



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO DE OXIDACIÓN DE AZUFRE ELEMENTAL CON *SULFOLOBUS*
METALLICUS A 67°C

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO
E INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

RACHEL ELIZABETH PACHECO ARIAS

PROFESOR GUÍA:
DR. TOMÁS VARGAS VALERO

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
BLANCA ESCOBAR MIGUEL
DR. FRANCISCO GRACIA CAROCA

SANTIAGO – CHILE
MARZO - 2013

Resumen

VALE es la segunda compañía minera más grande en el mundo, lidera la producción de mineral de Hierro y pellets. La sede principal de la compañía se encuentra en Brasil y han requerido la asesoría del laboratorio de Biohidrometalurgia del Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología de la Universidad de Chile, pues desean investigar la factibilidad técnica y económica de la recuperación de fósforo desde minerales fosfatados utilizando procesos relacionados con la biohidrometalurgia.

Si bien el proyecto completo abarca muchas áreas, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar experimentalmente el mecanismo de oxidación de azufre elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67 °C para la producción de ácido sulfúrico.

Se realizaron tres experimentos. El experimento principal con el fin de estudiar la capacidad oxidativa de azufre elemental, por lo que se monitorearon variables como pH, acidez, concentración de sulfato y crecimiento celular durante 264 horas. El segundo experimento tenía por objetivo determinar la capacidad de adherencia inicial de las arqueas a las perlas de azufre elemental estériles, por lo que monitoreó la concentración celular por 2 horas. Luego, en el último experimento, se evaluó la influencia del pH inicial del medio sobre la capacidad oxidativa de las arqueas a través de la variación del pH.

Los resultados indicaron que las células poseen una gran capacidad oxidativa, en comparación con la reacción química. También se observó que tanto la producción de ácido sulfúrico como la conversión presentaron una tendencia lineal entre las 48 y las 216 horas de cultivo con un máximo de 9,1 [g/L] de ácido y un 29% de conversión del azufre elemental alcanzado a las 216 horas. Mediante análisis de turbidimetría del ión sulfato se observó un comportamiento exponencial inicial para alcanzar un valor relativamente constante de 3600 [g/L]. Los datos obtenidos para el crecimiento presentaron una tendencia exponencial, para posteriormente decaer e incluso desaparecer en el caso de las células planctónicas, al alcanzar un pH inferior a 1. La reacción estuvo controlada por la reacción química con un τ de 1818 horas. El experimento de adherencia inicial demostró que no es tan alta ($3,5 \times 10^6$ [células adheridas/cm²] equivalente al 53,2% a las 2 horas de cultivo), en comparación a la alcanzada con otros microorganismos, pero con el tiempo este valor aumenta considerablemente por la reproducción de las células. Finalmente en el tercer experimento se observó que la velocidad inicial de oxidación de las células aumentaba al disminuir el pH del medio inicial de cultivo, alcanzando $1,7 \times 10^{-5}$ [h⁻¹] con el medio de pH inicial 1. La biooxidación de azufre elemental ocurre mediante un mecanismo cooperativo, donde la concentración de células adheridas fue casi cinco veces mayor al de las células planctónicas.

El proceso de biooxidación de azufre requirió de la presencia células para que ocurriera, pero su actividad catalítica se vio limitada por la presencia de intermediarios, provenientes de la oxidación parcial del azufre elemental realizada por las células, y por la alta acidez del medio, proveniente de la misma reacción. A pesar de esto, por la conversión alcanzada y la alta eficiencia del ácido sulfúrico como agente lixiviante de minerales fosfatados, este proceso debe ser estudiado, y con mayor información evaluar la factibilidad de su implementación en las operaciones de VALE.

Agradecimientos

Primero quiero agradecer a mis padres por su amor, entrega, comprensión y apoyo incondicional en esta etapa y en mi vida en general. También a mi hermano, abuelos, tíos y primos por el cariño, los cuidados y los maravillosos momentos compartidos.

Por su amistad y el apoyo incondicional, sobre todo en los momentos difíciles quiero agradecer a Elizabeth, Natalia y Pía.

Deseo agradecer a mi profesor guía Dr. Tomás Vargas por su buena disposición, preocupación y paciencia durante este trabajo. En conjunto a mi profesora co-guía Blanca Escobar por su comprensión, preocupación y buena disposición.

Es imprescindible agradecer a mis compañeros de universidad, en particular a los del departamento por hacer de esta etapa una de las más lindas de mi vida y haberme permitido compartir experiencias que me han ayudado a crecer académica y personalmente.

No puedo dejar de agradecer a las personas del laboratorio de biohidrometalurgia, en especial a la Sra. Emma por su buena disposición, paciencia y cariño.

Finalmente quiero agradecer al área de comunicaciones y de difusión colegios por la oportunidad que me dieron de participar en tantos proyectos y desafíos, permitiéndome conocer personas muy especiales que me han enseñado a desarrollar muchas habilidades que jamás pensé tener, brindándome todo el cariño, contención y apoyo que he necesitado, además de muchísimos momentos felices.

Tabla de contenido

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Antecedentes generales..... | 1 |
| 1.2. Azufre elemental..... | 2 |
| 1.3. Biooxidación de azufre | 5 |
| 1.4. Mecanismos de biolixiviación | 7 |
| 1.5. Microorganismos presentes en los procesos de biominería | 10 |
| 1.6. Características de <i>Sulfolobus metallicus</i> | 12 |
| 2. Motivación y justificación del proyecto..... | 13 |
| 3. Objetivos | 14 |
| 3.1. Objetivos Generales..... | 14 |
| 3.2. Objetivos Específicos..... | 14 |
| 4. Metodología..... | 15 |
| 4.1. Metodología experimental..... | 15 |
| 4.2. Diseño del experimento de oxidación de azufre elemental | 16 |
| 4.2.1. Cultivo de arqueas en perlas de azufre elemental..... | 16 |
| 4.2.2. Experimento de control para la oxidación de azufre elemental en perlas..... | 16 |
| 4.3. Análisis químicos..... | 17 |
| 4.3.1. Determinación de sulfato en solución por turbidimetría | 17 |
| 4.3.2. Medición de pH a 67°C..... | 17 |
| 4.4. Análisis biológicos | 18 |
| 4.4.1. Determinación de la capacidad de adherencia celular a la superficie | 19 |
| 4.4.2. Recuento de células planctónicas y adheridas a la superficie de las perlas mediante tinción con DAPI | 19 |
| 4.5. Efecto del pH inicial del medio Norris en la evolución del pH durante el cultivo de <i>Sulfolobus metallicus</i> sobre perlas de azufre elemental a 67°C..... | 18 |
| 5. Resultados..... | 22 |
| 5.1. Capacidad de adherencia inicial de <i>Sulfolobus metallicus</i> sobre perlas de azufre elemental | 22 |
| 5.2. Oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico con <i>S. metallicus</i> a 67°C..... | 23 |
| 5.3. Efectos del pH inicial del medio Norris en la evolución del pH durante el cultivo de <i>Sulfolobus metallicus</i> sobre perlas de azufre elemental a 67°C..... | 33 |
| 6. Discusión | 35 |
| 6.1. Capacidad de adherencia inicial de <i>Sulfolobus metallicus</i> sobre perlas de azufre elemental | 35 |
| 6.2. Oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico con <i>S. metallicus</i> a 67°C..... | 36 |
| 6.3. Influencia del pH inicial del medio en la capacidad oxidativa de <i>Sulfolobus metallicus</i> en perlas de azufre elemental a 67°C..... | 44 |

| | |
|--|----|
| 7. Conclusiones..... | 46 |
| 8. Recomendaciones..... | 48 |
| 9. Bibliografía..... | 49 |
| 10. Anexos | 53 |
| A. Implementación de metodología para la obtención de esferas o perlas de azufre..... | 53 |
| B. Modelo del núcleo sin reaccionar | 54 |
| C. Células planctónicas y adheridas a las perlas de azufre elemental..... | 57 |
| D. Efecto de la granulometría en la capacidad oxidativa de <i>Sulfolobus metallicus</i> en perlas de azufre elemental a 67°C | 58 |
| E. Titulación para determinar la concentración de protones | 59 |

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Estados de oxidación del azufre con sus respectivos compuestos..... | 3 |
| Tabla 2: Características y condiciones de cultivo de <i>Sulfolobus metallicus</i> | 12 |
| Tabla 3: Masa total, Densidad y Área total de Azufre disponible para la adherencia celular de <i>Sulfolobus metallicus</i> a 67 °C..... | 31 |
| Tabla 4: Capacidad oxidativa de <i>S. metallicus</i> a las 24 horas de cultivo en medio de pH inicial de 3; 1,7; 1,5 y 1..... | 44 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Mecanismos de biolixiviación para sulfuros metálicos. (Tributsch H., 2001)..... | 7 |
| Figura 2: Esquema de lixiviación por contacto, donde <i>A. ferrooxidans</i> acondiciona activamente la interfase con la pirita produciendo material polimérico extracelular (Tributsch, 2001)..... | 8 |
| Figura 3: Mecanismo Indirecto del Tiosulfato en sulfuros metálicos para <i>A. ferrooxidans</i> , <i>L. ferrooxidans</i> y <i>A. thiooxidans</i> (Sand W. et al., 2001)..... | 9 |
| Figura 4: Mecanismo Indirecto del Polisulfato en sulfuros metálicos para <i>A. ferrooxidans</i> , <i>L. ferrooxidans</i> y <i>A. thiooxidans</i> (Sand W. et al., 2001)..... | 10 |
| Figura 5: Fotografías en el microscopio de epifluorescencia de una sección de filtro con células planctónicas de un cultivo de oxidación de perlas de azufre elemental con <i>Sulfolobus metallicus</i> a 67°C, las que fueron teñidas mediante tinción DAPI y observadas al microscopio. En esta fotografía es posible visualizar el filtro con el fondo azul y las arqueas de color azul brillante y forma esferas. La primera fotografía (a) corresponde a una etapa inicial del cultivo, por lo que es posible apreciar una gran cantidad de células planctónicas, que van aumentando con el tiempo como se puede apreciar en la fotografía (b)..... | 29 |
| Figura 6: Fotografías en el microscopio de epifluorescencia de perlas de azufre elemental con <i>Sulfolobus metallicus</i> a 67°C, las que fueron teñidas mediante tinción DAPI y observadas al microscopio. En estas fotografías es posible visualizar las arqueas de color azul brillante y forma de esferas como se puede ver en (a), además de observar que crecen agrupadas y en ciertas zonas del azufre como se puede apreciar en (b)..... | 31 |
| Figura 7: Esquema del proceso de biooxidación de azufre elemental a sulfato, mediado por la presencia de intermediarios..... | 40 |
| Figura 8: Esquema del modelo de núcleo sin reaccionar, en que la el núcleo va disminuyendo su tamaño mientras avanza la reacción a través del sólido (Levenspiel O., 1993)..... | 54 |

1. Introducción

1.1. Antecedentes generales

VALE es la segunda compañía minera más grande en el mundo, lidera la producción de mineral de Hierro y pellets, además de ser la segunda productora de Níquel y estar entre los más grandes productores de Manganeso y aleaciones de Hierro. También investiga la producción y comercialización de Cobre, Carbón, Potasio, fertilizantes, Cobalto, metales del grupo Platino y metales preciosos. La sede principal de la compañía se encuentra en Brasil, sin embargo, posee sucursales alrededor del mundo, en 38 países (VALE).

Esta empresa requirió de la asesoría del laboratorio de Biohidrometalurgia del Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología de la Universidad de Chile, pues desean investigar sobre la factibilidad técnica y económica de la recuperación de fósforo desde residuos fosfatados utilizando procesos relacionados a la hidrometalurgia, principalmente biolixiviación. Si bien el proyecto completo abarca desde la producción del agente lixivante hasta la recuperación de fósforo desde el mineral, el objetivo de este trabajo es realizar un estudio de la cinética de oxidación del azufre elemental con la arquea *Sulfolobus metallicus* a 67 °C, con el fin de producir ácido sulfúrico agente lixivante.

La biolixiviación consiste en la solubilización de metales desde minerales en la presencia de un medio ácido, que actúa como agente lixivante y es catalizada por microorganismos. Estos microorganismos utilizan el mineral en su metabolismo, específicamente en la transferencia de electrones, liberando metales y calor sin necesidad del uso de alguna energía externa (Rodríguez et al., 2001). Es una tecnología probada que ha sido aplicada en numerosos procesos, principalmente en la recuperación de metales valiosos como cobre, uranio y oro, desde minerales sulfurados de baja ley y refractarios (Pina P. et al, 2010).

A pesar de la gran cantidad de estudios, existen pocos relacionados con la cinética de oxidación de azufre, pues la mayoría se enfoca en la cinética de oxidación del ión ferroso.

En el marco del proyecto, el ácido sulfúrico representa el mejor agente lixivante producido por microorganismos, pues su eficiencia en la disolución de fósforo desde minerales de hierro con alta concentración de fósforo versus la eficiencia que presentan otros ácidos orgánicos es mucho mayor (Wang J. et al, 2010).

La demanda de ácido sulfúrico a nivel mundial se encuentra en alza, siendo la industria de los fertilizantes fosfatados el mayor consumidor a nivel mundial. Se determinó que para el año 2005 la industria de los fertilizantes fosfatados utilizó aproximadamente 195 millones de toneladas ácido sulfúrico (60% del total consumido mundialmente durante el año 2005) para producir ácido fosfórico y otros productos asociados a la elaboración de fertilizantes. Países como China, Marruecos, Túnez, Egipto, Arabia Saudita y Vietnam han aumentado fuertemente la demanda de ácido

sulfúrico, asociada al desarrollo de la industria de los fertilizantes. La industria química se adjudica el segundo lugar en la demanda de ácido sulfúrico, seguida por la industria de la minería, que posee una creciente demanda.

La producción del ácido se realiza principalmente (71% de la producción anual durante el 2005) en plantas de tostación directa para azufre elemental o para pirita. También existen plantas de producción del ácido para satisfacer la demanda en alguno de los procesos productivos evitando así la necesidad de transporte y de almacenamiento. La principal fuente de azufre es la obtenida de la separación de petróleo y gas natural, luego se encuentra el uso de pirita y finalmente el uso de azufre elemental de origen natural. Otra forma de producción de ácido sulfúrico ocurre en las plantas integradas a fundiciones de metales básicos y otros procesos generadores de gases sulfurados, que deben ser removidos para el cumplimiento de las normativas ambientales. Finalmente el resto de la producción proviene de subproductos industriales y de la regeneración del ácido previamente utilizado.

En Brasil existe un déficit en aumento del ácido (530 millones de toneladas del ácido en el año 2005), razón por la cual este producto debe ser importado. Luego la generación de nuevas tecnologías para la obtención del ácido se presenta como una real propuesta (COCHILCO, 2006).

La producción de ácido sulfúrico mediada por microorganismos ocurre por la oxidación de azufre elemental o compuestos sulfurados. Las bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* han sido utilizadas convencionalmente para procesos de biolixiviación. Sin embargo, últimamente la atención se ha volcado a los procesos que ocurren a alta temperatura (60-80 °C) en presencia de microorganismos termófilos como las arqueas *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus metallicus*, *Acidianus brierleyi* y *Metallosphaera sedula* (Nemati M. y Harrison S.T.L., 2000).

Como la biolixiviación de minerales sulfurados ocurre con un aumento de temperatura, es óptima la utilización de microorganismos termófilos, pues permiten alcanzar un mayor grado de disolución de los minerales comparados con los microorganismos mesófilos (Stott et al, 2003).

1.2. Azufre elemental

La química del azufre es bastante compleja por la cantidad y diversidad de estructuras moleculares que es capaz de formar, los distintos tipos de anillos y formas poliméricas que es capaz de adoptar el azufre elemental, y además de las valencias que tiene, con sus respectivos estados de oxidación (Meyer B., 1976).

El azufre es un elemento no metálico del grupo VI, electronegativo, que posee nueve estados de oxidación entre -2 y +6, y su mayoría en sistemas acuosos (Tabla 1). El equilibrio entre los compuestos de azufre en un sistema acuoso, depende del potencial redox, el valor de pH, la temperatura, y la concentración, siendo los

compuestos más estables el sulfuro de hidrogeno (HS^-), azufre elemental (S_8) y sulfato (SO_4^{-2}) o sulfato ácido (HSO_4^-) (Andrews D. y Kokes R., 1965; Steudel R., 2000).

Tabla 5: Estados de oxidación del azufre con sus respectivos compuestos.

| Estado de Oxidación | Compuestos |
|---------------------|--|
| -2 | Ácido sulfhídrico (H_2S), ion sulfuro de hidrógeno (HS^-), ion sulfuro (S^{-2}) |
| -1 | Disulfano(H_2S_2), disulfuro(S_2^{-2}), polisulfuros ($^-\text{S}-\text{S}_n-\text{S}^-$), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$) |
| 0 | azufre elemental (S_n), polisulfanos orgánicos ($\text{R}-\text{S}_n-\text{R}$), politionatos ($^-\text{O}_3\text{S}-\text{S}_n-\text{SO}_3^-$) |
| +1 | Diclorurodisulfano ($\text{Cl}-\text{S}-\text{S}-\text{Cl}$) |
| +2 | Dicloruro de azufre(SCl_2), sulfoxilato (SO_2^{-2}) |
| +3 | Ditionito ($\text{S}_2\text{O}_4^{-2}$) |
| +4 | Dióxido de azufre (SO_2), sulfito (SO_3^{-2}), bisulfito (HSO_3^-) |
| +5 | Ditionato ($\text{S}_2\text{O}_6^{-2}$), sulfonato (RSO_3^-) |
| +6 | Trióxido de azufre (SO_3), sulfato (SO_4^{-2}), peroxosulfato (SO_5^{-2}) |

Los compuestos inorgánicos de azufre más comunes en la naturaleza son: el sulfuro de hidrogeno (HS^-), polisulfuros ($^-\text{S}-\text{S}_n-\text{S}^-$), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$), politionatos ($^-\text{O}_3\text{S}-\text{S}_n-\text{SO}_3^-$), azufre elemental (S_0), bisulfito (HSO_3^-) y sulfato (SO_4^{-2}). Sin embargo, para este trabajo los compuestos más importantes son los compuestos reducidos y si bien existe una gran cantidad sólo se mencionarán los más relevantes.

Al ser un elemento no metálico puede formar dos o más estructuras moleculares distintas (alotropía). En condiciones normales de temperatura el azufre forma estructuras moleculares que contienen 8 átomos unidos formando un anillo (ciclo-octaazufre). Según las condiciones físicas del sistema en el que se encuentre el azufre sólido puede presentar dos posibles formas, que son cristales de azufre rómbico y cristales de azufre monoclinico.

Azufre rómbico

Es la única forma estable del azufre a temperaturas inferiores a los 96 °C. Todas las demás formas se transforman a esta variedad si se mantienen en estas condiciones. El azufre rómbico es un sólido cristalino amarillo, de densidad 2,06 [g/cm^3] y punto de fusión a 112,8 °C, valor que varía a 114,5 °C en caso de ser una mezcla de azufre rómbico con monoclinico.

Entre 96 °C y 112,8 °C pasa a la variedad monoclinica. El azufre rómbico es insoluble en agua, poco soluble en alcohol y éter, es más soluble en aceites, y muy soluble en sulfuros de carbono. Pueden obtenerse cristales perfectos de azufre con una evaporación lenta de una disolución de azufre en sulfuro de carbono a la temperatura de 25°C.

