cada una de ellas:

### ETAPA I

Se usaron los microorganismos *Thiobacillus* spp., denominadas 3 y X. La activación consistió en sembrar 5 ml. de cada inóculo en matraces que contenían 100 ml de medio 9K (tabla II, p. 12). La cantidad de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se fue reduciendo, y se comprobó que la mitad de éste nutriente era suficiente para un crecimiento satisfactorio. Después de una semana, se tomaban 5 ml. de cada mezcla y se sembraron en matraces con medio 9K y cantidades cada vez mayores de carbón mineral (malla 100), hasta llegar a 5 g. Cada siembra se hizo por duplicado, de tal manera que para la siguiente, se hizo una selección del matraz con mejor crecimiento. Al final se tuvieron dos matraces, cada uno con 5 g. de carbón, correspondientes a cada una de las mezclas originales. La mezcla X resultó ser la de mejor crecimiento de las dos y fue la que se eligió para la siguiente etapa.

ETAPA II

Se sembraron 5 ml. de la mezcla X en matraces que se organizaron de acuerdo con la tabla VIII:

MATRAZ	CONTENIDO	FUNCION DEL MATRAZ
A	5g. de carbón + 0.05g. K HPO + 0.15g. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 0.1ml. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> según cálculos de 9K para 100ml.	Determinar el crecimiento de el inóculo sin el gasto de 9K Quantificar el hierro extraído del carbón, y el rendimiento sin 9K.
B	5g. de carbón + 9K sin <i>Thiobacillus</i>	Determinar la oxidación espontánea de Fe en presencia de carbón. Quantificar el Fe con el que puede contribuir el carbón a la disolución.
C	9K + <i>Thiobacillus</i> sin carbón	Comparar la cantidad de microorganismo adsorbido al carbón, midiendo Fe y proteínas (contra D).
D	5g. de carbón + 9K + <i>Thiobacillus</i>	Quantificar el crecimiento de <i>Thiobacillus</i> en presencia de todos los nutrientes necesarios y el carbón.

TABLA VIII. EXPERIMENTOS REALIZADOS EN MATRACES

Se cuantifica el crecimiento de la mezcla de *Thiobacillus* en presencia de todos los nutrientes necesarios y el carbón.

Para la etapa II se tomaron 2 muestras de 2 ml. en cada matraz, para no provocar cambios en las concentraciones de las disoluciones en los matraces. Cada muestra se trató como sigue:

La muestra se deja reposar de modo que el carbón que haya en suspensión, sedimente. De el volumen total de sobrenadante se toman aproximadamente 1.5 ml. que se guardan

para la posterior determinación de proteínas y aluminio. El volumen restante se centrifuga 3' a 3500 rpm y se diluye 1:100 manteniendo el pH en aproximadamente 3. Se toman 0.5 ml para determinar hierro (II) y el mismo volumen para hierro total, llevando a 25 ml en cada caso.

### ETAPA III

Se seleccionó el matraz D como el de mejor crecimiento (ver parte de resultados) y se trabajó la lixiviación en una columna de vidrio, con base de vidrio sinterizado, que se presenta en la figura 5.

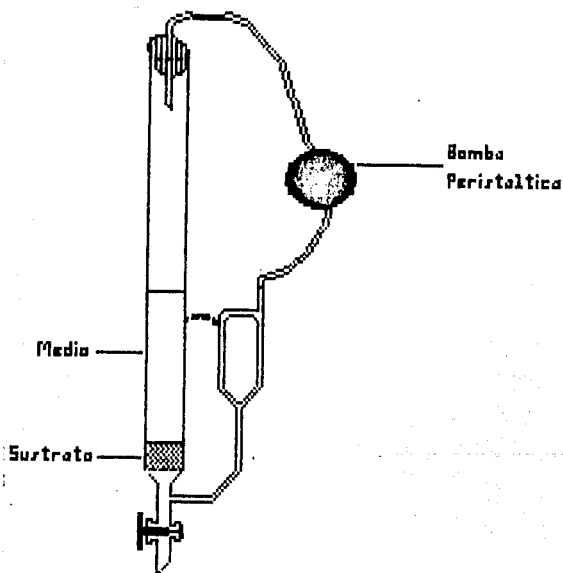
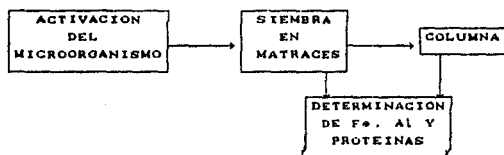


FIGURA V. Representación esquemática de la columna utilizada.

El volumen inicial de trabajo fue de 300 ml. Se sembraron 5 ml. del matraz seleccionado en la columna y se tomaron 4 ml para determinación de hierro, aluminio y proteínas. Se recicló el líquido con la bomba peristáltica un 20% del tiempo de lixiviación (5 horas diarias) y se tuvo en reposo el otro 80% para que la solución retenida en el sustrato penetrara en él y reaccionara con el carbón.

