



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FISICAS Y MATEMATICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA Y
BIOTECNOLOGIA**

**ESTUDIO DE OXIDACION DE ION FERROSO POR *SULFOBACILLUS
ACIDOPHILUS* CON USO DE CELDA ELECTROQUIMICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO CIVIL EN
BIOTECNOLOGIA**

ALDO ALFREDO COLLARI VILLALON

PROFESOR GUIA:
TOMAS VARGAS VALERO

MIEMBROS DE LA COMISION:
BLANCA ESCOBAR MIGUEL
CRISTIAN SALGADO HERRERA

SANTIAGO DE CHILE
ENERO 2011

RESUMEN

El objetivo de este trabajo de tesis fue caracterizar el crecimiento y la cinética de oxidación de ion ferroso del microorganismo *Sulfobacillus acidophilus*. En particular se estudió la influencia del potencial redox sobre la velocidad específica de oxidación de ion ferroso de la bacteria.

Se comprobó el crecimiento de *Sulfobacillus acidophilus* en azufre elemental y en ion ferroso como sustratos, calculándose para este último un rendimiento igual a $3,6 \cdot 10^4$ (bact/ $\mu\text{g Fe}^{2+}$ oxidado), pero no se pudo verificar el crecimiento del microorganismo con tetrionato como sustrato.

Para estudiar la cinética de oxidación de ion ferroso se utilizó como montaje experimental una celda electroquímica que permite regenerar el ion ferroso de la solución y determinar la velocidad de oxidación bacteriana a partir de la medida de corriente que se establece en la celda electroquímica.

Los resultados experimentales obtenidos se ajustaron a un modelo cinético que incorpora explícitamente el efecto del Eh de la solución y considera además los efectos de afinidad al sustrato (ion ferroso) y de inhibición por producto (ion férrico). Los resultados muestran que para valores de potencial redox menores a 0,65 (V vs SHE) la velocidad de oxidación bacteriana depende solo de la concentración de ion ferroso, para valores mayores a 0,65 (V vs SHE) la actividad oxidativa bacteriana es claramente inhibida al aumentar la concentración de ion férrico. Para valores mayores a 0,8 (V vs SHE) la cinética de oxidación disminuye abruptamente con el aumento del Eh hasta hacerse nula al alcanzar el valor máximo de Eh para el cual hay actividad bacteriana igual a 0,826 (V vs SHE).

Por último se compararon los resultados obtenidos con la cinética de oxidación de ion ferroso de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Se obtuvo que para cualquier valor de las variables del sistema siempre la velocidad específica de oxidación alcanzada por *Sulfobacillus acidophilus* es menor, aproximadamente en un orden de magnitud, que la de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Independiente de lo anterior, el efecto inhibitorio del Eh sobre la actividad bacteriana es muy similar para ambos microorganismos.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de mis estudios la vida me ha ofrecido muy buenas oportunidades de las cuales me siento muy agradecido. Llegar a la culminación de mi carrera universitaria ha sido posible gracias a varias personas que de una u otra manera aportaron en mi formación humana y profesional, en particular me gustaría agradecer:

- A mis padres, Giuliano Collari y Elvira Villalón, por su incondicional apoyo y confianza depositada en mí durante estos años.
- A mis hermanos, por su cariño y apoyo, especialmente a Daniela por su motivación brindada en momentos difíciles.
- Al resto de mi familia, por su cercanía y por estar siempre presentes.
- A Carolina Aliaga, por hacer más felices mis días universitarios gracias a su amor y compañía.
- A mis amigos, con los que compartimos tanto los buenos como los difíciles momentos, especialmente a Cristian Rodríguez y Sebastián Cubillos por su compañía y consejo.
- A los profesores del Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, por su educación de calidad que permitió mi formación profesional.
- A mi profesor guía Dr. Tomás Vargas, por su gestión en el inicio y desarrollo de esta investigación, por su forma directa y sincera de comunicarse que facilitó el aprendizaje requerido para alcanzar las metas de este trabajo.
- A mis profesores de comisión por sus sabios y precisos consejos, especialmente a la Dra. Blanca Escobar, por su enseñanza, paciencia y dedicación en la resolución de numerosas dudas que surgieron a lo largo del trabajo.
- A las personas que trabajan en los laboratorios de Biohidrometalurgia y Electroquímica, especialmente a Poldie Oyarzun y Emma Fonseca por su buena disposición en todo momento para colaborar con este trabajo.

INDICE DE CONTENIDOS

CAPITULO 1: INTRODUCCION	1
CAPITULO 2: ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	3
2.1 Características generales de <i>Sulfobacillus acidophilus</i>	3
2.2 Mecanismo de lixiviación bacteriano	3
2.3 Modelación cinética de biooxidación de ion ferroso	5
2.4 Método electroquímico para medición de actividad biooxidativa.....	9
CAPITULO 3: OBJETIVOS.....	12
CAPITULO 4: METODOLOGIA	13
4.1 Cultivo de bacterias.....	13
4.1.1 Cultivo de bacterias en ferroso	13
4.1.2 Cultivo de bacterias en azufre elemental	13
4.1.3 Cultivo de bacterias en tetrionato	14
4.2 Celda electroquímica	14
4.3 Procedimiento experimental para mediciones a potencial controlado.....	15
CAPITULO 5: RESULTADOS Y DISCUSION	17
5.1 Crecimiento de <i>Sulfobacillus acidophilus</i>	17
5.1.1 Crecimiento en ferroso.....	17
5.1.2 Crecimiento en azufre elemental.....	18
5.1.3 Crecimiento en tetrionato	19
5.2 Series experimentales a potencial controlado	20
5.3 Estimación de parámetros	23
5.3.1 Ajuste para modelo de Michaelis-Menten con inhibición por producto.....	24
5.3.2 Ajuste para modelo de Boon	25
5.3.3 Ajuste para modelo de Gabriel Meruane	27
5.3.4 Análisis de los parámetros obtenidos	28

5.4 Comparación de los resultados con otra información experimental.....	29
CAPITULO 6: CONCLUSIONES.....	32
REFERENCIAS	33
APENDICE A: PROTOCOLOS.....	35
APENDICE B: RENDIMIENTO DE OXIDACION DE ION FERROSO	37
APENDICE C: SERIES EXPERIMENTALES A POTENCIAL CONTROLADO	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema general de la cadena de transporte de electrones, en color rojo se resalta el transporte de electrones y en azul el flujo de protones.....	5
Figura 2.2 Esquema de la celda electroquímica usada para medir oxidación de ion ferroso (Meruane 2002).....	10
Figura 4.1. Montaje de la celda electroquímica.....	15
Figura 5.1: Evolución de cultivos en ion ferroso y adaptación de los microorganismos	17
Figura 5.2: Evolución del pH para cultivos en azufre.	18
Figura 5.3: Evolución del pH para cultivos en tetrionato, en verde se ilustra el valor de pH esperado en caso de haber oxidación de tetrionato.	19
Figura 5.4: Evolución de la corriente registrada en el tiempo para una medición experimental.....	20
Figura 5.5: Velocidad específica de oxidación en función de la concentración de ion ferroso.	22
Figura 5.6: Velocidad específica de oxidación en función del potencial redox	23
Figura 5.7: Correlación entre los valores ajustados y los experimentales de V_{Fe} para el modelo de Michaelis-Menten con inhibición por férrico.....	25
Figura 5.8: Correlación entre los valores ajustados y los experimentales de V_{Fe} para el modelo de Boon.	26
Figura 5.9: Correlación entre los valores ajustados y los experimentales de V_{Fe} para el modelo de Meruane.	28
Figura 5.10: Dependencia de la velocidad de oxidación de ion ferroso con el Eh y la concentración de ion ferroso para <i>Sulfobacillus acidophilus</i> y <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	30

INDICE DE TABLAS

Tabla 4.1: Composición del medio M.C.....	13
Tabla 4.2: Composición del medio Solución A	14
Tabla 5.1: Efecto del potencial aplicado sobre la velocidad de oxidación y el potencial redox establecido en la solución	22
Tabla 5.2: Parámetros del modelo de Michaelis-Menten con inhibición por producto....	24
Tabla 5.3: Parámetros ajustados al modelo de Boon.....	26
Tabla 5.4: Parámetros ajustados al modelo de Meruane con inhibición por producto ...	27
Tabla 5.5: Resumen de los parámetros cinéticos de los modelos estudiados	29
Tabla 5.6: Parámetros del Modelo de Meruane para <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y <i>Sulfobacillus acidophilus</i>	30
Tabla B.1: Cultivos para determinar rendimiento de oxidación de ion ferroso	37
Tabla C.1: Resultados y condiciones de series experimental a potencial controlado	38

CAPITULO 1: INTRODUCCION

La biolixiviación es el proceso convencional de lixiviación pero aplicado a los minerales sulfurados, catalizado por microorganismos que pueden disolver minerales liberando un metal de valor que con métodos convencionales sería muy difícil de extraer. La biolixiviación ofrece ventajas económicas, técnicas y genera menor impacto ambiental que los procesos pirometalúrgicos de tratamiento de sulfuros.

En los ambientes naturales asociados a la minería se han identificado y descrito diversas especies que participan en el proceso de biolixiviación, cada especie tiene distintos requerimientos de nutrientes como fuentes energéticas y sus actividades pueden ser inhibidas por diferentes factores, debido a esto el crecimiento conjunto de diferentes microorganismos puede resultar más eficiente que una especie pura en la biolixiviación de un mineral.

La población bacteriana también se encuentra fuertemente influenciada por la temperatura a la que está expuesta. Tradicionalmente el estudio de microorganismos fierrooxidantes se ha centrado en especies mesófilas, tales como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, microorganismo vastamente caracterizado cuya temperatura optima de crecimiento se encuentra entre los 28 y 33 °C. Por otra parte, en la actualidad nuevas especies termófilas moderadas y termófilas extremas han sido identificadas y caracterizadas. El interés en el estudio de los microorganismos termófilos se justifica precisamente en que en la práctica, los procesos de lixiviación pueden alcanzar temperaturas compatibles para estos microorganismos. En efecto, en el plano de la minería Chilena, según un reciente reporte realizado por COCHILCO (Comisión Chilena del Cobre) la temperatura en los sistemas industriales de biolixiviación puede alcanzar temperaturas cercanas a los 45 °C (COCHILCO, 2009), situación en la que es posible incorporar microorganismos termófilos moderados a los procesos de recuperación de cobre sin incurrir en gastos de calentamiento.

El mecanismo principal de catálisis bacteriana en la biolixiviación de minerales sulfurados es la producción de ion férrico a partir de la oxidación del ion ferroso, conocido como mecanismo de lixiviación indirecta. El ión férrico, es un agente fuertemente oxidante, y permite oxidar los minerales de sulfuro de cobre para recuperar el metal.

Para optimizar los parámetros de funcionamiento y mejorar el rendimiento de una operación de biolixiviación es indispensable contar con información sobre la cinética de la oxidación bacteriana del ion ferroso por los microorganismos presentes. Es por esto que en la literatura reciente se han caracterizado diversos microorganismos conocidos por participar en biolixiviación, tales microorganismos pueden ser descritos a través del desarrollo de modelos cinéticos que relacionan la tasa de consumo del ion ferroso con características del medio en el cual se produce la biooxidación como las concentraciones de los iones ferroso y férrico o el potencial redox de la solución.

En particular se destaca el uso de un método bioelectroquímico que ha sido usado por diversos investigadores en los últimos años para estudiar la cinética de oxidación bacteriana (Aguirre *et al.*, 1991; Harvey and Crundwell, 1997; Salhé, 1999; Meruane, 2002; Gálvez, 2005) el cual consiste en el uso de una celda electroquímica que presenta la ventaja de que no es necesario variar las concentraciones de los iones ferroso y férrico en solución durante los experimentos, a diferencia de los experimentos tradicionales batch, Esto permite un control más fino de las variables que afectan la cinética de oxidación bacteriana y una mejor interpretación de los resultados obtenidos.

En este trabajo se caracterizó la cinética de oxidación de ion ferroso por *Sulfobacillus acidophilus*, una bacteria termófila moderada capaz de oxidar ion ferroso, azufre elemental y minerales sulfurados a una temperatura óptima de 45°C. *Sulfobacillus acidophilus* fue validada como nueva especie en 1996 (IJSB, 1996) tras el trabajo realizado por Norris donde identificó y caracterizó el crecimiento de la bacteria (Norris *et al.*, 1996). Sin embargo la cinética de oxidación de ion ferroso de este microorganismo no ha sido caracterizada en la literatura, en particular en este trabajo se realizaron mediciones experimentales con *Sulfobacillus acidophilus* a su temperatura óptima de crecimiento en un montaje consistente en una celda electroquímica que permite un control fino de las variables del sistema para representar la cinética de biooxidación en función de la concentración del ion ferroso y del potencial redox de la solución.

CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Características generales de *Sulfobacillus acidophilus*

La bacteria *Sulfobacillus acidophilus* es un microorganismo termófilo moderado y acidófilo, capaz de oxidar ion ferroso, azufre elemental y minerales sulfurados. Es Gram-positivo, formador de endosporas y posee forma de bastón, sus dimensiones son de 0,5 a 0,8 μm de ancho y 3,0 a 5,0 μm de largo. Fue aislado originalmente de los desechos de una mina de carbón cerca de Alvecote en Inglaterra el año 1979, pero fue identificado como una nueva especie el año 1996 (IJSB, 1996). Específicamente se desarrolla bajo las siguientes condiciones (Norris *et al.*, 1996; Bogdanova *et al.*, 2006):

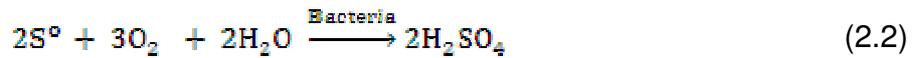
- Autotrófico: Creciendo en hierro (II) o azufre elemental pueden utilizar como fuente de carbono el dióxido de carbono, sin embargo su capacidad para fijarlo es baja por lo que necesitan altas cantidades en la atmosfera. También pueden crecer heterotróficamente en presencia de pequeñas cantidades de extracto de levadura.
- Aeróbico: Requieren de oxígeno.
- Mesófilo: crece en condiciones de temperatura entre 40 y 60 $^{\circ}\text{C}$, encontrándose el óptimo entre 45 y 50 $^{\circ}\text{C}$.
- Acidófilo: Se encuentra en ambientes ácidos, con un pH óptimo de crecimiento igual a 2,0.

2.2 Mecanismo de lixiviación bacteriano

Se describen a continuación los mecanismos de lixiviación que puede realizar el microorganismo en estudio. Dependiendo del sustrato a oxidar los mecanismos se clasifican en 2, en el primero la bacteria oxida directamente el minerales sulfurados o azufre elemental (lixiviación directa), y el segundo corresponde a la oxidación bacteriana de ion ferroso (lixiviación indirecta).

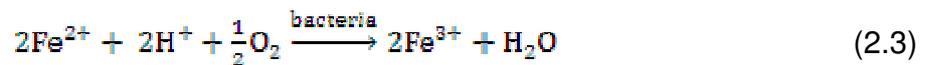
En el mecanismo de lixiviación directo las bacterias se adhieren al sólido para disolver directamente el sulfuro o el azufre elemental, estos procesos se describen en las siguientes reacciones:



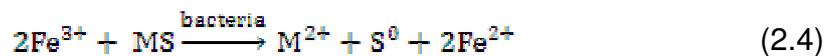


Donde M corresponde a un metal divalente.

El mecanismo de lixiviación indirecto, consiste en la oxidación bacteriana del ion ferroso a férrico en presencia de oxígeno disuelto y protones de acuerdo con la reacción:



La velocidad de la reacción anterior puede ser aumentada 10^6 veces en presencia de bacterias fierrooxidantes (Ingledeew, 1986). El ion férrico producido puede luego atacar químicamente a los sulfuros según la reacción general:



Donde M^{2+} corresponde a un catión metálico divalente. El ion ferroso producido en la reacción de disolución puede ser oxidado nuevamente por las bacterias, generándose de esta manera un ciclo altamente conveniente para la lixiviación de minerales sulfurados.

La oxidación de ion ferroso presentada en la ecuación (2.3) corresponde a una reacción de oxido-reducción, en efecto puede ser representada por las dos siguientes semi-reacciones:



El ion ferroso de la ecuación (2.5) no es transportado hacia el interior de la célula debido a que no puede pasar a través de la pared celular, sólo pasan a través de esta los protones, moléculas de agua y el oxígeno. Para poder llevar a cabo la reacción se establece sobre la pared celular una cadena que transporta el electrón del ion ferroso

hacia el interior de la célula. La bacteria obtiene la energía necesaria para su mantención y crecimiento a partir de esta cadena de transporte de electrones.

El mecanismo molecular y los complejos enzimáticos componentes de la cadena transportadora de electrones ha sido estudiado por diversos autores en el microorganismo *Acidithiobacillus ferrooxidans*, una descripción general del mecanismo se presenta en la Figura 2.1, esquema que sintetiza los modelos propuestos en la literatura (Meruane 2002).

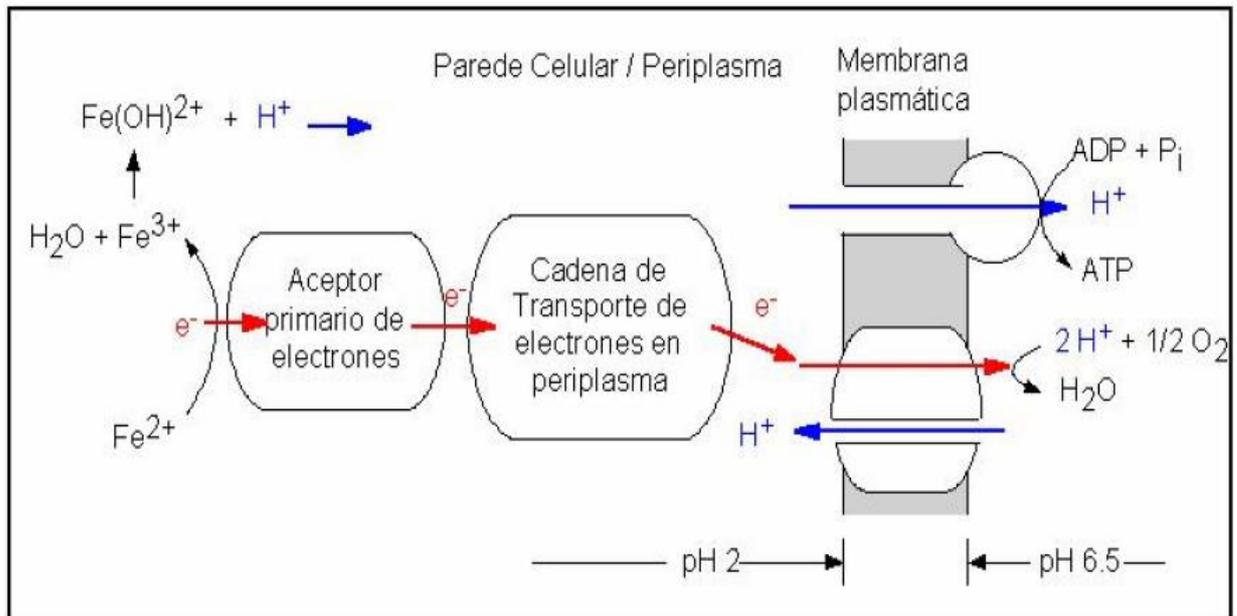


Figura 2.1. Esquema general de la cadena de transporte de electrones, en color rojo se resalta el transporte de electrones y en azul el flujo de protones.

La oxidación del ion ferroso presentada en la semireacción (2.5) se lleva a cabo en el periplasma de la bacteria, el cual se encuentra expuesto al medio externo donde residen los iones de hierro. El electrón extraído del ion ferroso es transportado a través de la cadena transportadora de electrones a través de la membrana plasmática hasta el citoplasma donde ocurre la reducción de oxígeno de acuerdo a la semireacción (2.6). Este proceso es acompañado por la simultánea disminución en la concentración de protones en el citoplasma celular, lo cual establece una diferencia de potencial electroquímico de protones a través de la membrana, que genera una fuerza protón motriz capaz de impulsar el proceso de fosforilación para formar ATP.

2.3 Modelación cinética de biooxidación de ion ferroso

Para estudiar la cinética de oxidación bacteriana es necesario definir una expresión que caracterice la velocidad de oxidación de ion ferroso V_{Fe} (gr de Fe^{2+} /hr), esta puede ser expresada en forma general de acuerdo a la siguiente expresión:

$$V_{Fe} = -\frac{dFe^{2+}}{dt} = \frac{\mu N}{Y} \quad (2.7)$$

Donde N es el número de bacterias, Y el rendimiento (células producidas/gr de Fe^{2+} consumido) y μ la velocidad específica de crecimiento de las bacterias (1/hr):

$$\mu = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt} \quad (2.8)$$

De lo anterior se desprende que se requiere de una expresión para la velocidad específica de crecimiento en función de la concentración de sustrato. Un modelo simple bastante aceptado es el propuesto por Monod, basado en la cinética enzimática de Michaelis-Menten, el cual supone que el crecimiento de los microorganismos está limitado por una etapa enzimática, asumiendo que las enzimas catalizan las reacciones tras la formación de un complejo enzima-sustrato. Este complejo (ES) puede regresar a las formas de enzima (E) y sustrato (S) o puede de manera irreversible formar el producto (P). Estas reacciones químicas para la formación del complejo y de producto, respectivamente, son:



A partir de este mecanismo se deduce una expresión cinética simple para el crecimiento celular:

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} \quad (2.11)$$

Donde K_S es la concentración de sustrato donde la velocidad específica de crecimiento es igual a la mitad de su valor máximo y μ_{max} es la máxima velocidad específica de crecimiento alcanzada para concentraciones de sustrato mucho mayores que el valor de K_S .

Luego, usando las ecuaciones (2.7) y (2.11) se puede obtener una expresión de la velocidad de oxidación de ion ferroso:

$$V_{Fe} = \frac{N \mu_{max} [Fe^{2+}]}{Y (K_S + [Fe^{2+}])} \quad (2.12)$$

Dividiendo la expresión anterior por el número de bacterias N y definiendo:

$V_{Fe \max} = \frac{\mu_{max}}{Y}$, velocidad específica máxima de consumo de sustrato se obtiene la velocidad específica de oxidación de ion ferroso:

$$v_{Fe} = \frac{v_{Fe\max} [Fe^{2+}]}{K_s + [Fe^{2+}]} \quad (2.13)$$

La ecuación (2.13) permite una adecuada modelación de la velocidad de biooxidación de ion ferroso, sin embargo, se ha reportado que la actividad de los microorganismos fierrooxidantes resulta inhibida en presencia de numerosos cationes como el Fe^{3+} (Nemati *et al.*, 1998), Pb^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} y Ag^+ (De *et al.*, 1997) y también de aniones como: I^- , F^- , Cl^- y Br^- (Ingledew, 1982). El efecto inhibitorio sobre la cinética de oxidación de ferroso no es considerado en el modelo (2.13).

En particular, se ha puesto gran interés en el estudio del efecto inhibitorio del ion férrico, el cual es producido por la misma bacteria a partir de la oxidación del ion ferroso. Se han propuesto diversos modelos para representar el efecto del ion sobre la cinética de biooxidación, a continuación se presentan algunos.

El modelo de Monod con inhibición por producto (ion férrico) es similar al de la ecuación (2.13), pero agrega un término que aumenta el denominador que da cuenta del efecto inhibitorio del ion férrico:

$$v_{Fe} = \frac{v_{Fe\max} [Fe^{2+}]}{K_s + [Fe^{2+}] + K_i [Fe^{3+}]} \quad (2.14)$$

Donde K_i es la constante de inhibición.

Este modelo (2.14) ha sido utilizado en trabajos de estudio de la velocidad de oxidación de ion ferroso usando una celda electroquímica (Harvey and Crundwell, 1996 y 1997), obteniéndose una buena correlación de los datos experimentales con el modelo.

La modelación de la inhibición por ion férrico también fue expresada considerando un término de mantención $[Fe^{2+}]_m$, una cantidad de ion ferroso necesaria para la subsistencia de las bacterias (Boon *et al.* 1999a, 1999b y 1999c), postulando la siguiente expresión:

$$v_{Fe} = \frac{v_{Fe\max} [Fe^{2+}]}{K_s + [Fe^{2+}] + K_i ([Fe^{2+}] - [Fe^{2+}]_m)} \quad (2.15)$$

En la expresión anterior se puede considerar que si el término de mantención $[Fe^{2+}]_m$ es pequeño respecto a la concentración de ion ferroso en la solución, es posible despreciarlo con lo cual la expresión (2.15) se simplifica a:

$$v_{Fe} = \frac{v_{Fe\max} [Fe^{2+}]}{K_s + [Fe^{2+}] + K_i [Fe^{3+}]} \quad (2.16)$$

Es importante destacar que en la ecuación (2.16) la velocidad de oxidación depende solo de la razón $[Fe^{3+}]/[Fe^{2+}]$ en solución, la cual está relacionada con el potencial

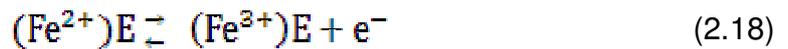
redox (Eh) de la solución, el cual puede ser expresado de acuerdo a la expresión de Nernst según:

$$Eh = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[Fe^{3+}]}{[Fe^{2+}]} \right) \quad (2.17)$$

Donde E^0 es el potencial estándar, R la constante de los gases, T la temperatura absoluta, n la cantidad de moles de electrones que participan en la reacción y F la constante de Faraday.

Este último planteamiento permite interpretar la expresión cinética de la oxidación de ion ferroso en términos electroquímicos. Es decir, se puede asumir que la velocidad de transferencia de electrones desde el ion ferroso al oxígeno a través de la membrana plasmática de la bacteria está controlada por el potencial redox de la solución. En efecto, bajo esta hipótesis Gabriel Meruane desarrolló un modelo cinético de especial interés para este trabajo (Meruane, 2002).

El modelo desarrollado por Gabriel Meruane se basa en que sobre la membrana plasmática ocurren las dos reacciones siguientes:



Donde $(Fe^{2+})E$ y $(Fe^{3+})E$ representan el complejo enzima-ferroso y enzima-férrico respectivamente. El modelo anterior denota la existencia de transferencia de carga entre $(Fe^{2+})E$ y $(Fe^{3+})E$, luego la velocidad de la reacción (2.18) puede ser expresada según la teoría cinética electroquímica, de acuerdo a la ecuación de Butler-Volmer:

$$v_{2.17} = \frac{i_0}{nF} \left[\exp \left(\frac{(1-\alpha)nF}{RT} \eta \right) - \exp \left(\frac{-\alpha nF}{RT} \eta \right) \right] \quad (2.20)$$

Donde i_0 representa la corriente de intercambio, α es el coeficiente de simetría y η es el sobrepotencial. La velocidad de oxidación del complejo enzima-ferroso en la membrana de la bacteria se expresa como i/nF , donde i es la densidad de corriente de electrones removidos desde el complejo enzima-ferroso hacia el circuito redox interno de la bacteria. El sobrepotencial se expresa de acuerdo a los potenciales establecidos en la membrana celular y se define como: $\eta = E^m - E^m_{eq}$.