Azufre monoclinico

Esta forma de azufre se obtiene cuando se enfría lentamente el azufre fundido y antes de que solidifique se dispersa la parte líquida, obteniéndose un conjunto de largas agujas transparentes de azufre monoclinico. La densidad de esta variedad de azufre es $1,96 \text{ [g/cm}^3\text{]}$, el punto de fusión es de $119,3 \text{ }^\circ\text{C}$, y es soluble en sulfuro de carbono.

Cuando el azufre monoclinico se deja a temperatura normal, los cristales transparentes se vuelven opacos, por pasar a la variedad rómbica, convirtiéndose en agregados en forma de agujas de microscópicos cristales de azufre rómbico. El equilibrio entre el azufre monoclinico y el azufre rómbico ocurre a una temperatura de $96 \text{ }^\circ\text{C}$, conocida también como temperatura de transición.

El azufre se combina directamente con la mayoría de los elementos para formar sulfuros y en algunos casos requiere calor. Se une a todos los metales con excepción del oro y del platino. En presencia del aire húmedo se oxida lentamente transformándose en ácido sulfúrico.

Es uno de los elementos más necesarios en la naturaleza y los microorganismos son fundamentales en el ciclo del azufre. Los microorganismos acidófilos que oxidan azufre son capaces de oxidar compuestos de azufre reducidos como parte de su metabolismo, haciendo posible la recuperación de metales de valor desde minerales sulfurados de baja ley (He H. et al., 2011).

Estudios revelan que antes de que ocurra el proceso de biooxidación del azufre elemental con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, este es convertido a azufre polimérico y a ciclo-octa azufre (S_8), con una concentración de azufre del 62,8 y del 37,2% respectivamente. Además se piensa que el ciclo-octaazufre es necesariamente convertido a azufre polimérico para posteriormente ser oxidado (He H. et al., 2011).

El azufre elemental se puede presentar en suspensión, como agregado o como cristales, y en metales sulfurados puede formar capas en la superficie, impidiendo o dificultando la velocidad de difusión de los iones y el oxígeno, además de alterar las propiedades electroquímicas de los sulfuros (Fowler T. y Crundwell, 1999).

Sólo es oxidado por microorganismos acidófilos que utilizan el azufre como fuente de energía, ya que este compuesto es inerte a oxidaciones abióticas en medio ácidos (Rohwerder et al., 2003).

La producción de ácido sulfúrico mediante la oxidación del azufre elemental o compuestos de azufre reducidos está dada por la necesidad de regenerar los protones consumidos en la primera etapa de la vía o mecanismo de los polisulfuros, con la ayuda de los compuestos azufre oxidantes que influyen la cinética de lixiviación (Rohwerder et al., 2003).

1.3. Biooxidación de azufre

La biooxidación es una variante del proceso de biolixiviación, pues ocurre cuando el mineral no puede ser solubilizado directamente por los microorganismos, sin embargo, su presencia permite la recuperación de este mediante la solubilización de la matriz en la que se encuentra atrapado (Donati E., 2006).

Es un fenómeno variable, representado por una sucesión de etapas fuertemente influenciadas por la temperatura, pH y el potencial redox; razón por la cual, para cada mineral puede existir un control bioquímico específico. Otras de las variables que pueden afectar este proceso son el crecimiento de microorganismos, cantidad de mineral y fenómenos como la corrosión (Mustin et al., 1992).

Existen microorganismos procariontes capaces de oxidar compuestos de azufre reducido como HS^- , S^{-2} , SO_3^{-2} , $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$, y varios politionatos ($\text{O}_3\text{S-S}_n\text{-SO}_3^-$), en condiciones alcalinas, neutras o ácidas (Alcántara S., 2000).

Estos microorganismos que disuelven metales sulfurados son acidófilos extremos capaces de oxidar tanto compuestos de azufre inorgánico como iones de hierro (Fe^{+2}) a pH inferiores a 3 (Rohwerder et al., 2003).

Las células que participan de procesos de biominería, pueden crecer adheridas al mineral o en suspensión. La adherencia entre el mineral y el microorganismo ocurre a través de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) o mediante interacciones hidrofóbicas. Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) de las células que crecen en azufre elemental son considerablemente diferente a las EPS de las células que crecen en minerales sulfurados, pues contienen una menor cantidad y concentración de azúcares y ácido urónico, y una mayor cantidad y concentración de ácidos grasos. Sin embargo, la mayor diferencia es la total falta de iones férricos (Fe^{+3}) o grupos de carga positiva, por lo que las interacciones hidrofóbicas son relevantes (Gehrke T. et al., 1998).

Aunque existen pocos estudios realizados con bacterias y arqueas en azufre elemental, estos trabajos permiten entender un poco mejor el funcionamiento de este proceso, a pesar de que aún falta información e investigación respecto al tema.

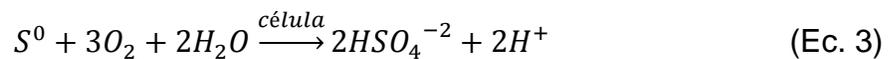
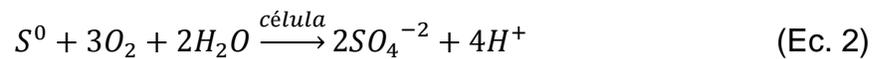
Uno de los principales es el estudio de la cinética de crecimiento para *Acidithiobacillus ferrooxidans* en perlas de azufre elemental en un cultivo batch. De este estudio se obtuvo que las bacterias adheridas presentan un crecimiento inicial con tendencia exponencial hasta lograr la saturación de la superficie sensible de las perlas, para posteriormente presentar un comportamiento lineal de crecimiento debido a la liberación lineal de las bacterias a la suspensión, por la replicación lineal de las bacterias adheridas (Espejo R. y Romero P., 1987). Comportamiento que se ve respaldado por otros estudios (Patino E., Sandoval R. y Frenay J., 2003. Además de lo antes señalado, en el trabajo de Espejo y Romero se observó que las células adheridas que son liberadas a la solución no siguen reproduciéndose.

En 1993, se publicó un trabajo en el que se demuestra que las células planctónicas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* son también capaces de crecer, por la presencia de intermediarios parcialmente oxidados del azufre, como tiosulfato y trazas de sulfito. Esto es porque a pesar de que las bacterias planctónicas se encontraran separadas del azufre mediante un filtro, estas recibían los compuestos parcialmente oxidados de azufre liberados por las células adheridas a la superficie de este (Shrihari et al., 1993).

Luego se determinó que tanto para *Sulfolobus metallicus* en azufre elemental a 70 °C como para *Acidithiobacillus ferrooxidans* en azufre elemental a 35 °C, la velocidad de consumo de azufre (r_{S^0}) midiendo la evolución de pH, el rendimiento de biomasa (Y_{SX}) y la velocidad de producción de biomasa (r_X) están ligadas por la siguiente ecuación (Patino et al., 2003).

$$-r_{S^0} = \frac{r_X}{Y_{SX}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Para el proceso de biooxidación de azufre elemental en presencia de microorganismos, es posible seguir las reacciones por la liberación de protones que ocurre en la formación de sulfato, como se muestra en la ecuación 2 y 3.



1.4. Mecanismos de biolixiviación

En el 2001 se propusieron tres estrategias o mecanismos de lixiviación bacteriana, dependiendo del tipo de mineral sulfurado y del medio. Estos mecanismos son la lixiviación indirecta, por contacto y la cooperativa, que se pueden observar en la Figura 1 (Tributsch H., 2001).

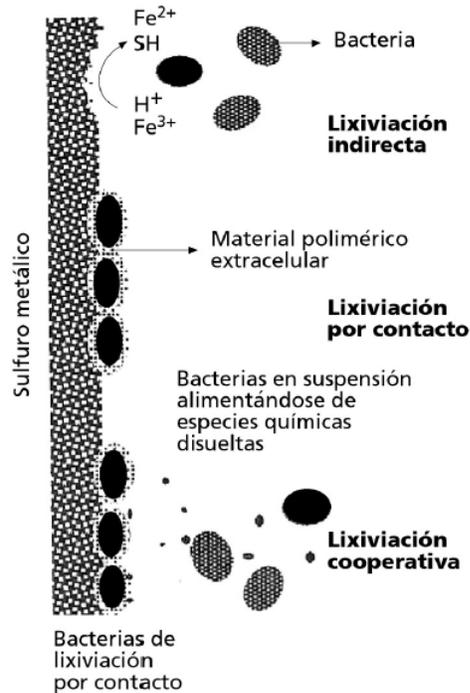
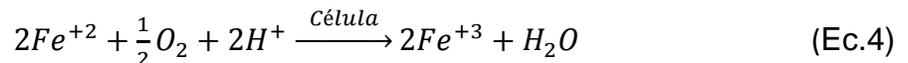
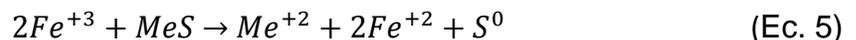


Figura 1: Mecanismos de biolixiviación para sulfuros metálicos planteados por Tributsch H. (2001).

El mecanismo indirecto ocurre cuando el ión ferroso (Fe^{2+}) es oxidado a ión férrico (Fe^{3+}) en la solución, lo que se puede apreciar en la ecuación 4.



Luego como el ión férrico posee una gran capacidad oxidante es capaz de disolver y liberar los metales insolubles que forman parte de los minerales sulfurados, tal como se presenta en la ecuación 5, donde Me corresponde a un metal bivalente (Ballester A., 2005).



En el mecanismo directo o de contacto el microorganismo se adhiere al sulfuro para permitir la disolución de éste, reacción que no ocurriría en su ausencia (Tributsch H., 2001). Algunos microorganismos crean una zona de control como las capas de EPS, donde se produce una disolución anódica localizada mediada por los iones férricos (Fe^{3+}) presentes en la capa de EPS con el objetivo de inducir la producción de tiosulfato

y, posteriormente sulfato. El resto de los microorganismos que participan de estos procesos poseen una cisteína portadora de azufre que permite formar polisulfuros, que liberan azufre coloidal, también utilizado como reservorio de energía temporal, como se puede observar en la Figura 2 (Tributsch H., 2001). Las siguientes ecuaciones representan este proceso (Ballester A., 2005).



Las ecuaciones 2, 3 y 7 son las más importantes para este estudio, ya que describen las reacciones involucradas en la producción de ácido sulfúrico por la oxidación de azufre elemental.

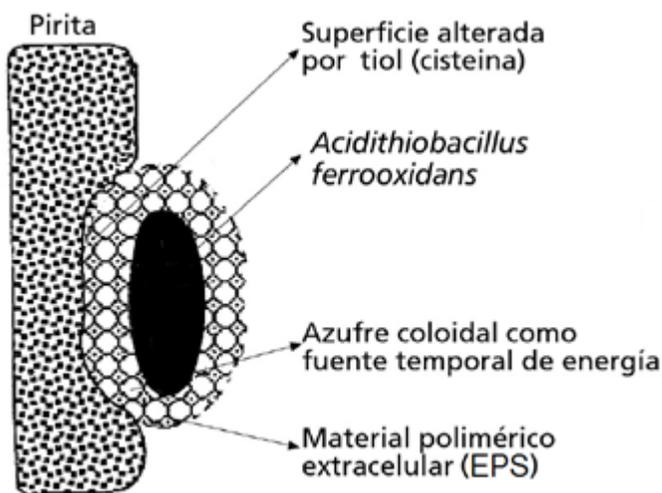


Figura 2: Esquema de lixiviación por contacto, donde *A. ferrooxidans* acondiciona activamente la interfase con la pirita produciendo material polimérico extracelular (Tributsch, 2001).

Además de los mecanismos previamente propuestos, también se plantea el mecanismo cooperativo, que corresponde al conjunto de ambos mecanismos en el cual la bacteria puede lixiviar estando adherida al mineral o en suspensión (Tributsch H., 2001). Este mecanismo representaría un suministro óptimo de energía, ya que las células planctónicas son capaces de oxidar los intermediarios producidos por las adheridas (Rojas-Chapana J. et al., 1998; Tributsch H., 2001).

Sin embargo, en el 2003 Crundwell modificaría la definición del mecanismo directo o de contacto, haciendo una distinción entre el mecanismo directo con contacto y el mecanismo indirecto con contacto. El mecanismo de contacto directo con contacto consiste en el contacto directo de la célula que oxida la superficie del mineral, sin la utilización de iones nítrico (Fe^{+3}), ni ferroso (Fe^{+2}). A diferencia del mecanismo indirecto con contacto que implica la presencia de EPS con iones férricos (Fe^{+3}) que provocan la disolución del mineral sulfurado (Crundwell F., 2003; Watling H., 2006).

Por otro lado, dependiendo de la solubilidad de los metales en ácido es posible describir dos mecanismos o vías de disolución de los metales sulfurados. Aquellos metales sulfurados que poseen bandas de valencia provenientes solamente de los orbitales de los átomos metálicos, no pueden ser atacados directamente por los protones del ácido, por lo que utilizan la vía del tiosulfato. A diferencia de aquellos minerales sulfurados que poseen bandas de valencia provenientes de orbitales del metal y del sulfuro son relativamente solubles en ácido, razón por la cual siguen la vía del polisulfuro (Sand et al., 2001).

Vía del Tiosulfato

Metales sulfurados como la pirita (FeS_2), molibdenita (MoS_2) y tungstenita (WS_2) son oxidados exclusivamente por la extracción de electrones con iones férricos (Fe^{3+}) mediados por microorganismos. En este grupo de metales los enlaces químicos entre el azufre y los metales no se rompe totalmente hasta que se hayan completado seis etapas y se libere el tiosulfato, tal como se muestra a continuación en la Figura 3.

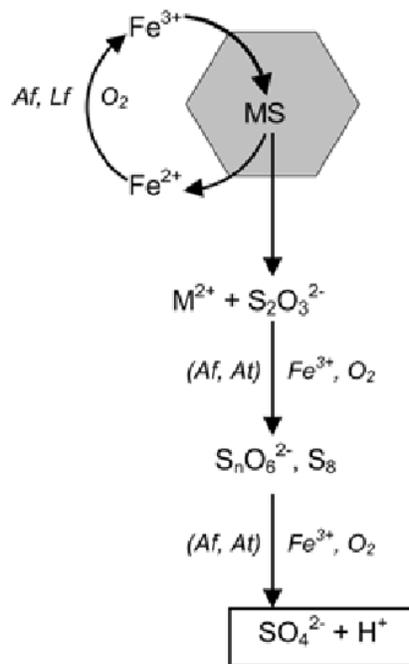


Figura 3: Mecanismo Indirecto del Tiosulfato en sulfuros metálicos para *A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* (Sand W. et al., 2001).

Una vez liberado el tiosulfato este es oxidado a tetrionato u otros politionatos para finalmente ser oxidado a sulfato. Los microorganismos que realizan esta vía deben ser hierro-azufre oxidantes para evitar la acumulación de azufre elemental y regenerar los iones férricos a partir de iones ferrosos, proceso que a pH cercano a 2 no ocurre abióticamente (Singer P. y Stumm W., 1970; Sand W. et al., 2001; Rohwerder T. et al., 2003).

Vía del Polisulfato

En esta vía minerales como la galena (PbS), esfalerita (ZnS), calcopirita (CuFeS₂), hauerita (MnS₂), oropimente (As₂S₂) y rejalgam (As₄S₄) son disueltos desde el mineral por la acción combinada de la extracción de electrones por el ion férrico y el ataque de protones. El enlace químico entre el metal y el sulfuro se rompe cuando dos protones se unen al sulfuro, liberando un catión de ácido sulfúrico (H₂S⁺), que a su vez es dimerizado y forma un disulfuro (H₂S₂), para finalmente oxidarse y dar origen a azufre elemental. Este mecanismo previamente descrito se puede observar en su totalidad en la Figura 4 (Sand W. et al., 2001; Rohwerder T. et al., 2003).

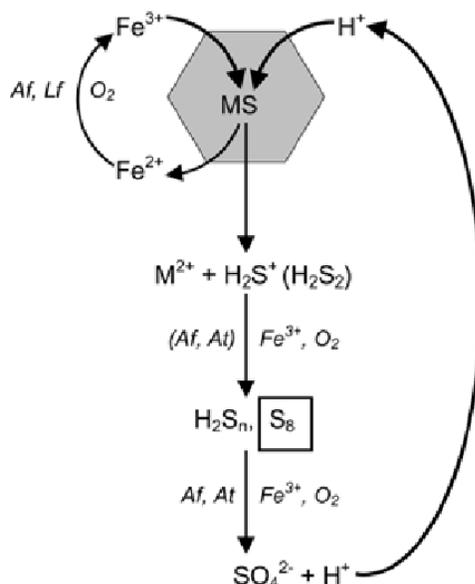


Figura 4: Mecanismo Indirecto del Polisulfato en sulfuros metálicos para *A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* (Sand W. et al., 2001).

Es importante mencionar que en ausencia de iones férricos, los microorganismos oxidan el sulfuro (H₂S) liberado del ataque de protones a azufre elemental y posteriormente a ácido sulfúrico (Rohwerder T. et al., 2003), reacción primordial en este estudio.

1.5. Microorganismos presentes en los procesos de biominería

La presencia de microorganismos en estos procesos se encuentra reportada y patentada desde los años 50, donde se probó la existencia de bacterias autótrofas que oxidaban hierro como la *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Zimmerley S. et al., 1958).

Los microorganismos acidófilos que oxidan hierro y/o azufre más conocidos y utilizados en estos procesos, clasificados según sus temperaturas óptimas de crecimiento son (Watling H., 2006; Escobar B., 2012):

- Mesófilos: Crecen entre los 10 y los 45 °C.
 - *Acidiphilium acidophilum*: Es autótrofa facultativa, oxida azufre y reduce el ión férrico (Fe^{+3}). Su rango de pH óptimo es de 2 a 3.
 - *Acidithiobacillus ferrooxidans*: Oxida azufre y sulfuros, además de oxidar el ión ferroso (Fe^{+2}) y reducir el ión férrico (Fe^{+3}) como anaerobio facultativo.
 - *Acidithiobacillus thiooxidans*: Oxida azufre y sulfuros, con un rango de pH de 2 a 4.
 - *Ferrimicrobium acidiphilium*: Es heterótrofa y oxida sulfuros, además de oxidar el ión ferroso (Fe^{+2}) y reducir el ión férrico (Fe^{+3}).
 - *Leptospirillum ferriphilum*: Oxida hierro.
 - *Leptospirillum ferrooxidans*: Oxida hierro y pirita.

- Termófilos moderados: Crecen entre los 40 y los 60 °C.
 - *Acidimicrobium ferrooxidans*: Es mixotrófica, Gram positivo y sólo oxida ión ferroso (Fe^{+2}).
 - *Acidithiobacillus caldus*: Es mixotrófica y oxida sólo compuestos de azufre reducido.
 - *Sulfobacillus acidophilus*: Oxida el ión ferroso (Fe^{+2}) y azufre, además de reducir el ión férrico (Fe^{+3}).
 - *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: Oxida el ión ferroso (Fe^{+2}) y azufre, además de reducir el ión férrico (Fe^{+3}).

- Termófilos Extremos: Son todas arqueas, que crecen entre los 60 y 90 °C o más, la mayoría son autotróficas aunque se han descrito cepas heterotróficas. Han sido aisladas de aguas termales y geiseres.
 - *Acidianus brierleyi*: Oxida compuestos de azufre reducido y reduce en condiciones anaeróbicas.
 - *Metallosphaera sedula*: Oxida compuestos de azufre reducido, H_2 y crece sobre extracto de levaduras y otros orgánicos.
 - *Metallosphaera prunae*.
 - *Sulfolobus acidocaldarius*: Es heterótrofa obligada y sólo oxidaría azufre.
 - *Sulfolobus metallicus*: Oxida azufre, sulfuros y el ión ferroso (Fe^{+2}), además de reducir el ión férrico (Fe^{+3}).
 - *Sulfolobus solfataricus*.