La metodología seguida puede resumirse de la siguiente manera:



Determinación de Hierro<sup>(23, 24)</sup>. - Este método se basa en la formación de un complejo octaédrico de  $[\text{Fe}(\text{fen})]_3^{2+}$ , rojo, muy estable ( $\beta_3 = 10^{21.3}$ ), que absorbe a 515 nm. El complejo de Fe (III), pese a que se forma, absorbe en otra región del visible (396 nm.), de manera que no interfiere en la determinación de Fe (II). Para determinar hierro total, se redujo el hierro (III) presente en la muestra, con hidroxilamina, de tal manera que el hierro total se mide como concentración de hierro (II) presente en la disolución.

A) Solución estándar.

1. Disolver 0.05 g. de hierro en polvo en  $\text{HNO}_3$  2M. Llevar la disolución resultante a 50 ml. (1000 mg/l Fe).
2. Preparar una disolución acuosa de hidroxilamina al 10% (p/v) y una de 1,10-fenantrolina al 0.25% (p/v).
3. Preparar, por duplicado, disoluciones de hierro que vayan de 0-4 mg/l de hierro a partir de la solución anteriormente preparada. Una disolución se usa para determinar Fe(II) y la otra para Fe total.
4. Agregar a cada matraz 5 ml. de hidroxilamina (para los matraces en que se va a determinar hierro total, únicamente).
5. Agregar 4 ml de 1,10-fenantrolina.
6. Aforar a 50 ml. con agua destilada, ajustando el pH a  $3.5 \pm 1$ .
7. Leer a 512 nm Fe(II) y Fe total.

B) Solución problema.

1. Tomar 2 veces alícuotas de 0.1 ml. del sobrenadante de la solución ya centrifugada y colocarlas en matraces de 25 ml.
2. Para Fe total, agregar a cada matraz 2.5 ml. de hidroxilamina.
3. Agregar 2 ml. de 1,10-fenantrolina y aforar a 25 ml. con agua destilada, ajustando el pH.
4. Para Fe(II), seguir el procedimiento sin agregar la hidroxilamina.
5. Leer a 512 nm.



Determinación de Proteínas<sup>(25,26)</sup>. - Lowry utilizó el reactivo de Folin y Ciocalteu, que detecta grupos fenólicos, en un método para cuantificar proteínas. El reactivo de Folin detecta residuos de tirosina debido a su naturaleza fenólica. Al agregarle  $\text{Cu}^{2+}$ , los grupos  $-\text{NH}$  de los enlaces peptídicos en las proteínas, reaccionan con él, dando un complejo cuadrado plano. El complejo Cu-proteína provoca la reducción de los ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico (componentes principales del reactivo de Folin) dando compuestos azules de molibdeno y wolframio, y principales responsables del color.

A) Tratamiento de las muestras.

1. Preparar las siguientes disoluciones:

Acido tricloroacético (ATC) 10% p/v .....500 ml.  
NaOH 0.4 N .....500 ml.  
Sulfato de cobre al 1% ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).....1 ml.  
Tartrato de sodio y potasio al 2% en NaOH 0.1 N..98 ml.

2. Tomar 1 ml. de muestra.

3. Centrifugar a 5000 rpm por 10'.

4. Agregar al sedimento ATC (2ml. por 1 de muestra).

5. Congelar por 24 hrs.

6. Descongelar a temperatura ambiente y centrifugar a 5000 rpm 10'.

7. Suspender el sedimento en 5 ml de NaOH 0.4 N. Agitar fuertemente.

8. Tomar 1 ml de esta disolución y aforar a 5ml.

B) Determinación de proteínas.

1. Se hace una curva patrón que vaya de 10-100 $\mu\text{g}$  con albúmina bovina.

2. Se preparan los tubos problema con 1 ml.de muestra. El blanco con 1 ml. de agua o PBS.

3. Se mezclan las disoluciones de cobre, tartrato y carbonato en ese orden y se agrega a cada tubo 3 ml.

4. Agitar y dejar reposar 10'.

5. Agregar a todos los tubos 0.3 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:1 con agua.

6. Agitar bien y dejar reposando 30'.

7. Leer a 600 nm.

Determinación Cualitativa de Aluminio<sup>(37,39,40)</sup>. - El método se basa en la capacidad del aluminio de formar complejos con la sal de amonio del ácido aurintricarboxílico (aluminón) a pH = 4, y fue seleccionado para desarrollarse en forma cualitativa debido a que la poca cantidad de muestra a manejar no permitía un tratamiento adecuado para el uso de métodos cuantitativos convencionales.

Debido a la interferencia significativa del hierro en las muestras, que no es posible eliminar por medio del ácido tioglicólico, se usa el reactivo cupferrón<sup>(40)</sup>, que precipita el complejo color café rojizo con Fe(III) en medio sulfúrico 1:10. Este complejo es muy soluble en cloroformo, lo que facilita su extracción cuantitativa de la solución acuosa. La extracción de hierro es más completa si se realiza 5' después de agregada la solución acuosa de cupferrón.

