



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

**ESTUDIO DE LA BIOOXIDACIÓN DE AZUFRE  
ELEMENTAL POR *SULFOBACILLUS  
THERMOSULFIDOOXIDANS* A 45°C**

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

**RHIDA ELENA LIRA AMPUERO**

PROFESOR GUÍA:

BLANCA ESCOBAR MIGUEL

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

TOMÁS VARGAS VALERO

FRANCISCO GRACIA CAROCA

SANTIAGO DE CHILE  
JULIO 2013

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE INGENIERA CÍVICIL QUÍMICA E  
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA  
POR: RHIDA LIRA AMPUERO  
FECHA: 04/06/2013

**ESTUDIO DE LA BIOOXIDACIÓN DE AZUFRE ELEMENTAL POR  
*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C**

El presente trabajo de título tiene como principal objetivo caracterizar el comportamiento de la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en la biooxidación de azufre elemental, para de esta forma contribuir a una mejor comprensión del comportamiento de este microorganismo en la producción de ácido sulfúrico; evalúa para ello su capacidad de oxidación y adherencia al azufre elemental con el objetivo de poder investigar la factibilidad técnica de la producción de ácido sulfúrico con este microorganismo a nivel industrial.

Para lo anterior se utilizaron cultivos puros de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en matraces agitados a 45°C en azufre en perlas estériles, con extracto de levadura. Se monitorearon periódicamente el pH, la concentración de ácido sulfúrico y sulfato en solución. Junto con lo anterior, se realizó el recuento de las células planctónicas y adheridas al azufre por medio de tinción DAPI, observación y recuento en un microscopio de Epifluorescencia.

Los resultados indicaron que el proceso de biooxidación de azufre elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* depende en gran medida de la concentración de las bacterias en la superficie del azufre, lo cual permitió el desarrollo de un modelo para que describe la cinética de este proceso. Con el modelo se estimó que el proceso es controlado principalmente por la difusión del oxígeno en el biofilm, requiriéndose 2000 horas para la completa oxidación del azufre. Asimismo, demostró que esta bacteria termófila moderada posee una alta capacidad azufre-oxidante, alcanzándose a las 312 horas de cultivo una concentración de 10,54 [g/L] de ácido sulfúrico. Junto con lo anterior, se demostró que *S. thermosulfidooxidans* posee un porcentaje de adherencia de 54% a la superficie del azufre elemental, además de un elevado crecimiento celular, tanto en la superficie del azufre como en la solución, cuantificándose a las 216 horas de cultivo  $6,6 \times 10^{11}$  y  $2,9 \times 10^{12}$  bacterias en suspensión y adheridas respectivamente, correspondientes al máximo número de microorganismos registrados. Por último, se determinó que el mecanismo por el cual estas bacterias oxidan el azufre es el mecanismo de lixiviación cooperativo, ya que tanto las bacterias planctónicas como las adheridas contribuyen a la oxidación del azufre elemental.

*A mi Hermanito*

## **Agradecimientos**

En primer lugar quisiera agradecerle a mi familia todo el apoyo y amor que siempre me han brindado, en especial a mis padres y a mis hermanos. Han estado conmigo toda mi vida y siempre supieron ser un apoyo y un refugio en todo tipo de situaciones.

A su vez quisiera agradecerles a mis amigos por todo el cariño y por siempre haber estado a mi lado en las buenas y en las malas, siempre haciendo cada día un momento inolvidable, en especial a: Chukie , Nati, Mumy, Niki, Andi, Vale, Dani, Yobi, Marce, Dani A.

Es muy importante para mi agradecerles a tres personas que estos últimos años se volvieron parte fundamental de mi vida, creo que sin su presencia y ayuda se me hubiera echo imposible concluir este trabajo, ya que su apoyo y amistad marco una gran diferencia. Muchas gracias a Juanrra, Gus Gus y Anjelo.

También quisiera agradecerle a mis profesores Blanca Escobar, Tomas Vargas y Francisco Gracia, por toda la ayuda que me brindaron en este trabajo y por la buena disposición que siempre tuvieron para solucionar mis dudas e inquietudes.

Por último quisiera agradecerle a la Emmita por todas sus enseñanzas, su cariño y dedicación, me hiciste sentir como en casa y me ayudaste indefinidas veces, siempre vas a tener un lugar en mi corazón.

# TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>ANTECEDENTES GENERALES</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>BIOLIXIVIACIÓN Y BIOOXIDACIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3</b>	<b>MICROORGANISMOS QUE PARTICIPAN EN LOS PROCESOS DE BIOOXIDACIÓN Y BIOLIXIVIACIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4</b>	<b>EL AZUFRE Y LAS BACTERIAS AZUFRE-OXIDANTES</b> .....	<b>6</b>
<b>1.5</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DE <i>SULFOBACILLUS THERMOSULFIDOOXIDANS</i></b> .....	<b>8</b>
<b>1.6</b>	<b>MECANISMOS DE BIOLIXIVIACIÓN</b> .....	<b>9</b>
1.6.1	MECANISMO DEL TIOSULFATO.....	9
1.6.2	MECANISMO DEL POLISULFURO.....	10
1.6.3	MECANISMO DE LIXIVIACIÓN INDIRECTA .....	11
1.6.4	MECANISMO DE LIXIVIACIÓN POR CONTACTO .....	12
1.6.5	MECANISMO DE LIXIVIACIÓN COOPERATIVO .....	13
<b>1.7</b>	<b>FUNCIÓN DE LAS BACTERIAS AZUFRE OXIDANTES EN LA LIXIVIACIÓN DE MINERALES SULFURADOS</b> .....	<b>14</b>
<b>1.8</b>	<b>CRECIMIENTO BACTERIANO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.9</b>	<b>ADHESIÓN BACTERIANA AL MINERAL</b> .....	<b>17</b>
<b>1.10</b>	<b>FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VELOCIDAD DE BIOOXIDACIÓN</b> .....	<b>20</b>
<b>1.11</b>	<b>REACCIONES HETEROGÉNEAS</b> .....	<b>21</b>
1.11.1	LA REACCIÓN QUÍMICA COMO ETAPA CONTROLANTE.....	24
1.11.2	LA DIFUSIÓN A TRAVÉS DE LA PELÍCULA GASEOSA COMO ETAPA CONTROLANTE .....	25
<b>2</b>	<b><u>MOTIVACIÓN</u></b> .....	<b>26</b>
<b>3</b>	<b><u>DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO Y JUSTIFICACIÓN</u></b> .....	<b>27</b>
<b>4</b>	<b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b>ALCANCES</b> .....	<b>29</b>
<b>5</b>	<b><u>METODOLOGÍA</u></b> .....	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>MATERIALES Y EQUIPOS</b> .....	<b>30</b>
<b>5.2</b>	<b>DISEÑO DEL EXPERIMENTO</b> .....	<b>30</b>
<b>5.3</b>	<b>IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE ESFERAS O PERLAS DE AZUFRE</b> .....	<b>31</b>
<b>5.4</b>	<b>ESTERILIZACIÓN DEL AZUFRE ELEMENTAL</b> .....	<b>32</b>
5.4.1	CULTIVOS DE BACTERIAS EN AZUFRE CON EXTRACTO DE LEVADURA.....	32
5.4.2	EXPERIMENTOS CONTROL.....	33
<b>5.5</b>	<b>ANÁLISIS BIOLÓGICOS</b> .....	<b>34</b>
5.5.1	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ADHERENCIA BACTERIANA AL AZUFRE .....	34
5.5.2	RECUENTO DE BACTERIAS PLANCTÓNICAS Y ADHERIDAS AL MINERAL MEDIANTE TINCIÓN DAPI	
	35	