Si bien la mayor parte de estudios en un inicio fueron desarrollados con microorganismos mesófilos o termófilos moderados, últimamente el interés se ha volcado a los microorganismos termófilos extremos o hipertermófilos, pues los rangos de velocidad de lixiviación son superiores a los alcanzados por los microorganismos mesófilos (Norris P., Burton N. y Foulis N., 2000).

Otra de las variables importantes de comprender en los procesos de biominería es el tipo de interacción entre los microorganismos y el mineral. Como ha sido mencionado previamente, la importancia de los microorganismos en estos procesos es fundamental, y si bien existen microorganismos que crecen en suspensión, la mayor parte de ellos crecen adheridos al mineral. Incluso hay estudios que revelan que si no existieran limitaciones de superficie, más del 80% de las bacterias desaparecerían de la solución en 24 horas (DiSpirito et al., 1983; Bagdigian R. y Meyerson M., 1986). Los mecanismos de adherencia a la superficie de los minerales están dados por la presencia de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y por interacciones hidrofóbicas. En el caso de las células planctónicas casi no existe desarrollo de EPS.

1.6. Características de *Sulfolobus metallicus*

Sulfolobus metallicus es una arquea termófila extrema y acidófila que pertenece al género de las *Sulfolobus*. Las especies que pertenecen a este género crecen tanto de forma heterotrófica como autotrófica. En condiciones autotróficas catalizan la oxidación de azufre elemental, ión ferroso (Fe^{+2}) y minerales sulfurados. Para los sulfuros metálicos alcanzan velocidades de lixiviación muy altas, sobre todo cuando el mineral presenta baja concentración de sólidos, es decir, una baja densidad de pulpa (Norris P. y Owen J., 1992).

Sulfolobus metallicus es quimiolitótrofo estricto, oxida azufre elemental y especies reducidas de este, además de oxidar hierro (Auernik K. et al., 2008). Fue aislada de campos de solfataras en Islandia, con condiciones de crecimiento entre los 50 y los 75 °C y pH entre 1 y 4,5. Entre sus características también se encuentran la tolerancia a altas concentraciones de NaCl (hasta un 3 %) y la alta concentración de guanina y citosina en su ADN (Han J., 1998).

Las condiciones de cultivo para *Sulfolobus metallicus* se observaban en la siguiente tabla (Huber H. y Stetter K., 1998; Nemati M. et al., 2000; Plumb J. et al., 2002; Norris P., 2006).

Tabla 6: Características y condiciones de cultivo de *Sulfolobus metallicus*.

| Género | Especie | T _{opt} (°C) | T _{max} (°C) | pH _{opt} | Rango de pH | Tasa específica de crecimiento μ (h ⁻¹) |
|-------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|-------------|---|
| <i>Sulfolobus</i> | <i>metallicus</i> | 68 | 75 | 1,8 | 1-4 | 0,018-0,025 |

2. Motivación y justificación del proyecto

Debido a la importancia y creciente demanda tanto en el mercado nacional como internacional de la producción de ácido sulfúrico, es necesaria la investigación de nuevas tecnologías que permitan su producción. Sin embargo, en este caso la necesidad de producir ácido sulfúrico se encuentra ligada a la necesidad de obtener un buen agente lixivante que solubilice el fósforo desde residuos minerales. Se investigará el proceso de oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico en el marco de un proyecto en conjunto entre el Laboratorio de Biohidrometalurgia, del Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología de la Universidad de Chile y la empresa brasileña VALE.

La principal motivación es que dada la falta de investigaciones relacionadas al área de la biooxidación de azufre elemental y particularmente, la inexistencia de publicaciones relacionadas a la producción de ácido sulfúrico mediante la oxidación de azufre elemental con *Sulfolobus metallicus*. Debido a que la mayor parte de las investigaciones son realizadas para estudiar la recuperación de metales desde sulfuros metálicos como la pirita y calcopirita, entre otros.

Microorganismos termófilos extremos como es el caso de *Sulfolobus metallicus*, acidófilos, capaces de oxidar azufre y sulfuros metálicos a temperaturas entre los 65 y los 75 °C, resultan ideales para procesos de biominería, ya que la cinética a mayores temperaturas es más rápida y la reacción de oxidación de azufre a ácido es una reacción exotérmica. Por lo que no es necesario incurrir en equipos de intercambio de calor para el sistema y a la vez, dada su condición acidófila toleran muy bajos pH, por lo que son ideales para la producción de ácidos.

Luego en este trabajo se realizó un estudio de las variables que afectan la cinética de oxidación del azufre elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67 °C para la producción de ácido sulfúrico, que es uno de los mejores agentes lixiviantes para la disolución de fosfatos, producidos por microorganismos, por sobre los ácidos orgánicos.

3. Objetivos

3.1. Objetivos Generales

El principal objetivo de este trabajo es estudiar el mecanismo de oxidación en perlas de azufre elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67 °C para la producción de ácido sulfúrico.

3.2. Objetivos Específicos

Con el fin de lograr los objetivos generales de este trabajo, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el efecto de la acidez en la cinética de oxidación de azufre elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67 °C.
- Estudiar la relación entre la cinética de oxidación de azufre elemental, la adherencia y el crecimiento de *Sulfolobus metallicus* a 67 °C.

4. Metodología

4.1. Metodología experimental

Con el objetivo de determinar la cinética de la reacción de oxidación de azufre elemental en presencia de *S. metallicus*, se realizaron tres ensayos. El principal de los ensayos compara la oxidación química con la oxidación en presencia de *S. metallicus*. Los ensayos de la oxidación química eran experimentos sin microorganismos y los cultivos de oxidación en presencia de *S. metallicus* fueron inoculados con esta cepa, siendo mantenidos a 67°C, con una agitación de 100 rpm y monitoreados durante dos semanas. Durante el experimento se cuantificó el crecimiento celular planctónico y en adherencia, el pH a temperatura ambiente (aproximadamente a 20°C) y a 67 °C, la acidez y concentración de sulfato. Para determinar la adherencia inicial de *S. metallicus* a la superficie de las perlas de azufre elemental se realizó un segundo ensayo y el último de los ensayos tenía como objetivo determinar el efecto de la inhibición por pH en la cinética de oxidación de los microorganismos.

Materiales y equipos

Las perlas de azufre preparadas de acuerdo al protocolo en Anexo A, fueron tamizadas y seleccionadas sólo aquellas que se encontraban entre las mallas N° 18 y N° 42. De esta forma el diámetro de las perlas de azufre se encuentra entre 0,355 y 1 mm.

Los cultivos fueron inoculados con una cepa de la arquea extremófila *S. metallicus* cultivada previamente en pirita, que es cultivada en el laboratorio de Biohidrometalurgia de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile. A continuación se indican los equipos requeridos para realizar los procedimientos.

- Incubación de los cultivos con *S. metallicus* y sin células: Shaker New Brunswick Scientific CO., inc. Edison, N.J. USA a 67 °C y con una agitación de 100 rpm.
- Medición de pH: Equipo marca JENCO, modelo 1671 con electrodo de vidrio.
- Determinación de la Concentración de Sulfato: Equipo de espectrofotetría UV-visible, marca Agilen, modelo 8453, equipado con una lámpara de Tungsteno.
- Determinación del pH a 67°C: Baño termoregulado con calefactor de inmersión marca HAADE D1 fisions, modelo 001-36003
- Recuento de células, para determinación de la adherencia de la arquea al azufre: Microscopio, marca Nikon, modelo Labophot, equipado con filtro de contrastes de fase y aumento ocular de 10X y objetivo de 40X. Cámara de recuento de células Petroff-Hausser de 0,02mm de profundidad.
- Recuento de células planctónicas y adheridas: Microscopio de Epifluorecencia, marca Zeiss, equipado con los filtros de 365 y 546 nm. Cámara fotográfica, marca Nikon, modelo Coolpix 4500 de 4 megapíxeles.

4.2. Diseño del experimento de oxidación de azufre elemental

Los experimentos de oxidación de perlas de azufre elemental en presencia y ausencia de células se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 ml previamente preparados, los que fueron dispuestos en un agitador orbital a 100 rpm y calefaccionados a 67 °C. Una vez que fueron agregadas las perlas de azufre elemental, el inóculo de las arqueas *S. metallicus* (en el caso de los cultivos) y el medio de cultivo Norris ajustado a un pH 2,3 con ácido sulfúrico concentrado.

Se prepararon ocho frascos de cultivo con *S. metallicus*, cada frasco fue retirado al momento de realizar el monitoreo. La frecuencia del monitoreo disminuye en el tiempo debido a que la cinética de reacción presenta mayores variaciones al inicio del experimento y luego se tiende a estabilizar. Para los experimentos de control o de oxidación química también se prepararon ocho frascos que fueron mantenidos y retirados bajo las mismas condiciones y simultáneamente a los del cultivo.

A los frascos de ambos experimentos se les midió el pH a temperatura ambiente y a 67°C, acidez, concentración de sulfato y recuento de células adheridas y planctónicas. Debido a la cantidad de ensayos y los requerimientos de medio y de las perlas de azufre, para realizar las mediciones fue necesario retirar cada matraz del proceso.

4.2.1. Cultivo de arqueas en perlas de azufre elemental

Materiales y equipos

- 8 Matraces Erlenmeyer de 100 ml.
- 45 ml de Inóculo puro de *Sulfolobus metallicus* con una población aproximada de $3,5 \times 10^{10}$ células o $7,7 \times 10^8$ [células/ml], previamente ambientada a las perlas de azufre elemental a usar en este estudio.
- 12 g de Perlas de Azufre Elemental.
- 360 ml de Medio de Cultivo Norris (0,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0,2 g/L de KH_2PO_4) a pH 2,3 ajustado con ácido sulfúrico concentrado.
- Shaker a una agitación de 100 rpm y calefaccionado a 67 °C.
- pHímetro.

Todos los matraces antes de ser inoculados deben ser tratados. Este tratamiento consiste en poner las perlas de azufre elemental en el matraz, agregar el medio Norris a pH 2,3 y autoclavar a presión ambiental durante 30 minutos, una vez que el agua ha comenzado a ebulir. El procedimiento anterior se repite a 24 horas de iniciado el primer autoclavado. Una vez concluido el procedimiento se debe desechar el medio líquido y conservar las perlas, a las que se les agrega medio fresco y el inóculo para comenzar el estudio.

4.2.2. Experimento de control para la oxidación de azufre elemental en perlas

Materiales y equipos

- 8 Matraces Erlenmeyer de 100 ml.
- 12 g de Perlas de Azufre Elemental.
- 400 ml de Medio de Cultivo Norris.
- Shaker a una agitación de 100 rpm y calefaccionado a 67 °C.
- pHímetro.

4.3. Análisis químicos

4.3.1. Determinación de sulfato en solución por turbidimetría

Materiales y equipos

- $\text{BaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$.
- Cloruro de Sodio (NaCl) 240 g/L en solución de HCl al 0,3%.
- Glicerina 1:1 con agua desionizada.
- Agua desionizada.
- Espectrofotómetro UV-visible, marca Agilen, modelo 8453.

4.3.1.1. Medición del sulfato

- En un matraz aforado de 100 ml agregar 10 ml de la muestra.
- Agregar 5 ml de NaCl 240 g/L. Agitar.
- Agregar 10 ml de glicerina 1:1. Agitar.
- Aforar a 100 ml con agua desionizada. Agitar.
- Agregar 0,3 g de $\text{BaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$.
- Agitar durante un minuto.
- Medir la concentración en espectrofotómetro UV-visible a 500 nm contra blanco.
- Repetir la agitación de un minuto y medición hasta tener cuatro mediciones para cada muestra.

4.3.2. Medición de pH a 67°C

Materiales y equipos

- Baño termoregulado.
- Calefactor de inmersión.
- Termómetro

- Agua destilada

4.3.2.1. Medición de pH

- Se ajusta el baño termoregulado con el calefactor de inmersión a 67°C, medidos por el termómetro inmerso en el agua destilada.
- Se calibra el pHímetro a 67°C.
- Se sumergen las muestras y se toman las mediciones verificando con el termómetro que la temperatura sea de 67°C.

4.4. Análisis biológicos

4.4.1. Determinación de la capacidad de adherencia celular a la superficie

Materiales y equipos

- 2 matraces de 100 ml.
- 10 ml de Inóculo de la arquea *Sulfolobus metallicus* con una población aproximada de $2,1 \times 10^8$ células o $2,1 \times 10^7$ [células/ml], previamente ambientada en perlas de azufre elemental a utilizar en el estudio.
- 2 g de Perlas de Azufre Elemental.
- 40 ml de Medio de Cultivo Norris.
- Shaker a una agitación de 100 rpm y calefaccionado a 67 °C.
- Microscopio de Contrastes de Fases, marca Nikon, modelo Labophot.
- Cámara de recuento de células Petroff-Hausser de 0,2 mm de profundidad.

Para determinar la capacidad de adherencia de las arqueas *Sulfolobus metallicus* en las perlas de azufre elemental se realizó un experimento en duplicado con los dos matraces de 100 ml. A cada uno de los matraces se le agregó 1 g de perlas de azufre elemental, ya esterilizadas. Una vez realizada la esterilización se les agregó 20 ml del medio de cultivo Norris a un pH 2,3 y 5 ml de inóculo de las arqueas, se agitaron y se les extrajeron 8 µl a cada uno para determinar la concentración inicial de células en la solución. Inmediatamente después se llevaron los matraces al shaker a 67°C, donde se mantuvieron hasta el final de la experiencia.

Se extrajeron 8 µl de cada uno de los matraces inmediatamente después de la inoculación, es decir en el tiempo cero, y cada 15 minutos hasta completar una hora, posteriormente cada media hora hasta completar dos horas, y finalmente cada una hora hasta completar las cuatro horas. Todo esto con el objetivo de cuantificar mediante recuento directo las células.

4.4.1.1. Recuento directo de células

- Tomar 8 µl de la muestra.
- Colocar la muestra sobre una cámara Petroff-Hauser de 0,2 mm de profundidad.
- Posicionar la cámara de recuento para ser observada en el microscopio con un aumento ocular de 10x y objetivo 40x.
- Contar las células presentes en cada cuadro de la cámara, en al menos 5 cuadrados, si hay baja densidad celular se cuenta en los cuadrados grandes y si hay alta densidad se cuenta en los cuadrados pequeños.
- Se promedia en número de células por el número de cuadrados cuantificados y este valor se multiplica por $1,25 \times 10^6$ o $2,00 \times 10^7$ según se haya realizado el conteo en cuadrados grandes o pequeños, respectivamente.
- El valor obtenido corresponde a la concentración aproximada de células/ml en la muestra.

4.4.2. Recuento de células planctónicas y adheridas a la superficie de las perlas mediante tinción con DAPI

Materiales y equipos

- Cultivo de oxidación de perlas de azufre elemental en presencia de *Sulfolobus metallicus*.
- Formaldehído al 4%.
- Reactivo DAPI de concentración 1 µg/ml.
- Reactivo Mountaint (5,5 partes de Citifluor, 1 parte de VectaShield, 0,5 partes de PBS 1x y DAPI a una concentración final de 1 µg/ml.
- Aceite de cedro.
- Filtro de Policarbonato con tamaño de poro de 0,22 µm.
- Papel Filtro.
- Placas Petri.
- Portaobjeto.
- Cubreobjeto.
- Microscopio de Epifluorescencia, marca Zeiss, equipado con filtros de 365 y 546 nm.
- Cámara fotográfica, marca Nikon, modelo Coopix 4500 de 4 megapíxeles.

4.4.2.1. Traspaso de células desde la solución al soporte

Mediante el siguiente procedimiento es posible traspasar las células planctónicas de la solución a un soporte, para lo que se utiliza una muestra directa del cultivo.

- Fijar las células de 5 ml de cultivo de la oxidación, con formaldehído al 4% por dos horas en el congelador.
- Descongelar la muestra fijada y agitar a mano la solución.
- Filtrar la muestra en una membrana de policarbonato.

- Guardar la muestra en una placa Petri en el congelador, hasta ser analizadas por tinción con DAPI.

4.4.2.2. Traspaso de las células desde las perlas de azufre a un soporte

- Recuperar las perlas de azufre del matraz a analizar, utilizando para esto el papel filtro.
- Lavar las perlas de azufre elemental 3 veces con el medio de cultivo Norris.
- Incubar las perlas en 10 ml de PBS 1x con formaldehído al 4% por dos horas en el congelador.
- Descongelar la muestra de las perlas.
- Recuperar las perlas y guardarlas en una placa Petri en el congelador, hasta ser analizadas por tinción con DAPI.

4.4.2.3. Recuento celular por tinción con DAPI

- Cortar las membranas de policarbonato en que fueron traspasadas las células, tres cuadros de 0,7 x 0,7 cm aproximadamente, y ubicarlos dentro de una nueva placa Petri.
- Sacar parte de las perlas donde fueron fijadas las arqueas de cada muestra y ubicarlas en una nueva placa Petri.
- Teñir las muestras con el reactivo DAPI de concentración 1 µg/ml.
- Colocar la muestra de la membrana de policarbonato o de las perlas, al que fue agregado el reactivo DAPI, sobre el portaobjetos.
- Cubrir la sección de la membrana o de las perlas de azufre con reactivo Mountaint.
- Colocar un cubreobjeto sobre la membrana o sobre las perlas de azufre, y agregar sobre este una gota de aceite de cedro.
- Evaluar la sección de la membrana o de las perlas de azufre utilizando un microscopio de epifluorescencia con un aumento de 1000x (objetivo 100x y ocular de 10x) y filtro de luz UV con una longitud de onda de 365 nm.

4.5. Efectos del pH inicial del medio Norris en la evolución del pH durante el cultivo de *Sulfolobus metallicus* sobre perlas de azufre elemental a 67°C

Para evaluar el efecto de la acidez sobre las células se prepararon 4 matraces con perlas previamente colonizadas con *Sulfolobus metallicus* y sus respectivos duplicados. Estos matraces se cultivaron durante 24 horas, registrando la evolución del pH cada dos horas durante 12 horas y finalmente un registro a las 24 horas.

Materiales y equipos

- 8 Matraces Erlenmeyer de 100 ml.
- 4 g de Perlas de Azufre Elemental colonizadas previamente con *Sulfolobus metallicus*.
- 50 ml de Medio de Cultivo Norris (0,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0,2 g/L de KH_2PO_4) a pH 3 ajustado con ácido sulfúrico concentrado.
- 50 ml de Medio de Cultivo Norris (0,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0,2 g/L de KH_2PO_4) a pH 1,7 ajustado con ácido sulfúrico concentrado.
- 50 ml de Medio de Cultivo Norris (0,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0,2 g/L de KH_2PO_4) a pH 1,5 ajustado con ácido sulfúrico concentrado.
- 50 ml de Medio de Cultivo Norris (0,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0,2 g/L de KH_2PO_4) a pH 1 ajustado con ácido sulfúrico concentrado.
- Shaker a una agitación de 100 rpm y calefaccionado a 67 °C.
- pHímetro.

5. Resultados

5.1. Capacidad de adherencia inicial de *Sulfolobus metallicus* sobre perlas de azufre elemental

El objetivo de este experimento fue evaluar la capacidad de adherencia inicial de las arqueas *Sulfolobus metallicus* sobre perlas de azufre elemental a 67 °C mediante la cuantificación de las células que permanecen en suspensión en el tiempo durante las dos primeras horas de cultivo. De este modo, las células adheridas a la superficie del azufre corresponden a la diferencia entre las células totales en el tiempo inicial y las contabilizadas en cada monitoreo.