El reactivo de aluminón se prepara disolviendo 0.5 g. del reactivo en 100 ml. de agua y 100 g. de acetato de amonio en 400 ml. de agua. Se le agregan 56 ml. de HCl, se mezclan las disoluciones y se afora a 1 l. con agua destilada.

A) Se preparan las siguientes disoluciones:

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 N. ....	50 ml.
Disolución amortiguadora de ácido acético/acetato de sodio pH = 4.5 .....	250 ml.
Disolución acuosa saturada de cupferrón .....	25 ml.
Reactivo de aluminón .....	100 ml.

B) Método.

1. Se mezclan 0.5 ml. de muestra, 0.5 ml. de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0.5 ml. de cupferrón.
2. Se agita y deja reposar 5'.
3. Se extrae con 1 ml. de cloroformo, agitando vigorosamente durante 30". Después de otras dos extracciones, se hace otra adición de 0.5 ml. de

cupferrón hasta que en la fase acuosa aparezca un precipitado blanco (producto de descomposición del cupferrón sin complejar en medio ácido).

4. La disolución resultante se lleva a pH = 4 con hidróxido de amonio o ácido sulfúrico. Se afora a 5 ml. con buffer de acetatos.
5. Se toman 2 ml. de la disolución y se agregan 0.5 ml. de reactivo de aluminon.
6. Se registra la intensidad del color desarrollado, comparada con un blanco de agua.

### **CAPITULO III: RESULTADOS Y ANALISIS**

### III.I. Resultados.

De acuerdo con la metodología experimental aplicada se presentan los resultados obtenidos a continuación:

Las tablas IX y X nos muestran los valores de absorbencia y concentraciones respectivamente, de hierro (II) perteneciente a los matraces. El matraz A (sembrado sin 9K) presenta muy bajos valores de absorbencia, sobre todo en los días 0-5. El día 7 alcanza su máximo y luego decrece. Es notorio el decremento observado en los valores de los matraces B y C en los días 8 y 11, donde la cantidad de hierro (II) se reduce prácticamente a cero.

DIA MATRAZ	0	2	3	5	7	8	11
A	0.008	0.008	0.008	0.012	0.082	0.011	0.018
B	0.058	0.020	0.047	0.018	0.029	0.015	0.008
C	0.045	0.038	0.030	0.028	0.039	0.025	0.008
D	0.075	0.058	0.028	0.024	0.025	0.026	0.025

TABLA IX. ABSORBENCIAS OBTENIDAS EN LA DETERMINACION DE Fe(II). MATRACES.

DIA MATRAZ	0	2	3	5	7	8	11
A	5.6	5.6	5.6	600	3894	528.6	800
B	7904.2	2449.8	6402.1	1562.7	2420.4	1158.6	5.5
C	6074.1	4844.8	3614	4103.7	5008	2794.6	2.5
D	10912.5	8206.2	3203.8	2629.8	2800	2957.8	4351.9

TABLA X. CONCENTRACION DE Fe(II) EN mg/l. MATRACES.

En general, se puede observar por las tablas XI y XII que el hierro total (medido como Fe(II)) tiene una tendencia creciente con oscilaciones. El valor más bajo lo tiene el matraz A el día 3 y los más altos corresponden en general al matraz B (sin microorganismos).

DIA	0	2	3	5	7	8	11
MATRAZ							
A	0.031	0.014	0.011	0.012	0.032	0.020	0.010
B	0.068	0.060	0.057	0.043	0.052	0.034	0.061
C	0.064	0.048	0.037	0.026	0.031	0.027	0.032
D	0.069	0.058	0.028	0.024	0.030	0.026	0.035

TABLA XI. ABSORBENCIAS OBTENIDAS EN LA DETERMINACION DE Fe TOTAL MATRACES.

DIA	0	2	3	5	7	8	11
MATRAZ							
A	3778	989.6	497	1500	1978.7	200	333.6
B	9856.6	8500.6	8042.2	5695.9	7140.2	4269.9	8616.3
C	9190	6566	4714.2	2957.8	3825.8	8039.8	3941.9
D	7900	8206.2	3202.8	2629.8	3553.3	2957	4351.9

TABLA XII. CONCENTRACION DE Fe TOTAL PRESENTE COMO Fe(II) EN mg/l. MATRACES.

Las tablas XIII y XIV muestran las absorbencias y concentraciones respectivamente, obtenidas de proteínas. Los valores más bajos corresponden al matraz B y los más altos los comparten los matraces C (sin carbón) y D (con todo).

DIA MATRAZ	0	2	4	5	7	8	11
A	0.082	0.089	0.029	0.038	0.052	0.040	0.047
B	0.023	0.028	0.032	0.038	0.026	0.036	0.034
C	0.084	0.087	0.068	0.064	0.042	0.049	0.087
D	0.090	0.087	0.087	0.060	0.047	0.045	0.043

TABLA XIII. ABSORBENCIAS OBTENIDAS EN LA DETERMINACION DE PROTEINAS. MATRACES.