<b>6</b>	<b><u>RESULTADOS</u></b> .....	<b>37</b>
<b>6.1</b>	<b>CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE LA BACTERIA <i>SULFOBACILLUS THERMOSULFIDOOXIDANS</i> AL AZUFRE ELEMENTAL</b> .....	<b>37</b>
<b>6.2</b>	<b>BIOOXIDACIÓN DE AZUFRE ELEMENTAL CON <i>SULFOBACILLUS THERMOSULFIDOOXIDANS</i> A 45°C</b> .....	<b>38</b>
6.2.1	EVOLUCIÓN DEL PH .....	38
6.2.2	EVOLUCIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE AZUFRE .....	39
<b>6.3</b>	<b>ANÁLISIS BIOLÓGICOS</b> .....	<b>43</b>
6.3.1	CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS PLANCTÓNICAS .....	43
6.3.2	CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ADHERIDAS A LA SUPERFICIE DEL AZUFRE .....	46
6.3.3	CURVA DE CRECIMIENTO .....	48
6.3.4	CINÉTICA DE LA OXIDACIÓN DE AZUFRE POR <i>SULFOBACILLUS THERMOSULFIDOOXIDANS</i> A 45°C	49
<b>6.4</b>	<b>ANÁLISIS CUALITATIVOS DE LOS CULTIVO DE BIOOXIDACIÓN Y EXPERIMENTO CONTROL</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b><u>DISCUSIONES</u></b> .....	<b>60</b>
<b>7.1</b>	<b>CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE <i>SULFOBACILLUS THERMOSULFIDOOXIDANS</i> SOBRE AZUFRE ELEMENTAL</b> .....	<b>60</b>
<b>7.2</b>	<b>ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS</b> .....	<b>62</b>
<b>7.3</b>	<b>ANÁLISIS BIOLÓGICOS</b> .....	<b>66</b>
<b>7.4</b>	<b>CONVERSIÓN DEL PROCESO</b> .....	<b>69</b>
<b>7.5</b>	<b>COMPARACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE AZUFRE ELEMENTAL CON <i>SULFOBACILLUS THERMOSULFIDOOXIDANS</i> A 45°C Y <i>SULFOLOBUS METALLICUS</i> A 67°C</b> .....	<b>71</b>
<b>8</b>	<b><u>DISCUSIÓN GENERAL</u></b> .....	<b>75</b>
<b>9</b>	<b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	<b>77</b>
<b>10</b>	<b><u>RECOMENDACIONES</u></b> .....	<b>79</b>
<b>11</b>	<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	<b>80</b>
<b>12</b>	<b><u>ANEXOS</u></b> .....	<b>84</b>
<b>A.</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA ADHERENCIA BACTERIANA AL AZUFRE</b> .....	<b>84</b>
<b>B.</b>	<b>CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS PLANCTÓNICAS Y ADHERIDAS</b> .....	<b>84</b>
<b>C.</b>	<b>ANÁLISIS QUÍMICOS</b> .....	<b>86</b>
C.1	DETERMINACIÓN DE SULFATO EN SOLUCIÓN POR TURBIDIMETRÍA .....	86
C.2	ENSAYOS DE TITULACIÓN .....	87
	MEDICIÓN DE LOS PROTONES EN SOLUCIÓN .....	87
<b>D.</b>	<b>GRÁFICOS DE LA OXIDACIÓN DE AZUFRE ELEMENTAL CON <i>SULFOLOBUS METALLICUS</i></b> .....	<b>88</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Reacciones de oxidación y reducción catalizadas por bacterias. ....	7
Tabla 2: Nomenclatura Modelo del Núcleo sin Reaccionar.....	23
Tabla 3: Características de las Partículas de Azufre Elemental.....	46
Tabla 4: Datos del Azufre Utilizado en los Experimentos .....	46
Tabla 5: Tiempos de Conversión Completa para las Resistencias de la Reacción Química y la Difusión en la Película.....	56
Tabla 6: Relación molar entre sulfato y protones.....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distintos hábitats donde se desarrollan bacterias quimiolitotróficas .....	8
Figura 2: Mecanismos Propuestos por W. Sand. A) Mecanismos del Tiosulfato; B) Mecanismo del Polisulfuro (Sand et al., 2001) .....	10
Figura 3: Mecanismo de Lixiviación por Contacto Propuesto por H. Tributsch (Tributsch., 2001) .....	13
Figura 4: Mecanismos de Lixiviación Propuestos por H. Tributsch (Ballester., 2005). .	14
Figura 5: Fases del Crecimiento Bacteriano (Gómez., 2012).....	16
Figura 6: Representación del mecanismo de lixiviación por contacto catalizada por una célula de <i>At. ferrooxidans</i> . La célula queda embebida en la capa de EPS adhiriéndose a la piritita por interacción electrostática. Durante la oxidación de tiosulfato y tetratiónatos puede formar agregados de azufre elemental y politionatos en el espacio periplasmático (glóbulos de azufre) (Rohwerder et al., 2003).....	18
Figura 7: Modelo de la Oxidación Bacteriana de Azufre Elemental (Rohwerder et al., 2003).....	19
Figura 10: Ilustración del Modelo del Núcleo sin Reaccionar en Ausencia de Ceniza (Levenspiel., 1987) .....	23
Figura 11: Fotografía al Microscopio de Epifluorescencia de las Bacterias Planctónicas. 1) 0 horas de cultivo, 2) 72 horas de cultivo, 3) 144 horas de cultivo, 4) 216 horas de cultivo. ....	45
Figura 12: Fotografía al Microscopio de Epifluorescencia de <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> en Azufre Elemental. 1) 0 horas de cultivo, 2) 24 horas de cultivo .....	47
Figura 13: Fotografía de los Experimentos Control al Inicio (1) y Final de los Experimentos (2).....	58
Figura 14: Fotografía de los Cultivos de Biooxidación con <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> . A la derecha: Cultivos en tiempo inicial y su duplicado; A la izquierda: Cultivos en su tiempo final y duplicado .....	59



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Recuento de bacterias planctónicas totales y porcentaje de adherencia de <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> sobre azufre a 45°C durante las primeras 5 horas.	37
Gráfico 2: Comparación de la variación del pH durante el proceso de biooxidación de azufre a 45°C con <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> y el experimento control.	39
Gráfico 3: Comparación de la variación de la concentración de sulfato en solución medida en el experimento control y la determinada durante el proceso de biooxidación de azufre a 45°C con <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> .	40
Gráfico 4: Variación de la concentración de Ácido Sulfúrico y Protones en el cultivo de biooxidación con <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> a 45°C.	41
Gráfico 5: Relación entre el pH y la concentración de Ácido Sulfúrico.	41
Gráfico 6: Variación de la concentración de azufre oxidado durante el proceso de biooxidación a 45°C con <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> .	42
Gráfico 7: Crecimiento de <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> en Solución a 45°C.	43
Gráfico 8: Fase Exponencial del Crecimiento de <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> en Solución a 45°C.	44
Gráfico 9: Linealización de la Fase Exponencial del Crecimiento Celular de <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> .	44
Gráfico 10: Crecimiento de <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> en Azufre Elemental.	47
Gráfico 11: Curva de Crecimiento de <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> en Azufre Elemental a 45°C.	48
Gráfico 12: Conversión Molar de Azufre a Ácido Sulfúrico.	49
Gráfico 13: Ajuste Modelo del Núcleo sin Reaccionar; Control por la Reacción Química.	49
Gráfico 14: Ajuste Modelo del Núcleo sin reaccionar; Control por Difusión en la Película.	50
Gráfico 15: Ajuste Modelo del Núcleo sin Reaccionar; Control por Difusión en la Ceniza.	50
Gráfico 16: Ajuste Modelo del Núcleo sin Reaccionar; Control por Difusión en la Película con Tamaño de Partícula Decreciente.	51
Gráfico 17: Crecimiento Bacteriano en Azufre Elemental.	52
Gráfico 18: Modelo Cinético para los Resultados de Oxidación de Azufre con <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> a 45°C.	55
Gráfico 19: Rendimiento de la Biooxidación de Azufre con <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> a 45°C.	57
Gráfico 20: Comparación entre el pH medido y el pH estimado mediante la concentración de protones en solución.	64
Gráfico 21: Evolución del pH en un cultivo de seis meses de antigüedad con <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> en azufre a 45°C.	66
Gráfico 22: Evolución de la conversión de azufre elemental a ácido sulfúrico con <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> a 45°C.	70
Gráfico 24: Adherencia al Azufre Elemental de <i>Sulfolobus metallicus</i> (Pacheco., 2012).	88
Gráfico 25: Variación del pH en el Proceso de Oxidación de Azufre Elemental con <i>Sulfolobus metallicus</i> a 67°C (Pacheco., 2012).	89
Gráfico 26: Crecimiento Celular de <i>Sulfolobus metallicus</i> en Azufre Elemental a 67°C (Pacheco., 2012).	89

Gráfico 27: Concentración de Ácido Sulfúrico y Protones en la Oxidación de Azufre Elemental con <i>Sulfolobus metallicus</i> a 67°C (Pacheco., 2012) .....	90
Gráfico 28: Concentración de Sulfato en la Oxidación de Azufre Elemental con <i>Sulfolobus metallicus</i> a 67°C (Pacheco., 2012).....	90
Gráfico 29: Conversión del Proceso de Oxidación de Azufre Elemental con <i>Sulfolobus metallicus</i> a 67°C (Pacheco., 2012).....	91
Gráfico 30: Modelo del Núcleo sin Reaccionar para la Oxidación de Azufre Elemental con <i>Sulfolobus metallicus</i> a 67°C (Pacheco., 2012).....	91

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes Generales

Los metales valiosos han sido obtenidos a partir de minerales por lixiviación hace cientos de años. Este proceso se creyó que era una reacción química mediada por la presencia de oxígeno y agua hasta 1947, cuando fue demostrada la catálisis bacteriana de la oxidación del hierro y la formación de ácido sulfúrico en las aguas de mina (Colmer et al., 1947).

En la actualidad, el uso de microorganismos para extraer metales a partir de minerales, denominado biominería, es bien conocido. Los microorganismos participan en la deposición y solubilización de metales pesados de la corteza terrestre desde siempre y esta actividad ha estado mayoritariamente ligada al ciclo del hierro y del azufre. El uso de microorganismos en el procesamiento de minerales tiene algunas ventajas sobre los métodos fisicoquímicos tradicionales: son compatibles con el medio ambiente, no requieren un elevado costo energético y son útiles en la recuperación de minerales de baja ley (Rawlings., 2002).

La biominería incluye los términos de biolixiviación y biooxidación. La biolixiviación consiste en la conversión de un metal formando parte de un compuesto insoluble mediante un proceso de oxidación que lo transforma en una forma soluble, permitiendo así la extracción del metal en el medio acuoso. La biooxidación se refiere a los procesos en los cuales la recuperación de un metal (por ejemplo, oro) es facilitada por la descomposición microbiana del mineral, pero el metal extraído no es solubilizado. Un ejemplo es la recuperación de oro a partir de arsenopirita, la oxidación se produce sobre otros compuestos del mineral que acompañan al oro, permitiendo la liberación de éste que es posteriormente extraído por cianuración.

La aplicación de procesos basados en la biolixiviación y biooxidación permite la obtención de metales a partir de minerales en su forma natural pero también a partir de residuos industriales que no pueden ser manejados por técnicas convencionales.

Además, la oxidación de compuestos reducidos de azufre inorgánico a azufre elemental y sulfato por bacterias quimiolitóautótrofas tiene importancia aplicada para la eliminación de sulfuro en efluentes y en la corrosión microbiológica del concreto, debido a que los compuestos inorgánicos de azufre son exclusivamente oxidados por bacterias y arqueas.

La biolixiviación y biooxidación están siendo utilizadas comercialmente solo para la recuperación de cobre, uranio y oro, sin embargo, en el futuro estos procesos podrían expandirse para la recuperación de zinc, cobalto, níquel, fósforo, entre otros.

Lo anterior es debido a la elevada producción de ácido sulfúrico a partir de una fuente relativamente económica, el azufre elemental, lo que permite su uso como agente lixivante en una amplia variedad de situaciones, como: descomposición de

rocas, solubilización de fósforo procedente de rocas fosfáticas y lixiviación de metales a partir de sulfuros minerales. Además tanto la infraestructura como los costos de operación son más bajos que los procesos pirometalúrgicos e hidrometalúrgicos convencionales y las plantas de procesamiento pueden ser construidas en las proximidades de los depósitos minerales, salvando así los costos de transporte (Gómez et al., 1999; Suzuki., 2001).

Las bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* han sido utilizadas convencionalmente para procesos de biolixiviación ya que estos microorganismos son capaces de oxidar el azufre elemental a ácido sulfúrico y el Fe(II) a Fe(III) (Gómez et al., 1999; Suzuki et al., 2001).

Sin embargo, en la actualidad se está estudiando la posibilidad de utilizar bacterias termófilas para dichos procesos, debido a que la capacidad oxidativa aumenta con la temperatura, aumentando por lo tanto la velocidad de lixiviación. Además 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 (Nemati M. y Harrison S.T.L., 2000; Stott et al., 2003).