Adherencia de *S. metallicus* sobre perlas de azufre

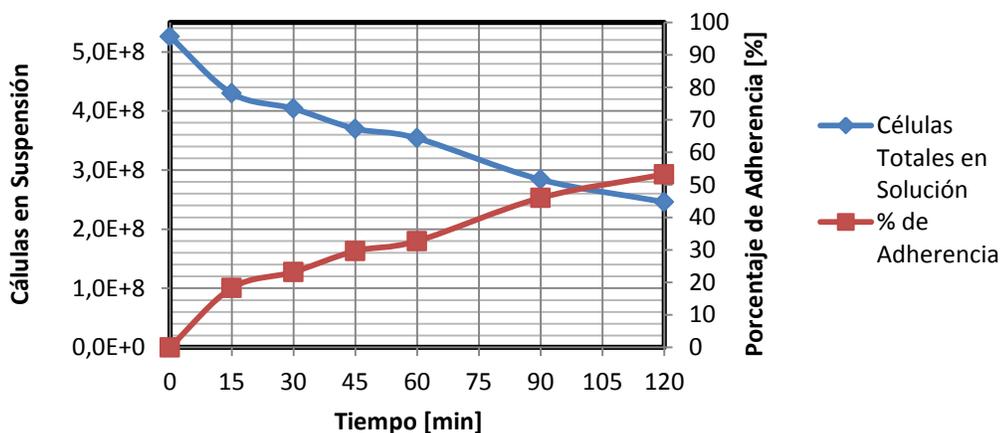


Gráfico 1: Recuento de células planctónicas totales y porcentaje de adherencia de *Sulfolobus metallicus* en las perlas de azufre elemental a 67 °C durante las dos primeras horas de cultivo.

En el Gráfico 1 se muestra la capacidad de adherencia de las arqueas, con un número inicial de células planctónicas totales inoculadas de $5,4 \times 10^8$, valor que disminuye considerablemente durante los primeros 60 minutos, alcanzando un 32,7% de adherencia. Luego, el número de células continúa disminuyendo con el tiempo hasta alcanzar un número de $2,5 \times 10^8$ células planctónicas totales, equivalentes a un 53,2% de adherencia en las dos primeras horas de cultivo a 67°C.

5.2. Oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico con *S. metallicus* a 67 °C

Con el objetivo de determinar la cinética de oxidación de azufre elemental de *Sulfolobus metallicus*, se realizaron cultivos de ésta arquea sobre las perlas de azufre elemental a 67 °C, junto con experimentos de control estériles que no fueron inoculados con estas células. Esta experiencia cumplía con el fin de comparar tanto la oxidación biológica como química para los parámetros estudiados.

Los experimentos fueron monitoreados periódicamente durante las dos semanas que duró el experimento. Los parámetros fisicoquímicos monitoreados fueron el pH a temperatura ambiente y a 67 °C de las soluciones con electrodos de vidrio, la acidez mediante titulación con Hidróxido de Sodio y la concentración de sulfato mediante turbidimetría. También en los cultivos con arquea se realizaron recuentos tanto de células planctónicas y adheridas a las perlas de azufre mediante el método de tinción con DAPI y observación en el microscopio de epifluorescencia, con el objetivo de determinar el crecimiento de los microorganismos y su relación con la oxidación del azufre elemental.

5.2.1. Análisis fisicoquímicos

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos de los estudios experimentales de oxidación de azufre elemental en presencia y ausencia de las arqueas *Sulfolobus metallicus* a 67 °C.

5.2.1.1. Evolución del pH

En el Gráfico 2 se puede apreciar la evolución del pH monitoreado en las soluciones a temperatura ambiente en el tiempo tanto para los cultivos de *Sulfolobus metallicus* en perlas de azufre elemental a 67 °C, como para los experimentos de control. Se puede apreciar que para el caso de la oxidación química no existe una variación del pH, sin embargo para el cultivo en presencia de microorganismos se observa un aumento en la concentración de protones con el tiempo. Las mayores variaciones de pH se producen al inicio de la reacción. Sin embargo después de las 120 horas de estudio el pH se mantiene relativamente constante en torno a 1. Esta tendencia es más notoria cuando se compara la evolución del pH a 67 °C para ambos experimentos, lo que se puede observar en el Gráfico 3.

Variación de pH a Temperatura Ambiente

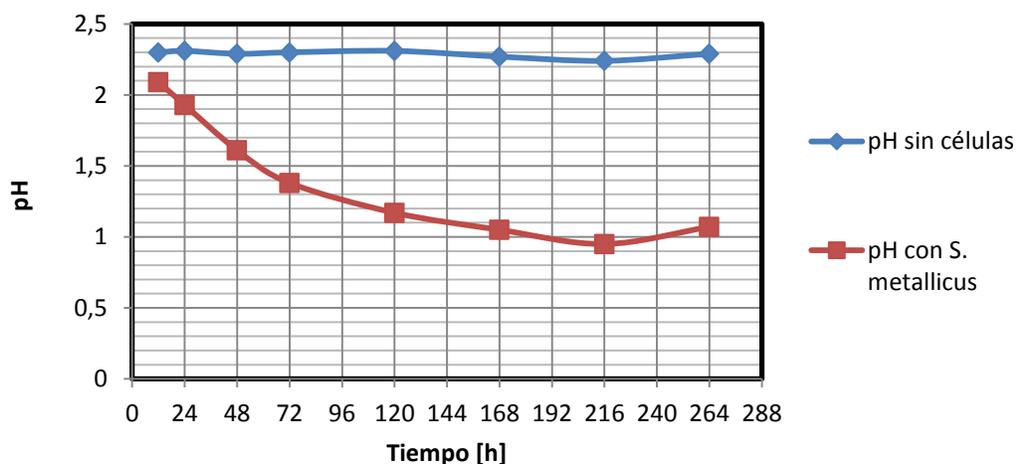


Gráfico 2: Variación de pH en el proceso de oxidación de perlas de azufre elemental a 67 °C con *Sulfolobus metallicus* y en el experimento control. Con monitoreo a temperatura ambiente.

En el Gráfico 3 se puede apreciar también la caída en el pH cuando comienza la reacción mediada por los microorganismos. Sin embargo no se observa una oxidación aparente del azufre elemental en ausencia de células. Para el experimento con el cultivo de arqueas el pH a partir de las 168 horas se mantiene en torno a pH 0,2.

Variación de pH a 67 °C

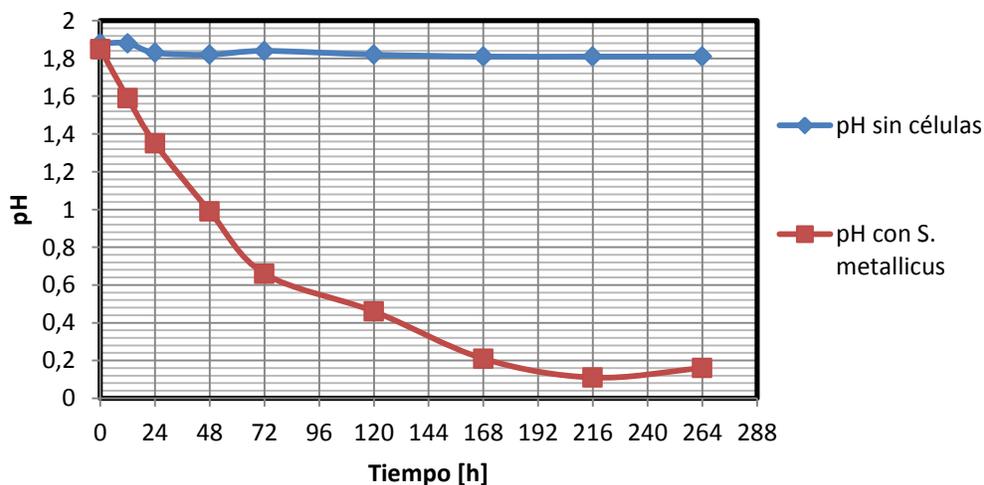


Gráfico 3: Variación de pH en el proceso de oxidación de perlas de azufre elemental a 67 °C con *Sulfolobus metallicus* y en el experimento control. Con monitoreo a 67 °C.

Es importante notar que al final del experimento para el cultivo con *S. metallicus* se registró un aumento en el pH del último punto de monitoreo, tanto para la medición a temperatura ambiente como a 67 °C.

La evolución del pH en el tiempo para el cultivo de *Sulfolobus metallicus* en perlas de azufre elemental a 67 °C puede ser observada en el Gráfico 4. Las mediciones fueron realizadas tanto a temperatura ambiente como a 67 °C. De este gráfico es posible observar que a mayor temperatura existe una mayor presencia de protones en la solución. Además de que en la medida que avanza el tiempo aumenta la diferencia de pH. La línea de tendencia de la variación de pH disminuye en el tiempo, lo que dice relación con el avance de la reacción de oxidación de azufre mediada por las arqueas *Sulfolobus metallicus*.

Variación de pH según la Temperatura

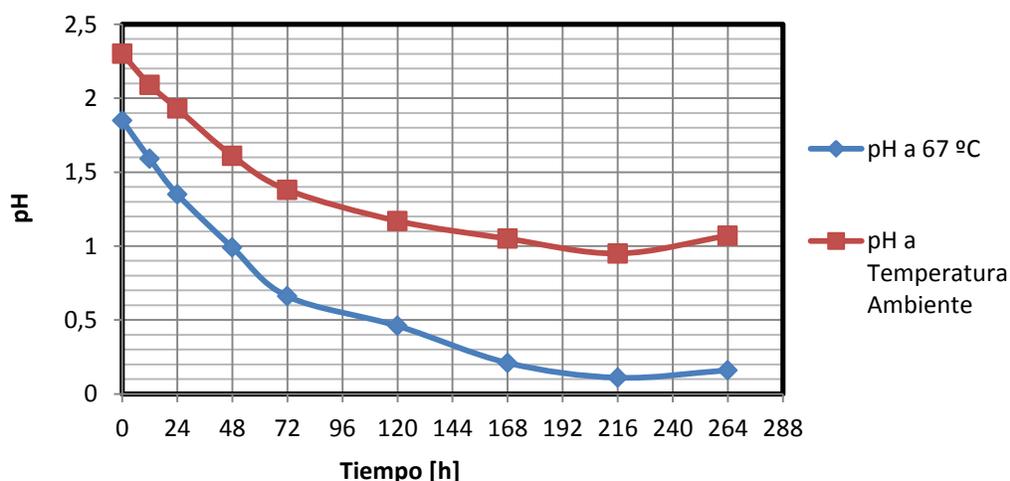


Gráfico 4: Variación de pH en el proceso de oxidación de perlas de azufre elemental a 67 °C con *Sulfolobus metallicus*. Con monitoreo a temperatura ambiente y a 67 °C.

5.2.1.2. Evolución de la Acidez

A partir de las muestras tomadas desde las soluciones del cultivo y del experimento control se realizaron análisis de acidez, para los que se determinó la concentración de ácido sulfúrico y la concentración de protones libres en la solución.

La concentración de ácido en la solución se determinó en base al consumo de hidróxido de sodio realizado en la titulación, obteniéndose la normalidad del ácido sulfúrico a partir de la ecuación 8, que luego puede ser convertida a concentración de ácido sulfúrico en [g/L] con el peso equivalente de este compuesto (ecuación 9). Esta concentración se relaciona con la concentración de protones en [mol/L] al dividir por el peso molecular del ácido sulfúrico como se muestra en la ecuación 10, y a la vez este valor puede ser convertido a pH si se utiliza la ecuación 11.

$$Normalidad_{H_2SO_4} = \frac{Normalidad_{NaOH} \cdot Volumen_{NaOH}}{Volumen_{H_2SO_4}} \quad Ec. 8$$

$$Concentración_{H_2SO_4} = Normalidad_{H_2SO_4} \cdot Peso\ Equivalente_{H_2SO_4} \quad Ec.9$$

$$Concentración_{H^+} = \frac{Concentración_{H_2SO_4}}{Peso\ Molecular_{H_2SO_4}} \quad Ec. 10$$

$$pH = -\log (Concentración_{H^+}) \quad Ec. 11$$

. En el Gráfico 5 se puede apreciar la evolución de la concentración de ácido sulfúrico y de protones en las soluciones, monitoreadas mediante los ensayos de titulación y calculados con las ecuaciones previamente expuestas.

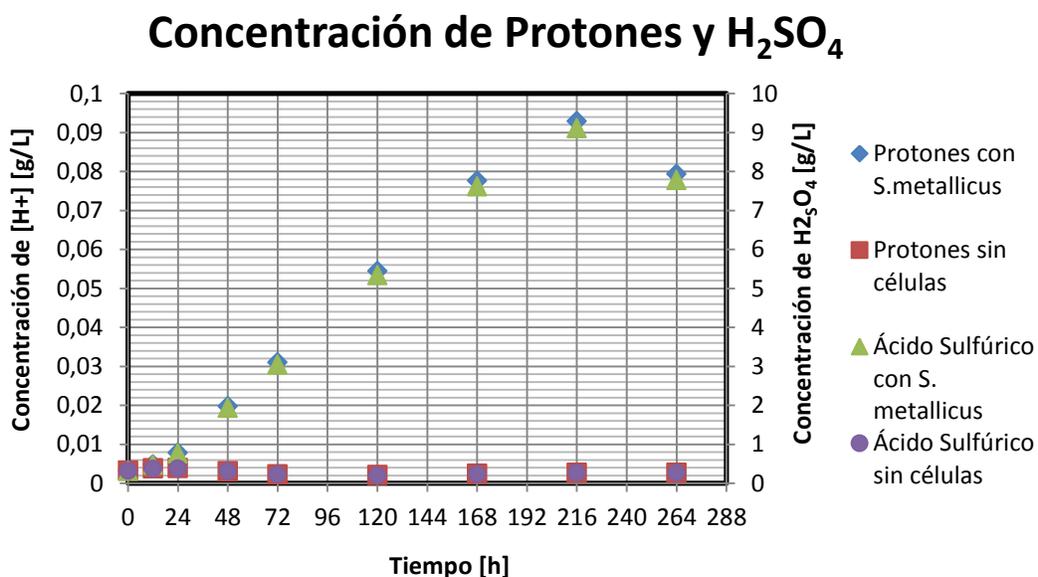


Gráfico 5: Evolución en la concentración de protones y de ácido sulfúrico determinadas mediante titulación durante el proceso de oxidación de perlas de azufre elemental a 67 °C con *Sulfobus metallicus*.

Es posible observar que la producción de protones o ácido sulfúrico en los experimentos control sin presencia de células no presentan un aumento de la concentración de estos compuestos, sino que se observa una concentración constante de 0,003 [g/L] y 0,3 [g/L] respectivamente. También es posible apreciar en el Gráfico 5 que la tendencia de producción de ácido sulfúrico y protones para los cultivos con microorganismos desde las 24 a las 216 horas es lineal, además que durante las primeras 24 horas la oxidación es lenta. El último punto, correspondiente a las 264 horas de cultivo presenta una disminución en la concentración de ácido sulfúrico y protones.

La concentración inicial de ácido sulfúrico es la misma (0,319 [g/L]), tanto para los cultivos con *Sulfolobus metallicus*, como para los experimentos control. Sin embargo este valor aumenta considerablemente hasta los 9,112 [g/L] en el caso de los cultivos con *S. metallicus*; a diferencia de lo que ocurre con los experimentos control, donde este valor oscila en torno al valor inicial. Un resultado similar se aprecia con respecto a la concentración de protones en la solución, pues la concentración inicial es de 0,003 [g/L] en el cultivo con *S. metallicus* y en los experimentos control, valor que se mantiene relativamente constante en el caso de los experimentos controles y que varía hasta alcanzar un máximo de 0,093 [g/L] de protones para los cultivos con la arquea.

En el Gráfico 6 se puede apreciar la variación de pH durante el estudio del cultivo con las arqueas. Es posible notar que al igual que los resultados obtenidos mediante el monitoreo con el pHímetro, la tendencia en los cultivos con células es que el pH disminuye hasta llegar a una constante aproximadamente a las 170 horas en torno a pH 1.

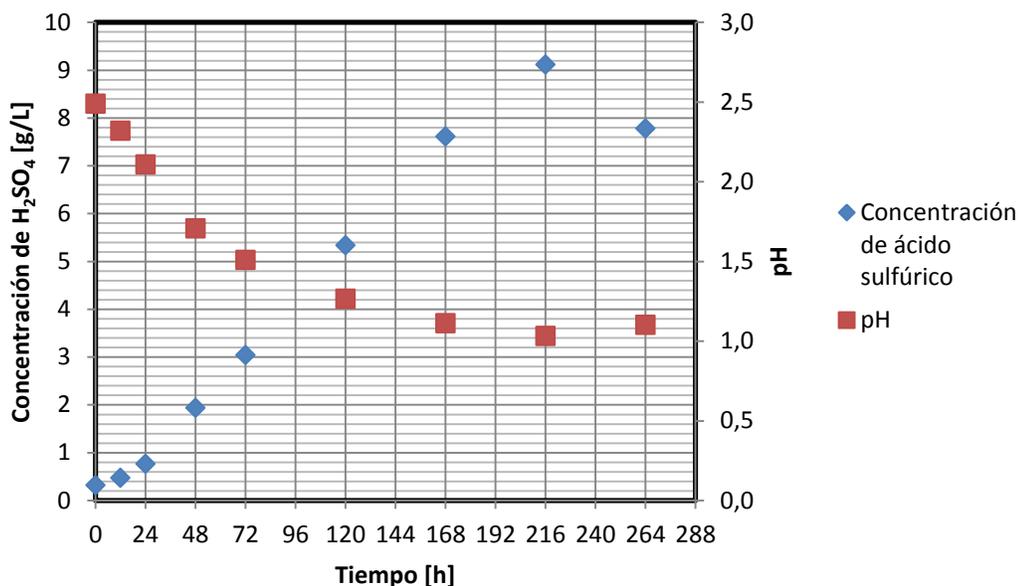


Gráfico 6: Variación del pH y acidez determinadas mediante titulación durante el proceso de oxidación de perlas de azufre elemental a 67 °C con *Sulfolobus metallicus*.

5.2.1.3. Evolución de la concentración del ión sulfato

La concentración del ión sulfato determinada mediante turbidimetría se puede observar en el Gráfico 7. En los experimentos en presencia del arquea se observa un aumento exponencial de la concentración de sulfato entre las 0 y las 72 horas de cultivo, para posteriormente pasar a una concentración relativamente constante en torno a los 3600 [g/L] del compuesto. En el caso de los experimentos control en ausencia de células se sigue observando una concentración constante de en torno a los 1000 [g/L] de sulfato.