DIA MATRAZ	0	2	4	5	7	8	11
A	678.4	181.9	141.6	181.9	383.4	252.4	322.9
B	81.2	131.6	171.9	232.3	111.4	212.1	192.0
C	695.6	423.1	534.4	494.2	272.6	343.1	222.2
D	756	222.2	725.8	458.9	322.9	302.8	282.6

TABLA XIV. CONCENTRACION DE PROTEINAS EN mg/l. MATRACES.

La tabla XV muestra absorbencias de Fe (II) y Fe total y la tabla XVI las concentraciones correspondientes a dichas absorbencias. Es de notar el descenso de valores de hierro (II) y el aumento de hierro total hasta el día 6.

DIA	A	Conc.	DIA	A	Conc.
0	0.045	6000	8	0.028	8208.8
2	0.034	4269	9	0.030	3531.9
4	0.041	5336	11	0.031	3777.9
5	0.028	3878.2	12	0.033	4105.9
6	0.010	333.6	15	0.031	3777.9

TABLA XV. ABSORBENCIAS Y CONCENTRACIONES (mg/l) PARA Fe(II). COLUMNA.

DIA	A	mg/l	DIA	A	mg/l
0	0.045	6200	8	0.037	4762
2	0.051	7058.2	9	0.042	5500
4	0.052	7140.2	11	0.040	5254
5	0.062	8862.3	12	0.055	7714.2
6	0.062	8862.3	15	0.043	5746

TABLA XVI. ABSORBENCIAS Y CONCENTRACIONES (mg/l) OBTENIDAS PARA Fe TOTAL. COLUMNA.



La tabla XVII muestra las absorbencias y concentraciones de proteínas en la columna. Se aprecia un descenso inicial hasta el día 2, luego un aumento hasta el día 7 y luego otro descenso en los valores.

DIA	A	Conc.	DIA	A	Conc.
0	0.005	504.2	7	0.092	615.0
2	0.019	40.9	9	0.042	272.6
4	0.028	131.6	10	0.047	322.9
6	0.074	564.7	13	0.057	423.7

TABLA XVII. ABSORBENCIAS Y CONCENTRACIONES EN mg/l DE PROTEINAS. COLUMNA.

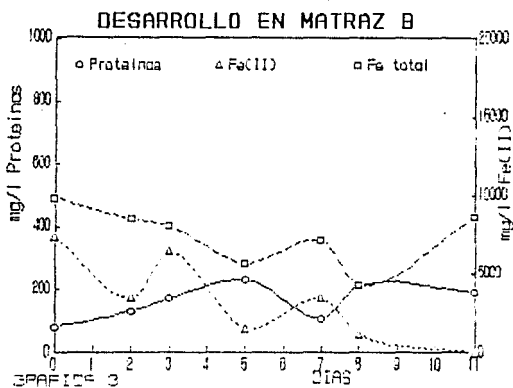
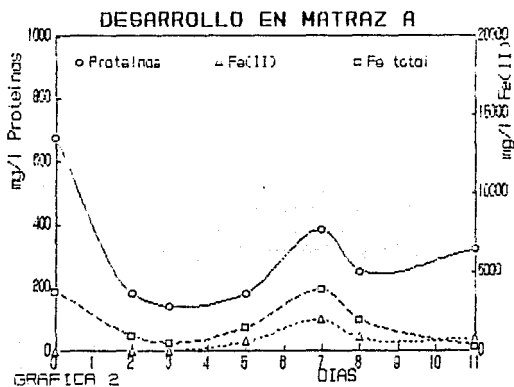
La tabla XVIII muestra los resultados de la determinación cualitativa de aluminio. La cantidad de cruces se marcó en función de la intensidad relativa de color desarrollado, medida contra un blanco con agua.

MUESTRA DÍA	Matraz A	Matraz B	Matraz C	Matraz D	Columna
0	+	++	-	I+	+
2	+	+++	-	+++	+
4	+	+++	-	+++	++
5	++	++	-	++	+
6	++	++	-	++	+
8	+++	+	-	+++	++
10	+	++	-	++	++
11	++	+++	-	++	++
12	+++	+	-	++	++
15	++	+++	-	++	+++

TABLE XVIII. DETERMINATION QUALITATIVE DE ALUMINIO EN MATRASES Y COLUMNA.

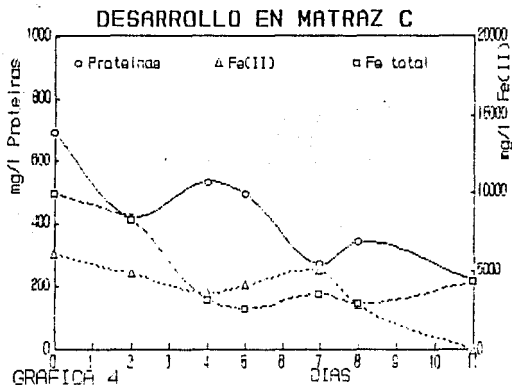
Se puede observar claramente que el matraz C, con ausencia de carbón no presenta desarrollo de color apreciable. Asimismo, el desarrollo en el matraz A y en la columna son similares y a su vez menores que el matraz B. Es en el matraz D donde se encuentra mayor presencia de aluminio.