Estudios mostraron que los concentrados de pirita son oxidados durante el crecimiento de una variedad de microorganismos acidófilos en un amplio rango de temperaturas. Se comparó un cultivo mesofílico compuesto por *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* a 30°C, con un cultivo de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C y un cultivo *Sulfolobus metallicus* a 67°C. A bajas concentraciones de mineral la velocidad de disolución de la pirita es proporcional a la temperatura. Sin embargo, el uso de elevadas temperaturas para aumentar la velocidad de disolución por sobre las obtenidas por mesófilos parece posible sólo con microorganismos termófilos moderados, como *S.thermosulfidooxidans*, ya que el crecimiento de *Sulfolobus metallicus* es inhibido a altas concentraciones de mineral (Clark et al., 1996).

Por otra parte estudios determinaron la presencia de altas concentraciones de cobre, además de varios sulfuros y especies de hierro en la superficie de la calcopirita después de una disolución inicial en presencia de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C. Los principales compuestos identificados en la suspensión fueron: S<sup>2-</sup>, S<sub>2</sub><sup>2-</sup>, S<sup>0</sup>, SO<sub>2</sub><sup>-4</sup>, Cu<sup>+</sup>, Fe<sup>+3</sup>, con lo que fue posible comprobar que dicha bacteria es capaz de biolixiviar la calcopirita (Parker et al., 2003).

Este trabajo se centrará en el estudio de la biooxidación de azufre elemental mediante *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, de manera de aumentar el conocimiento que se tiene de este microorganismo y de esta manera poder determinar con mayor exactitud la factibilidad de utilizarlo para la producción de ácido sulfúrico a nivel industrial.

## 1.2 Biolixiviación y Biooxidación

La biolixiviación y biooxidación corresponden a procesos de lixiviación u oxidación catalizados biológicamente por microorganismos, los cuales disuelven los compuestos de interés contenidos en los minerales, no requiriéndose de esta manera altas energías de activación, disminuyendo las altas presiones y temperaturas que son necesarias para llevar a cabo las reacciones de disolución en ausencia de los microorganismos (Rodríguez et al., 2001; Donati E., 2006; Pina et al., 2010).

Los procesos biohidrometalúrgicos se dan en condiciones cercanas a las ambientales y los compuestos utilizados pertenecen a los ciclos biogeoquímicos, por lo tanto los productos y subproductos que se obtienen son compatibles medioambientalmente, lo que resulta en una ventaja al compararse con otros procesos de disolución de minerales tales como los procesos pirometalúrgicos, ya que estos últimos producen emisiones de SO<sub>2</sub>, ausentes en los procesos biohidrometalúrgicos. A su vez las bacterias logran desagregar matrices de baja porosidad, las cuales son poco accesibles a reactivos utilizados en hidrometalurgia, permitiendo de esta manera la disolución de metales sin necesidad de realizar una molienda previa del mineral hasta que éste alcance tamaños de partículas muy reducidos (Gehrke et al., 1998; Rohwerder et al., 2003).

No obstante, la lixiviación u oxidación bacteriana presenta ciertas desventajas, que en algunos casos han limitado su comercialización a escala industrial, entre las cuales se pueden mencionar las bajas velocidades de reacción, la obtención de soluciones demasiado diluidas como para poder obtener el producto de interés directamente de ellas. En realidad se trata de una tecnología en desarrollo donde se hace necesario mayor conocimiento, como por ejemplo sobre el comportamiento y/o las características de los microorganismos y por lo tanto sus rendimientos en la disolución u oxidación de los compuestos de interés (fosfatos, cobre, azufre, etc.), dadas las distintas condiciones de operación (Rodríguez et al., 2001).

Tal como se mencionó anteriormente la biooxidación es una variante del proceso de biolixiviación, pues ocurre cuando el mineral no puede ser solubilizado directamente por los microorganismos; sin embargo, estos permiten la recuperación de éste mediante la solubilización de la matriz en la que se encuentra atrapado (Donati E., 2006). En este contexto se ha estudiado la factibilidad de lixiviar fosfatos desde minerales con ácido sulfúrico, el cual puede ser producido por medio de la oxidación de azufre elemental con microorganismos azufre-oxidantes, dentro de los cuales se encuentran las bacterias *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

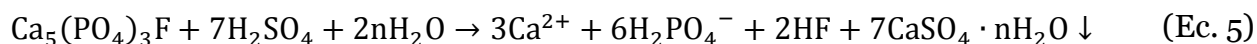
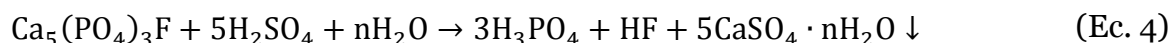
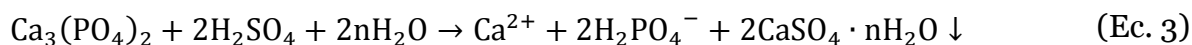
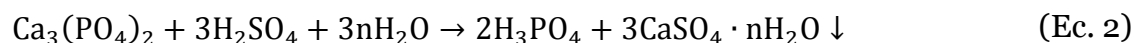
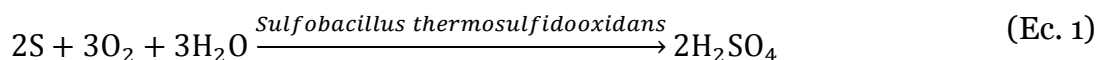
Estos estudios han resultado de gran interés debido al potencial uso en escala industrial de la biooxidación de azufre para producir ácido sulfúrico, la que involucra una disminución importante de los costos asociados a los procesos convencionales de lixiviación química, debido principalmente a que el azufre elemental, es más económico que los reactivos utilizados en la lixiviación química. Además que el consumo de ácido es considerablemente menor en los procesos biológicos, y a que el

proceso de lixiviación biológica requiere una menor temperatura que el químico (Wang et al., 2010).

A su vez se ha observado que el ácido sulfúrico es capaz de disolver los fosfatos presentes en los minerales de hierro y que esta disolución aumenta, al aumentar la temperatura (Wang et al., 2010).

Otros estudios muestran que la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* crece adherida a los minerales de hierro y/o azufre, por lo cual se ha estimado que esta bacteria puede actuar a través del mecanismo de lixiviación cooperativo (Parker et al., 2003).

Las reacciones químicas involucradas en los procesos de biooxidación de azufre elemental y de lixiviación de fosfatos son las siguientes:



Por lo que la biooxidación de azufre, puede generar el ácido sulfúrico necesario para la disolución de fosfatos desde minerales de hierro.

Es necesario mencionar que el fenómeno de biooxidación de azufre elemental es variable y es representado por una sucesión de etapas fuertemente influenciadas por la temperatura, pH y el potencial redox, por lo que para cada mineral puede existir un control bioquímico específico. Otras de las variables que pueden afectar este proceso son el crecimiento de microorganismos tanto adheridos como en solución, la cantidad de mineral y fenómenos como la corrosión (Mustin et al., 1992).

### 1.3 Microorganismos que Participan en los Procesos de Biooxidación y Biolixiviación

Los microorganismos involucrados en los procesos de biooxidación corresponden a arqueas o bacterias, las que se caracterizan por desarrollarse en condiciones extremas, tales como pH ácidos, altas temperaturas y concentraciones de elementos metálicos, y cuya principal fuente de energía está dada por la oxidación del ion ferroso a férrico, azufre y compuestos reducidos de azufre. Estas bacterias son

aisladas generalmente de lugares donde ocurre la oxidación natural de minerales, tales como minas, aguas manantiales ricas en azufre y depósitos de carbón. Es posible clasificar a estos microorganismos de acuerdo al rango de temperaturas donde es posible su desarrollo, distinguiéndose tres grupos: mesófilos, termófilos moderados y termófilos extremos (Rodríguez et al., 2001).

Las bacterias mesófilas tienen un rango de temperatura de crecimiento entre los 15°C y los 40°C. Entre ellas se encuentran las autótrofas, que utilizan como fuente de carbono compuestos inorgánicos tales como el anhídrido carbónico; las heterótrofas, que utilizan compuestos orgánicos, y las mixotróficas, que utilizan tanto compuestos orgánicos como inorgánicos como fuente de carbono. Dentro de esta categoría, las bacterias más comúnmente encontradas y aisladas de ambientes mineros son *Acidithiobacillus ferroxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferroxidans*, las cuales coexisten en ambientes naturales cooperando en la biolixiviación de minerales. Su mayor diferencia reside en la capacidad que tienen de utilizar el ion ferroso y/o los compuestos reducidos de azufre como fuente de energía, por ejemplo, *T. ferrooxidans* es capaz de utilizar ambas fuentes de energía, mientras que *L. ferrooxidans* solo puede utilizar el ion ferroso. No obstante, todos estos tipos de bacterias utilizan el oxígeno como el aceptor final de electrones (Zimmerley S. et al., 1958; Rodríguez et al., 2001; Watling H., 2006; Escobar B., 2012).

Las bacterias termófilas moderadas se caracterizan por desarrollarse en ambientes ácidos y a temperaturas entre los 45°C y 55°C, entre estas bacterias se encuentran *Acidithiobacillus caldus*, *Leptospirillum thermoferrooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* y *Sulfobacillus acidophilus*. La bacteria *At. caldus* es autótrofa azufre-oxidante e incapaz de oxidar el ion ferroso. Por su parte *L. thermoferrooxidans* es quimioautótrofa estricta, hierrooxidante e incapaz de oxidar el azufre. Mientras que entre las bacterias del género *Sulfobacillus* se ha observado que *S. thermosulfidooxidans* es la más activa en relación a la oxidación de  $Fe^{+2}$  y de sulfuros minerales, mientras que *S. acidophilus* es más eficiente en la oxidación de azufre; sin embargo, se considera que ambas son nutricionalmente versátiles debido a que son capaces de crecer tanto de forma autótrófica, heterótrófica o mixotrófica, al utilizar dióxido de carbono, glucosa y extracto de levadura como fuentes de carbono (Rodríguez et al., 2001; Watling H., 2006; Escobar B., 2012).