E^m_{eq} es el potencial de membrana para el cual el sistema se encuentra en equilibrio ($i=0$), se encuentra determinado por la razón de las concentraciones de los complejos enzima-férrico y enzima-ferroso en la superficie de la membrana. Cuando la corriente de oxidación de ion ferroso en la membrana es cero este potencial debe igualarse al potencial de Nernst asociado a la razón férrico-ferroso en la solución Eh. E^m es el potencial establecido en la cara periplasmática de la membrana cuando el proceso de oxidación de ion ferroso se desarrolla a una velocidad finita.

Utilizando las hipótesis expuestas en la descripción del modelo, la siguiente expresión para la velocidad de oxidación de ion ferroso fue derivada por Meruane:

$$v_{Fe} = \frac{v_{max} - K_2 * \frac{[Fe^{3+}]}{[Fe^{2+}]}}{1 + K_s * \frac{1}{[Fe^{2+}]} + K_1 * \frac{[Fe^{3+}]}{[Fe^{2+}]}} \quad (2.21)$$

Los términos v_{max} , k_1 , k_s y k_2 son los parámetros que caracterizan la cinética de los microorganismos. La ecuación anterior es similar a las expresiones del tipo Monod con inhibición por férrico, sin embargo en este caso existe un término que disminuye el numerador. Este término indica la existencia de una razón férrico/ferroso para la cual la velocidad neta de oxidación de ion ferroso es cero.

Esta misma ecuación puede ser observada en forma más clara al expresar la velocidad de oxidación de ion ferroso en función del potencial de membrana (E^m) y el potencial redox (Eh) de la solución:

$$v_{Fe} = \frac{K_1 * \exp\left[\frac{nF}{2RT}(E^m - Eh^0)\right] * \left\{1 - \exp\left[\frac{-nF}{RT}(E^m - Eh)\right]\right\}}{1 + K_2 * \frac{1}{[Fe^{2+}]} + K_3 * \exp\left[\frac{nF}{RT}(Eh - Eh^0)\right]} \quad (2.22)$$

En esta última expresión, la velocidad de oxidación de ion ferroso depende explícitamente del potencial redox de la solución y de la concentración de ion ferroso, mientras que los valores K_1 , K_2 , K_3 , E^m , son parámetros que caracterizan la cinética del microorganismo. De ellos se destaca el potencial de membrana E^m , el cual representa el Eh máximo para el cual la bacteria presenta actividad oxidativa, para $Eh = E^m$ la velocidad de oxidación bacteriana es cero.

2.4 Método Electroquímico para medición de actividad biooxidativa

El uso de celdas electroquímicas ha permitido estudiar o controlar procesos de biooxidación. Las celdas electroquímicas utilizadas para el estudio de la cinética de microorganismos fierrooxidantes consisten en dos compartimientos separados por una membrana de intercambio catiónico, la cual sólo permite intercambio de protones. Cada compartimiento contiene electrodos conectados a una fuente de poder externa. El compartimiento catódico contiene los microorganismos fierrooxidantes e iones de fierro, mientras que el compartimiento anódico sólo contiene medio de cultivo sin células ni fierro. La membrana que separa ambos compartimientos evita que el electrodo anódico ejerza oxidación de ion ferroso, lo cual interferiría con la actividad oxidativa de las bacterias.

La novedad de estos trabajos radica en que permite controlar el potencial redox de la solución o, análogamente, la razón de las concentraciones de los iones férrico y ferroso vía control del potencial aplicado en la fuente de poder. La corriente controla la reducción del ion férrico a ferroso que ocurre en el compartimiento catódico, de esta

manera se logra compensar la biooxidación de las bacterias permitiendo generar el potencial redox prefijado.

Un esquema del montaje y funcionamiento de la celda electroquímica utilizada en el trabajo de Gabriel Meruane para medir la cinética de oxidación de ion ferroso se presenta en la Figura 2.2

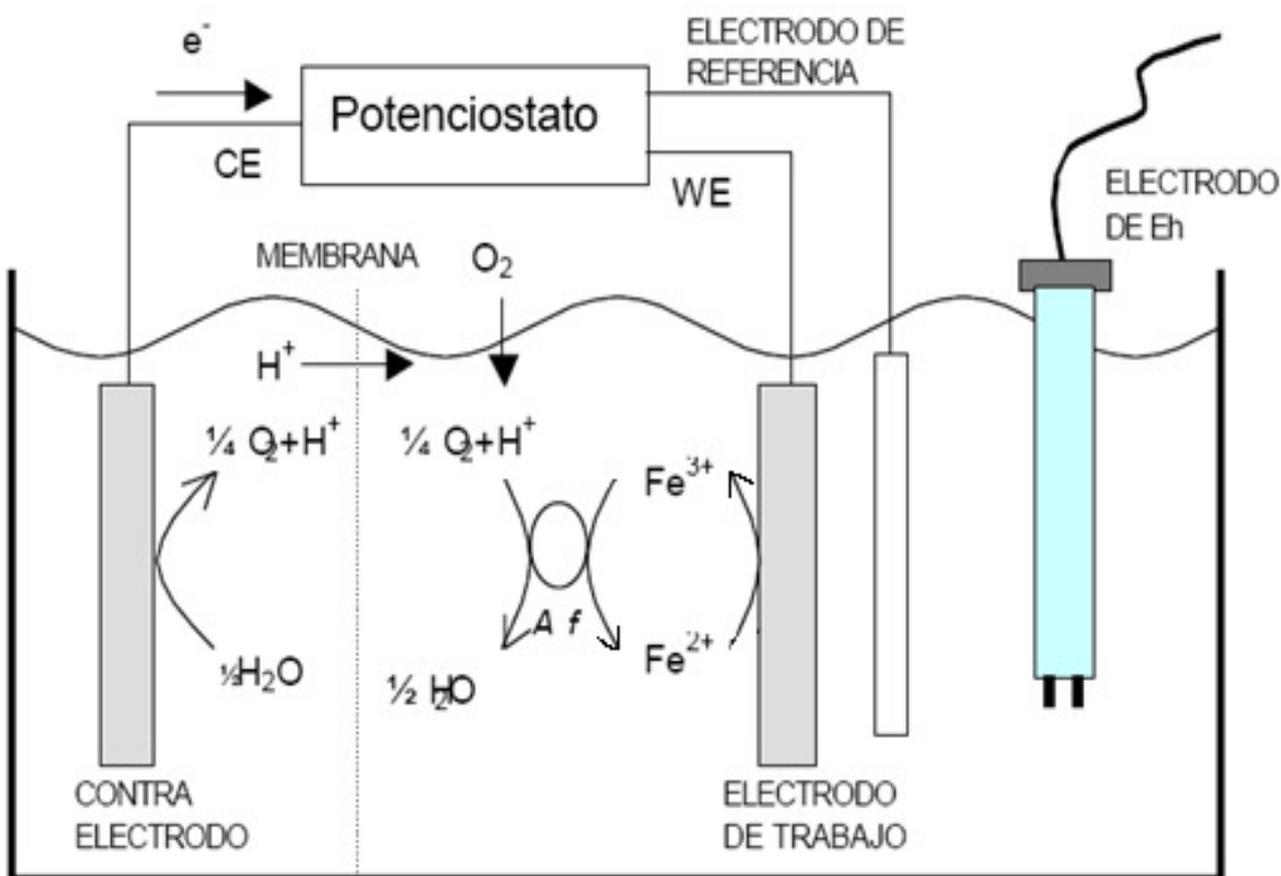


Figura 2.2 Esquema de la celda electroquímica usada para medir oxidación de ion ferroso (Meruane, 2002).

El uso de la celda electroquímica permite medir la velocidad de biooxidación a partir de la corriente estacionaria que se establece entre la reducción electroquímica de ion férrico y la biooxidación de ion ferroso, ya que la corriente mide la cantidad de carga que fluye por unidad de tiempo en el circuito, la cual esta acoplada a la oxidación biológica producida por el microorganismo bajo estudio. De esta manera, es posible determinar la velocidad de oxidación bacteriana de ion ferroso a partir de la siguiente expresión:

$$v_{Fe} = \frac{I}{zFN} \quad (2.23)$$

La ecuación (2.23) corresponde a la aplicación de la ley de Faraday para reacciones de electrodo, I es la corriente estacionaria registrada, z es el número de electrones transferidos en la reducción de un átomo de ion férrico ($z=1$) y N es el número de bacterias en solución.

La validez de la ecuación (2.23) ha sido estudiada con el objetivo de verificar que la relación teórica entre la corriente y la velocidad de oxidación bacteriana se cumple, para esto se realizaron experiencias en la celda en ausencia de microorganismos, registrándose eficiencias de corriente cercanas al 100% (Salhé, 1999).

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS

En este trabajo de tesis se busca caracterizar el crecimiento y la cinética de oxidación de ion ferroso del microorganismo *Sulfobacillus acidophilus*. Para esto se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el crecimiento de *Sulfobacillus acidophilus* en diferentes sustratos: ion ferroso, azufre elemental y tetratiónato.
- Obtener datos experimentales de la cinética de biooxidación de ion ferroso de *Sulfobacillus acidophilus*, mediante el uso de un montaje electroquímico en ausencia de mineral que permite trabajar a potencial controlado.
- Integrar estos datos como parte de un modelo cinético que permita expresar explícitamente el efecto del potencial redox de la solución y de la concentración de sustrato sobre la velocidad de oxidación de la bacteria.
- Comparar los resultados del modelo cinético de oxidación de ion ferroso de *Sulfobacillus acidophilus* con el modelo ajustado a datos experimentales de la cinética de oxidación de la cepa ATCC19859 de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

CAPÍTULO 4: METODOLOGIA

4.1 Cultivo de bacterias

Se utilizó una cepa pura DSMZ10332 de *Sulfobacillus acidophilus*. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml. Los componentes del cultivo fueron previamente esterilizados y se manejaron los cultivos siempre bajo condiciones estériles para garantizar que no se contaminen con otros microorganismos. Los matraces con los cultivos son tapados con un tapón de gasa y llevados a un agitador orbital calefaccionado a 45° C. A continuación se describen los cultivos de acuerdo a los diferentes sustratos utilizados.

4.1.1 Cultivo de bacterias en ion ferroso

Los cultivos realizados en ion ferroso poseen la siguiente composición:

- 88,5 ml de medio de cultivo basal denominado M C (pH 1,6)
- 4,5 ml de una solución al 33% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, equivalente a 3 (g/L) de ion ferroso
- 2 ml de una solución al 1% de extracto de levadura
- 5 ml de inóculo ($\sim 10^7$ bact/ml)

El crecimiento de los cultivos tarda entre 48 y 72 horas en llegar a su máximo crecimiento. La composición del medio de cultivo utilizado se indica en la siguiente tabla:

Tabla 4.1: Composición del medio M C

Compuesto	Concentración [g/L]
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,400
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,400
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,056

4.1.2. Cultivo de bacterias en azufre elemental

Los cultivos realizados en azufre elemental poseen la siguiente composición:

- 93 ml de medio de cultivo M C (pH 2,3)
- 15 μl de una solución al 33% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, equivalente a 10 (mg/L) de ion ferroso
- 2 ml de una solución al 1% de extracto de levadura
- 5 ml de inóculo ($\sim 10^7$ bact/ml)
- 3 grs de azufre elemental sólido granulado.

Se monitorea diariamente el pH del cultivo, el cual va disminuyendo a medida que se oxida el azufre, cuando se alcanza un pH cercano a 1,6 la mitad del medio de cultivo es descartado y renovado con medio fresco con el objetivo de aumentar el pH del medio.

4.1.3. Cultivo de bacterias en tetrionato

Los cultivos realizados en tetrionato poseen la siguiente composición:

- 83 ml de medio de cultivo denominado solución A (pH 4,0)
- 10 ml de una solución 0,1M de $K_2S_4O_6$
- 2 ml de una solución al 1% de extracto de levadura
- 5 ml de inóculo ($\sim 10^7$ bact/ml)

. La composición del medio de cultivo utilizado se indica en la siguiente tabla:

Tabla 4.2: Composición del medio Solución A.

Compuesto	Concentración [g/L]
$(NH_4)_2SO_4$	6,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,0
KCl	0,2
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0,02

4.2. Celda electroquímica

La celda electroquímica utilizada para realizar las pruebas experimentales de oxidación de ion ferroso a potencial controlado está construida en Pyrex, posee dos compartimentos separados por una membrana de intercambio catiónico Nafion N-117 (DuPont) de área aproximada $4,9 \text{ cm}^2$. En la sección de mayor volumen (compartimiento catódico) se ubica el electrodo de trabajo en forma de alambre de platino de área total aproximada 16 cm^2 (diámetro 0,5 mm, largo 2 m). Además, en este compartimento se ubica un electrodo de referencia Hg/HgSO₄ Radiometer Analytical Modelo REF601, junto con 100 ml de medio de cultivo libre de fierro y una población bacteriana a ser caracterizada.