Concentración de Sulfato mediante Turbidimetría

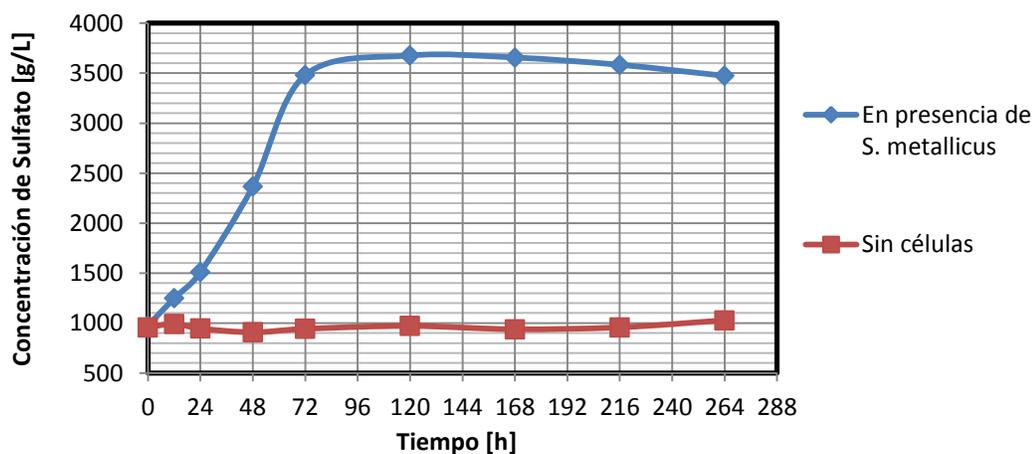


Gráfico 7: Evolución en la concentración del ión sulfato determinadas mediante turbidimetría durante el proceso de oxidación de perlas de azufre elemental a 67 °C con *Sulfolobus metallicus*.

5.2.2. Análisis Biológicos

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la cuantificación de células adheridas en la superficie de las perlas de azufre y planctónicas pertenecientes a los cultivos de *Sulfolobus metallicus* a 67 °C.

5.2.2.1. Cuantificación de Arqueas Planctónicas

Con el objetivo de evaluar la concentración y proliferación de las células libres en suspensión se tomaron muestras directas desde los cultivos, se fijaron y se filtraron, para posteriormente ser cuantificadas mediante tinción DAPI y observación en el microscopio de epifluorescencia. En la Figura 5 se puede apreciar una fotografía de la evolución del crecimiento de células planctónicas obtenida durante la cuantificación de las arqueas *Sulfolobus metallicus*, estas células presentan un color azul brillante y forma circular.

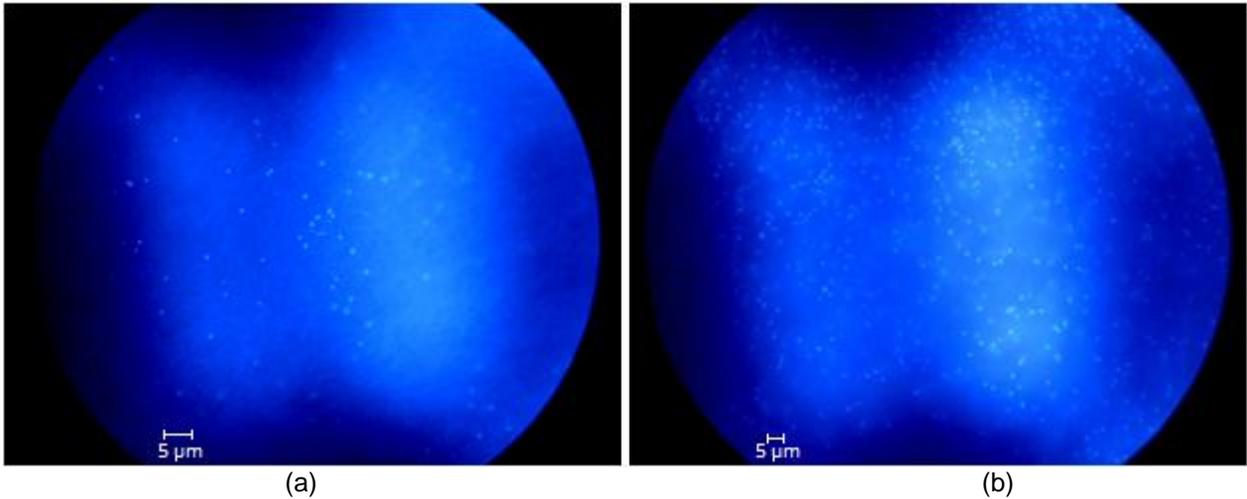


Figura 5: Fotografías en el microscopio de epifluorescencia de una sección de filtro con células planctónicas de un cultivo de oxidación de perlas de azufre elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67°C, las que fueron teñidas mediante tinción DAPI y observadas al microscopio. En esta fotografía es posible visualizar el filtro con el fondo azul y las arqueas de color azul brillante y forma esferas. La primera fotografía (a) corresponde a una etapa inicial del cultivo, por lo que es posible apreciar una gran cantidad de células planctónicas, que van aumentando con el tiempo como se puede apreciar en la fotografía (b).

La evolución en el tiempo de las células totales planctónicas puede ser observado en el Gráfico 8. La concentración inicial de células es de $7,7 \times 10^7$ [células/ml] equivalente a $3,8 \times 10^9$ células totales en suspensión, valor que aumenta y obtiene un máximo a las 168 horas de cultivo con una concentración de $1,9 \times 10^8$ [células/ml] equivalente a $9,4 \times 10^9$ células totales en suspensión. A partir de las 216 horas de cultivo las células desaparecen bruscamente, por lo que en los dos últimos monitoreos no es posible observar células. Entre las 24 y las 120 horas de cultivo se logra observar un crecimiento del tipo exponencial de las arqueas, pues después de las 120 horas se observa una disminución en la tasa de crecimiento.

Células Planctónicas en el Tiempo

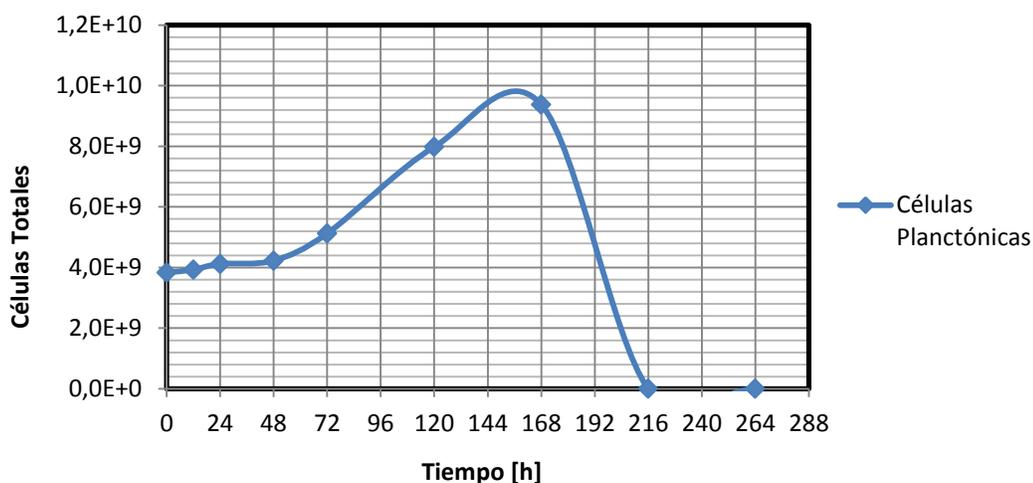


Gráfico 8: Evolución en el tiempo del número total de arqueas *Sulfolobus metallicus* en suspensión en el medio de cultivo.

5.2.2.2. Cuantificación de Arqueas Adheridas

Para evaluar la concentración y proliferación de las células adheridas en la superficie de las perlas de azufre elemental se tomaron muestras directas desde los cultivos y se fijaron, para posteriormente ser cuantificadas mediante tinción DAPI y observación en el microscopio de epifluorescencia. En la Figura 6 se puede apreciar una fotografía de la evolución del crecimiento de las células obtenida durante la cuantificación de las arqueas *Sulfolobus metallicus* adheridas a la superficie de las perlas de azufre elemental, estas células presentan un color azul brillante, forma esférica, crecen agrupadas y sólo en ciertas zonas del azufre.

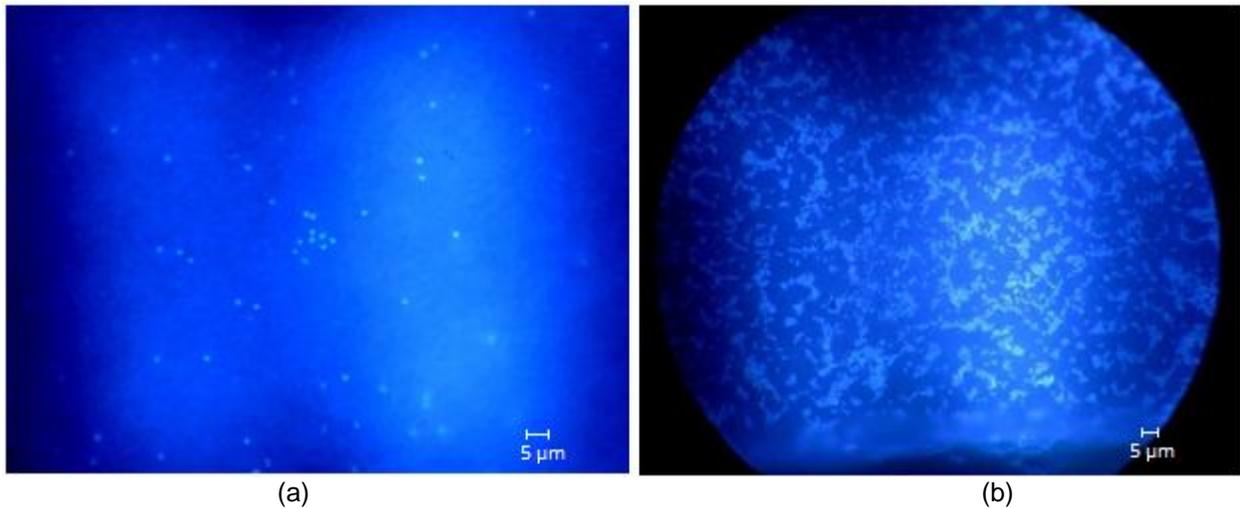


Figura 6: Fotografías en el microscopio de epifluorescencia de perlas de azufre elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67°C, las que fueron teñidas mediante tinción DAPI y observadas al microscopio. En estas fotografías es posible visualizar las arqueas de color azul brillante y forma de esferas como se puede ver en (a), además de observar que crecen agrupadas y en ciertas zonas del azufre como se puede apreciar en (b).

De forma similar que en el estudio del crecimiento de las células planctónicas, en este caso para los dos últimos monitoreos (a partir de las 216 horas de cultivo) las células disminuyen.

El procedimiento para realizar la cuantificación de las células adheridas y planctónicas se encuentra detallado en el anexo C. Pues para este caso fue necesario suponer que las perlas eran completamente esféricas, que su tamaño no variaba durante los experimentos y se consideró el tamaño como el promedio de las granulometrías, con el objetivo de determinar el radio promedio de las esferas de azufre (338,75 [µm]). Con este valor es posible determinar el área superficial y el volumen esférico de las perlas de azufre. Además al determinar la densidad de las perlas de azufre es posible calcular el área total disponible de las perlas de azufre, como se puede apreciar a continuación en la Tabla 3.

Tabla 7: Masa total, Densidad y Área total de Azufre disponible para la adherencia celular de *Sulfolobus metallicus* a 67 °C.

| Datos de Azufre | Valor | Unidad |
|-----------------|-----------------------|----------------------|
| Masa Total | 1,5 | [g] |
| Densidad | $1,1 \times 10^{-12}$ | [g/µm ³] |
| Área Total | $1,21 \times 10^{10}$ | [µm ²] |

Luego como fue calculada la cantidad de células por unidad de área mediante la técnica de tinción con DAPI y observación al microscopio de epifluorescencia, es posible calcular la cantidad total de células adheridas en las perlas de azufre elemental, como se ve en el Gráfico 9.

Células Adheridas en el Tiempo

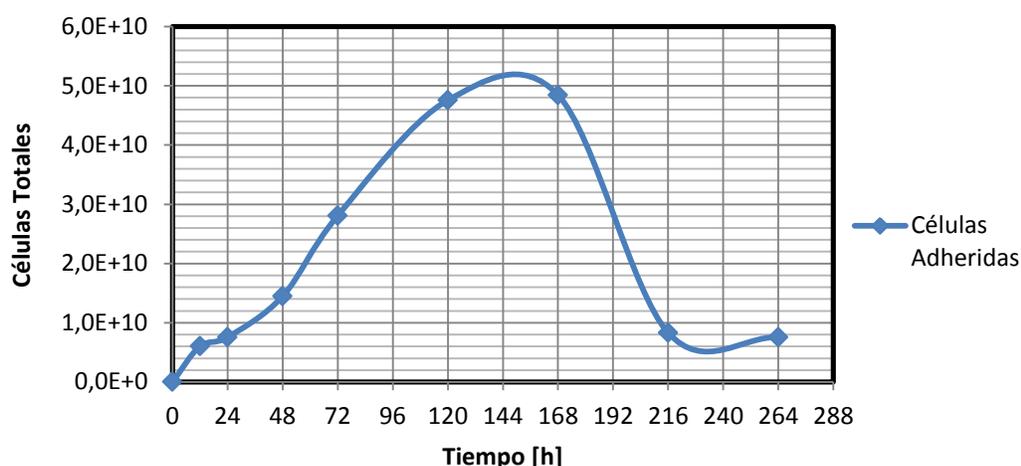


Gráfico 9: Evolución en el tiempo del número total de arqueas *Sulfolobus metallicus* adheridas a la superficie de las perlas de azufre elemental.

Es posible apreciar que entre las 12 y las 120 horas de cultivo se observa un crecimiento exponencial de las arqueas sobre la superficie de las perlas de azufre. La concentración inicial de células es cero, ya que las perlas se encuentran esterilizadas y el inóculo se realiza en el medio de cultivo, sin embargo rápidamente comienzan a adherirse y a proliferar. Después de las 120 horas de cultivo, al igual que para las células planctónicas se observa una disminución en la tasa de crecimiento y a partir de las 216 horas de cultivo la población de arqueas disminuye a valores cercanos a la población inicial.

La comparación entre las células totales, adheridas a la superficie de las perlas de azufre y las planctónicas en función del tiempo pueden ser apreciadas en el Gráfico 11, además del pH a 67 °C en función del tiempo. La importancia de la variable del pH radica en que a partir de las 216 horas de cultivo con un pH inferior a 0,2 las células disminuyen drásticamente o desaparecen y entre un pH de 0,66 a 0,46 se observa la mayor tasa de crecimiento celular.

En el Gráfico 10 también es posible apreciar que la proliferación de las células adheridas es superior al de las células planctónicas, presentando en ambos casos un crecimiento exponencial entre las 24 y las 48 horas de cultivo.

Crecimiento y pH en el Tiempo

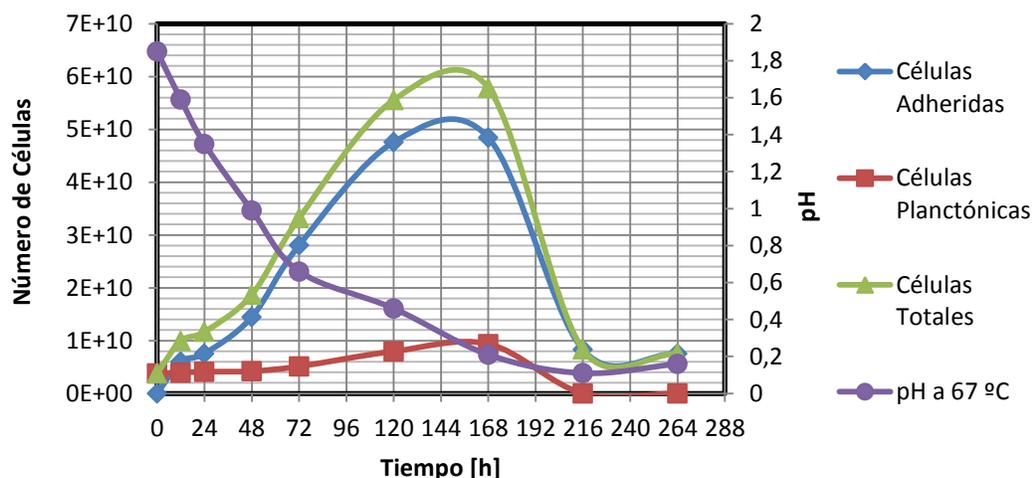


Gráfico 10: Evolución en el tiempo del número de arqueas *Sulfolobus metallicus* adheridas a la superficie de las perlas de azufre elemental, planctónicas y totales. Además de la evolución en el tiempo del pH medido a 67 °C.

5.3. Efectos del pH inicial del medio Norris en la evolución del pH durante el cultivo de *Sulfolobus metallicus* sobre perlas de azufre elemental a 67°C

Con el objetivo de determinar el efecto del pH sobre la evolución de la oxidación del azufre elemental se realizaron ensayos a distintos pH iniciales del medio de cultivo.

Como se muestra en el Gráfico 14, la evolución de los cultivos a diferentes pH iniciales fueron monitoreados durante 24 horas, los pH iniciales del medio Norris utilizados fueron los pH 3, pH 1,7, pH 1,5 y pH 1. Durante las primeras cuatro horas es posible observar la mayor variación del pH para posteriormente disminuir relativamente lento en el tiempo. El cultivo que presenta la mayor variación de pH en el tiempo es el que tenía el medio Norris con un pH inicial de 3.

Variación de pH para cultivos a diferente pH Inicial del medio Norris

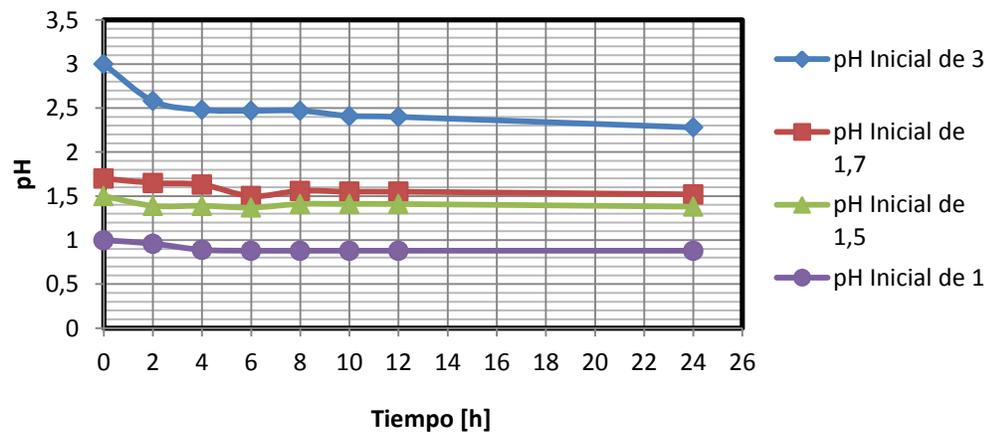


Gráfico 11: Evolución del pH para cultivos de la arquea *Sulfolobus metallicus* en perlas de azufre elemental a 67 °C con medios Norris de pH iniciales 3; 1,7; 1,5 y 1.

6. Discusión

6.1. Capacidad de adherencia inicial de *Sulfolobus metallicus* sobre Perlas de Azufre Elemental

Durante dos horas se monitoreó la cantidad de células en suspensión, que bajaron a un poco menos de la mitad de la concentración inicial porque se adhirieron a la superficie de las perlas de azufre elemental, alcanzando una adherencia del 53, 2% de las células (Gráfico 1). Valor que a pesar de estar por sobre el 50% de adherencia es relativamente menor al de esta cepa en minerales sulfurados como la calcopirita, donde alcanza un 68% de adherencia (Escobar B. et al., 2003).