A partir de los datos presentados en las tablas IX-XVIII, se obtienen las siguientes gráficas:



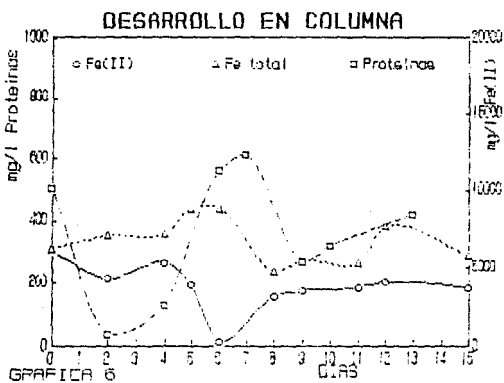
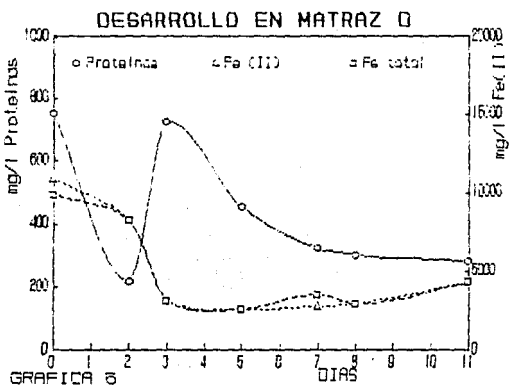
En la gráfica 2 se observa una caída importante en las concentraciones de hierro y proteínas. Esto ocurre hasta el día 4 aproximadamente, cuando las concentraciones tienden a aumentar, llegando a un máximo el día 7.

La gráfica 3 presenta oscilaciones irregulares en las concentraciones de las especies. Sin embargo, puede apreciarse un comportamiento descendente en la concentración de Fe(II) y una medida más o menos constante de la concentración de Fe total.



En la gráfica 4 se observa un decremento en la concentración de proteínas, un máximo en el 4° día y luego un decremento. Las concentraciones de Fe(II) y Fe total tienden a caer en general, siendo mínimas hacia el día 4. La gráfica 5 permite ver un notorio máximo en la concentración de proteínas el día 3, que coincide con caídas grandes en las concentraciones de hierro (II) y total. El día anterior presenta un mínimo en lectura de proteínas que coincide con

concentraciones altas de hierro.



El comportamiento en la columna, mostrado en la gráfica 6, permite apreciar una variación en la lectura de proteínas que llega a ser significativa entre los días 2 y 7, donde se tienen las lecturas mínima y máxima, respectivamente. El día 6, la concentración de hierro (II) cae, mientras que la de hierro total tiene un aumento posterior al día 9, con oscilaciones.

### III.2. Análisis de Resultados.

Desarrollo en los Matraces.- En el matraz A (ver parte experimental) se nota un incremento en las lecturas de Fe(II) y Fe total, con un máximo en el séptimo día. Como el hierro total siempre es mayor que hierro (II), es probable que el Fe (II) que se observa se deba a la solubilización del hierro presente en el carbón. Dicha solubilización coincide con la fase "log" (Apéndice I) de proteínas, lo que implicaría la extracción de hierro en el sustrato por el microorganismo. La disminución brusca en la concentración de proteínas probablemente se deba a la adsorción de microorganismos en el sustrato con un posterior crecimiento a partir del hierro presente. En cuanto a las lecturas de aluminio, se puede notar que el valor máximo observado coincide con el de hierro y proteínas; i.e., el día siete. Pensando en que el matraz sin el medio 9K fuera el que menor costo implique, el día 7 sería el ideal para la posible recolección del metal solubilizado.

En general, se ve que hay una tendencia de hierro total, a un valor constante y de hierro (II) a una caída suave, debido a la oxidación espontánea en el matraz B. La lectura de proteínas tiende a ser constante. Los resultados en la extracción de aluminio son comparables a los obtenidos en el trabajo descrito en el capítulo I.4 de antecedentes, por lo que se confirma la capacidad de extraer aluminio con lavados acuosos en medios ácidos.

Al comparar los valores iniciales de Fe total en el matraz B contra el D, no se observa una diferencia significativa, por lo que se infiere que la contribución inicial del carbón a las lecturas de hierro puede despreciarse frente a la del medio 9K. Más adelante, la presencia de precipitados impide establecer una comparación razonable de estas contribuciones. Comparando las lecturas de aluminio en los matraces B y D, tampoco se nota una diferencia apreciable, por lo que se deduce que la influencia de la

generación del medio ácido por el microorganismo en la extracción del aluminio es despreciable.