En la sección de menor volumen (compartimiento anódico) se ubica como contraelectrodo una lámina de platino de área total igual a 3 cm^2 inmersa en 20 ml de medio de cultivo libre de fierro.

La celda electroquímica se conecta a un baño termostático de agua que permite mantener la temperatura en $45,0^\circ\text{C}$. El compartimento catódico es agitado con un impulsor magnético y burbujeado con aire. El electrodo de trabajo, la referencia y el contraelectrodo son conectados a un potencióstato EG&G Princeton Applied Research, modelo 363, que permite aplicar una diferencia de potencial sobre la celda

electroquímica. Para monitorear la corriente se conecta en serie al sistema un multímetro digital UNI-T modelo UT60F.

En la Figura 4.1 se presenta una fotografía de la celda electroquímica. Una representación esquemática de la celda electroquímica se presenta en la Figura 2.2 del Capítulo 2.



Figura 4.1. Montaje de la celda electroquímica

4.3 Procedimiento experimental para mediciones a potencial controlado

A continuación se presenta el procedimiento paso a paso de las series experimentales realizadas a potencial controlado en la celda electroquímica.

1. La población bacteriana a ser utilizada en la celda electroquímica se obtiene a partir de los cultivos en ion ferroso que se encuentran en el final de su etapa de crecimiento (luego de 48 a 72 horas de cultivo), esta solución se filtra utilizando

filtros Millipore de 0,22 μ m de tamaño de poro. Las células filtradas son resuspendidas en 100 ml de medio basal libre de hierro, los cuales son depositados en el compartimiento catódico de la celda electroquímica, mientras que el compartimiento anódico es llenado con 20 ml de medio de cultivo.

2. Se adicionan a la celda electroquímica un volumen fijo de una solución al 33% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y se aplica un potencial constante sobre la celda con el potencióstato.
3. La corriente es registrada con el multímetro, esta aumenta en el tiempo en la medida que aumenta la concentración de ion férrico como consecuencia de la oxidación bacteriana del ion ferroso.
4. Una vez alcanzado el estado estacionario, se registra el valor de la corriente y se mide el potencial redox (Eh) de la solución utilizando un electrodo de Eh. Simultáneamente se toman muestras de 3 ml para medir las concentraciones de ion ferroso y hierro total disueltos en la solución mediante el método colorimétrico de la orto-fenantrolina en un espectrofotómetro. También se toman 8 μ l de muestra para determinar el número de bacterias en solución por medio de un recuento directo en celda de Petroff-Hausser en el microscopio. Los protocolos para las mediciones de ion ferroso y hierro total en solución y para el recuento de bacterias se encuentran en el Anexo A.
5. Se determina la velocidad de oxidación bacteriana de ion ferroso a partir de la siguiente expresión:

$$v_{\text{Fe}} = \frac{I}{zFN}$$

En la ecuación anterior, v_{Fe} es la velocidad de oxidación bacteriana, I es la corriente estacionaria registrada, z es el número de electrones necesarios para la reducción de un átomo de ion férrico (z=1), F es la constante de Faraday (96.496 C/eq) y N es el número de bacterias obtenido del recuento en el microscopio. El procedimiento descrito se realiza a diferentes valores de potencial aplicado, 0,2, 0,4 y 0,6 (V vs SHE), y a diferentes valores de concentración de hierro total.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Crecimiento de *Sulfobacillus acidophilus*.

Se estudió el crecimiento de las bacterias en distintos sustratos, las condiciones y medios de cultivo para cada caso se detallan en el Capítulo 4.

5.1.1 Crecimiento en ferroso.

Cultivos de *Sulfobacillus acidophilus* fueron mantenidos creciendo en ion ferroso en el laboratorio desde la tercera semana del mes de Agosto de 2010 a la fecha, siempre con una concentración de hierro total igual a 3 (g/l) suministrado como sulfato ferroso pentahidratado. Para monitorear la actividad de los microorganismos se midió diariamente el Eh de los cultivos, ya que el aumento de este revela la aparición de ion férrico, el cual es producido por la biooxidación del ion ferroso.

En la figura 5.1 se observa la evolución del Eh en el tiempo para cultivos iniciados en diferentes fechas de los meses de agosto, septiembre y octubre de 2010. Se puede apreciar que la tendencia no es la misma para los diferentes meses, esto se debe a que los microorganismos pasaron por un periodo de adaptación a las condiciones de cultivo del laboratorio, en efecto los primeros cultivos realizados alcanzaron un Eh máximo menor a 650 (mV vs SHE) en un periodo de 4 días, mientras que para los cultivos realizados a partir del 25 de octubre se alcanza entre el segundo y tercer día de cultivo un Eh cercano a los 800 (mV vs SHE), valor para el cual casi la totalidad del hierro en solución se encuentra como ion férrico.

Con cultivos posteriores al periodo de adaptación se determinó el rendimiento de oxidación de ion ferroso de *Sulfobacillus acidophilus* igual a $3,6 \cdot 10^4$ (bact/ μg de Fe^{+2} oxidado), el procedimiento experimental y cálculo para este valor se encuentra detallado en el Apéndice B.

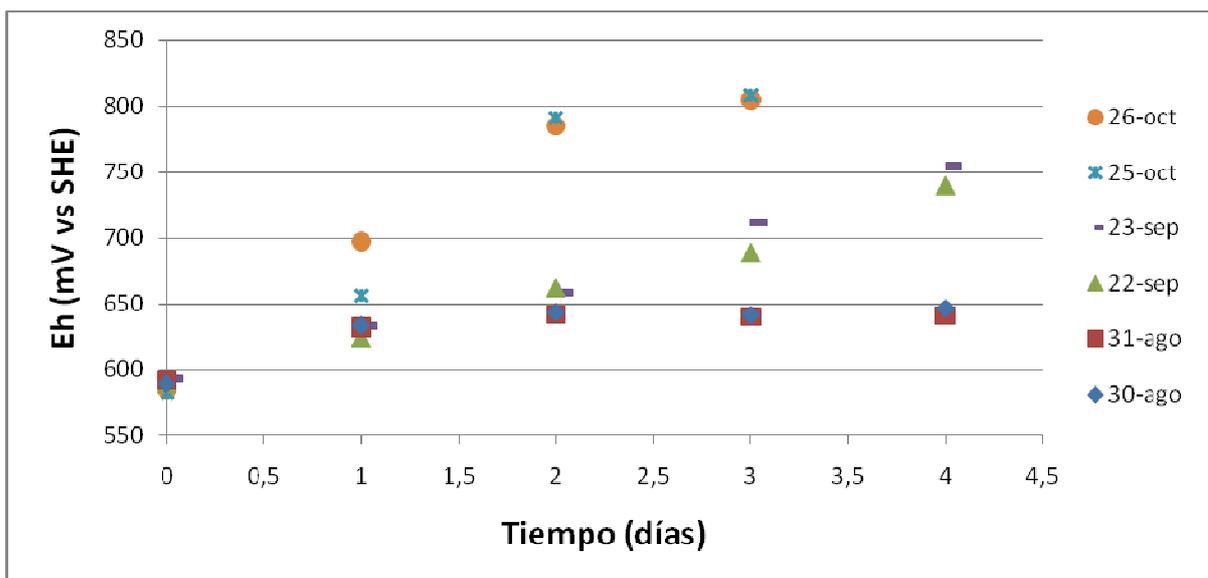


Figura 5.1: Evolución de cultivos en ion ferroso y adaptación de los microorganismos.

5.1.2 Crecimiento en azufre.

Se estudió el crecimiento utilizando azufre elemental sólido como sustrato, para monitorear la actividad de los microorganismos se midió diariamente el pH de los cultivos, ya que la disminución de este revela la aparición de ácido sulfúrico, producto de la oxidación del azufre.

En la figura 5.2 se presenta la evolución del pH en el tiempo para dos cultivos crecidos en azufre, se observa que el pH disminuye hasta alcanzar valores cercanos a 1,6 en 7 días, esto permite inferir que hay crecimiento de los microorganismos.

Para corroborar el desarrollo de los microorganismos se realizaron recuentos en cámara de Petroff-Hauser, alcanzándose valores de concentración celular entre 10^6 y 10^7 (bact/ml), cabe destacar que esta concentración celular representan la población bacteriana que crece en solución, sin embargo también es posible que una cantidad de microorganismos crezcan adheridos al azufre, indetectables con la cámara de recuento de Petroff-Hauser. Este tema no fue abordado con mayor detalle en este trabajo ya que va más allá de los objetivos principales.

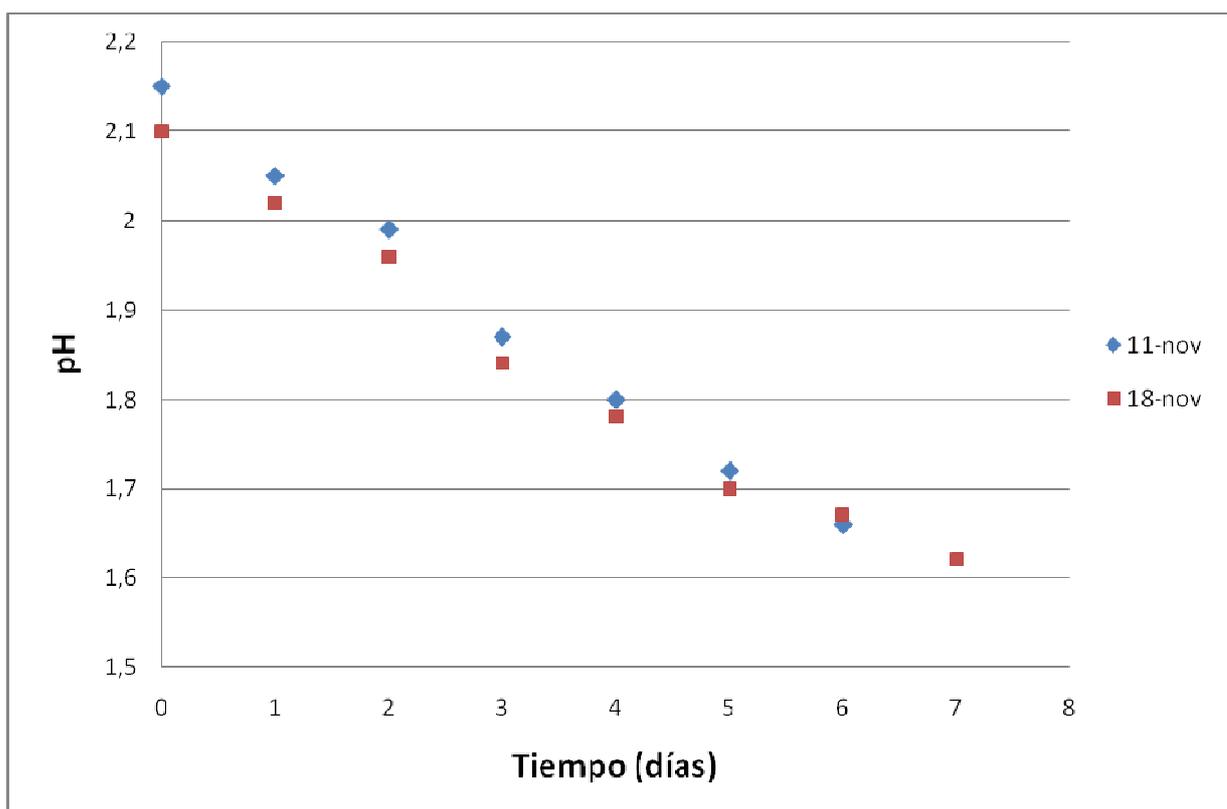


Figura 5.2: Evolución del pH para cultivos en azufre.

5.1.3 Crecimiento en tetrionato.

Se estudió el crecimiento en ion tetrionato como sustrato, el cual fue suministrado en forma de tetrionato de potasio a una concentración 0,01M. Para monitorear la actividad de los microorganismos se midió diariamente el pH de los cultivos, para medir aparición de protones producidos por oxidación del ion tetrionato

En la figura 5.3 se observa la evolución del pH en el tiempo para cultivos crecidos en tetrionato. El pH inicial fue cercano a 3,4 debido a que el medio de cultivo utilizado posee pH 4, este valor disminuye en el tiempo en los primeros días de cultivo, transcurridos 10 días de cultivo, el pH alcanzó valores mínimos cercanos a 2,5.