Los microorganismos termófilos extremos, como el arquea *Sulfolobus metallicus*, se presentan en ambientes con temperaturas entre los 55°C y los 90°C, al igual que los otros tipos de microorganismos, estos pueden crecer tanto de manera autótrofa y heterótrofa, donde bajo las primeras condiciones, catalizan la oxidación de azufre elemental, Fe (II) y minerales de azufre reducido. En general los termófilos extremos presentan velocidades de biolixiviación de sulfuros metálicos considerablemente altas, sobre todo cuando la concentración de los sólidos y la densidad de la pulpa son bajas. En el caso contrario su acción se ve altamente restringida debido a problemas de sensibilidad de sus membranas frente a fenómenos de atrición, lo que obliga a utilizarlas en los procesos de biolixiviación dinámica, con densidades de mezcla considerablemente menores a los utilizados con bacterias termófilas moderadas. A su vez estas últimas son resistentes a

concentraciones elevadas de  $\text{Fe}^{+2}$  (Rodríguez et al., 2001; Watling H., 2006; Escobar B., 2012).

Con el tiempo va tomando mayor fuerza la utilización de bacterias termófilas moderadas en la biolixiviación de concentrados minerales, debido a que se pueden alcanzar mayores grados de disolución y velocidades de lixiviación al compararlas con las bacterias mesófilas.

#### **1.4 El Azufre y las Bacterias Azufre-Oxidantes**

El azufre es el décimo elemento más abundante en la corteza terrestre. Se encuentra naturalmente en las cercanías de aguas termales, zonas volcánicas, minas y agua de mar en forma de minerales de sulfato ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), minerales sulfurados como piritita ( $\text{FeS}_2$ ), azufre elemental ( $\text{S}^0$ ) y sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) (Meyer B., 1976; Alcántara S., 2000).

Bioquímicamente, el azufre es muy importante dado que es abundante en todos los organismos, donde aparece en compuestos orgánicos como aminoácidos, proteínas, hormonas, lípidos y vitaminas, entre otros. La materia orgánica viva y muerta constituye un reservorio menor de azufre pero de rápido reciclado. En contraste, los compuestos inorgánicos de azufre, tienen un papel biológico más restringido, sirviendo como fuente de azufre para su asimilación e incorporación en los compuestos orgánicos o son empleados como aceptores de electrones en el transporte desasimilatorio durante los procesos de respiración anaeróbica de algunos procariontes (Meyer B., 1976; Alcántara S., 2000).

Los compuestos inorgánicos reducidos de azufre son oxidados casi exclusivamente por procariontes. Los procariontes sulfooxidantes son filogenéticamente diversos. El dominio Arquea está restringido a los miembros del orden Sulfolobales (hipertermófilas) y en el dominio Bacteria, el azufre es oxidado por litótrofos aerobios. Adicionalmente, algunos microorganismos heterótrofos, incluyendo bacterias y arqueas, tienen la capacidad de oxidar compuestos reducidos de azufre (Meyer B., 1976).

Por otra parte el azufre elemental es oxidado solo por microorganismos acidófilos que utilizan el azufre como fuente de energía, ya que este compuesto es inerte a oxidaciones abióticas en medios ácidos. En presencia de estos microorganismos la oxidación continúa hasta la formación de ácido sulfúrico, donde la producción de este último 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 (Imai et al., 1978; Rohwerder et al., 2003).

La oxidación de compuestos inorgánicos reducidos de azufre por bacterias quimiolitioautótrofas es parte vital del ciclo biogeoquímico del azufre en el medio ambiente. Además, este tipo de reacciones tienen importancia en el tratamiento de la



contaminación por compuestos de azufre, en corrosión y en minería (Espinosa et al., 2010; He et al., 2011).

Las bacterias quimiolitautótrofas obtienen su energía de la oxidación de donadores de electrones inorgánicos y fijan el CO<sub>2</sub> por el ciclo de Calvin. La mayoría de las bacterias sulfooxidantes usan oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) como aceptor final de electrones. Algunas especies, como *Thiobacillus denitrificans*, son también capaces de usar nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en condiciones anaerobias como aceptor final de electrones (Andrews et al., 1965).

Las fuentes de donadores de electrones inorgánicos son diversas y abundantes en la naturaleza; pueden ser de origen geológico, biológico y antropogénico. La actividad volcánica es una importante fuente de compuestos inorgánicos reducidos de azufre al igual que la sulfato reducción (Steudel., 2000).

Las actividades derivadas de la agricultura y minería así como la quema de combustibles fósiles y otras actividades industriales liberan compuestos inorgánicos reducidos de azufre al medio ambiente, los cuales pueden ser utilizados como donadores de electrones por las bacterias quimiolitautótrofas sulfooxidantes (Steudel., 2000).

Los compuestos de azufre más comunes que pueden ser utilizados como fuente de energía son el H<sub>2</sub>S, el S<sup>0</sup> y S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>. En la mayoría de los casos, el producto final en la oxidación del azufre es SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y el cambio de estado de oxidación es de -2 a 6 (Andrews y Kokes., 1965; Steudel., 2000; Alcántara., 2000).

Tabla 1: Reacciones de oxidación y reducción catalizadas por bacterias.

$H_2S + 2O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$	Producto final: Sulfato $\Delta G^{\circ} = -798,2$ [kJ/reacción]
$HS^- + \frac{1}{2}O_2 + H^+ \rightarrow S^0 + H_2O$	Producto final: Azufre $\Delta G^{\circ} = -209,4$ [kJ/reacción]
$S^0 + H_2O + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + H_2O$	Producto final: Sulfato $\Delta G^{\circ} = -587,1$ [kJ/reacción]
$S_2O_3^{2-} + H_2O + 2O_2 \rightarrow 2SO_4^{2-} + 2H_2O$	Producto final: Sulfato $\Delta G^{\circ} = -818,3$ [kJ/reacción]

En la Figura 1, se muestran distintas variedades de bacterias sulfooxidantes quimiolitótrofas y los hábitats en que se desarrollan.

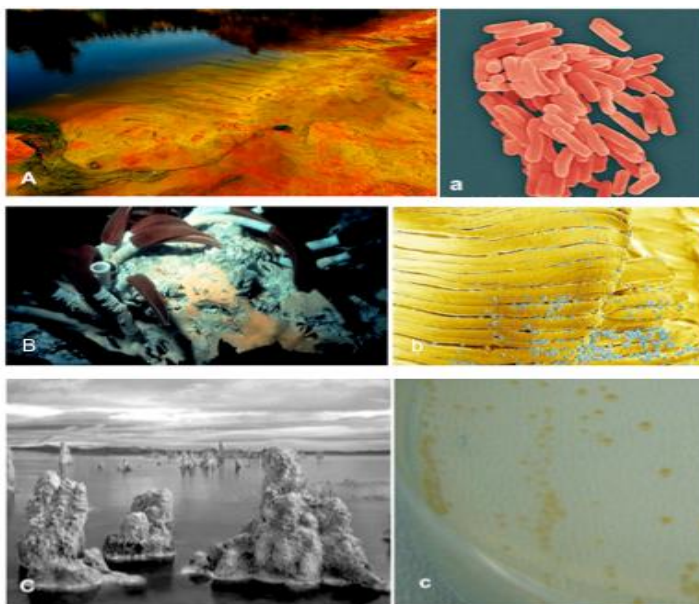


Figura 1: Distintos hábitats donde se desarrollan bacterias quimiolitotoautótrofas sulfooxidantes. A) Rio Tinto, España, a) micrografía de *Acidithiobacillus ferrooxidans*; B) Fuentes hidrotermales, b) en azul bacterias sulfooxidantes endosimbióticas de gusanos anélidos; C) Lago Mono, EU, c) morfología colonial de *Thioalkalivibrio jannaschii* (Espinosa et al., 2010).

### 1.5 Características de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*

La bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* posee las siguientes características:

- Es un microorganismo termófilo moderado, pues crece entre los 20°C y 60°C, siendo su rango óptimo de crecimiento entre 40-55°C, a su vez es una bacteria acidófila, que crece óptimamente a un pH de 2, posee forma de bastón y su tamaño es de 1 x 3 μm, es Gram-positiva y formadora de endosporas esféricas (Rawlings., 1997).
- A su vez estas bacterias son quimiolitótrofas, ya que en presencia de oxígeno, son capaces de oxidar ion ferroso, azufre elemental y minerales sulfurados para obtener la energía necesaria para su desarrollo. Sin embargo también puede oxidar azufre en presencia de ion férrico por lo que es un microorganismo anaerobio facultativo (Norris et al., 1996).

- Por otro lado, se considera como un microorganismo quimiolitoheterótrofo, debido a que utiliza Fe (II), S<sup>0</sup> y sulfuros como fuente de energía y extracto de levadura como fuente de carbono (Bridget y Johnson., 1998).

## 1.6 Mecanismos de Biolixiviación

Distintos mecanismos han sido propuestos para explicar la lixiviación bacteriana de los minerales. Entre ellos se encuentran el mecanismo del tiosulfato y el polisulfuro, propuestos por Sand (Sand et al., 2001). Aquellos sulfuros metálicos 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.

Además están los mecanismos de biolixiviación por contacto, indirecto y cooperativo, propuestos por Tributsch (Tributsch., 2001). Estos mecanismos consideran necesaria la adherencia bacteriana al mineral a través de una capa de polímeros extracelulares (EPL), los que actúan como medio para la reacción de disolución del mineral. Estas teorías se presentan a continuación.

### 1.6.1 Mecanismo del Tiosulfato

Minerales sulfurados como la pirita (FeS<sub>2</sub>), molibdenita (MoS<sub>2</sub>) y tungstenita (WS<sub>2</sub>) son oxidados exclusivamente por la extracción de electrones con iones férricos (Fe<sup>+3</sup>) mediados por microorganismos. Este mecanismo consiste en que el ion férrico ataca al mineral sulfurado mediante la extracción de un electrón reduciéndose a ferroso (el enlace entre el sulfuro y el metal se rompe) y obteniéndose del mineral el catión metálico y compuestos de azufre intermedios solubles en agua. Las bacterias hierro-oxidantes (*At. ferrooxidans* (Af) y *Leptospirillum ferrooxidans* (Lf)) catalizan el reciclado del ion férrico en condiciones ácidas. El primer compuesto de azufre liberado es el Tiosulfato que es oxidado por las bacterias azufre-oxidantes vía tetrionato y otros politionatos para dar finalmente sulfato. También puede darse la acumulación de azufre si no se encuentran presentes bacterias azufre-oxidantes. Para la extracción del electrón se concluye que solo las bacterias oxidantes de ferroso pueden lixiviar sulfuros no solubles en ácido (Singer et al., 1970; Schippers et al., 1999; Sand et al., 2001; Rohwerder et al., 2003).