Si bien el porcentaje de adherencia inicial es cercano al 50% no es posible concluir sobre la importancia o predominio del mecanismo de contacto directo o el indirecto con respecto a sus aportes al proceso de oxidación de azufre a ácido sulfúrico. Sin embargo, debido a que la concentración de células adheridas es mayor que la concentración de células en suspensión durante mayores escalas de tiempo (Gráfico 10), la actividad oxidativa debe ser desarrollada mayormente por las células adheridas, que liberan intermediarios a la solución que sirven de nutrientes a las que se encuentran en suspensión.

Luego si se calcula y analiza la capacidad de adherencia inicial de *Sulfolobus metallicus* sobre calcopirita (Escobar B. et al., 2003) versus la adherencia de la misma arquea sobre perlas de azufre elemental es posible notar que la superficie de preferencia para la adherencia inicial de *Sulfolobus metallicus* es la calcopirita, tal como se muestra en el Gráfico 12.

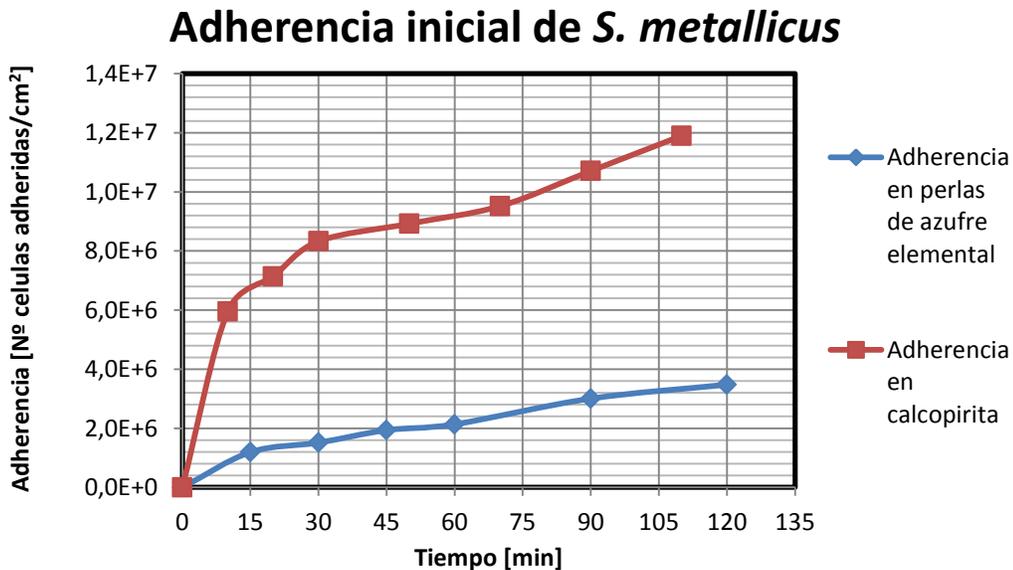


Gráfico 12: Adherencia inicial por unidad de superficie disponible para cultivos de la arquea *Sulfolobus metallicus* en calcopirita y perlas de azufre elemental.

A pesar de que la adherencia inicial por unidad de superficie disponible es menor, la conversión alcanzada durante el proceso es razonable, por lo que es probable que la formación del biofilm sea más lenta, pero con una gran capacidad oxidativa o que las células no presenten tanta afinidad por la superficie de las perlas de azufre y con la agitación del medio las células que se encontraban adheridas sean removidas de la superficie, mientras las que se encuentran en suspensión se adhieren a la superficie de las perlas, generando un equilibrio en las primeras horas de cultivo.

6.2. Oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico con *S. metallicus* a 67 °C

Como era de esperar, cuando se compara la oxidación química versus la biooxidación de azufre, ya sea con mediciones realizadas a temperatura ambiente como a 67 °C (Gráfico 2 y Gráfico 3, respectivamente), se observa que para la oxidación química no existe una variación considerable en el pH, ya que el azufre no es oxidado químicamente. Sin embargo, para el caso de la biooxidación de azufre con *S. metallicus* se observa una considerable variación de pH, que indica que la reacción de oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico está ocurriendo. De estos gráficos, también se observa que las mediciones de pH realizadas a temperatura ambiente son menos ácidas que las realizadas a 67 °C, lo que puede ser explicado por la temperatura, ya que a mayor temperatura debe existir una mayor disociación del ácido y por ende una mayor concentración de protones en solución, que a temperatura ambiente. Por otro lado, para tener datos completamente representativos del comportamiento del cultivo es recomendable tomar las mediciones a 67 °C, pues al ser más ácidas estas mediciones entregan información sobre la mayor concentración de protones o pH que es capaz de tolerar la arquea *Sulfolobus metallicus* antes de inhibirse o antes de que ocurra lisis celular, siendo una importante variable a considerar ya que este trabajo se centra en la producción de ácido sulfúrico.

Si bien, tanto en el Gráfico 2 como en el Gráfico 3 es posible observar una tendencia decreciente del pH entre las 0 a las 216 horas, en ambos casos entre las 216 y las 264 horas de cultivo se observa un leve aumento del pH. Esto se puede deber a algún tipo de inhibición por acidez o incluso, la lisis de las arqueas, pues si se consideran las mediciones de pH a 67 °C, los pH son de 0,11 y de 0,16. Luego estos dos últimos datos escapan de los intereses del estudio, razón por la cual no son considerados.

La condición previamente descrita sobre la diferencia entre las mediciones de realizadas a temperatura ambiente y a 67°C se puede observar con mayor claridad en el Gráfico 4, donde se puede apreciar que no se trata de un simple traslación de los valores y que al inicio de la reacción la diferencia entre las curvas es menor y a medida que aumenta el tiempo de cultivo esta diferencia se hace más pronunciada.

Al igual que para las mediciones de pH, las mediciones de acidez (Gráfico 5) también revelaron que el azufre no es oxidado químicamente, por lo que necesita la presencia de microorganismos azufre-oxidantes. Este método, del mismo modo que las curvas de pH ya analizadas presenta la tendencia decreciente del pH desde las 0 a las

216 horas de cultivo, para posteriormente, entre las 216 y las 264 horas registrar una leve alza en el pH calculado. En estas mediciones el pH mínimo alcanzado durante el cultivo fue de 1 a las 216 horas de cultivo.

La medición de la acidez también permite determinar la concentración de protones en la solución además de la concentración de ácido sulfúrico en esta, lo que puede ser observado en el Gráfico 5. Para los experimentos control, tanto la concentración de protones como la concentración de ácido sulfúrico es cercana a cero. Sin embargo, para los cultivos con *S. metallicus* se observa durante las primeras 24 horas una producción exponencial de ácido sulfúrico, que a partir de las 24 horas y hasta las 216 horas cambia a una producción lineal del ácido y finalmente, a partir de las 216 se observa una disminución en la concentración de ácido sulfúrico. Esta disminución del ácido sulfúrico puede estar asociada a un proceso de inhibición por producto de las células o por acidez del medio o la posible lisis celular. La máxima concentración de ácido sulfúrico alcanza los 9,11 [g/L] a las 216 horas de cultivo.

Considerando la concentración de ácido sulfúrico en la solución y la cantidad inicial de azufre elemental es posible determinar la conversión, que indica el porcentaje de azufre que es oxidado a ácido sulfúrico en presencia de *S. metallicus* a 67 °C, tal como se presenta en el siguiente gráfico.

Conversión de Azufre Elemental a Ácido Sulfúrico

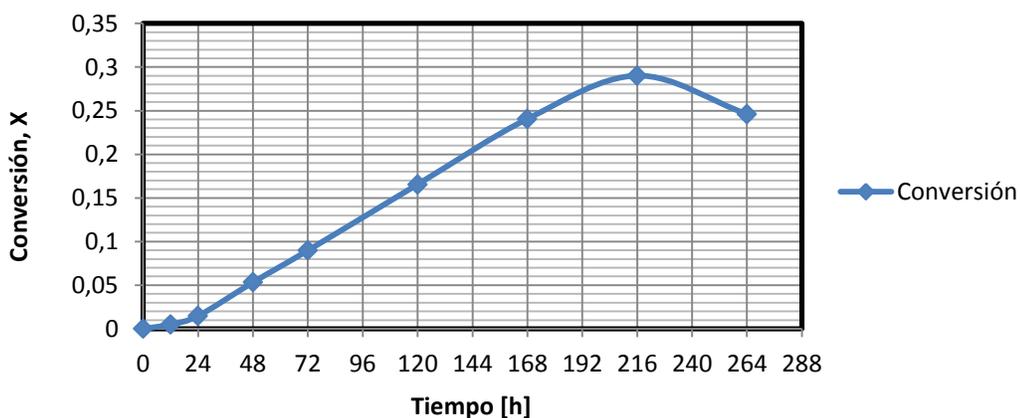


Gráfico 13: Conversión de la reacción de oxidación de perlas de azufre elemental a 67 °C a ácido sulfúrico con *Sulfolobus metallicus*.

Esta conversión entre las 12 y las 24 horas presenta un comportamiento exponencial, para posteriormente, entre las 24 y las 216 horas de cultivo presente un comportamiento lineal. Este comportamiento lineal puede ser provocado por un crecimiento lineal de las arqueas o, en caso de que el crecimiento de las arqueas sea exponencial, puede tratarse de algún tipo de inhibición como las mencionadas con anterioridad, sin embargo, más adelante se discutirán estas ideas de forma más

detallada. Por otro lado, en este gráfico también es posible observar una disminución en la conversión, que era de esperar por la disminución en la producción de ácido.

La máxima conversión de azufre es de un 29% y es alcanzada a las 216 horas de cultivo. Luego como no existe este antecedente en estudios de conversión en azufre elemental con *Sulfolobus metallicus*, este valor fue calculado a partir de los datos existentes para otros microorganismos cultivados en perlas de azufre elemental, con el fin de comparar. Con los datos obtenidos para un estudio de la actividad oxidativa de la bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans* en perlas de azufre elemental (Herrera R., 2012) fue posible calcular que la máxima conversión alcanzada por esta bacteria fue de aproximadamente el 15% a las 95 horas de cultivo. A pesar de que el valor obtenido para la bacteria es menor que el alcanzado por la arquea, el tiempo en el que se alcanzó la conversión del 29% fue mayor. Luego si se hubiera detenido el experimento a las 95 horas la conversión alcanzada por *S. metallicus* hubiera sido del 12,6%. Sin embargo, estos valores dependen del tipo de cepa, la concentración de células, tanto adheridas como planctónicas o por la superficie del azufre disponible, entre otros factores.

Otra de las variables que puede ser afectada por el crecimiento celular es la conversión u oxidación del azufre elemental, que se observa en el Gráfico 14.

Crecimiento Celular y Conversión en el Tiempo

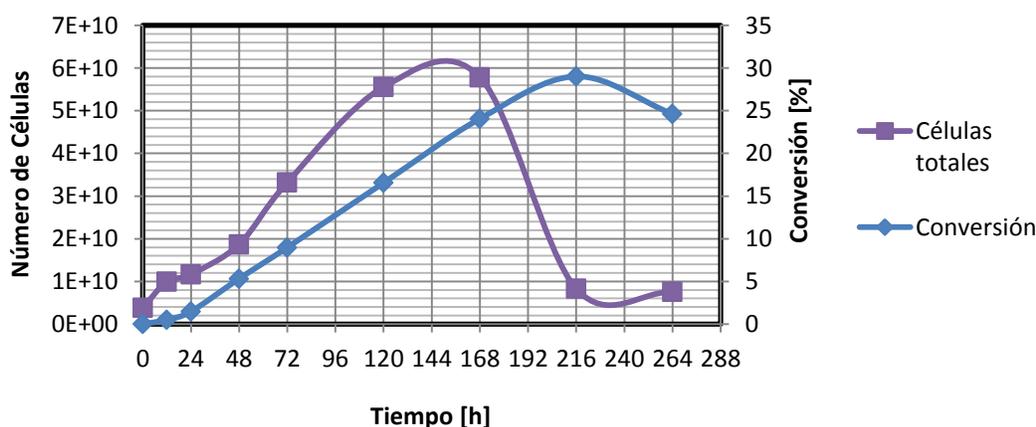


Gráfico 14: Evolución en el tiempo del número total de arqueas *Sulfolobus metallicus* y de la conversión de azufre elemental.

Como se aprecia en el Gráfico 14, es posible observar un comportamiento lineal creciente de la conversión en contraste con el comportamiento exponencial creciente presentado por las curvas de crecimiento. También es posible observar un retardo en el peak de conversión con respecto al peak de crecimiento de las arqueas. Este efecto se ve reflejado de la misma forma en el retardo que se genera en la caída o disminución

de los valores del crecimiento y conversión a partir de las 168 y de las 216 horas en adelante, respectivamente.

Luego la oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico no está ligada al crecimiento, pues a pesar de que en la medida que existe una mayor concentración de células, mayor es la producción de ácido; no aumentan de la misma forma. Hay factores que afectan tanto el crecimiento como la capacidad oxidativa de los microorganismos. Un factor importante que condiciona tanto el crecimiento como la capacidad oxidativa en este estudio fue la acidez, pues a pesar de observarse un comportamiento exponencial en la proliferación celular entre las 12 y las 120 horas de cultivo, la conversión de azufre a ácido es lineal (Gráfico 14), al igual que concentración de ácido sulfúrico (Gráfico 5). El comportamiento esperado sería que la tendencia de proliferación celular fuera la misma que la tendencia de producción de azufre elemental, pero este efecto lineal de la oxidación de azufre puede ocurrir por inhibición por acidez, al tener un medio con pH inferior a 1 (Norris P., 2006), que en los experimentos se observa a partir de las 48 horas y por la presencia de intermediarios en el proceso de oxidación del azufre elemental.

Como en las primeras 48 horas se observa un comportamiento exponencial tanto para la proliferación celular como para la conversión, puede existir en esta etapa la población superficial de las perlas por las células y la formación del biofilm. Sin embargo, entre las 48 y las 216 horas de cultivo se observa una tendencia lineal de la conversión que se contradice con el comportamiento exponencial de las células, por lo que la presencia de intermediarios en el proceso de oxidación explicaría esta tendencia. Pues la presencia de intermediarios limitaría la producción directa de sulfato y, por lo tanto, también limitaría la producción de ácido sulfúrico y la conversión de azufre elemental no presentaría la misma tendencia que la proliferación celular. El esquema que describe esta teoría de forma gráfica se presenta en la Figura 7, donde los intermediarios debido a sus diferentes valencias son representados por S_xO_y .

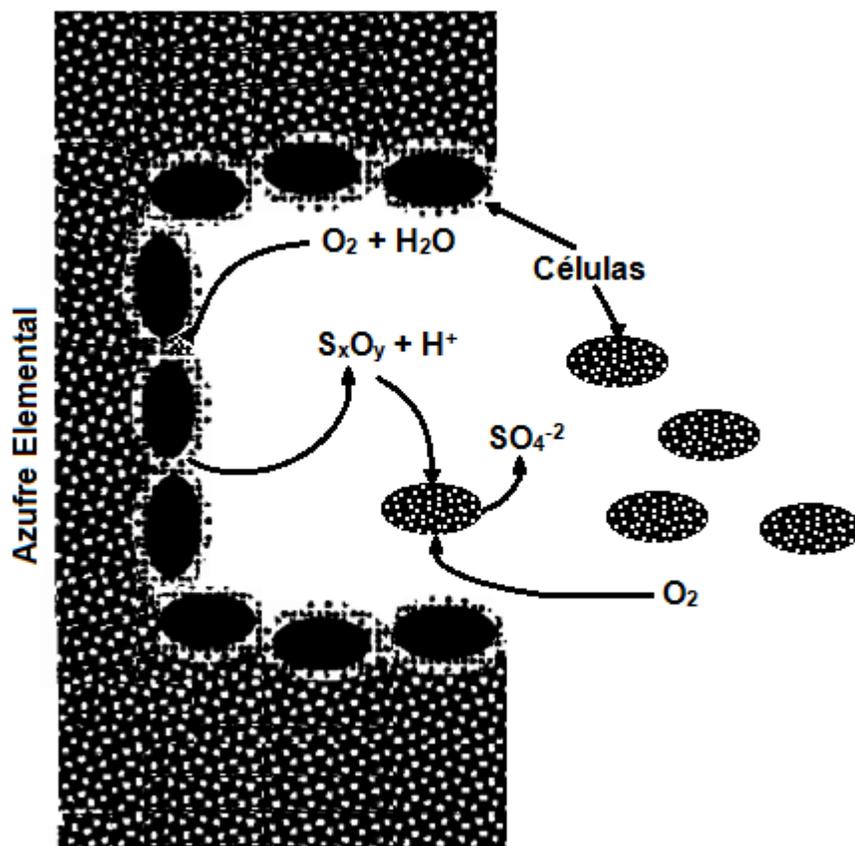


Figura 7: Esquema que representa el proceso de biooxidación de azufre elemental a sulfato, mediado por la presencia de intermediarios.

En el Gráfico 6 se puede observar la relación entre el pH y la producción de ácido sulfúrico, con los datos experimentales obtenidos de la medición de acidez. En las primeras 48 horas se observa un comportamiento creciente exponencial de la concentración de ácido sulfúrico. Luego entre las 48 y las 216 horas presenta un comportamiento creciente lineal que alcanza un máximo de 9,112 [g/L], para finalmente decrecer. Este comportamiento está ligado a la disminución del pH, que ocurre hasta aproximadamente las 170 horas de cultivo, para posteriormente mantenerse relativamente constante.

Otro de los factores relevante para determinar la cinética de oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico es la concentración de iones sulfato, que se determinó con el método de turbidimetría como se muestra en el Gráfico 7. En este gráfico se observa que la concentración de sulfato durante las primeras 24 horas sigue un comportamiento exponencial, que luego tiende a una concentración constante en torno a los 3600 [g/L]. Del punto de vista del crecimiento este comportamiento es bastante extraño, ya que a pesar de observar una proliferación celular exponencial, la producción de sulfato es constante. Además si se considera que el comportamiento del pH que presenta una caída en el tiempo, la concentración de sulfato no puede ser constante. Por lo que esta medición puede no ser representativa o exacta.

En base a los datos experimentales obtenidos durante la determinación de acidez del experimento también es posible evaluar el modelo del núcleo sin reaccionar, que puede ser revisado en el Anexo B, con el fin de obtener mayor información sobre el cinético de oxidación de azufre elemental. El modelo del núcleo sin reaccionar explicaría el proceso completo a través de sus etapas, además de que dependiendo de la resistencia impuesta en cada etapa es posible determinar el tipo de control en la velocidad de oxidación del azufre elemental. Las etapas descritas se presentan a continuación.

- Difusión de reactivos de la capa límite hacia la superficie de la partícula: Esta etapa corresponde a la difusión del reactivo oxidante (O_2) a través de la capa límite hacia la superficie del biofilm formado por las células adheridas a las perlas de azufre elemental.
- Penetración y difusión del reactivo al interior de la partícula y hacia la zona de reacción: Esta etapa corresponde a la difusión del oxígeno a través del biofilm de células hasta la zona de reacción.
- Reacción química: Es cuando ocurre la reacción química y se forman tanto los intermediarios como los productos.
- Difusión de los productos soluble desde la zona de reacción a la superficie de la partícula: En esta etapa tanto los intermediarios como los productos difunden desde la zona de reacción a través del biofilm a la superficie.
- Difusión de los productos solubles desde la capa límite al seno de la solución: Esta última corresponde a la difusión de los intermediarios y productos desde el biofilm al seno de la solución.

Las ecuaciones utilizadas para evaluar el modelo del núcleo sin reaccionar dependiendo de la etapa de control son las siguientes.