En el matraz C, sin carbón, se observa una caída grande en las concentraciones de hierro (II) y total, aunque poco pronunciada. Como se vió en los antecedentes (pág.11), la jarosita se forma a partir de Fe(III) y potenciales mayores a 500 mv. Este potencial, que no se controló, dada la concentración de Fe(III) pudo haber llegado a dichos valores. En el matraz se observa la presencia al mismo tiempo (a partir del día 3) de un precipitado color pardo amarillento que probablemente sea jarosita, lo que explicaría las caídas de concentración. Al onceavo día prácticamente no hay hierro (II) en disolución. No hay contribución apreciable de aluminio por el medio 9K.

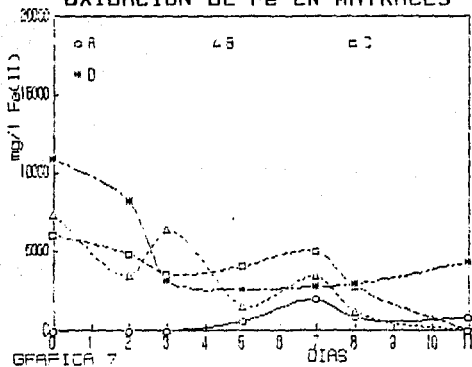
En la curva de proteínas se observa una fase "lag" corta (comparada con A) que abarca los días 2 al 4 y que coincide con la oxidación y la precipitación de hierro. Esto implica un desarrollo máximo de microorganismos en ausencia de carbón al cabo de dos días.

Cuando se incluye carbón en el experimento, que es el caso de matraz D, se observa una más rápida aparición del precipitado que en C. La mayor tasa de oxidación de hierro y precipitación coinciden con la fase log más pronunciada, lo que indica un crecimiento máximo en el matraz D, con también máxima oxidación de hierro. Los valores de Fe(II) y Fe total son muy similares. La formación de precipitados a partir de Fe(III), provoca un desplazamiento a la derecha en el equilibrio de oxidación de Fe(II). Las curvas indican que el Fe(II) se oxida y casi simultáneamente precipita.

El matraz D fué seleccionado para el trabajo en columna ya que, como se observa en las gráficas 7 y 8, presenta una mayor oxidación de hierro (con precipitación prácticamente simultánea) y una extracción máxima de aluminio (igual a la

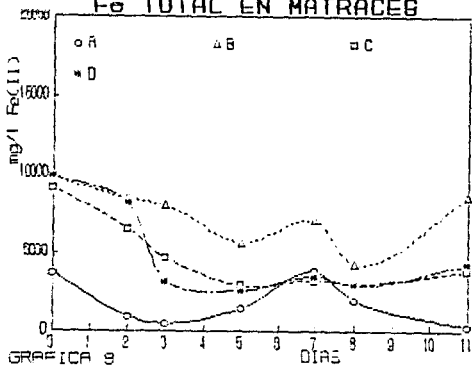


### OXIDACION DE Fe EN MATRACES



GRAFICA 7

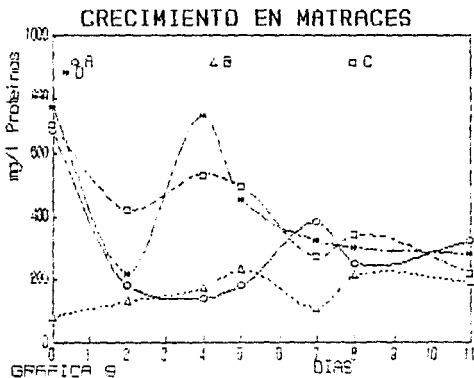
### Fe TOTAL EN MATRACES



GRAFICA 8

del matraz B). La presencia del carbón, comparando con el matraz sin carbón, aumenta la velocidad de oxidación de Fe(II). Se sabe<sup>(29)</sup> que el microorganismo, particularmente *Thiobacillus ferrooxidans*, se adsorbe fuertemente al carbón, por lo que se presume que al distribuirse en la superficie de la partícula, la oxidación de hierro sea más eficiente por efecto del aumento de la superficie de contacto.

En cuanto al crecimiento (gráfica 9), se puede observar que la fase lag más corta, así como el máximo crecimiento, corresponden al matraz D. El matraz A tiene una fase lag 4 días aproximadamente más larga que D. Si el medio en A no tiene 9K, las condiciones para el desarrollo de los microorganismos son diferentes, al grado que las bacterias se ven obligadas a adaptarse a muy bajas concentraciones de hierro y sulfuros. Sin embargo, el crecimiento se presenta en el día 7. Si el crecimiento depende exclusivamente de la capacidad del microorganismo para extraer los metales del carbón, probablemente repetidas resiembras puedan aumentar su capacidad de extracción.