## 1.6.2 Mecanismo del Polisulfuro

Este mecanismo explica la disolución de minerales como la galena (PbS), esfalerita (ZnS), calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>), hauerita (MnS<sub>2</sub>), oropimente (As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>) y rejalgar (As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>). En este caso, como los sulfuros son solubles en ácido, la disolución se realiza por la acción combinada de la extracción de electrones por iones férricos y el ataque del protón, es decir, el enlace del protón a la parte sulfuro del mineral mediante los electrones de la banda de valencia. La unión metal-sulfuro en el mineral puede romperse por el ataque del protón, después de que dos protones se hayan unido se libera sulfuro de hidrógeno. A su vez, el férrico puede oxidar al azufre del mineral liberando catión sulfuro que dimeriza espontáneamente a disulfuro H<sub>2</sub>S<sub>2</sub> y se oxida, posteriormente, vía polisulfuro y radicales polisulfuro a azufre elemental. La acción oxidante del ion férrico no es prerequisite para la vía del polisulfuro, ya que, en este caso, la unión metal-sulfuro puede romperse por el ataque de protones, de modo que los sulfuros metálicos solubles en ácido pueden ser disueltos por la actividad de las bacterias azufre-oxidantes. En ausencia de Fe (III), estas bacterias oxidan el sulfuro de hidrógeno liberado del ataque del protón al mineral a azufre y luego a ácido sulfúrico, regenerando así los protones previamente consumidos por la disolución del mineral (Sand, W. 2003; Rohwerder T. et al., 2003).

En la Figura 2 se ilustran los mecanismos propuestos por Sand.

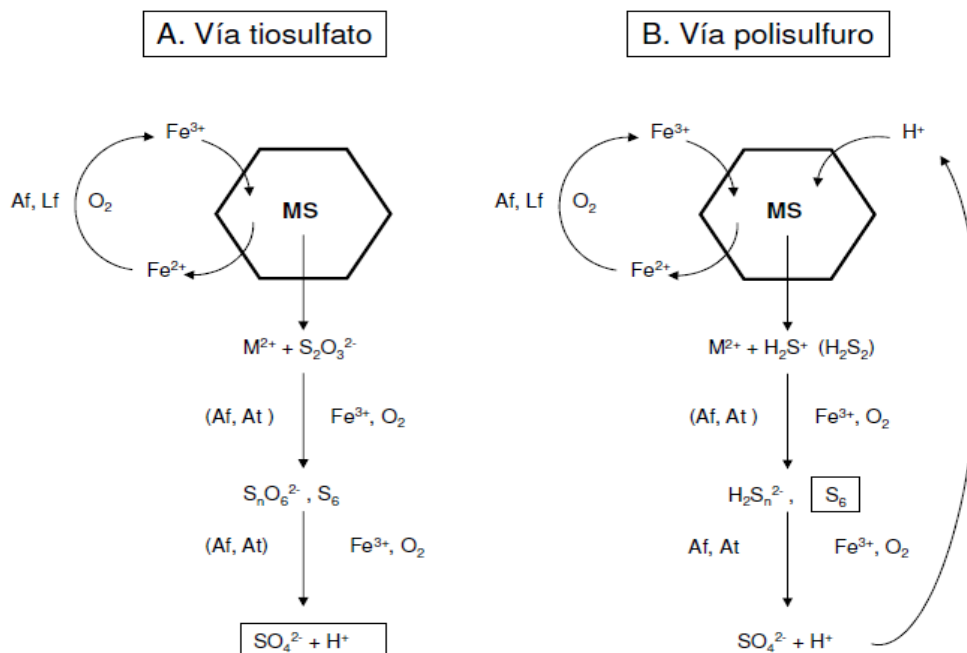
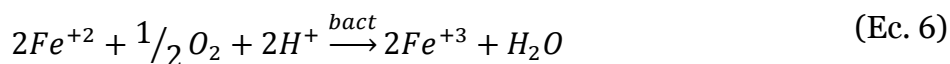


Figura 2: Mecanismos Propuestos por W. Sand. A) Mecanismos del Tiosulfato; B) Mecanismo del Polisulfuro (Sand et al., 2001)

Con respecto a la estrategia que utilizan las bacterias para biolixiviar el mineral, ya sea adhiriéndose a éste, o manteniéndose en solución, existen los siguiente mecanismos propuestos por Tributsch.

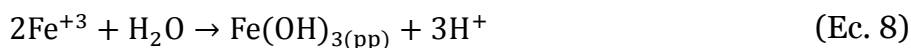
### 1.6.3 Mecanismo de lixiviación indirecta

Se conoce el mecanismo indirecto como aquel en que las bacterias aportan reactivos químicos importantes para la lixiviación, pero no necesariamente existe contacto directo entre los microorganismos y el mineral. Por ejemplo, algunos microorganismos adheridos así como los que se encuentran en solución, en presencia de oxígeno y de protones pueden oxidar el Fe (II) a Fe (III), según la siguiente ecuación:

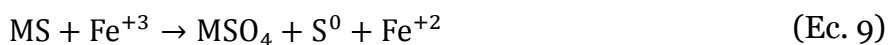


$$\Delta G = -8,1 \left[ \text{Kcal/mol} \right] \quad (\text{Ec. 7})$$

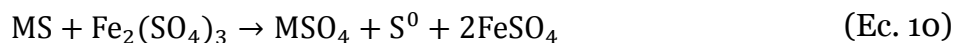
Esta reacción consume protones, lo que conlleva a un aumento del pH por lo que se puede producir precipitación de  $Fe(OH)_3$ , formándose, de esta manera, barreras difusionales importantes que impiden el contacto directo entre el ion férrico y el sólido, afectando negativamente a la disolución biológica del mineral (Ballester 2005).



Pero, el Fe (III) es un muy buen oxidante de sulfuros y reacciona mediante la siguiente ecuación.



Expresada formalmente como:



El Fe (II) resultante de la reacciones anteriores puede ser nuevamente oxidado a Fe (III) por las bacterias. Así, existe una cadena de reacciones (oxidación de Fe (II) por bacterias y oxidación de los sulfuros por el Fe (III)) que puede continuar dando

lugar a la disolución de los sulfuros metálicos mediante la acción indirecta de los microorganismos.

El caso específico de la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, consiste en que estas bacterias oxidan el azufre, promoviendo la generación de ácido sulfúrico, el cual posteriormente ataca al mineral.



$$\Delta G = -150 \left[ \text{Kcal/mol} \right] \quad (\text{Ec. 12})$$

#### 1.6.4 Mecanismo de lixiviación por contacto

Anteriormente este mecanismo era denominado como directo, el cual se refiere a un contacto directo entre la membrana del microorganismo y el mineral a lixiviar, utilizando para esto último mecanismos enzimáticos, los cuales pueden resumirse mediante la siguiente ecuación:



Sin embargo Tributsch propuso que se sustituyese dicha definición por la de mecanismo por contacto, debido a que el microorganismo crea una zona de reacción controlada con una capa de exopolímeros (EPL) entre la membrana bacteriana y el mineral (Figura 3). De esta manera la bacteria mantiene un estrecho contacto con la interfaz del mineral, con el fin de condicionar el entorno del mineral para facilitar la disolución electroquímica por ataque iónico. Sin embargo la bacteria no se une en cualquier lugar de la superficie del mineral, sino que lo hace en lugares específicos de imperfecciones del cristal. (Tribusch., 2001).

La capa de exopolímeros es 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 (Tributsch., 2001).

En la Figura 3 se observa el agente de lixiviación biológico cisteína, el cual actúa como un surfactante para el azufre, es decir, como un activador de su superficie.

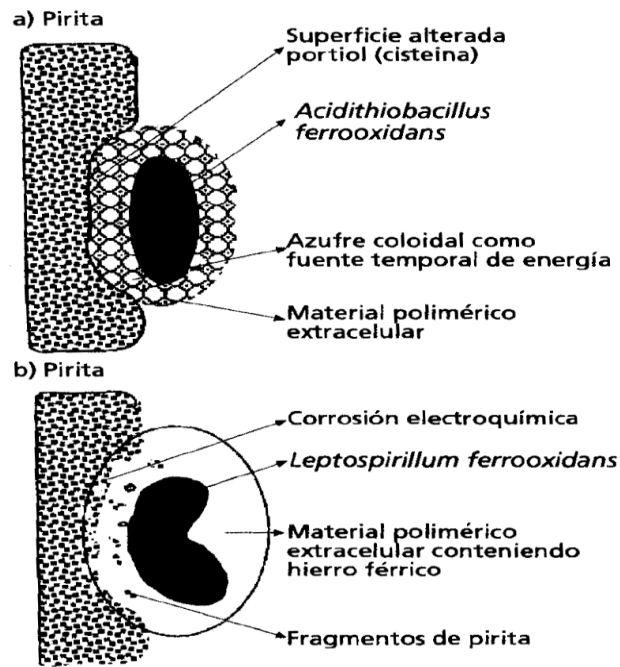


Figura 3: Mecanismo de Lixiviación por Contacto Propuesto por H. Tributsch (Tributsch., 2001)

### 1.6.5 Mecanismo de lixiviación cooperativo

Este mecanismo se basa en que los microorganismos adheridos al mineral y aquellos que se encuentran en solución, cooperan entre sí. Las bacterias adheridas al mineral, liberan especies metálicas oxidables, como por ejemplo el ion ferroso, que son oxidadas por las bacterias en solución, regenerando así el agente oxidante  $Fe^{+3}$ , el que ataca al mineral dando lugar a la lixiviación directa (Rojas et al., 1998; Tributsch., 2001; Crundwell., 2003; Rodríguez et al., 2003; Watling., 2006).

En la Figura 4 son esquematizados los tres mecanismos de lixiviación antes mencionados.