Difusión a través de la película

Corresponde a la etapa en que el reactivo oxidante (O_2) difunde desde el seno del fluido a la superficie del biofilm formado por las células de *S. metallicus* adheridas a la superficie de las perlas de azufre. Se modela por la siguiente ecuación.

$$\frac{t}{\tau} = x \quad \text{Ec. 12}$$

Difusión a través de la ceniza

Corresponde a la etapa de penetración y difusión del oxígeno a través de la ceniza hasta la superficie reactiva entre las perlas de azufre y las células. Se modela por la siguiente ecuación cuando la concentración del reactivo permanece constante en el tiempo:

$$\frac{t}{\tau} = 1 - 3(1 - x)^{\frac{2}{3}} + 2(1 - x) \quad \text{Ec. 13}$$

Reacción química

Corresponde a la etapa de reacción entre el reactante y el sólido en la superficie reactiva. Se modela por las siguientes ecuaciones cuando la concentración del reactivo permanece constante en el tiempo:

$$\frac{t}{\tau} = 1 - 1(1 - x)^{\frac{1}{3}} \quad \text{Ec. 14}$$

Donde,

τ : tiempo de conversión total del sólido.

x : conversión de azufre elemental a sulfato.

La conversión utilizada en las ecuaciones 12, 13 y 14 fue determinada por la masa de azufre disuelto en el medio versus la masa inicial de azufre elemental disponible para la reacción. Además, sólo se utilizaron los registros para la acidez entre las 24 y las 216 horas de cultivo, ya que los otros datos presentan un comportamiento que escapa a los intereses de este estudio.

La aplicación de los modelos de control por difusión a través de la película, control por difusión a través de la ceniza y control por la reacción química con su respectiva ecuación a los datos experimentales se muestran en el Gráfico 15.

Modelo del Núcleo sin Reaccionar

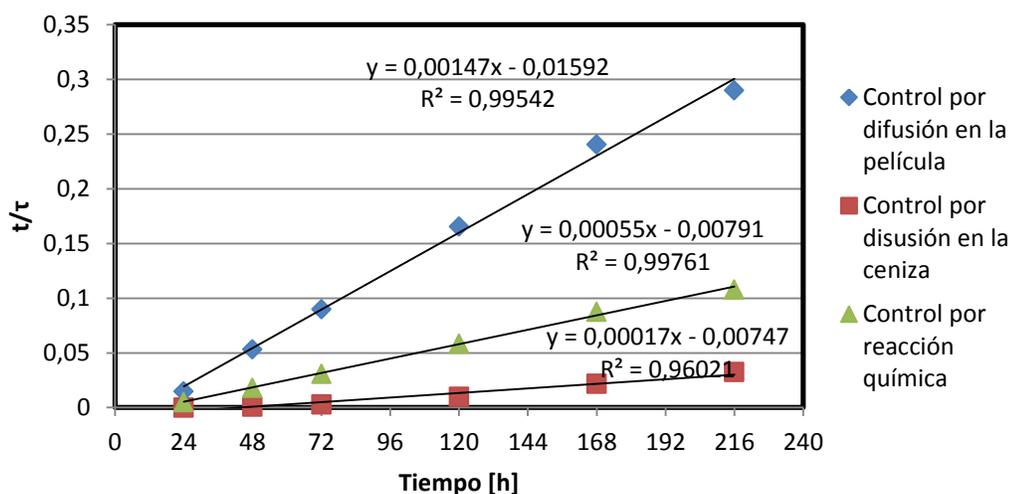


Gráfico 15: Modelo del Núcleo sin Reaccionar para los datos experimentales de la oxidación de azufre elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67 °C entre las 24 y las 216 horas de cultivo.

A partir de las regresiones lineales de las funciones graficadas es posible determinar que la etapa limitante es la de Control por la reacción química, pues el valor de la correlación es el mayor ($R^2=0,997$), indicando que este modelo es el que mejor se ajusta a la linealización. A pesar de que el control por la difusión en la película también posee un valor de correlación bastante alto ($R^2=0,995$).

También es posible determinar en base a la pendiente de la ecuación el tiempo de disolución completa del azufre elemental (τ), pues la pendiente corresponde a $1/\tau$. Luego, considerando como etapa controlante la de la reacción química, el tiempo de disolución completa del azufre elemental es de 1818,18 horas, aproximadamente 76 días.

Las arqueas *S. metallicus* poseen forma de esferas (Figura 5), su concentración planctónica hasta las 24 horas es relativamente constante y luego presenta un comportamiento exponencial hasta aproximadamente las 120 horas de cultivo, donde se observa una disminución en la tasa de crecimiento seguido de un decaimiento (Gráfico 8), pues a partir de las 216 horas de cultivo no fue posible observar a las arqueas. Dada la ausencia de células y para verificar que no se tratara de algún error en la manipulación o cultivo estos dos puntos últimos fueron repetidos y analizados nuevamente, observándose exactamente el mismo resultado.

Es importante notar que si bien las células priorizan el crecimiento adheridas a la superficie, también se observa la proliferación de estas en la solución (Figura 5), alcanzando una concentración de $1,9 \times 10^8$ [células/ml], lo que se explica porque las células adheridas al momento de duplicarse liberan la nueva célula a la solución o porque las células adheridas se despegan de la superficie con la agitación o que las mismas células planctónicas se dupliquen sin necesariamente de estar adheridas a la superficie, pues poseen los intermediarios de azufre reducido como nutrientes (Gautier V. et al., 2008).

Al analizar las fotografías de las células adheridas es posible notar su aumento en el tiempo, además de notar que crecen formando conglomerados (Figura 6 b), lo que puede ser explicado por la preferencia de estas células a cierto tipo estructura molecular de las perlas de azufre y a zonas fraccionadas de estas.

En el Gráfico 9 se observa en las primeras 12 horas de cultivo una tendencia lineal de crecimiento, seguido de un crecimiento exponencial hasta las 120 horas, que declina y disminuye hasta un valor cercano a la concentración existente a las 12 horas de cultivo. A diferencia de las células planctónicas que desaparecen completamente de la solución, estas células sólo disminuyen su concentración, que es un interesante factor a considerar, pues al parecer estas células se encuentran más protegidas de los agentes externos o inhibidores al encontrarse adheridas formando un biofilm. Este efecto de que las células que se encuentran adheridas no desaparecen completamente puede estar ligado también a que las células comiencen a penetrar al interior de la perlas de azufre (efecto observado directamente en perlas de azufre con un tiempo de cultivo mayor a los 3 meses en el laboratorio), y que por efectos difusivos se encuentren mayormente protegidas de ataques de protones o radicales.

Como se menciona previamente uno de los factores que claramente afecta o condiciona el crecimiento de las células y, por ende, la oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico es el pH del medio de cultivo. La mayor proliferación celular se observa en las células adheridas (Gráfico 10), pues la máxima concentración de células planctónicas es considerablemente menor que la de células adheridas, con $9,4 \times 10^9$ y $4,9 \times 10^{10}$ células totales respectivamente, alcanzadas a las 168 horas de cultivo, que registran un pH de 0,21. Dada la acidez del medio por debajo del rango de tolerancia de esta arquea, que es de pH 1 (Norris P., 2006), es de esperar que a partir de las 168 horas de cultivo se comience a observar una drástica disminución o desaparición de las células. El pH de 0,99 se alcanza a las 48 horas de cultivo (Gráfico 10), por lo que desde ese momento en adelante es posible comenzar a suponer efectos inhibitorios, que pueden llegar a provocar la lisis celular.

6.3. Influencia del pH inicial del medio en la capacidad oxidativa de *Sulfolobus metallicus* en perlas de azufre elemental a 67 °C

El objetivo de variar los pH iniciales del medio de cultivo consistía en observar posibles efectos inhibitorios de la acidez en la capacidad oxidativa, lo que se ve reflejado en las curvas con pH iniciales muy ácidos (Gráfico 11), pues en estos casos no se observan mayores variaciones del pH, siendo el medio de mayor pH inicial el que presenta la mayor variación de este. Sin embargo para analizar la actividad oxidativa es necesario calcular la velocidad de producción de protones en el tiempo para cada cultivo con medio Norris de diferente pH inicial.

En la Tabla 4 es posible apreciar la capacidad oxidativa de los cultivos con medio a diferente pH inicial, una vez transcurridas 24 horas de cultivo, calculadas a través de la siguiente ecuación.

$$velocidad_{oxidación} = \frac{masa\ de\ protones}{tiempo \cdot masa\ de\ azufre\ elemental\ inicial} \quad Ec. 15$$

Tabla 8: Capacidad oxidativa de *S. metallicus* a las 24 horas de cultivo en medio de pH inicial de 3; 1,7; 1,5 y 1.

| pH inicial | Velocidad [1/h] |
|------------|-----------------------|
| 3 | $2,21 \times 10^{-6}$ |
| 1,7 | $5,34 \times 10^{-6}$ |
| 1,5 | $5,24 \times 10^{-6}$ |
| 1 | $1,66 \times 10^{-5}$ |

Las velocidades obtenidas para las 24 horas de cultivo indican que la mayor actividad oxidativa es la del cultivo a pH inicial 1 y que presenta una tendencia general de aumentar la actividad oxidativa a medida que disminuye el pH. El aumento en la

capacidad oxidativa inicial con la disminución del pH puede ser explicado por las características óptimas de cultivo para las células, acelerando la etapa de adaptación al medio.

Al comparar los valores obtenidos para la velocidad de oxidación inicial con valores calculados a partir de un estudio con cultivos de la bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans* sobre perlas de azufre elemental (Herrera R., 2012) se observa que a las 23 horas de cultivo la velocidad de oxidación es de $1,3 \times 10^{-5}$ [1/h] con un pH de 1,8. Luego esta velocidad sólo es inferior a la obtenida para el cultivo de *S. metallicus* con pH inicial 1. Y esta diferencia radica en que son diferentes cepas, por lo que el pH óptimo de cultivo difiere.

A pesar de que es posible observar una variación en el pH y en la velocidad oxidativa inicial, no es lo suficientemente considerable como para asumir efectos inhibitorios por acidez y construir un modelo en base a estos datos, pues otras variables pueden estar afectando el proceso, como la distribución de la concentración celular o población homogénea de células sobre las perlas de azufre y la actividad de las células adheridas a las perlas, entre otras.

7. Conclusiones

El proceso de oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico requirió de la presencia de *Sulfolobus metallicus* a 67 °C para que la reacción ocurriera, pues en ausencia de la arquea y a pesar de las altas temperaturas, no ocurrió una apreciable oxidación del azufre elemental.

La conversión del proceso de biooxidación de azufre elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67 °C fue influenciado por la acidez del medio y por la presencia de intermediarios, lo que generó un comportamiento no esperado entre la tendencia lineal de la producción de sulfato y ácido sulfúrico, en relación a la tendencia exponencial del crecimiento celular. El aumento en la acidez del sistema, que puede disminuir e incluso provocar la desaparición de las células, y la presencia de intermediarios, considerando que el sistema es controlado por la reacción química, permiten explicar el comportamiento lineal que presenta la conversión.

La presencia de intermediarios sugiere que el mecanismo cooperativo es el que mejor describe la reacción.

Sulfolobus metallicus cultivado en perlas de azufre elemental a 67 °C presentó un gran capacidad oxidativa, que fue monitoreada a través de la disminución del pH. Se alcanzó una conversión del 29% de azufre elemental a las 216 horas de cultivo. Sin embargo, por la acidez y la presencia de intermediarios producidos por la oxidación parcial del azufre elemental, la producción de ácido sulfúrico y la conversión fueron lineales en vez de ser exponenciales como se esperaba por el comportamiento exponencial en el crecimiento de las células totales.

La reacción de oxidación de las perlas de azufre elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67 °C estuvo controlada por la reacción química. Con un tiempo de 1818 horas, equivalente a aproximadamente 76 días para completar la disolución de azufre elemental.

Las células de *Sulfolobus metallicus* cultivadas en las perlas de azufre elemental, inicialmente no alcanzaron tan altos porcentajes de adherencia inicial, sólo un 53, 2% y una adherencia inicial de $3,5 \times 10^6$ [células adheridas/cm²] a las 2 horas de cultivo. La concentración de células adheridas en el tiempo fue casi cinco veces mayor a la de las células planctónicas. Sin embargo, el mecanismo de oxidación debe ser cooperativo, donde las células adheridas oxidan parcialmente el azufre elemental y producen los intermediarios que terminan de oxidar las células plantónicas.

Las células adheridas a la superficie de las perlas de azufre crecen formando conglomerados lo que indica la preferencia de estas células por ciertas estructuras del azufre. Además de que las primeras 48 horas el crecimiento de las células y la conversión son exponenciales lo que puede corresponder al poblamiento superficial de las perlas.

Los experimentos sobre la influencia del pH inicial del medio de cultivo revelaron que la mayor velocidad inicial de oxidación ($1,7 \times 10^{-5}$ [h⁻¹]) se alcanzó con el medio de

cultivo de pH inicial más bajo (medio Norris con pH inicial de 1). Pero estos datos no son los suficientes para construir un modelo que considere los efectos de la acidez.

Finalmente debido a la alta conversión alcanzada y a la efectividad del ácido sulfúrico como agente lixivante por sobre los ácidos orgánicos para la disolución de fosfatos, es recomendable continuar los estudios para determinar la factibilidad de implementar el proceso de biooxidación de azufre elemental en las operaciones de VALE.

8. Recomendaciones

Una de las principales recomendaciones es realizar estudios en los que se pueda detectar y cuantificar la presencia de intermediarios que influyen en capacidad oxidativa de *Sulfolobus metallicus* sobre perlas de azufre elemental.

Debido a la formación de conglomerados de células sobre las perlas de azufre es necesario estudiar sobre qué tipo de estructura del azufre elemental presentan una mayor capacidad de adherencia.

También es necesario tener un método confiable y de alta precisión para la cuantificación del ión sulfato con el objetivo determinar exactamente la capacidad oxidativa del microorganismo.

Hubiese sido interesante también, registrar la evolución del potencial electroquímico, pues podría haber entregado mayor información con respecto al proceso oxidativo del azufre.

A pesar de no haber incluido en resultados datos experimentales previos, el efecto de la granulometría es muy importante en la actividad oxidativa (anexo D), dada la importancia del mecanismo de contacto, por lo que es recomendable utilizar perlas de un tamaño similar al de las utilizadas en este trabajo. Debido a que las perlas de mayor tamaño restringen la superficie disponible para la adherencia celular y si bien las perlas de tamaño pequeño aumentan la superficie, la capacidad de adherencia de las células disminuye cuando las perlas son muy pequeñas.

9. Bibliografía

Alcántara S. Estudio de la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfoxidantes. Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental. Tesis para optar a Doctor en Ciencias Biológicas. México. Universidad Autónoma Metropolitana, 2000. pp. 3-20.

Andrews D. y Kokes R. Fundamental Chemistry. 2ª Ed. USA, John Wiley & Sons, Inc. 1965. pp 570-595.

Auernik K., Maezato Y., Blum P., Kelly R., 2008. The genome sequence of the metal-mobilizing extremely Thermoacidophilic Archaeon *Metallosphaera sedula* provides insights into bioleaching-associated metabolism. Applied Environmental Microbiology 74: 682-692.

Bagdigian R., Meyerson A., 1986. The adsorption of *Thiobacillus ferrooxidans* on coal surfaces. Biotechnology and Bioengineering 28:467-479

Ballester A. Mecanismos de Biolixiviación. En: ACEVEDO F. y GENTINA J. Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras. Valparaíso, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, 2005. pp. 9-24.

COCHILCO, 2006. EL MERCADO DEL ÁCIDO SULFÚRICO EN CHILE PROYECTADO AL AÑO 2015, Comisión Chilena del Cobre. Dirección de Estudios y Políticas Públicas.

Crundwell F., 2003. How do bacteria interact with minerals? Hydrometallurgy 71: 75-81

DiSpirito A., Dugan P., Tuovinen O., 1983. Sorption of *Thiobacillus ferrooxidans* to particulate material. Biotechnology and Bioengineering 25: 1163-1168

Donati E., 2006. Biominería: Una tecnología alternativa. Fundación para el desarrollo de la tecnología de la minería argentina, Facultad de Ciencias Exactas. [En línea] La Plata, Argentina. <<http://www.fundamin.com.ar/es/publicaciones/61-mineria-y-medio-ambiente/105-biomineria-una-tecnologia-alternativa.html>> [Consulta: 20 Agosto 2012]

Escobar B., Hevia M., Vargas T., 2003. Evaluating the growth of free and attached cells during the bioleaching of chalcopyrite with *Sulfolobus metallicus*. Proceedings of International Biohydrometallurgy Symposium (IBS 2003).

Espejo R. y Romero P., 1987. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on elemental sulfur. Applied and Environmental Microbiology 53: 1907-1912

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

Gautier V., Escobar B., Vargas T., 2008. Cooperative action of attached and planktonic cells during bioleaching of chalcopyrite with *Sulfolobus metallicus* at 70°C. [En línea] <http://www.captura.uchile.cl/bitstream/handle/2250/7297/Gautier_V.pdf?sequence=1> [Consulta: 30 Enero 2013]

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

Han J. Physiological studies of extremely thermoacidophilic microorganisms under normal and stressed conditions. Disertación como requerimiento parcial para optar al grado de Doctor en Ingeniería Química. Universidad del Estado de Carolina del Norte, USA, 1998. pp 9.

He H., Xia J., Huang G., Jiang H., Tao X., Zhao Y., He W., 2011. Analysis of the elemental sulfur bio-oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* with sulfur K-edge XANES. World Journal of Microbiology and Biotechnology 27: 1927-1931.

Herrera R. Reacciones de oxidación de compuestos reducidos de azufre en cultivos de microorganismos biolixivantes. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil en Biotecnología. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. 2012.

Huber H., Stetter K., 1998. Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology. Journal of Biotechnology 64: 39-52.

Levenspiel O., 1993. Ingeniería de las Reacciones Químicas. Reverté Ediciones S.A. México D.F. pp. 397-411.

Meyer B., 1976. Elemental Sulfur. Chemical Reviews 76: 367-388.

Mustin C., Berthelin J., Marion P., Donato P., 1992. Corrosion and electrochemical oxidation of a pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. Applied Environmental Microbiology 58: 1175-1182.

Nemati M., Harrison S.T.L., 2000. A comparative study on thermophilic and mesophilic biooxidation of ferrous iron. Minerals Engineering 13: 19-24.

Nemati M., Lowenadler J., Harrison S.T.L., 2000. Particle size effects in bioleaching of pyrite by acidophilic thermophile *Sulfolobus metallicus* (BC). Applied Microbiology and Biotechnology 53: 173-179.

Norris P., 2006 Acidophile diversity in mineral sulfide oxidation. Biomining, Rawlings D.E. and Johnson B.D., Springer. pp 201-216.

Norris P., Burton N., Foulis N., 2000. Acidophiles in a bioreactor mineral processing. Extremophiles 4: 71-76.

Norris P. y Owen J. Strain Selection for High Temperature Oxidation of Mineral Sulfides in Reactors, Harnessing Biotechnology for the 21st century. Washington, American Chemical Society, 1992. pp 445-458.

Patino E., Sandoval R., Frenay J. Kinetics of sulfur oxidation: pH and temperature influence on bioleaching. En: TSEZOS M., REMOUDAKI E. y HATZIKIOSEYIAN A. Proceedings of the International Biohydrometallurgy, Symposium IBS'03. Tsezos M., Amsterdam, Elsevier, 2003. pp. 285-289.

Pina S., Oliveira V., Cruz F., Leão V., 2010. Kinetics of ferrous iron oxidation by *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Biochemical Engineering Journal 51: 194-197.