ESTE DOCUMENTO  
 PERTENECE AL  
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
 CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS  
 DEL CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Desarrollo en la Columna.- En la columna se extiende la fase lag un día comparando con D, que fue la fuente del microorganismo sembrado. Sin embargo, la fase log de crecimiento coincide con la mayor oxidación de Fe (II), lo que implica el máximo desarrollo. El aumento de hierro total podría indicar que el microorganismo lo está extrayendo. Cabe hacer notar que la columna es el método de laboratorio más parecido al que actualmente utiliza la industria (*dump leaching*). La recirculación del medio de cultivo sobre el sustrato por medio de la bomba peristáltica permite el aereamiento de la solución, el cual, pese a todo, no es tan efectivo como el de los matraces en agitación. En este caso, el abastecimiento de aire en la columna se sacrifica por mantener la esterilidad en ella, por lo que es probable que si han sido efectivos el crecimiento y la extracción de hierro bajo estas condiciones, a aire libre lo sean más. Aún considerando la presencia de otros microorganismos, son muy pocos los acidófilos que sobrevivirían a las condiciones de crecimiento de *Thiobacillus*.

## **CAPITULO IV: CONCLUSIONES**

A partir del análisis de los resultados, se puede concluir lo siguiente:

La presencia de carbón en el medio de cultivo de los microorganismos estudiados, afecta visiblemente su tasa de crecimiento, siendo esta mayor cuando se agrega carbón al medio 9K que cuando no se incluye. Probablemente, la adherencia del microorganismo al carbón provoque un aumento en la superficie de contacto, favorable a la oxidación del hierro ferroso presente en la disolución.

La extracción de aluminio aparentemente no se ve afectada por la presencia de microorganismos, sin embargo, es necesaria la agitación para lograr rendimientos máximos apreciables. Sería conveniente llevar a cabo el método desarrollado para determinar aluminio, esta vez en forma cuantitativa (con mayor cantidad de muestra) para poder llegar a conclusiones más significativas.

El sistema de oxigenación en la columna es deficiente, comparado con los matraces, que están bajo constante agitación. Sacrificar la oxigenación fue necesario para mantener las condiciones de esterilidad del experimento. Sin embargo, si hay un sistema que, en pequeña escala, se aproxima satisfactoriamente a las terrazas, es el de columna, por lo que los resultados obtenidos de ella son útiles para la implantación de sistemas de biolixiviación a gran escala.

En el matraz sin 9K, se observó una tendencia a extraer el hierro y el aluminio del carbón. Es probable que mediante resiembras sucesivas pueda buscarse un mutante que tienda a extraer hierro al máximo. Con respecto a las próximas etapas de el presente trabajo, sería interesante implementar columnas en serie con los microorganismos anteriormente mencionados, para buscar una mayor similitud con los sistemas de terrazas.

## APENDICE

## CINETICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

El tamaño de la población de bacterias y algas en función del tiempo, se ilustra en la figura 6, que muestra una curva de población para un cultivo bacteriano. Tal cultivo comienza con la inoculación de un medio rico en nutrientes con una pequeña cantidad de bacterias. La curva de población consta de 4 regiones. La primera se caracteriza por una baja reproducción y se le conoce como fase lag. La fase lag se debe a la necesidad de la bacteria de adaptarse al nuevo medio donde se va a desarrollar. Después de la fase lag sigue un período de crecimiento bacteriano muy rápido, conocido como fase log, o fase exponencial, durante la cual la población se duplica en periodos constantes.

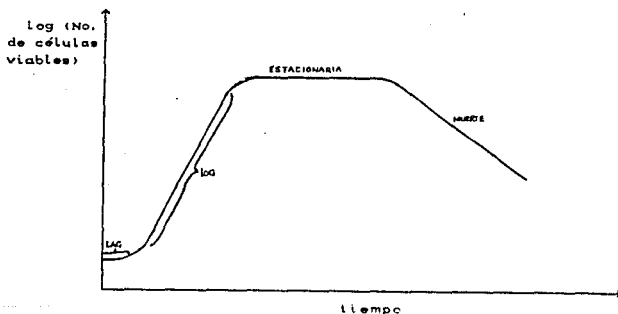


FIGURA VI. Cinética de Crecimiento Bacteriano.

El crecimiento bacteriano se puede representar matemáticamente con un modelo en el que el crecimiento es proporcional al número de individuos presentes y no existen limitantes tales como muerte o ausencia de nutrientes:

$$dN/dt = kN$$

Esta ecuación se integra para dar

$$\ln \frac{N}{N_0} = kt \quad \Rightarrow \quad N = N_0 e^{kt}$$

donde  $N$  es la población al tiempo  $t$  y  $N_0$  es la población al tiempo  $t = 0$ . El tiempo de generación, o de duplicación (cuando  $N = 2N_0$ ), es  $\ln(2)/k$ .

Cuando se encuentra un factor limitante tal como eliminación de un nutriente esencial, presencia o síntesis de sustancias tóxicas, o ausencia de oxígeno, la fase log termina y la fase estacionaria comienza. Durante esta fase, el número de células viables permanece casi constante y su duración depende de la especie bacteriana y otras circunstancias. Después de la fase estacionaria, las bacterias comienzan a morir más rápido de lo que se reproducen y la población entra a la fase de muerte.