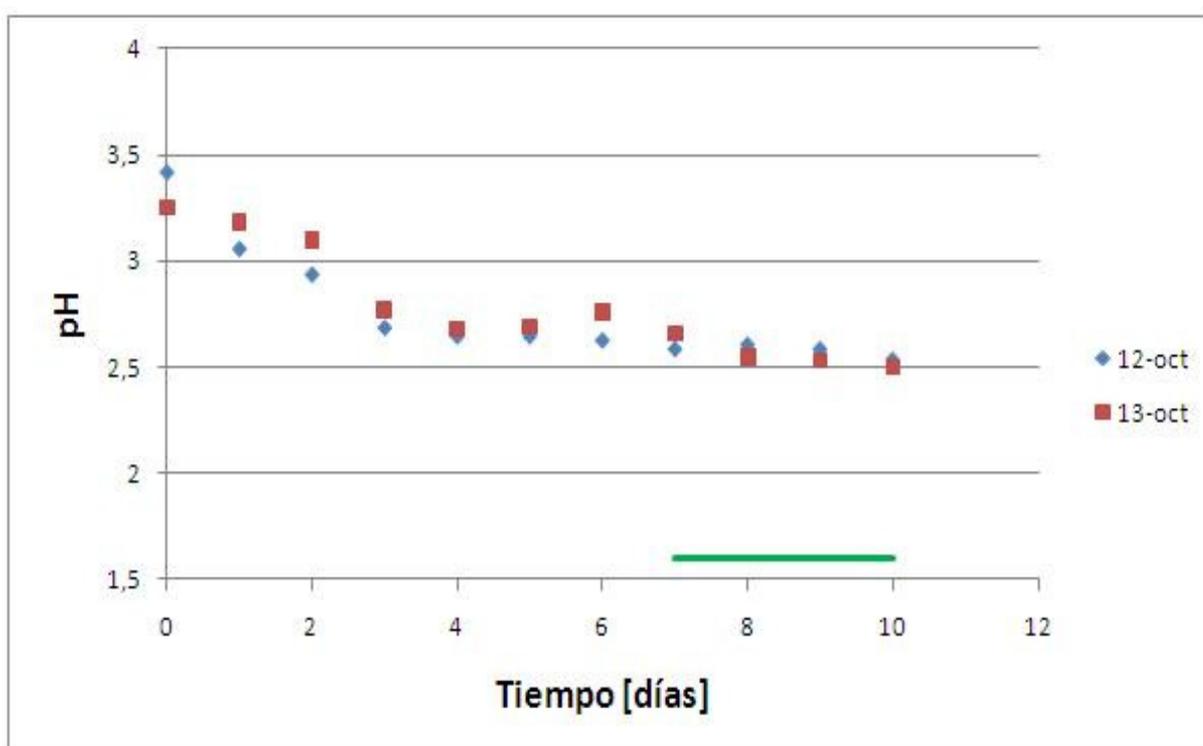


Figura 5.3: Evolución del pH para cultivos en tetrionato, en verde se ilustra el valor de pH esperado en caso de haber oxidación de tetrionato.

La experiencia con otros microorganismos en el Laboratorio donde se realizó este trabajo sobre el crecimiento de cultivos con tetrionato como sustrato, señala que el pH alcanzado debe ser cercano a 1,6 en caso de consumirse el sustrato. Lo cual nunca se observó en los cultivos realizados con *Sulfobacillus acidophilus*, junto con esto no fue posible determinar el número de bacterias en solución con cámara de Petroff-Hauser, debido a que el número de células vistas en el campo del microscopio fue muy pequeño y poco significativo estadísticamente.

Dado lo anterior, no se puede afirmar que los microorganismos crecieron en tetrionato. Los resultados aquí presentados concuerdan con lo señalado en la literatura que caracteriza las especies *Sulfobacillus*, donde para *Sulfobacillus*

acidophilus se han reportado como sustratos el ion ferroso, el azufre elemental y minerales sulfurados (Bogdanova et al., 2006).

5.2 Series experimentales a potencial controlado

En las series experimentales realizadas se obtienen perfiles de la corriente de reducción de ion férrico que evolucionan en el tiempo a un estado estacionario similares a los de la figura 5.4:

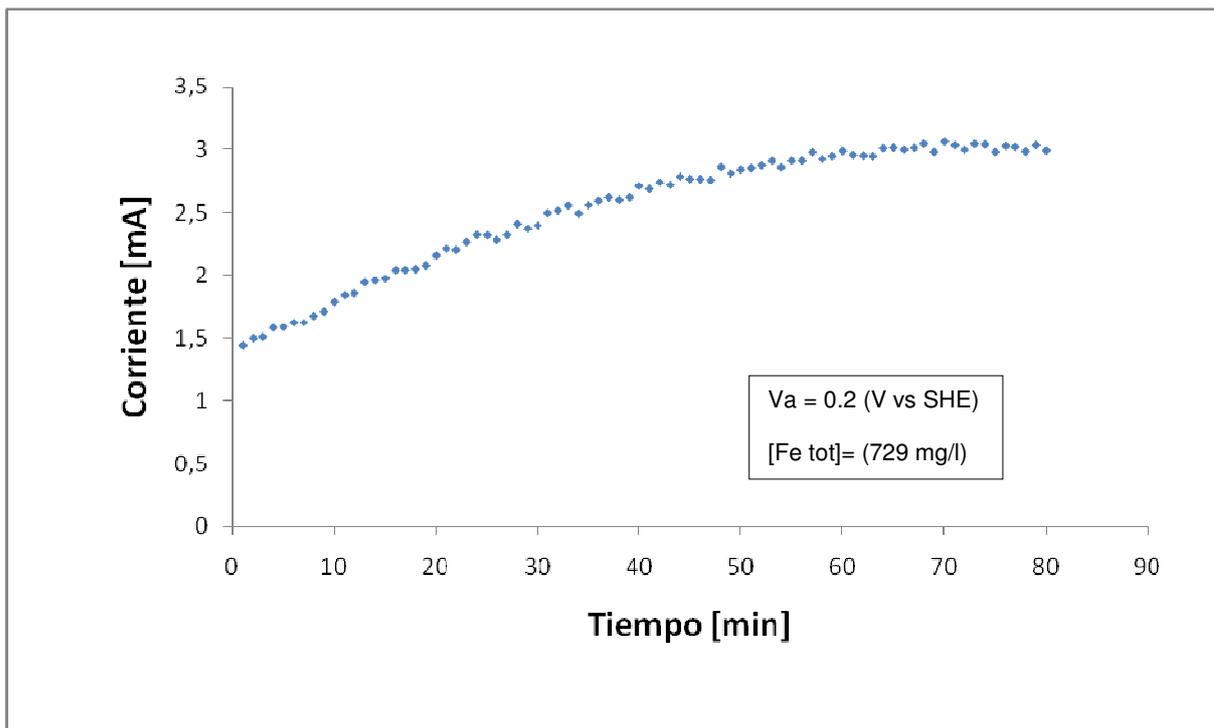


Figura 5.4: Evolución de la corriente registrada en el tiempo para una medición experimental.

La diferencia de potencial aplicado en la celda electroquímica genera un flujo de electrones originando la reducción del ion férrico llevada a cabo en el electrodo de trabajo, esta corriente es monitoreada y registrada en el tiempo a través del multímetro. La forma de los perfiles de corriente para cada medición son similares al de la Figura 5.4, la corriente aumenta en el tiempo debido a la acumulación del ion férrico en la solución, ya que en el inicio de la serie experimental el hierro total es suministrado como ion ferroso el cual comienza a ser oxidado por las bacterias a ion férrico, pero de acuerdo al potencial aplicado solo una fracción del mismo es reducido a ion ferroso electroquímicamente.

Cuando se alcanza el estado estacionario de corriente, las velocidades de oxidación bacteriana y reducción electroquímica se igualan, debido a que las concentraciones de los iones ferroso y férrico llegan a un equilibrio en que se mantienen prácticamente constantes.

El estado estacionario es alcanzado cerca de los 60 minutos para la medición presentada en la figura anterior, correspondiente a la serie experimental con un voltaje aplicado de 0.2 (V vs SHE) y una concentración de fierro total igual a 729 (mg/l). El tiempo en alcanzar el estado estacionario varía en cada serie experimental, alcanzando un mínimo de 30 minutos para las pruebas con bajas concentración de fierro total y un máximo cercano a los 120 minutos para las mediciones a mayores valores de voltaje aplicado y concentración de fierro total.

En el Apéndice C se presentan los valores de concentración de fierro total, potencial redox de la solución, corriente estacionaria, voltaje aplicado, concentración celular, concentración de ion ferroso, concentración de ion férrico y la velocidad específica de oxidación bacteriana de ion ferroso para cada serie experimental.

En la Figura 5.5 se presentan los valores de la velocidad específica de oxidación de ion ferroso obtenidos en función de la concentración de ion ferroso para los diferentes valores de potencial aplicado (V_a). Cada punto del gráfico representa el valor alcanzado en el estado estacionario de las pruebas experimentales.

Se observa claramente en la Figura 5.5 que existe una dependencia de la concentración de ion ferroso en la velocidad de oxidación bacteriana, además se aprecia que para un valor dado de concentración de ferroso, la velocidad de oxidación disminuye para los valores mayores de potencial aplicado. Es necesario hacer notar que el incremento del potencial aplicado se refleja en un aumento de los potenciales redox de la solución como se muestra en la Tabla 5.1.

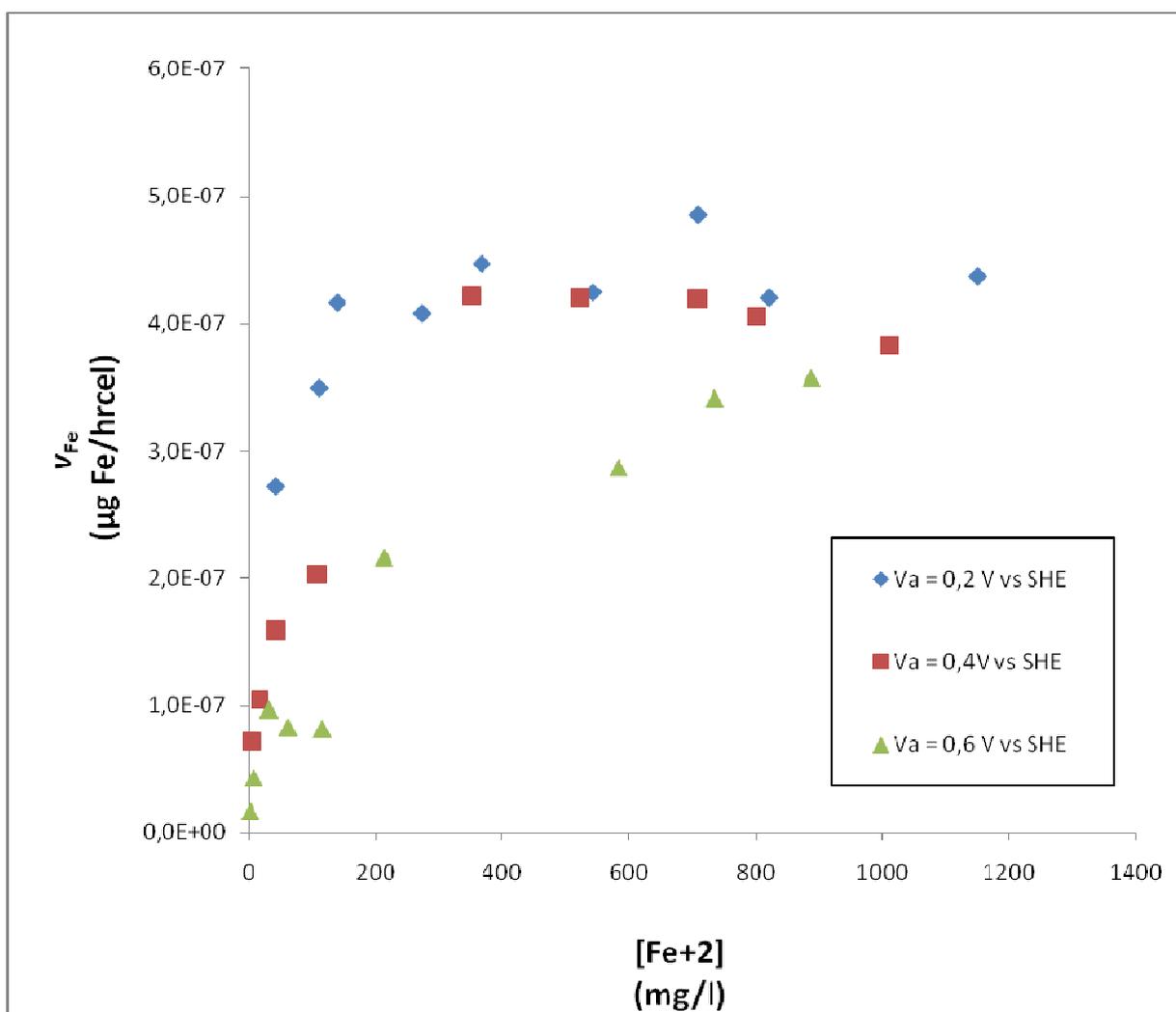


Figura 5.5: Velocidad específica de oxidación en función de la concentración de ion ferroso.

Tabla 5.1: Efecto del potencial aplicado sobre la velocidad de oxidación y el potencial redox establecido en la solución.

V _a (V vs SHE)	[Fe+2] (mg/l)	V _{Fe+2} (µg Fe/hr.cel)	E _h (V vs SHE)
0,200	43,56	2,72E-07	0,654
0,400	43,00	1,59E-07	0,692
0,600	32,09	9,73E-08	0,718
0,200	112,34	3,49E-07	0,633
0,400	107,73	2,03E-07	0,685
0,600	115,76	8,19E-08	0,694
0,200	543,36	4,25E-07	0,593
0,400	522,34	4,20E-07	0,604
0,600	583,23	2,87E-07	0,648

En la Figura 5.6 se presentan las mediciones de la velocidad específica de oxidación de ion ferroso por *Sulfobacillus acidophilus*, ahora en función del potencial redox establecido en la solución en el estado estacionario de cada prueba experimental. En esta figura se puede apreciar claramente que la velocidad de oxidación disminuye significativamente con el aumento del potencial redox.

Los resultados experimentales obtenidos muestran que la cinética de oxidación de ion ferroso con *Sulfobacillus acidophilus* depende significativamente de la concentración del ion ferroso y además del Eh de la solución, por lo que una adecuada modelación de la cinética del microorganismo debe considerar ambas variables en el modelo.