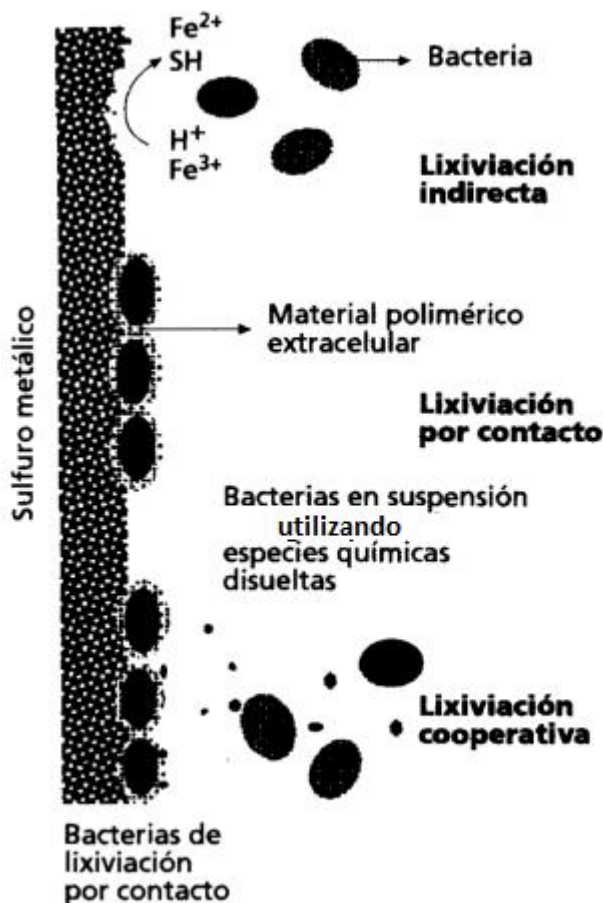


Figura 4: Mecanismos de Lixiviación Propuestos por H. Tributsch (Ballester., 2005).

### 1.7 Función de las bacterias azufre oxidantes en la lixiviación de minerales sulfurados

Tanto en la vía del polisulfuro como en la vía del tiosulfato, las bacterias hierro oxidantes tienen un papel primordial en la regeneración de Fe (III), que es el principal agente lixivante en los ambientes ácidos propios de los procesos de extracción de minerales. Los microorganismos oxidantes de ferroso controlan el potencial redox de estos ambientes, el cual se determina principalmente por la relación Fe (III)/Fe (II) en solución.

Por su parte, las bacterias oxidantes de azufre contribuyen a la transformación de los compuestos intermedios de azufre a ácido sulfúrico, fuente de protones



(Schippers et al., 1999). En el caso del azufre elemental esta transformación es llevada a cabo exclusivamente por las bacterias ya que esta especie es inerte a la oxidación abiótica en medios ácidos. Esto hace que en ausencia o estado de inhibición de estas bacterias el azufre elemental se acumule en el curso del proceso de disolución del mineral sulfurado. El azufre elemental puede estar suspendido, en forma de agregados o cristales libres, o formando una capa sobre la superficie del mineral. En este último caso, las propiedades electroquímicas de la superficie del mineral podrían cambiar y/o formarse una barrera que reduciría la velocidad de difusión de los iones lixiviantes y el oxígeno para interactuar con el mineral, lo cual influye negativamente en la velocidad de lixiviación (Fowler et al., 1999; Mustin et al., 1993).

Las bacterias azufre-oxidantes tienen entonces una doble función en la lixiviación de minerales sulfurados:

- La producción de ácido sulfúrico a partir de compuestos de azufre reducido para la regeneración de los protones consumidos en la etapa inicial de lixiviación (vía polisulfuros).
- La eliminación del azufre acumulado en la superficie de los minerales sulfurados.

## **1.8 Crecimiento Bacteriano**

El crecimiento microbiano se define como un aumento de los constituyentes celulares que puede dar como resultado:

1. Un aumento en el número de células, por ejemplo, cuando el microorganismo se reproduce por gemación o fisión binaria.
2. Aumento en el tamaño de la célula, por ejemplo, los microorganismos cenocíticos llevan a cabo divisiones del núcleo que no van acompañadas de división celular.

En microbiología se estudia frecuentemente el crecimiento de la población en lugar del crecimiento de células individuales. Al estudiar el crecimiento de un cultivo bacteriano puro de manera batch (es decir, sin regeneración) se obtiene la curva de crecimiento. Esta curva se construye graficando el logaritmo del número de células con respecto al tiempo. Se pueden diferenciar cuatro fases distintas, las cuales son ilustradas en la Figura 5.

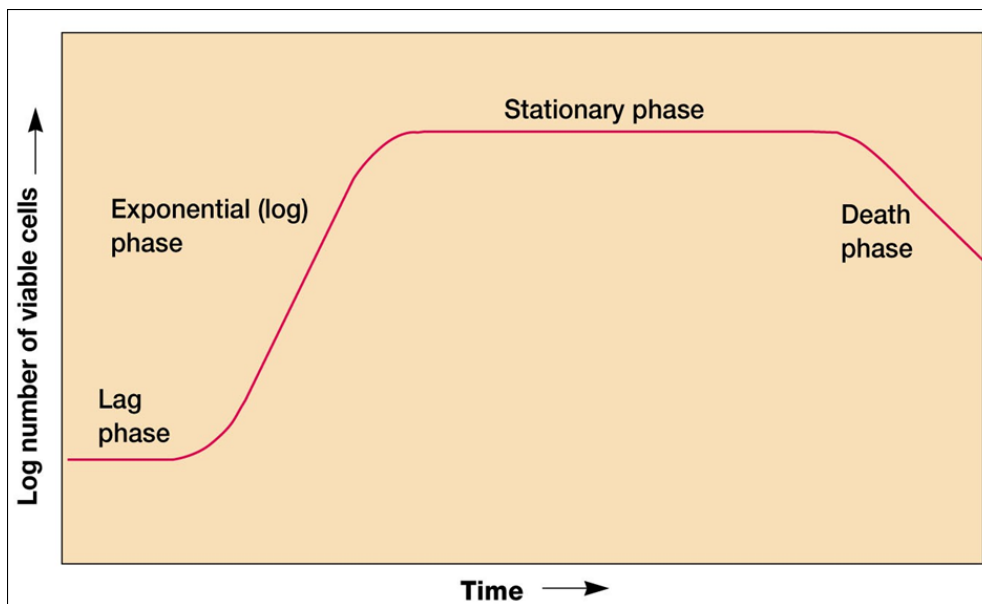


Figura 5: Fases del Crecimiento Bacteriano (Gómez., 2012).

1. Fase lag: En esta etapa el microorganismo se adapta a las nuevas condiciones y pone en marcha su maquinaria metabólica para poder crecer activamente, por lo que las células sintetizan nuevos componentes. La duración de esta fase es variable y en general es mayor cuanto más grande sea el cambio en las condiciones en las que se encuentra el microorganismo (Gómez., 2012).
2. Fase exponencial: la velocidad de crecimiento (el aumento en el número de microorganismos, N) es constante a razón  $\mu$ , es decir:

$$\frac{dN}{dt} = \mu \cdot N \quad (\text{Ec. 14})$$

La población es más uniforme desde el punto de vista químico y propiedades físicas.

3. Fase estacionaria: no hay aumento neto del número de microorganismos, lo que no significa que no se reproduzcan algunos, sino que la aparición de nuevos individuos se compensa por la desaparición de otros (Gómez., 2012).
4. Fase de muerte: La muerte celular se define como la pérdida irreversible de la capacidad de dividirse y es importante entender este concepto porque los organismos microbiológicamente muertos no tienen por qué estar metabólicamente inactivos. En esta fase el número de microorganismos vivos disminuye de forma exponencial con una constante k que depende de diferentes circunstancias (Gómez., 2012).

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot N \quad (\text{Ec. 15})$$

En algunos casos la velocidad de muerte es lenta debido a la acumulación de células resistentes.

## **1.9 Adhesión Bacteriana al Mineral**

La mayoría de las bacterias lixiviantes crecen adheridas a la superficie de los minerales. Se sabe que el proceso de adhesión es predominantemente mediado por la presencia de sustancias poliméricas extracelulares, conocidas como EPS. Hay suficientes evidencias que demuestran la función de una capa orgánica en la interacción bacteria-sustrato. Estas películas han sido observadas en células de *At.ferrooxidans* crecidas en piritita y para comprender su función en los procesos de biolixiviación se ha estudiado su composición en este sistema. Para llevar a cabo la lixiviación las células, atacan la superficie del mineral por medio de sustancias exopoliméricas excretadas por las mismas (lipopolisacaridos) y oxidan el mineral a ácido sulfúrico e iones férricos. El ataque primario a la piritita (pH 2) es mediado por un complejo exopolímero-Fe (III). Se cree que la especie de hierro se une a subunidades de ácido glucorónico, este complejo tiene una carga neta positiva que interacciona electrostáticamente con la carga negativa de la superficie del sustrato, piritita (Gehrke et al., 1995; Sand et al., 2001)

En la Figura 6 es posible observar un modelo de mecanismo de lixiviación de la pirita por la adhesión de células de *At.ferrooxidans*.

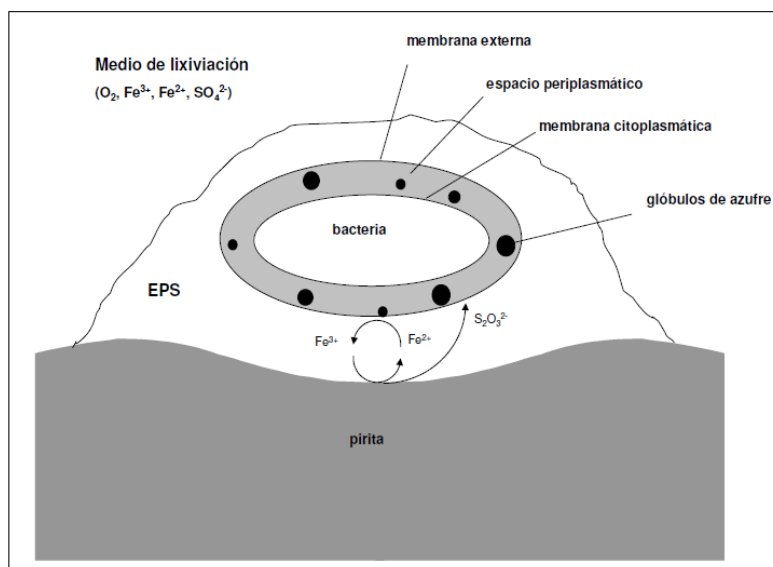


Figura 6: Representación del mecanismo de lixiviación por contacto catalizada por una célula de *At.ferrooxidans*. La célula queda embebida en la capa de EPS adheriéndose a la pirita por interacción electrostática. Durante la oxidación de tiosulfato y tetratiónatos puede formar agregados de azufre elemental y politiónatos en el espacio periplásmico (glóbulos de azufre) (Rohwerder et al., 2003).