## BIBLIOGRAFIA

- (1) Gentina, J.C. and Acevedo, F. Trends in Biotechnology 3, [4], 86-89, (1985).
- (2) Olson, G.J. and Kelly, R.M. Biotechnology Progress 2, [1], 5, (1986).
- (3) Torma, A.E. Biotechnology & Bioengineering Symp. No. 16, (1986).
- (4) Colmer, A.R., Temple, K.L., Hinkle, M.E.; J. Bacteriol. 59, 317, (1950).
- (5) Temple, K.L., Colmer, A.R.; J. Bacteriol. 62, 605, (1951).
- (6) Temple, K.L., Delchamps, E.W. Appl. Microbiol. 1, 255, (1953).
- (7) Tuttle, J.H., Randles, C.I., Dugan, P.R. J. Bacteriol. 95, 1495, (1968).
- (8) Brierley, C.L. Sci. Am. 44, (Sept. 1982).
- (9) Torma, A.E. Advances in Biochemical Engineering 6, 3-4, (1984).
- (10) Silverman, M.P. J. Bacteriol. 94, 1046, (1967).
- (11) Blaylock, B.A., Nason, A.; J. Biol. Chem. 238, 3453, (1963).
- (12) Yates, M.G., Nason, A.J. J. Biol. Chem. 241, 4872, (1966).
- (13) Lundgren, D.G., Silver, M. Ann. Rev. Microbiol. 34, 268, (1980).
- (14) Silverman, M.P.; Lundgren, D.G. J. Bacteriol. 77, 642, (1959).
- (15) Lazaroff, N. J. Bacteriol. 85, 78-83, (1963).
- (16) Beck, J.V. J. Bacteriol. 79, 502, (1960).
- (17) Razell, W.E., Trussell, P.C. Appl. Microbiol. 11, 105, (1963).
- (18) Duncan, D.W., Trussell, P.C., Walden, C.C. Appl. Microbiol. 12, 122, (1964).
- (19) Bryner, L.C., Beck, J.V., Davis, D.B., Wilson, D.G. Ind. Eng. Chem. 46, 2587, (1954).
- (20) Zajic, J.E. Microbial Biogeochemistry. Academic Press, N.Y. (1969).
- (21) Espinosa, F.; Mondragon, C.; Meza, R. y Gonzalez, J.J. Revista de Ingenieria. 1, [4], 41-64, (1980).
- (22) MICARE. Carbon Mineral y Electricidad en México. pp. 7-32. (1982).

- (23) ASTM standards. Standard Test Method for Iron in Trace Quantities Using the 1,10- Phenantroline Method. Método E 394. 933-6 (1981).
- (24) Vogel, A.I. A Textbook of Quantitative Inorganic Analysis. 4<sup>th</sup> ed. Longman, N.Y. (1978).
- (25) Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. J. Biol. Chem. 193,265-75,(1967).
- (26) Holme, D.J. y Peck, H. Analytical Biochemistry. pp. 383-404. Longman, London (1983).
- (27) Corrans, I. J. *et. al.* Journal of the South African Institute of Mining and Metallurgy.221-230,(1972).
- (28) Alzaga, R. y Muñoz, H. Comunicación personal.
- (29) Bagdigian, R.M.; Myerson, A.S. Biotechnology & Bioengineering. 28 467-79,(1986).
- (30) Ehrlich, H.L. Geomicrobiology. Marcel Dekker, Inc., N.Y. (1981).
- (31) Munch, J.C. and Ottow, J.G.G., Soil Sci., 129,15,(1980).
- (32) Trimble, R.B. and Ehrlich, H.L. Appl. Microbiol., 16,695,(1968).
- (33) Rossi, G and Torma, A.E., Eds., Recent Progress in Biohidrometallurgy (Associazione Mineraria Sarda 09016 Iglesias, Italy),1983.
- (34) Ehrlich, H.L. en Biogeochemistry of Ancient and Modern Environments. pp.609-614.
- (35) Ottow, J.C.G., Ztschft. Pflanzenern. Bodenk., 24, 238 (1969).
- (36) Lebedeva, E. V. y Lyalikova, N. N., Mikrobiologiya. 48, 517, (1978).
- (37) Chapman, H. D. y Pratt, P. C. Métodos de Análisis para Suelos, Plantas y Aguas. 3<sup>a</sup> Ed., Trillas México (1981).
- (38) Conn, E. E. y Stumpf, P. K. Bioquímica Fundamental. 3<sup>a</sup> Ed., L.I.M.U.S.A. México (1978).
- (39) A.O.A.C. Método 1.026 14<sup>th</sup>. Ed. (1984).
- (40) Sandell, E. B. Colorimetric Determination of Traces of Metals. 3, cap. 5, Interscience, 3<sup>a</sup> Ed. N.Y. (1959).
- (41) Manahan, S. E. Environmental Chemistry. 4<sup>th</sup>. Ed. Willard Grant Press. Boston (1984).
- (42) Colmer, A. R., Hinkle, M. E. Science 106, 253, (1947).

(43) Zavarzin, G. A. Lithotrophic Bacteria. Moscow: Nauka (1972).

(44) Burton, K. Nature 181, 1594, (1958).