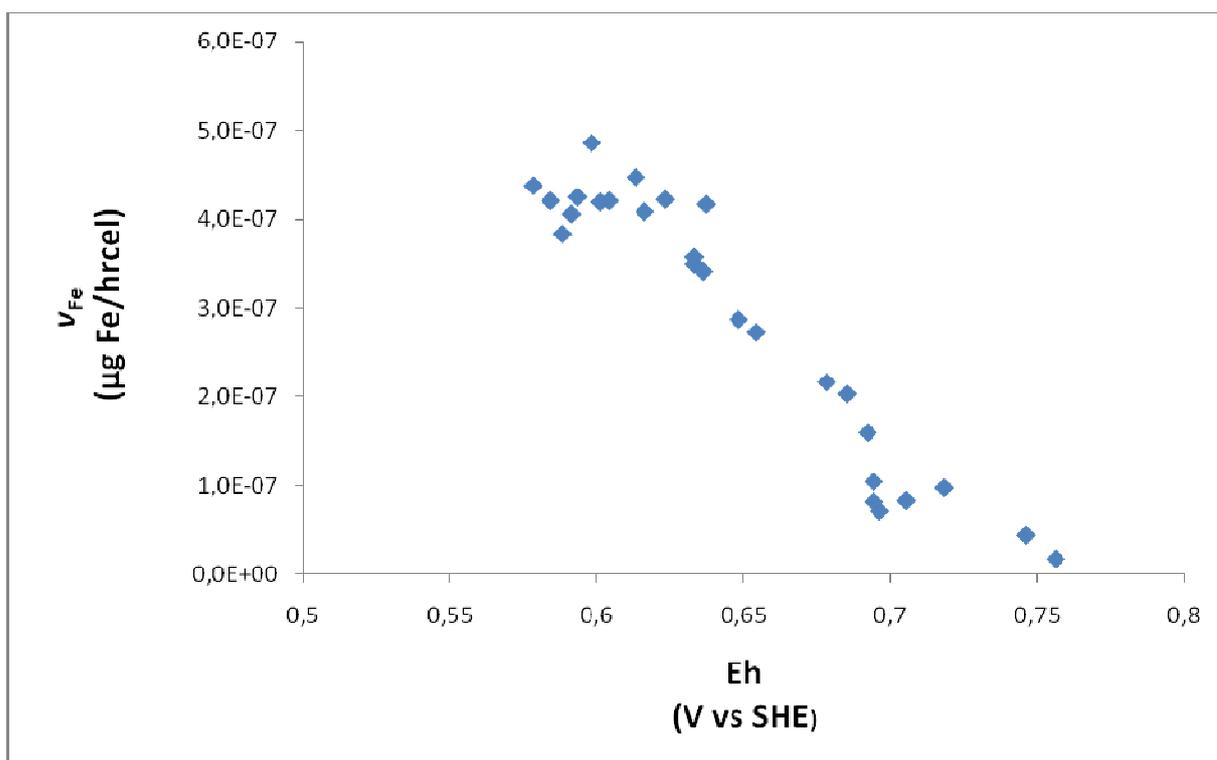


Figura 5.6: Velocidad específica de oxidación en función del potencial redox.

5.3 Estimación de parámetros

Con los datos experimentales obtenidos se realizó un ajuste de parámetros para tres modelos cinéticos de la oxidación de ion ferroso. Los parámetros se obtuvieron de acuerdo al método de los mínimos cuadrados, este busca minimizar la suma de los cuadrados de las diferencias ordenadas entre los datos experimentales y los generados por el modelo cinético. El método fue programado de acuerdo a cada modelo con el software MATLAB.

5.3.1 Ajuste para modelo de Michaelis-Menten con inhibición por producto.

El modelo cinético de Michaelis-Menten presentado en la ecuación (5.1) describe la velocidad específica de consumo de ion ferroso en función de las concentraciones del sustrato (ion ferroso) y del producto (ion férrico)

$$v_{Fe} = \frac{v_{Fe\max} [Fe^{2+}]}{K_s + [Fe^{2+}] + K_i [Fe^{3+}]} \quad (5.1)$$

Los valores de los parámetros obtenidos en el ajuste se presentan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2: Parámetros del modelo de Michaelis-Menten con inhibición por producto

Parámetro	Valor
K_s (mg/l)	1,628
K_i (-)	0,564
$v_{Fe\max}$ ($\mu\text{g Fe/hr.cel}$)	4,00 E-07

En la figura 5.7 se correlacionan los valores experimentales de V_{Fe} con los calculados utilizando la ecuación (5.1) y los parámetros ajustados del modelo ($R^2=0,969$).

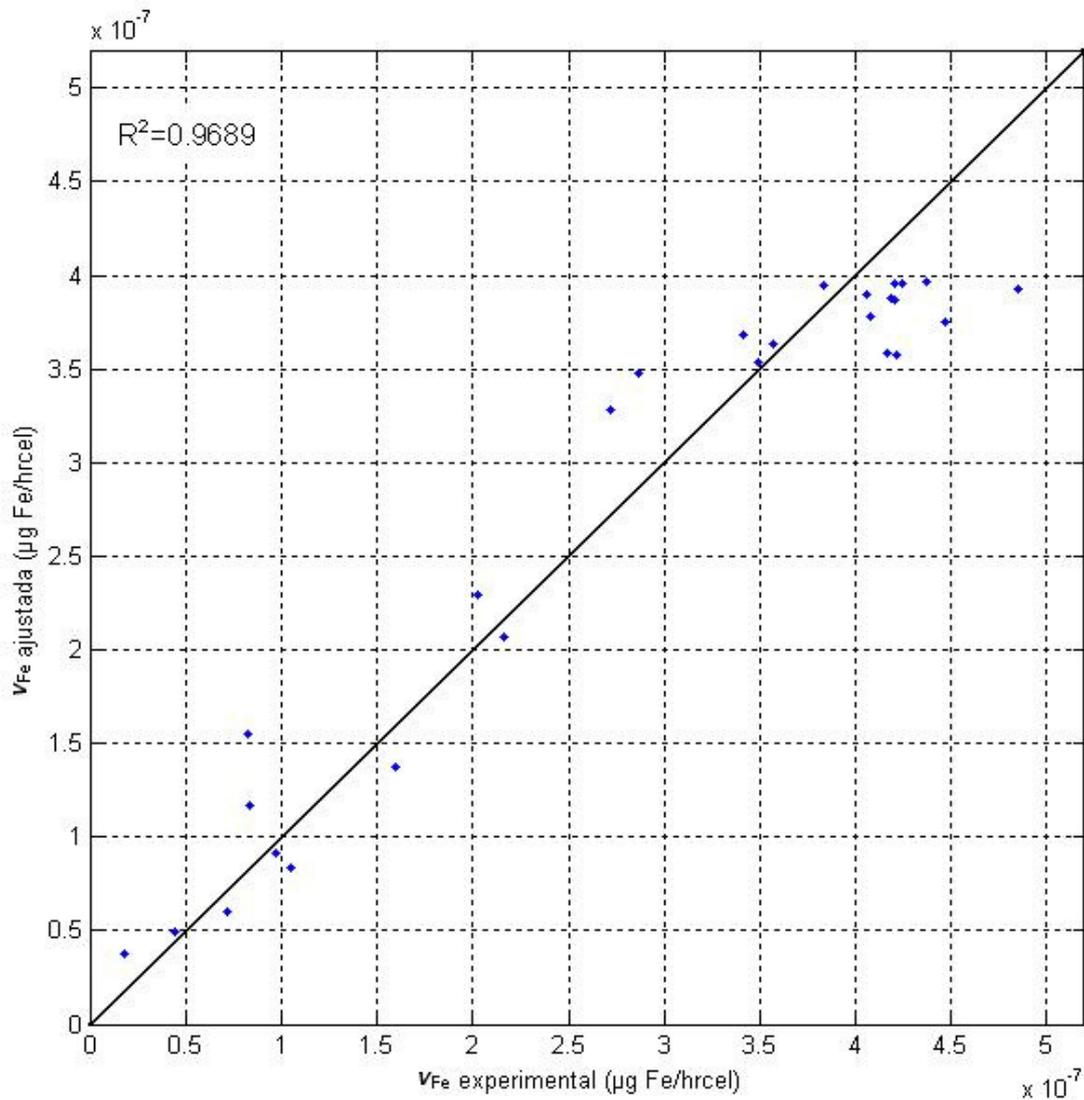


Figura 5.7: Correlación entre los valores ajustados y los experimentales de V_{Fe} para el modelo de Michaelis-Menten con inhibición por férrico.

5.3.2 Ajuste para modelo de Boon.

El modelo cinético formulado por M. Boon (1999) presentado en la ecuación (5.2) describe la velocidad específica de consumo ion ferroso en función de la razón de las concentraciones de los iones férrico y ferroso.

$$v_{Fe} = \frac{v_{Fe\ max}}{1 + \frac{K_s[Fe^{3+}]}{K_i[Fe^{2+}]}} \quad (5.2)$$

En la Tabla 5.3 se presentan los valores de los parámetros obtenidos en el ajuste realizado.

Tabla 5.3: Parámetros ajustados al modelo de M. Boon.

Parámetro	Valor
$K_s/K_i(-)$	0,5793
$V_{Fe\ max} (\mu g.Fe/hr.cel)$	3,98 E-07

En la figura 5.8 se presenta la correlación de los datos experimentales con los del modelo (5.2) ajustado con los parámetros calculados ($R^2=0,968$).

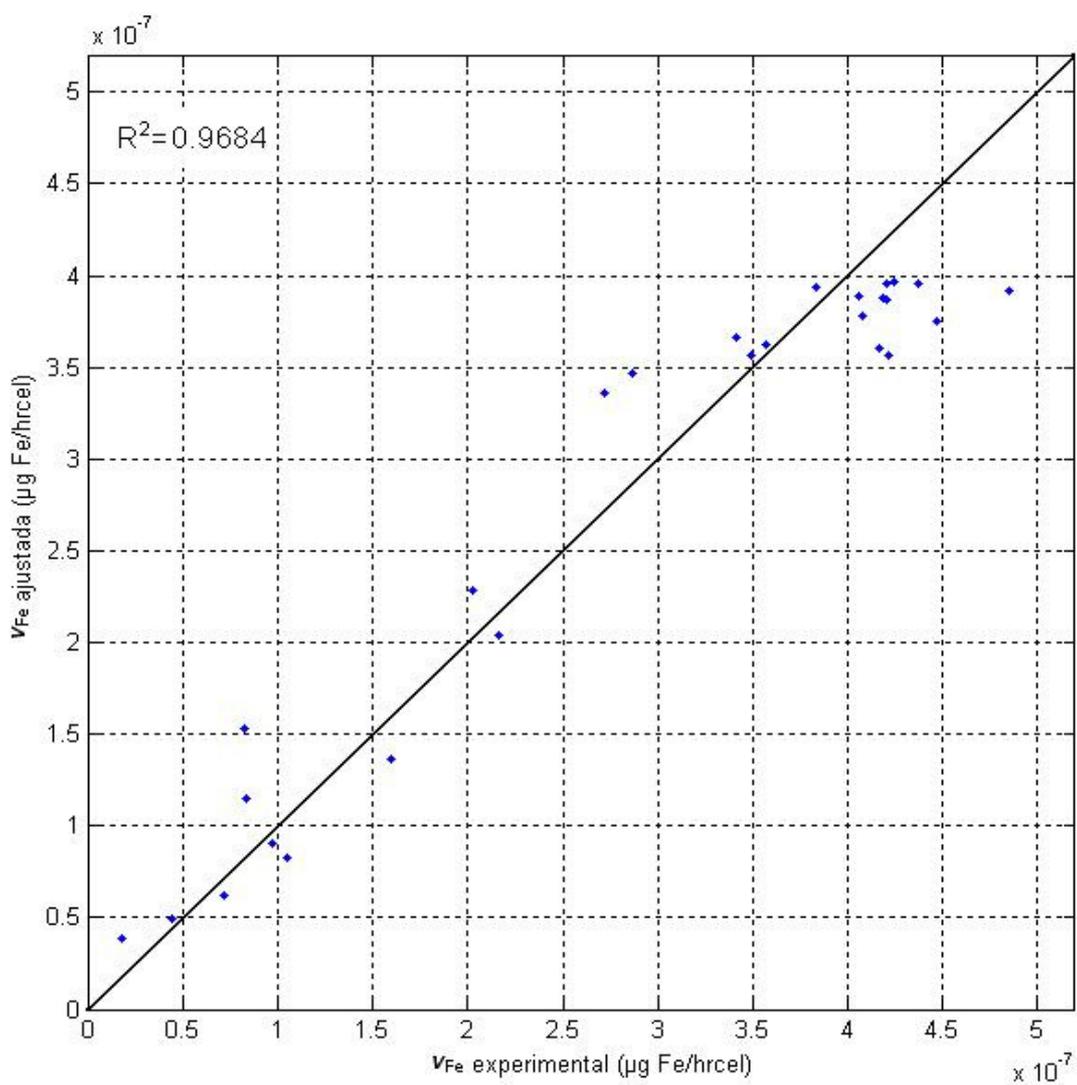


Figura 5.8: Correlación entre los valores ajustados y los experimentales de V_{Fe} para el modelo de Boon.