La capa de exopolímeros formando complejos con Fe(III) constituye un lugar de reacción en el cual el proceso de disolución tiene lugar (Fowler et al., 1999; Tributsch et al., 1999). Este puede ser interpretado como un compartimiento donde algunas condiciones especiales, aunque todavía no bien conocidas, prevalecen (pH, potencial redox, concentración de iones, etc.) (Sand et al., 1999). Estudios tratan de demostrar la importancia de este tipo de compuestos realizando experimentos con bacterias *At.ferrooxidans* a las cuales se les ha desprendido la capa de sustancias exopoliméricas. En este caso se observa una disminución de la capacidad oxidativa y en pocas horas la capa de exopolímeros es producida nuevamente por las células. La adición de compuestos exocelulares a las células previamente desprendidas de las capas exopoliméricas también regenera la capacidad oxidativa en poco tiempo, alcanzando niveles de lixiviación similares a las de las células sin tratar (sin modificar su EPS) (Sand et al., 2001).

Las células que crecen sobre azufre, sin hierro, exhiben una composición diferente de sus exopolímeros, constituyen una superficie fuertemente hidrofóbica y no atacan a la pirita. En el estudio de sus EPS no se ha detectado la presencia de ácido glucurónico ni férrico pero sí un aumento del fosfato. Por lo tanto, es evidente que el sustrato influye en la estructura química de los exopolímeros, aunque no todos los mecanismos de regulación están aun clasificados se estima que la capa de

exopolímeros sería la encargada de dar el medio necesario para la oxidación biológica del azufre elemental para dar sulfato, siendo necesaria para la oxidación del azufre la adhesión bacteriana (Sand et al., 2001).

Considerando las propiedades de la superficie bacteriana, la adhesión al azufre se piensa que está regida por fuerzas de carácter hidrófobo (Van der Waals), mientras que la adhesión a otros minerales, por ejemplo la pirita, estaría regida por fuerzas electroestáticas. A su vez, se estima que estas bacterias también pueden crecer en intermediarios de la reacción de oxidación de azufre tales como el tiosulfato y trazas de sulfito que se encuentran disueltos en el medio. Esto es porque a pesar de que las bacterias planctónicas se encontraban separadas del azufre, estas recibían los compuestos parcialmente oxidados de azufre liberados por las células adheridas a la superficie de éste (Shrihari et al., 1993; Sand et al., 2001).

En la Figura 7, es posible observar un modelo del mecanismo de oxidación de azufre elemental debido a la acción de microorganismos. A su vez es posible apreciar la formación de intermediarios del tipo  $S_xO_y$  que provienen de la reacción de oxidación (Sand et al., 2001).

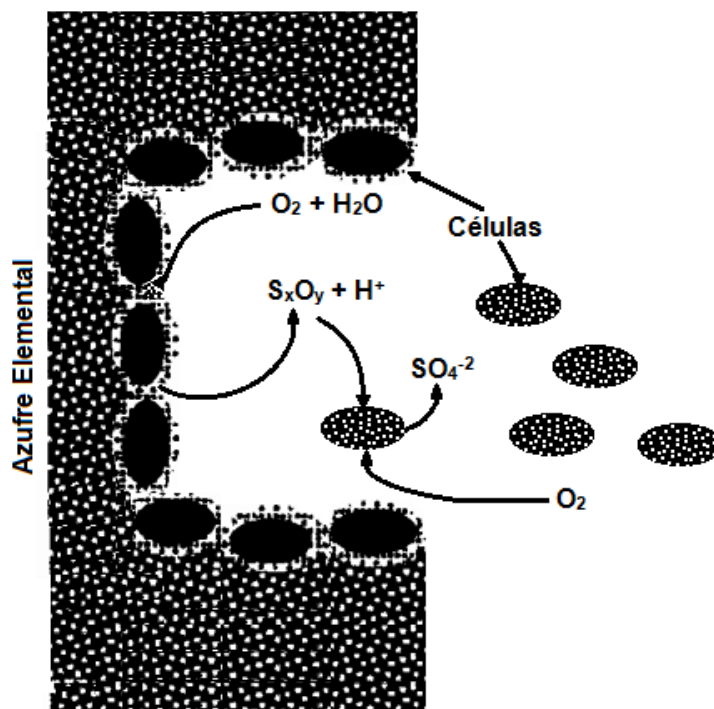


Figura 7: Modelo de la Oxidación Bacteriana de Azufre Elemental (Rohwerder et al., 2003).

## 1.10 Factores que Influyen en la Velocidad de Biooxidación

La efectividad de la biolixiviación y la biooxidación depende en gran medida de la eficiencia de los microorganismos y de la composición química y mineralógica del mineral a ser lixiviado. La extracción máxima del compuesto a biolixiviar o biooxidar puede ser alcanzada solo cuando las condiciones de operación corresponden a las condiciones óptimas de crecimiento de la bacteria. Entre los factores que intervienen en estos procesos destacan:

- **Nutrientes:** Los microorganismos que se emplean tanto para biooxidación como para la biolixiviación son bacterias quimiolitótrofas, con lo cual, solo requieren de compuestos inorgánicos para su crecimiento. En general, los nutrientes minerales son obtenidos del medio ambiente y a partir del mineral donde se encuentra el compuesto a extraer. Para un crecimiento óptimo es necesaria la presencia de la cantidad adecuada de hierro, azufre, sales de amonio, fosfato y magnesio que la bacteria a utilizar requiere para su correcto crecimiento.
- **Oxígeno y dióxido de carbono:** Para el adecuado crecimiento y actividad oxidativa se requiere suplemento de oxígeno por lo que es necesario airear o agitar el lugar donde se está realizando el proceso. El dióxido de carbono es generalmente la única fuente de carbono requerida y normalmente no es necesaria una adición externa de ese gas, sin embargo, si resulta ser requerida otra fuente de carbono, esta deberá ser suministrada para el correcto crecimiento de la bacteria.
- **pH:** Es importante el correcto ajuste del pH al valor óptimo para el crecimiento de la bacteria y su capacidad de solubilización. El pH óptimo, así como el rango de pH, en el que la bacteria trabaja con efectividad varía de una cepa a otra, por tanto, es importante conocerlos ya sea mediante literatura o trabajos experimentales.
- **Temperatura:** El óptimo de temperatura para el crecimiento y lixiviación con bacterias azufre-oxidantes, dependen al igual del pH de la cepa a utilizar y del pH al que se encuentre el medio.
- **Sustrato mineral:** La composición mineralógica del sustrato a biooxidar es de gran importancia. Un alto contenido en carbonato del mineral puede aumentar el pH del medio inhibiendo o suprimiendo la actividad bacteriana. Los bajos valores de pH necesarios para estos procesos pueden ser alcanzados por un aporte externo pero esto puede provocar la formación o aparición de algunos compuestos y afectar el costo del proceso. La velocidad de biolixiviación o biooxidación depende también de la superficie total del sustrato. Una disminución del tamaño de partícula se traduce en un aumento del área superficial, dando lugar a una mayor cantidad del compuesto extraído para una masa igual de mineral.

- Metales pesados: Tanto la biolixiviación de sulfuros metálicos como la biooxidación de azufre desde un mineral que contiene metales pesados, dan lugar a un incremento en la concentración de metales disueltos en el medio. En general, las bacterias lixiviantes, y entre ellas las azufre-oxidantes, tienen la capacidad de tolerar concentraciones relativamente altas de metales pesados. Diferentes cepas de una misma especie presentan sensibilidades muy diferentes a un mismo metal. Por ello, es importante conocer la tolerancia de las bacterias que se van a emplear en estos procesos a los metales concretos que se encuentran en el mineral. Con bastante frecuencia, estos microorganismos también presentan la capacidad de adaptarse a niveles mayores de un metal por continuos subcultivos a concentraciones incrementadas gradualmente del metal a estudiar (Baillet et al., 1997 y 1998; Boyer et al., 1998; Novo et al., 2000).
- Agentes surfactantes y “extractantes” orgánicos: estos compuestos empleados como disolventes en la extracción generalmente tienen efectos inhibitorios sobre la lixiviación y biooxidación bacteriana, principalmente porque disminuye la tensión superficial y la transferencia de oxígeno.

### 1.11 Reacciones Heterogéneas

Las reacciones sólido fluido son reacciones heterogéneas en las que un gas o líquido se pone en contacto con un sólido reaccionando con él y transformándolo en el producto. En el caso que las partículas sólidas contengan gran cantidad de impurezas que queden adheridas como ceniza o si estas forman un producto material consolidado sólido o fluido sólido, éstas no cambiarán de tamaño. Mientras que el tamaño de las partículas disminuirá cuando se forme una ceniza no adherente o un producto no consolidado (Levenspiel., 1987).

Las reacciones heterogéneas son numerosas y de gran importancia industrial. Algunas de las reacciones en que no cambia considerablemente el tamaño del sólido durante la reacción son la tostación u oxidación, la preparación de metales a partir de sus óxidos por reacción en atmósfera reductora y la protección de superficies sólidas por procesos tales como la electrodeposición de metales, entre otras. Se puede nombrar como ejemplos en que varía el tamaño del sólido las reacciones de sustancias carbonosas, las de tiosulfato sódico a partir de azufre y sulfito sódico, las de disolución, el ataque de metales por ácidos y la oxidación del hierro (Levenspiel., 1987).

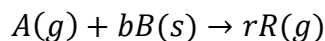
El transcurso de una reacción puede ser representado matemáticamente dada su ecuación cinética por un modelo, el cual debe representar de la forma más precisa y sin demasiada complicación matemática el proceso real. Se consideran dos modelos idealizados para las reacciones no catalíticas de las partículas sólidas con el fluido que les rodea, estos son: la conversión progresiva y el del núcleo sin reaccionar. Donde en el primero de estos, se considera que el líquido reaccionante penetra y reacciona simultáneamente en toda la partícula sólida, aunque no necesariamente a igual velocidad en los distintos lugares de ésta; de esta forma el reactante sólido se está

convirtiendo continua y progresivamente en toda la partícula. Por su parte, en el modelo del núcleo sin reaccionar la reacción tiene primero lugar en la superficie exterior de la partícula sólida, luego se desplaza hacia el interior del sólido, dejando atrás el material convertido y sólido inerte llamado ceniza. Así, en el transcurso de la reacción existe un núcleo de la partícula sólida que no ha reaccionado y cuyo tamaño va disminuyendo conforme ocurre la reacción. Dicho modelo en la mayoría de los casos representa con mayor aproximación el comportamiento real.