Plumb J., Gibbs B., Stott M., Robertson W., Gibson J., Nichols P., Watling H., Franzmann P., 2002. Enrichment and characterisation of thermophilic acidophiles for the bioleaching of mineral sulphides. Minerals Engineering 15: 787-794.

Rodríguez Y., Blázquez M.L., Ballester A., González F., Muñoz J.A., 2001. La biolixiviación al comienzo del siglo XXI. Revista de Metalurgia Madrid 37: 616-627.

Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K., Sand W., 2003. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulphide oxidation. Applied Microbiology and Biotechnology 63: 239-248.

Rojas-Chapana J., Bärtels C., Pohlmann L., Tributsch H., 1998. Co-operative leaching and chemotaxis of *thiobacilli* studied with spherical sulphur/sulphide substrates. Process Biochemistry 33: 239-248

Sand W., Gehrke T., Jozsa P., Schippers A., 2001. (Bio) chemistry of bacterial leaching- direct vs. indirect bioleaching. Hydrometallurgy 59: 159-175

Shrihari, Bhavaraju S., Modak J., Kumar R., Gandhi K., 1993. Dissolution of sulfur particles by *Thiobacillus ferrooxidans*: substrate for unattached cells. Biotechnology and Bioengineering 41: 612-616.

Singer P., Stumm W., 1970. Acidic mine drainage: the rate determining step. Science 67: 1121-1123

Steudel, R. The chemical sulfur cycle. En: LENS P. y HULSHOFF P. Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution – Principles and Engineering. Londres, International Water Association, 2000. pp. 1-31.

Stott M. B., Sutton D., Watling H. R., Franzmann P. D., 2003. Comparative leaching of chalcopyrite by selected acidophilic *Bacteria* and *Archaea*. Geomicrobiology Journal 20: 215-230.

Tributsch H., 2001. Direct versus indirect bioleaching. Hydrometallurgy 59: 177-185

VALE. What do we do. [En línea] <<http://www.vale.com/en-us/o-que-fazemos/pages/default.aspx>> [Consulta: 22 Enero 2012]

Watling H., 2006. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides. *Hydrometallurgy* 84: 81-108

Wang J., Shen S., Kang J., Li H., Guo Z., 2010. Effect of ore solid concentration on the bioleaching of phosphorus from high-phosphorus iron ores using indigenous sulphur-oxidizing bacteria from municipal wastewater. *Process Biochemistry* 45, 1624-1631.

10. Anexos

A. Implementación de metodología para la obtención de esferas o perlas de azufre

Como fue mencionado en la sección 4.1 Metodología Experimental, a continuación se detalla el procedimiento realizado para la obtención de perlas de Azufre elemental utilizadas en los ensayos de este trabajo.

Materiales y equipos

- Azufre p.a. Merck.
- 5 L de Agua Destilada.
- Reactor de 10 L.
- Agitador IKA LABORTECHNIK modelo RW 20 N.
- Manto Calefactor.
- Termómetro Brannan de -20 a 260 °C.
- Balón de 500 ml diseñado.
- Tamices ENDECOTTS LTD.
- Estufa de Secado.
- Papel Filtro.
- Equipo de Filtración.
- Campana de extracción.
- Soportes y parrilla metálica.

Obtención de perlas de azufre

- Instalar el reactor con el agitador.
- Agregar el agua destilada al reactor.
- Posicionar el manto calefactor con el balón sobre el reactor.
- Regular el manto calefactor y controlar con el termómetro que alcance una temperatura inicial de 130 °C.
- Agregar el azufre dosificado y verificar que la temperatura no sobrepase los 160 °C.
- Una vez que el azufre se funde y cae sobre el agua destilada en agitación se obtienen las esferas o perlas de azufre.
- Filtrar la solución para separar las perlas de azufre del agua destilada.
- Llevar el filtro con la perlas de azufre a secado a 30 °C por 24 horas.
- Utilizar los tamices para separar por granulometría las perlas de azufre.

B. Modelo del núcleo sin reaccionar

El modelo del núcleo sin reaccionar corresponde a un modelo que representa las reacciones heterogéneas sólido-fluido, donde el sólido es contactado con un gas o líquido que reaccionan y dan origen a productos.

En este modelo la reacción ocurre inicialmente en la superficie de partícula sólida para posteriormente desplazarse al interior del sólido, dejando el material convertido y el sólido inerte sobre la superficie (Figura 8). Es por esto que el modelo recibe el nombre de núcleo sin reaccionar, pues este modelo supone que existe un núcleo sólido de la partícula que se encuentra sin reaccionar.

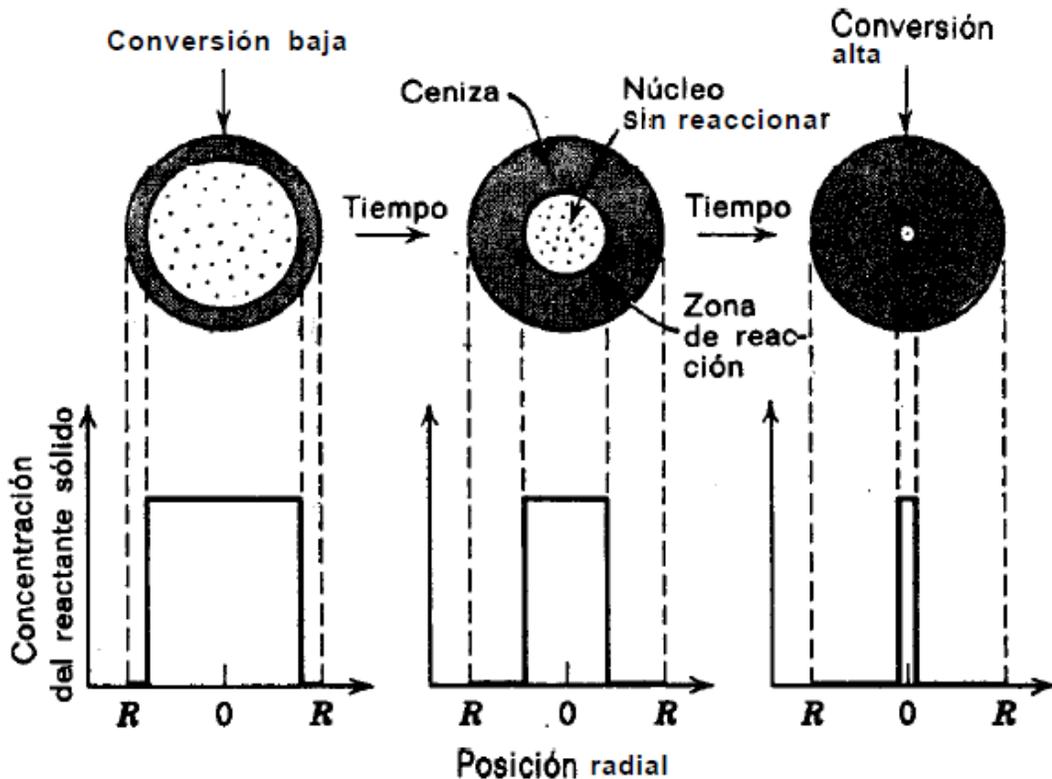


Figura 8: Esquema del modelo de núcleo sin reaccionar, en que la el núcleo va disminuyendo su tamaño mientras avanza la reacción a través del sólido (Levenspiel O., 1993).

Las partículas sólidas no cambian de tamaño durante la reacción cuando contienen gran cantidad de impurezas, pues estas quedan adheridas como ceniza o formando un producto material consolidado. Sin embargo, las cuando la ceniza es no adherente o el producto no es consolidado el tamaño de los sólidos disminuye.

Entonces, dado que el comportamiento de la lixiviación de una partícula de mineral o concentrado está relacionado con las etapas involucradas en el modelo del núcleo sin reaccionar. Este modelo también puede ser aplicado a procesos como la biooxidación de azufre elemental. Este mecanismo cuenta de una serie de 5 etapas que se detallan a continuación.

- Difusión de los reactivos a través de la capa límite hacia superficie de la partícula.
- Reactivo penetra y difunde en el interior de la partícula hacia la zona de reacción.
- Ocurre la reacción química, formándose los productos de esta.
- Los productos solubles de la reacción difunden en el interior de la partícula hacia la superficie de ésta.
- Los productos solubles difunden a través de la capa límite hacia el seno de la solución.

Luego, dependiendo de las resistencias que impongan estas diferentes etapas es posible establecer la etapa que controla la velocidad de oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico, pues la que presenta mayor resistencia es la que controla el proceso.

La conversión de las partículas en el tiempo puede ser calculada en función del radio de las partículas y el radio sin reaccionar, sin embargo en este trabajo se calculó con la concentración de sulfato y la masa inicial de azufre.

Las ecuaciones del modelo de núcleo sin reaccionar para partículas esféricas de tamaño constante en función del tiempo y de la etapa de control se muestran a continuación.

Difusión a través de la película

Corresponde a la etapa en que los reactivos difunden desde el seno del fluido a la superficie del sólido o capa límite que lo rodea. Se modela por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{t}{\tau} = x \quad \text{Ec. 16}$$

$$\tau = \frac{\rho_B \cdot R}{3 \cdot b \cdot k_g \cdot C_{Ag}} \quad \text{Ec. 17}$$

Difusión a través de la ceniza

Corresponde a la etapa de penetración y difusión del reactivo a través de la ceniza hasta la superficie reactiva del sólido. Se modela por las siguientes ecuaciones cuando la concentración del reactivo permanece constante en el tiempo:

$$\frac{t}{\tau} = 1 - 3(1 - x)^{\frac{2}{3}} + 2(1 - x) \quad \text{Ec. 18}$$

$$\tau = \frac{\rho_B \cdot R^2}{4 \cdot b \cdot D_e \cdot C_{Ag}} \quad \text{Ec. 19}$$

Reacción química

Corresponde a la etapa de reacción entre el reactante y el sólido en la superficie reactiva. Se modela por las siguientes ecuaciones cuando la concentración del reactivo permanece constante en el tiempo:

$$\frac{t}{\tau} = 1 - 1(1 - x)^{\frac{1}{3}} \quad \text{Ec. 20}$$

$$\tau = \frac{\rho_B \cdot R}{b \cdot k_s \cdot C_{Ag}} \quad \text{Ec. 21}$$

Donde,

τ : tiempo de conversión total del sólido.

x : conversión.

ρ_B : densidad de la partícula.

R : radio inicial de la partícula.

b : coeficiente estequiométrico de la fase sólida.

C_{Ag} : concentración del reactivo en la superficie.

k_g : coeficiente de transferencia de masa entre el fluido y la partícula sólida.

D_e : coeficiente de difusión efectiva del reactante en la ceniza.

k_s : coeficiente cinético de primer orden para la reacción en la superficie.

C. Células planctónicas y adheridas a las perlas de azufre elemental

Cuantificación de células adheridas y planctónicas

Con los datos obtenidos del conteo de células en solución en el microscopio de epifluorescencia, es posible determinar concentración promedio de células planctónicas en el tiempo por área $\overline{[Células P]_{\text{área}}}$, luego la concentración de células planctónicas totales queda dada por la siguiente ecuación.

$$Células_t^{totales} = \frac{\overline{[Células P]_{\text{área}}} \cdot C_{\text{área/volumen}}}{V_{\text{muestra DAPI}}} \quad \text{Ec. 22}$$

Con,

$$C_{\text{área/volumen}} = 1,734 \cdot 10^7$$

Donde,

$C_{\text{área/volumen}}$: factor de conversión a concentración volumétrica.

$V_{\text{muestra DAPI}}$: volumen de la muestra de solución tomada para la fijación de las células a la membrana de policarbonato.

Luego para determinar las células adheridas a las perlas de azufre se debe calcular la superficie total disponible en función del radio de las partículas de azufre estimando un radio promedio (r) entre las granulometrías utilizadas, como se muestra en las siguientes ecuaciones.

$$A_{\text{esférica}}^{\text{part.azufre}} = 4 \cdot \pi \cdot r_{\text{part.azufre}}^2 \quad \text{Ec. 23}$$

$$V_{\text{esférica}}^{\text{part.azufre}} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r_{\text{part.azufre}}^3 \quad \text{Ec. 24}$$

Entonces, el área de las perlas disponible (A_{total}), está dada por la masa de azufre de la muestra (m_{azufre}), la densidad promedio de esta (ρ_{azufre}), el área y volumen esféricos de las partícula, expuestos previamente.

$$A_{\text{total}} = \frac{m_{\text{azufre}} \cdot A_{\text{esférica}}^{\text{part.azufre}}}{\rho_{\text{azufre}} \cdot V_{\text{esférica}}^{\text{part.azufre}}} \quad \text{Ec. 25}$$

Por lo tanto, la expresión para la cantidad de células totales adheridas a la superficie de azufre en el tiempo ($Células A_t^{totales}$), que depende de la cantidad promedio de células por área de azufre ($Células A_t^{area}$) y del area total disponible de las perlas (A_{total}), queda de la siguiente ecuación.

$$Células A_t^{totales} = Células A_t^{area} \cdot A_{\text{total}} \quad \text{Ec. 26}$$

Determinación de las células adheridas a las perlas de azufre elemental

Con los datos obtenidos del conteo de células en solución mediante recuento directo en el microscopio de contraste de fases y la cámara de recuento Petroff-Hausser, se calcula un promedio de células en cada muestreo $\overline{Células_t^{contadas}}$ y se multiplica por 2×10^7 . Luego como la cantidad de total de células $Células_t^{totales}$ corresponde al producto de la concentración de células contadas y el volumen de la solución en el matraz (V_{matraz}), la cantidad de células totales puede ser representada por:

$$Células_t^{totales} = \overline{Células_t^{contadas}} \cdot (2 \cdot 10^7) \cdot V_{matraz} \quad \text{Ec. 27}$$

Finalmente como la cantidad de células adheridas depende de la cantidad de células iniciales y de la cantidad de células planctónicas en un momento determinado, el porcentaje de adherencia para las células en un momento determinado queda dado por la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Adherencia} = \frac{Células_{t=0}^{totales} - Células_t^{totales}}{Células_{t=0}^{totales}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 28}$$

D.Efecto de la granulometría en la capacidad oxidativa de *Sulfolobus metallicus* en perlas de azufre elemental a 67 °C

La granulometría es determinante para la actividad oxidativa de las células, pues a menor tamaño de las partículas mayor superficie disponible para adherirse, lo que implica un aumento en el crecimiento de las células sobre esta superficie, y por consiguiente, un aumento en la actividad oxidativa total. Sin embargo, cuando la granulometría de las partículas es muy pequeña las células no son capaces de adherirse, por lo que es necesario encontrar un tamaño de partícula ideal.

En los ensayos realizados previos a los experimentos de este trabajo se analizó el efecto de la granulometría sobre la capacidad oxidativa, registrando la evolución del pH en el tiempo para matraces en las mismas condiciones, pero con diferente granulometría, tal como se observa en el Gráfico 16. La granulometría fina corresponde a la granulometría utilizada para este estudio (entre 1 y 0,355 mm de diámetro) y la granulometría gruesa corresponde a una granulometría sobre los 2 mm.

La línea azul corresponde a los datos obtenidos para el cultivo de *Sulfolobus metallicus* a 67 °C con una granulometría gruesa durante 240 horas, donde se registra un pH inicial de 2,1 y un pH final de 1,37 a las 240 horas de cultivo.

Las líneas rojas representan la evolución del pH para cultivos con *Sulfolobus metallicus* a 67 °C, utilizando perlas de azufre de una granulometría fina, que fue la utilizada en este trabajo. En el Gráfico 16 se observa una primera curva roja, que

corresponde a la evolución de pH entre las 0 y las 120 horas, que presentan un pH inicial de 2 y un pH final de 1,3. En punto de discontinuidad para la línea roja a las 120 horas de cultivo corresponde al cambio de medio para los matraces de granulometría fina, donde el nuevo pH inicial es de 2 y en pH final es de 1,37.

Entonces, a modo de conclusión cuando se utilizaron granulometrías mayores, fue más lenta la capacidad oxidativa de los microorganismos, pues para bajar desde un pH 2 a un pH 1,37 demoraron 240 horas. Sin embargo, cuando se utilizó una granulometría menor, se tardó la mitad del tiempo en disminuir desde un pH 2 a un pH 1,37. Por lo que la velocidad de oxidación aumentó al doble cuando se utilizó la granulometría fina.

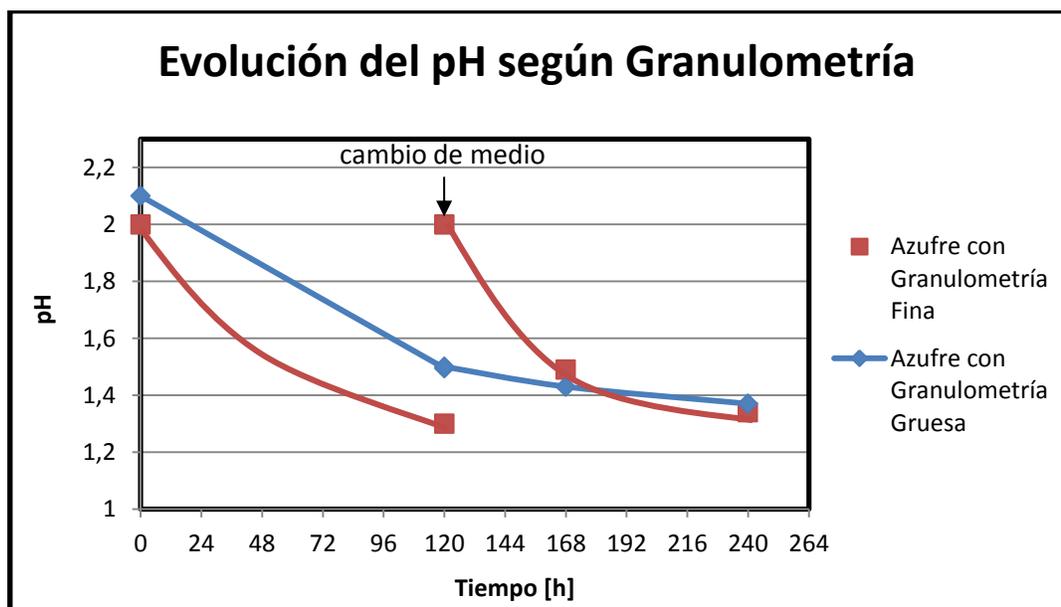


Gráfico 16: Efecto de la granulometría en cultivos con perlas de azufre elemental de iguales condiciones, salvo por la diferente granulometría.

E. Titulación para determinar la concentración de protones

Materiales y equipos

- Agitador magnético.
- Magnetos.
- Matraces Erlenmeyer de 350 ml.
- Bureta graduada de 0 a 10 ml.
- Soporte Universal.
- Anaranjado de metilo.
- Agua destilada.
- Patrón de Hidróxido de Sodio (NaOH) 0,1 N.

- Pipeta de 5 ml.
- Probeta de 100 ml.

Medición de Acidez

- Agregar 95 ml de agua destilada en el matraz con la probeta.
- Agregar 5 ml de muestra en el matraz con la pipeta.
- Ambientar y llenar la bureta con el Hidróxido de Sodio.
- Colocar el matraz con el magneto sobre el agitador magnético.
- Posicionar la bureta en el soporte universal sobre el matraz.
- Adicionar el anaranjado de metilo con gotario y encender el agitador magnético.
- Abrir la válvula de la bureta para permitir el paso del hidróxido de sodio en el matraz y cerrar la válvula al observar el viraje de color de la reacción, registrando el consumo de hidróxido de sodio.