5.3.3 Ajuste para modelo de G. Meruane.

El modelo cinético de G. Meruane presentado en la ecuación (5.3) describe la velocidad específica de consumo ion ferroso en función de la concentración de ferroso y del potencial redox de la solución.

$$v_{Fe} = \frac{K_1 * \exp\left[\frac{nF}{2RT}(E^m - Eh^0)\right] * \{1 - \exp\left[\frac{-nF}{RT}(E^m - Eh)\right]\}}{1 + K_2 * \frac{1}{[Fe^{2+}]} + K_3 * \exp\left[\frac{nF}{RT}(Eh - Eh^0)\right]} \quad (5.3)$$

Los valores de los parámetros obtenidos en el ajuste se presentan en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4: Parámetros ajustados al modelo de G. Meruane con inhibición por producto

Parámetro	Valor
E^m (V vsSHE)	0,8261
K_1 ($\mu\text{g.Fe/hr cel}$)	2,54E-08
K_2 (mg/l)	14,783
K_3 (-)	0,599

En la figura 5.9 se presenta la correlación de los datos experimentales con los del modelo de Meruane ajustado con los parámetros calculados ($R^2=0,974$).

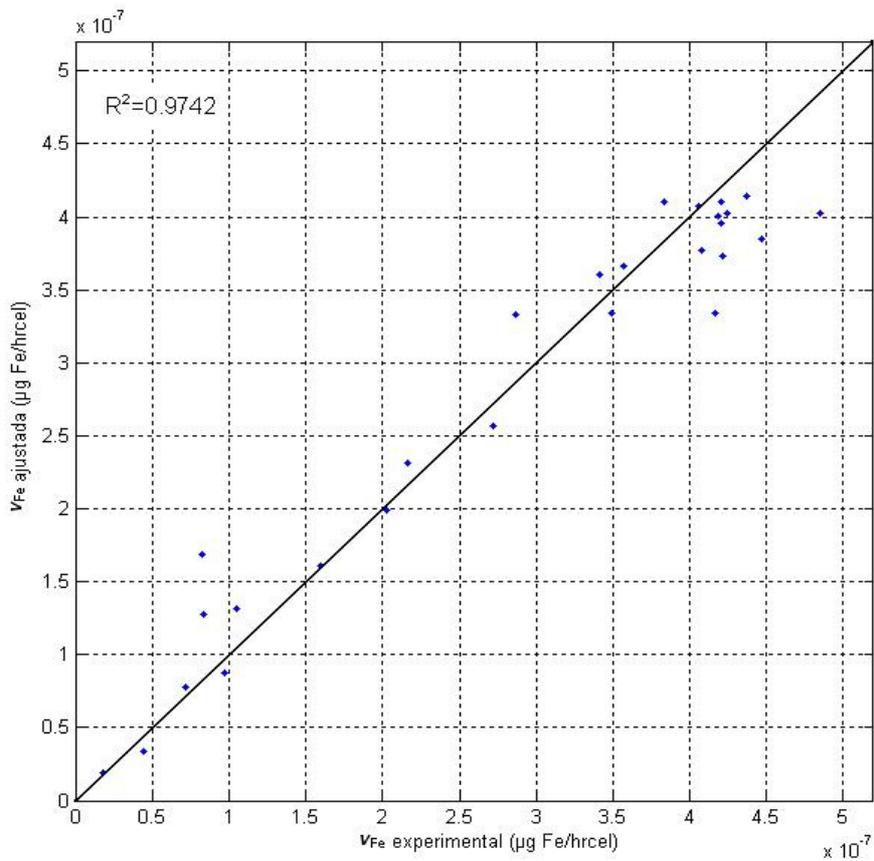


Figura 5.9: Correlación entre los valores ajustados y los experimentales de V_{Fe} para el modelo de Meruane.

5.3.4 Análisis de los parámetros obtenidos

Los tres modelos considerados en este trabajo muestran una adecuada descripción de los datos experimentales ($R^2 > 0,96$). Esto puede ser visualizado en las figuras (5.7), (5.8) y (5.9) de cada modelo que correlaciona los valores experimentales de V_{Fe} con los valores calculados utilizando el modelo cinético y los parámetros calculados correspondientes.

Para hacer más comprensibles los parámetros obtenidos se hacen las siguientes redefiniciones para el Modelo de G. Meruane:

$$V_{Fe\max} \cong K_1 * \exp\left[\frac{nF}{2RT} (E^m - Eh^0)\right], \quad K_s = K_2, \quad K_i = K_3$$

Dado lo anterior se presenta en la Tabla 5.5 un resumen de los parámetros obtenidos en los diferentes modelos.

Tabla 5.5: Resumen de los parámetros cinéticos de los modelos estudiados

Modelo	$v_{Fe\ max}$ ($\mu\text{g Fe/hr.cel}$)	K_s (mg/l)	K_i (-)	K_s/K_i (-)	E^m (V vs SHE)
Michaelis-Menten	4,00 E-07	1,628	0,564	-	-
Boon	3,98 E-07	-	-	0,5793	-
Meruane	4,27E-07	14,783	0,599	-	0,826

Se desprende de la tabla 5.5 que los valores encontrados de la tasa específica máxima de oxidación de ion ferroso son muy cercanos en cada modelo, además son similares a los valores máximos experimentales de v_{Fe} presentados en la Figura 5.5 donde se presentan los resultados de las series experimentales. Esto genera confianza en que la estimación de parámetros realizada sea correcta.

Los valores de las constantes K_s y K_i se relacionan con la afinidad a los iones ferroso y férrico respectivamente, menores valores de la constante K_s indican mayor afinidad por el ion ferroso mientras que mayores valores de K_i representan mayor afinidad por el ion férrico.

El parámetro K_s/K_i representa el efecto inhibitorio que produce la razón férrico/ferroso sobre la cinética de oxidación bacteriana, mayores valores de este parámetro indican mayor efecto inhibitorio.

El potencial de membrana E^m representa el potencial redox del lado periplasmático de la membrana celular, además de acuerdo a la expresión (5.3) se deduce que cuando el potencial redox de la solución (E_h) iguala al potencial de membrana, la velocidad de oxidación bacteriana de ion ferroso se hace cero. Es decir, E^m es el máximo E_h que puede ser alcanzado en solución al oxidar ion ferroso.

El valor obtenido del potencial de membrana E^m puede ser relacionado con los estudios realizados de crecimiento de *Sulfobacillus acidophilus* en ion ferroso en este trabajo presentado en la sección 5.1.1. En efecto, las mediciones de potencial redox realizadas en la etapa final de crecimiento para los cultivos del microorganismo en ion ferroso alcanzaron siempre valores cercanos al potencial de membrana calculado 0,826 V vs SHE.

5.4 Comparación de los resultados con otra información experimental

Los modelos cinéticos caracterizados en la sección anterior permiten establecer comparaciones cualitativas entre diferentes microorganismos. A continuación se comparan los valores de los parámetros obtenidos en este trabajo que caracterizan la cinética de oxidación de ion ferroso por *Sulfobacillus acidophilus* con los resultados de otros trabajos presentados en la literatura para *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Boon *et al.* modelaron la cinética de oxidación de ion ferroso de acuerdo a la expresión (5.2), en su trabajo (Boon *et al.*, 1999c) obtuvieron un valor del parámetro $K_s/K_i = 0,08 \pm 0,02$ para *Acidithiobacillus ferrooxidans*, valor 7 veces menor al obtenido aquí para

el microorganismo estudiado. Esto indica que la velocidad de oxidación de ion ferroso se ve más inhibida por la razón férrico/ferroso para *Sulfobacillus acidophilus* que para *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Cabe destacar que las mediciones experimentales realizadas en el trabajo de Boon *et al.* fueron realizadas en cultivos batch que carecían del control del potencial electroquímico efectuado en este trabajo.

El modelo de G. Meruane basado en aspectos electroquímicos de la ecuación (5.3), fue ajustado por el mismo autor (Meruane *et al.*, 2002) para describir la cinética de oxidación de ferroso por *Acidithiobacillus ferrooxidans* utilizando el mismo montaje experimental que este trabajo, en la Tabla 5.6 se presentan los resultados que obtuvo junto con los resultados de este trabajo para *Sulfobacillus acidophilus*.

Tabla 5.6: Parametros del Modelo de Meruane para *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Sulfobacillus acidophilus*

Microorganismo	E^m (V vs SHE)	K_1 ($\mu\text{g.Fe/hr cel}$)	K_2 (mg/l)	K_3 (-)
<i>A. ferrooxidans</i>	0,839	1,594E-07	73,128	0,641
<i>S. acidophilus</i>	0,8261	2,54E-08	14,783	0,599

Para una comprensión íntegra de los parámetros que caracterizan cada microorganismo se presentan en la Figura 5.10 las velocidades específicas de oxidación de ion ferroso para *Sulfobacillus acidophilus* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* en función del Eh de la solución para cuatro valores diferentes de concentración de ion ferroso, calculadas a partir del modelo cinético de Meruane con los parámetros de la Tabla 5.6

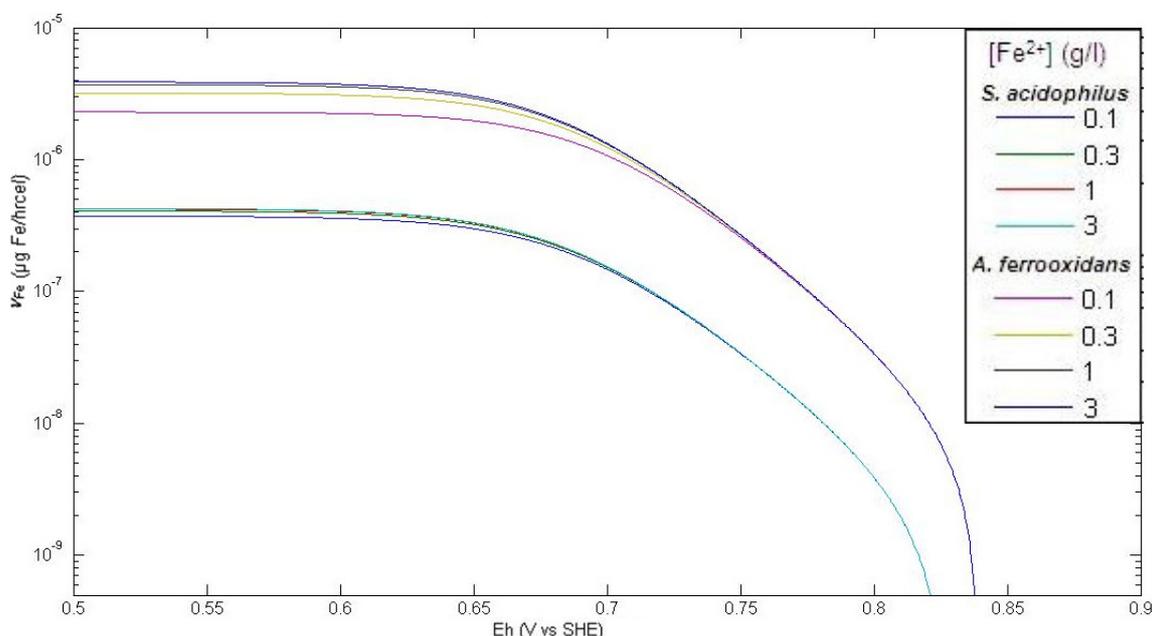


Figura 5.10: Dependencia de la velocidad de oxidación de ion ferroso con el Eh y la concentración de ion ferroso para *Sulfobacillus acidophilus* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Al comparar las curvas de la Figura 5.10 y los parámetros de la Tabla 5.6 se pueden realizar las siguientes observaciones:

Las curvas cinéticas de ambos microorganismos siguen la misma tendencia, es decir se observa una dependencia similar del Eh en cada caso, sin embargo los valores de la velocidad de oxidación son diferentes. En las curvas de la figura 5.10 se pueden observar zonas caracterizadas por distinto comportamiento. En la zona de Eh bajo 0,65 (V vs SHE), la velocidad de oxidación depende principalmente de la concentración de ion ferroso en solución y prácticamente no varía con el Eh, en esta zona la cinética de oxidación de ion ferroso se puede simplificar a una expresión cinética del tipo Monod estándar. Para potenciales mayores a 0,65 (V vs SHE) los valores del Eh comienzan a tomar peso en el modelo disminuyendo la velocidad de oxidación, pero la concentración de ion ferroso sigue siendo importante en el modelo. Para potenciales mayores a 0,80 (V vs SHE) la cinética de oxidación de ion ferroso parece ser controlada exclusivamente por el Eh de la solución, en efecto el modelo cinético queda predominantemente determinado por la diferencia entre el potencial de membrana y el Eh.

Los valores máximos alcanzados de velocidad de oxidación de ion ferroso por *Acidithiobacillus ferrooxidans* son un orden de magnitud mayor ($\sim 10^{-6}$ ($\mu\text{g. Fe/hr cel}$)) que los alcanzados por *Sulfobacillus acidophilus* (10^{-7} ($\mu\text{g. Fe/hr cel}$)). De hecho para un valor de Eh dado, la velocidad de oxidación de ion ferroso siempre es mayor para *Acidithiobacillus ferrooxidans*, este resultado señala que el uso del microorganismo *Sulfobacillus acidophilus* en procesos industriales de biolixiviación a temperaturas de operación cercanas a 45 °C no presenta ventajas cinéticas sobre la biolixiviación industrial a temperaturas cercanas a 30 °C llevada a cabo por *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

El Eh de máxima inhibición es similar para ambos microorganismos, si bien el valor de E^m para *Sulfobacillus acidophilus* es levemente menor esta diferencia no supera el 2%. Esto indica que ambos microorganismos alcanzan sus máximos niveles de inhibición a altos valores del potencial redox de la solución.

La afinidad hacia el ion ferroso es mayor en *Sulfobacillus acidophilus*. Esto se desprende de que el valor de K_2 para *Sulfobacillus acidophilus* es casi 5 veces menor al de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, este hecho también se observa en la Figura 5.10 en la zona de Eh menores a 0,65 (V vs SHE), en efecto las curvas presentadas para cada valor de concentración de ion ferroso son más cercanas unas a otras para *Sulfobacillus acidophilus* que para *Acidithiobacillus ferrooxidans*, lo cual denota la menor dependencia del ion ferroso en la cinética de oxidación.

La inhibición por ion férrico es similar para ambos microorganismos. En efecto el parámetro K_3 no difiere en más de un 7% entre *Sulfobacillus acidophilus* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*, este parámetro da cuenta de la inhibición ejercida por el ion férrico al formar complejos con los sitios catalíticos de la bacteria.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

Se ha verificado mediante cultivos de *Sulfobacillus acidophilus* en ion ferroso, y azufre elemental, la actividad oxidativa de esta bacteria en dichos sustratos, pero no se ha podido confirmar el crecimiento del microorganismo cuando el sustrato es tetrionato.

Se ha utilizado como montaje experimental una celda electroquímica que permitió un control fino de las variables del sistema. Los resultados experimentales permitieron determinar que la cinética de oxidación de ion ferroso por *Sulfobacillus acidophilus* queda bien representada por el Modelo de Meruane que describe la cinética como función explícita del potencial redox de la solución y de la concentración de ion ferroso.

La velocidad de oxidación de ion ferroso de *Sulfobacillus acidophilus* puede ser representada como función exclusiva de la concentración de ion ferroso para valores de potencial redox menores a 0,65 (V vs SHE), para potenciales mayores a este valor la cinética es claramente dependiente del potencial redox debido al incremento de la concentración de ion férrico y se hace preciso representar la cinética a través de un modelo en función de la concentración de ion férrico o del Eh.

La dependencia de la cinética de oxidación de ion ferroso de *Sulfobacillus acidophilus* sigue un comportamiento similar a la de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, sin embargo la velocidad específica de oxidación alcanzada por *Sulfobacillus acidophilus* para un valor dado de potencial redox y concentración de ion ferroso es siempre menor en un orden de magnitud a la de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

REFERENCIAS

- Aguirre R., J.V. Wiertz and Ricardo Badilla-Ohlbaum. (1991). "An amperometric method for measuring iron oxidizing activity of *Thiobacillus ferrooxidans*". In. Bioleaching: From molecular biology to industrial applications. Eds: R. Badilla-Ohlbaum, T. Vargas and L. Herrera. Editorial Universitaria. Chile. Pp. 107-117.
- Bard, A. J. "Electrochemical methods: fundamentals and applications". New York, John Wiley.
- Boon M., H.J. Brassler, G.S. Hansford and J.J. Heijnen (1999a), "Comparison of the oxidation kinetics of different pyrites in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans* or *Leptospirillum ferrooxidans*", Hydrometallurgy Vol. 53 Pp.57-72.
- Boon M., T.A. Meeder, C. Thone, C. Ras and J.J. Heijnen (1999b), "The ferrous iron oxidation kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* in continuous cultures", Applied Microbiology and Biotechnology Vol 51. Pp. 820-826.
- Boon M., C. Ras and J.J. Heijnen (1999c), "The ferrous iron oxidation kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* in batch cultures", Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 51, Pp. 813-819.
- Bogdanova T., A. I. Tsaplina, T. F. Kondrat'eva, V. I. Duda, N. E. Suzina, V. S. Melamud, T. P. Tourova and G. I. Karavaiko (2006) *Sulfobacillus thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant, chemolithotrophic bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 56, Pp. 1039–1042
- Comisión Chilena del Cobre (2009), "Biolixiviación: Desarrollo actual y sus expectativas", Chile.
- De G.C., D.J. Oliver and B.M. Pesic (1997), "Effect of heavy metals on the ferrous iron oxidizing ability of *Thiobacillus ferrooxidans*", Hydrometallurgy, Vol. 44, Pp. 53-63.
- Galvez Avendaño, Sebastián Eduardo. "Cinética de Oxidación bacteriana del ion ferroso con *Leptospirillum ferrooxidans*, Estudio y comparación de cinética de oxidación entre *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* vía uso de celda electroquímica". Tesis (Ingeniero Civil en Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2005.
- Harvey P.I. and F.K. Crundwell (1997), "Growth of *Thiobacillus ferrooxidans*: a novel experimental design for batch growth and bacterial leaching studies", Applied and Environmental Microbiology Vol. 63, Pp. 2586-2592.
- Ingledew W.J. (1982), "*Thiobacillus ferrooxidans*: The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph", Biochimica et Biophysica Acta Vol. 683, Pp. 89-117.

- Ingledew V.J. (1986), "Ferrous iron oxidation by *thiobacillus ferrooxidans*", Biotechnology and Bioengineering Symp. N° 16, Pp. 23-33.
- Editors of International Journal of Systematic Bacteriology (1996), "Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB" International Journal of Systematic Bacteriology Vol. 46, Pp. 1189-1190
- Meruane Naranjo, Gabriel Eduardo (2002). "Oxidación bacteriana de sulfato ferroso con *Acidithiobacillus ferrooxidans*". Tesis (Doctorado en Ciencias de la Ingeniería mención Química). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas,
- Nemati M., S.T.L. Harrison, G.S. Hansford and C. Webb (1998), "Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: a review on kinetic aspects" Biochemical Engineering Journal Vol. 1, Pp. 171-190.
- Norris P. R., D. A. Clark, J. P. Owen and S. Waterhouse (1996) "Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp.nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria". Microbiology, Vol. 142, Pp. 775-783
- Salhe Leiva, María Carolina. "Evaluación de la inhibición bacteriana en soluciones de lixiviación industrial usando métodos bioelectroquímicos". Tesis (Ingeniero Civil Químico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 1999

APÉNDICE A: PROTOCOLOS

A.1 Determinación de la concentración de Fierro total por el método de la ortofenantrolina:

- Se diluye la muestra X veces a una concentración menor a 100 ppm
- Se toma 100 µl de la muestra diluida
- Se agregan 100 µl de hidroxilamina
- Se agita
- Se agregan 400 µl de orto-fenantrolina
- Se agita
- Se agregan 1,9 ml de agua destilada
- Se agita
- Se mide en espectrofotómetro UV-visible a 510 nm contra blanco
- Se aplica un factor de dilución 25*X para obtener el valor de la concentración de fierro total.

A.2 Determinación de la concentración de ion ferroso por el método de la ortofenantrolina:

- Se diluye la muestra X veces a una concentración menor a 100 ppm
- Se toma 100 µl de muestra diluida
- Se agregan 400 µl de orto-fenantrolina
- Se agita
- Se agregan 2 ml de agua destilada
- Se agita
- Se mide en espectrofotómetro UV-visible a 510 nm contra blanco
- Se aplica un factor de dilución 25*X para obtener el valor de la concentración de ion ferroso.

A.3 Recuento de bacterias

- Se Toman 8 μ l de muestra.
- Se coloca la muestra sobre una cámara Petroff-Hausser de 0,02mm de profundidad.
- Se ubica la cámara de recuento para ser observada en microscopio con aumento ocular de 10X y objetivo de 40X.
- Se cuentan las células presentes por cada cuadro de la cámara, en al menos cinco cuadros, si hay baja densidad celular se cuenta en los cuadrados grandes y si hay alta densidad celular en los pequeños.
- Se promedia el número de células por el numero de cuadros en que se realizó el conteo y se multiplica este valor por $1,25 \cdot 10^6$ o $2,00 \cdot 10^7$, según se haya realizado el recuento en los cuadros grandes o pequeños respectivamente
- El valor obtenido es la concentración (células/ml) que se encuentran aproximadamente en la muestra.

APÉNDICE B: RENDIMIENTO DE OXIDACIÓN DE ION FERROSO

El rendimiento de oxidación de ion ferroso, Y (bacterias/ μg de hierro oxidado), es calculado a partir de la siguiente expresión:

$$Y = \frac{N_f - N_i}{[\text{Fe}^{2+}]_i - [\text{Fe}^{2+}]_f} \quad (\text{B.1})$$

Donde los subíndices i , f se refieren al estado inicial y final del cultivo respectivamente, N es el número de bacterias en solución y $[\text{Fe}^{2+}]$ es la concentración de ion ferroso

Para evaluar la expresión anterior, se realizaron dos cultivos en ion ferroso con la composición indicada en el Capítulo 4. Se midió diariamente el Eh de la solución para determinar el estado final del cultivo, correspondiente al agotamiento del sustrato (Eh cercano a 800 mV). Además se midió el número de bacterias en el microscopio y la concentración de ion ferroso con el método de la ortofenantrolina al inicio y término del cultivo. Los valores de las mediciones se presentan a continuación:

Tabla B.1: Cultivos para determinar rendimiento de oxidación de ion ferroso

Tiempo (Días)	CULTIVO 1			CULTIVO 2		
	Eh (mv VS SHE)	N (bact)	$[\text{Fe}^{2+}]$ (mg/l)	Eh (mv VS SHE)	N (bact)	$[\text{Fe}^{2+}]$ (mg/l)
0	570	4,28E+08	2906,3	572	4,28E+08	2641,2
1	643	-	-	652	-	-
2	764	-	-	753	-	-
3	818	8,60E+09	11,76	811	1,20E+10	14,29

Utilizando la expresión (B.1) se calcularon los rendimientos para cada cultivo, obteniéndose $Y_1 = 2,8 \cdot 10^4$ (bact/ μg Fe^{2+}) $Y_2 = 4,4 \cdot 10^4$ (bact/ μg Fe^{2+}) y un rendimiento promedio igual a $3,6 \cdot 10^4$ (bact/ μg Fe^{2+}).

APÉNDICE C: SERIES EXPERIMENTALES A POTENCIAL CONTROLADO

Tabla C.1: Resultados y condiciones de series experimental a potencial controlado

Fe Total (mg/l)	Eh (V vs SHE)	Corriente (A)	Va (V vs SHE)	[bact] (cel/ml)	[Fe ³⁺]/[Fe ²⁺] (--)	[Fe+2] (mg/l)	[Fe+3] (mg/l)	VFe+2 (µg Fe/hrcel)
57,63	0,654	1,07E-03	0,200	8,19E+07	0,323	43,56	14,07	2,722E-07
135,28	0,633	1,48E-03	0,200	8,83E+07	0,204	112,34	22,94	3,493E-07
165,66	0,637	2,48E-03	0,200	1,24E+08	0,182	140,18	25,48	4,164E-07
299,55	0,616	1,62E-03	0,200	8,27E+07	0,094	273,82	25,73	4,082E-07
408,44	0,613	2,81E-03	0,200	1,31E+08	0,110	368,12	40,32	4,470E-07
549,67	0,593	1,83E-03	0,200	8,98E+07	0,012	543,36	6,31	4,246E-07
729,34	0,598	2,97E-03	0,200	1,28E+08	0,029	708,49	20,85	4,854E-07
834,23	0,584	1,92E-03	0,200	9,52E+07	0,016	821,48	12,75	4,203E-07
1165,21	0,578	1,95E-03	0,200	9,29E+07	0,014	1148,76	16,45	4,374E-07
51,79	0,696	4,85E-04	0,400	1,41E+08	9,442	4,96	46,83	7,162E-08
133,71	0,694	5,90E-04	0,400	1,18E+08	6,567	17,67	116,04	1,042E-07
185,43	0,692	1,42E-03	0,400	1,86E+08	3,312	43	142,43	1,591E-07
246,71	0,685	9,30E-04	0,400	9,55E+07	1,290	107,73	138,98	2,029E-07
422,91	0,623	2,90E-04	0,400	1,43E+07	0,204	351,36	71,55	4,218E-07
549,65	0,604	3,57E-04	0,400	1,77E+07	0,052	522,34	27,31	4,203E-07
743,59	0,601	3,87E-04	0,400	1,93E+07	0,051	707,34	36,25	4,189E-07
836,58	0,591	3,95E-04	0,400	2,03E+07	0,044	801,64	34,94	4,055E-07
1032,56	0,588	3,97E-04	0,400	2,16E+07	0,021	1011,32	21,24	3,830E-07
42,88	0,756	6,69E-05	0,600	8,00E+07	16,084	2,51	40,37	1,743E-08
102,36	0,746	1,14E-04	0,600	5,42E+07	12,208	7,75	94,61	4,390E-08
220,24	0,718	1,87E-04	0,600	4,01E+07	5,863	32,09	188,15	9,729E-08
323,39	0,705	3,14E-04	0,600	7,86E+07	4,262	61,46	261,93	8,314E-08
435,84	0,694	2,88E-04	0,600	7,33E+07	2,765	115,76	320,08	8,190E-08
564,43	0,678	3,45E-04	0,600	3,33E+07	1,646	213,32	351,11	2,161E-07
734,02	0,648	2,81E-04	0,600	2,04E+07	0,259	583,23	150,79	2,869E-07
845,32	0,636	3,43E-04	0,600	2,10E+07	0,151	734,43	110,89	3,413E-07
1043,34	0,633	4,11E-04	0,600	2,40E+07	0,176	887,32	156,02	3,570E-07