Cuando no hay formación de ceniza, como en la biooxidación de azufre elemental, la partícula reaccionante disminuye de tamaño durante la reacción hasta su desaparición total; este proceso se representa en la Figura 10. Para una reacción de este tipo consideremos las tres etapas siguientes, que transcurren sucesivamente:

- Etapa 1. Difusión del reactante A a través de la película fluida desde el seno de la masa del fluido hasta la superficie del sólido.
- Etapa 2. Reacción en la superficie entre el reactante A y el sólido.
- Etapa 3. Difusión de los productos de reacción a través de la película fluida desde la superficie del sólido hasta el seno de la masa del fluido.

Para poder escribir adecuadamente la ecuación cinética es necesario identificar cual de las etapas antes nombradas está controlando la reacción. Por lo cual para ejemplificar la deducción de la expresión se supondrá la siguiente reacción química entre un fluido (gas) y una partícula solida:





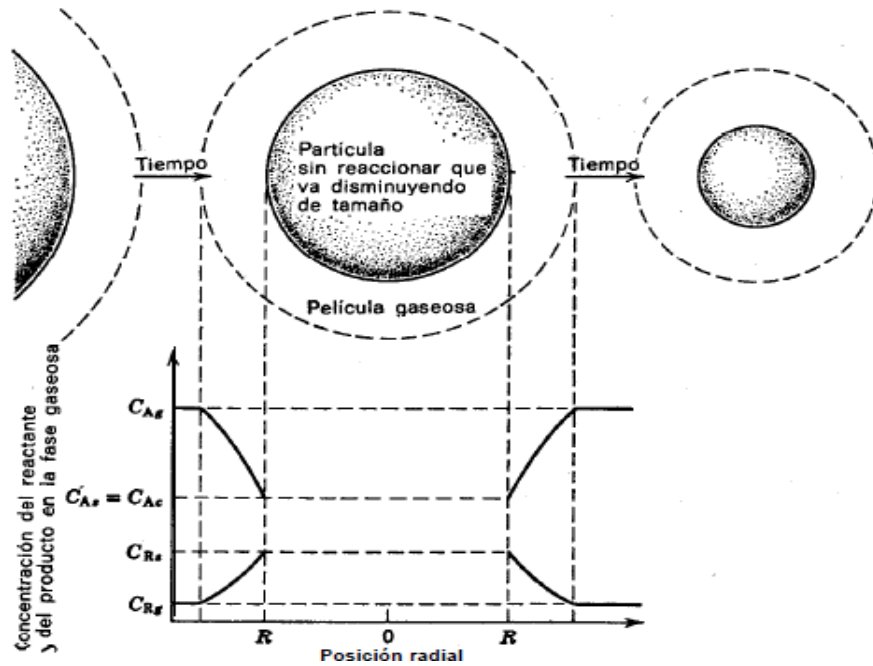


Figura 8: Ilustración del Modelo del Núcleo sin Reaccionar en Ausencia de Ceniza (Levenspiel., 1987)

En la tabla 2 se muestra la nomenclatura utilizada para este modelo.

Tabla 2: Nomenclatura Modelo del Núcleo sin Reaccionar

Símbolo	Significado
$N_B$	Moles de B
$N_A$	Moles de A
$k_s$	Coefficiente cinético de primer orden para la reacción en la superficie
$b$	Coefficiente estequiométrico para el sólido
$C_{Ag}$	Concentración del reactante A en el seno del gas
$X_B$	Conversión molar de B
$\tau$	Tiempo de conversión completa
$R_0$	Radio inicial de la partícula
$R$	Radio de la partícula
$D$	Constante de difusión

### 1.11.1 La reacción química como etapa controlante

Cuando la reacción química es la etapa controlante tenemos que la cantidad de sustancia reactante es proporcional a la superficie disponible del núcleo sin reaccionar. Por consiguiente, la velocidad de reacción, basada en la unidad de superficie del núcleo sin reaccionar, está dada por:

$$-\frac{1}{4\pi r_c^2} \frac{dN_B}{dt} = -\frac{b}{4\pi r_c^2} \frac{dN_A}{dt} = bk_s C_{Ag} \quad (\text{Ec. 16})$$

Escribiendo  $N_B$  en función de la disminución del radio:

$$-\frac{1}{4\pi r_c^2} \rho_B 4\pi r_c^2 \frac{dr_c}{dt} = -\rho_B \frac{dr_c}{dt} = bk_s C_{Ag} \quad (\text{Ec. 17})$$

Siendo  $\rho_B$ , la densidad molar del sólido y  $r_c$  es el radio del núcleo sin reaccionar. Por lo que al integrar se tiene que:

$$-\rho_B \int_R^{r_c} dr_c = bk_s C_{Ag} \int_0^t dt \Rightarrow t = \frac{\rho_B}{bk_s C_{Ag}} (R - r_c) \quad (\text{Ec. 18})$$

Por lo tanto, tendremos que el tiempo de conversión completa, es decir el tiempo cuando  $r_c=0$  será de:

$$\tau = \frac{\rho_B}{bk_s C_{Ag}} \quad (\text{Ec. 19})$$

Obteniéndose de esta forma:

$$\frac{t}{\tau} = 1 - \frac{r_c}{R} = 1 - (1 - X_B)^{1/6} \quad (\text{Ec. 20})$$

### 1.11.2 La difusión a través de la película gaseosa como etapa controlante

La resistencia de la película en la superficie de una partícula depende de numerosos factores, tales como la velocidad relativa entre la partícula y el fluido, el tamaño de la partícula, y las propiedades del fluido. Estos factores han sido correlacionados para varios métodos de contacto sólido-fluido, tales como lechos de relleno, lechos fluidizados, y sólidos en caída libre. Por ejemplo, para sólidos en caída libre, (Ranz et al., 1952) encontraron que:

$$-\frac{1}{S_{ex}} \frac{dN_B}{dt} = -\frac{1}{4\pi R^2} \rho_B 4\pi R^2 \frac{dR}{dt} = -\rho_B \frac{dR}{dt} = bk_g C_{Ag} \quad (\text{Ec. 21})$$

Si se considera régimen de Stokes, al tener partículas solidas de pequeño tamaño, se cumple que:

$$k_g = \frac{2\mathcal{D}}{d_p y} = \frac{\mathcal{D}}{Ry} \quad (\text{Ec. 22})$$

Por lo tanto, tendremos que:

$$\int_{R_0}^R R dR = \frac{b\mathcal{D}C_{Ag}}{y\rho_B} \int_0^t dt \Rightarrow t = \frac{\rho_B y R_0^2}{2b\mathcal{D}C_{Ag}} \left[ 1 - \left( \frac{R}{R_0} \right)^2 \right] \quad (\text{Ec. 23})$$

Por lo que el tiempo necesario para la desaparición completa de la partícula será:

$$\tau = \frac{\rho_B y R_0^2}{2b\mathcal{D}C_{Ag}} \quad (\text{Ec. 24})$$

Obteniéndose de esta forma:

$$\frac{t}{\tau} = 1 - \left( \frac{R}{R_0} \right)^2 = 1 - (1 - X_B)^{2/3} \quad (\text{Ec. 25})$$

## 2 MOTIVACIÓN

Dada la importancia económica que representa el uso de fertilizantes fosfatados para la agricultura, es necesario incrementar la extracción de estos, para disminuir de esta forma el costo económico asociado a las importaciones de fertilizantes fosfatados, el cual tiende al alza debido al agotamiento de este compuesto en las minas alrededor del mundo. Lo anterior ha motivado la búsqueda de potenciales fuentes de aprovechamiento de fosfatos, como los relaves mineros.

Lo anterior implica a su vez que se estudien formas de extraer este recurso, de una manera económicamente viable, lo cual puede resolverse mediante lixiviación con ácido sulfúrico, el cual puede ser obtenido por biooxidación de azufre. Estos procesos involucran a microorganismos que gracias a su acción catalítica, son capaces de producir este ácido a menores temperaturas y con un menor número de contaminantes que los métodos químicos convencionales. A su vez, se sabe que la velocidad de lixiviación aumenta con la temperatura, por lo que en la actualidad se están utilizando microorganismos termófilos en los procesos de biohidrometalúrgicos.

Dentro de los microorganismos azufre-oxidantes se encuentra la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, la cual es acidófila y termófila moderada. Sin embargo, en la actualidad existe escaso conocimiento sobre su comportamiento en la oxidación de azufre. Por lo tanto, se hace necesario llevar a cabo una mayor investigación sobre este microorganismo, para de esta forma aportar en el conocimiento de la tecnología de biooxidación de azufre elemental.

### 3 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO Y JUSTIFICACIÓN

El trabajo de título consistirá en realizar un estudio del comportamiento de la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en la biooxidación de azufre.

Debido a que un alto porcentaje de los ingresos económicos de Brasil dependen de la actividad agrícola, todo desarrollo o conocimiento relacionado con dicha área es de gran relevancia, y aún más aquellos implicados con la biooxidación de azufre para producir ácido sulfúrico, el cual puede ser utilizado para lixiviar fosfatos desde fuentes no convencionales como relaves mineros. Debido a que este tipo de procesos tienen impactos ambientales menores al utilizar microorganismos que pertenecen al ciclo biogeoquímico del azufre, por lo que no generan contaminantes dañinos al medio ambiente, lo cual va en directa relación con la política medioambiental de esa nación, además de la política propia del grupo minero VALE SA.

Existen variados antecedentes bibliográficos que señalan el efecto positivo del aumento de la temperatura en la tasa de lixiviación tanto química como biológica de minerales. Sin embargo mantener altas temperaturas conlleva un gasto energético importante, por lo cual resulta interesante realizar un estudio con bacterias termófilas moderadas, de manera de comenzar a dilucidar la factibilidad de utilizar estos microorganismos en los procesos y así disminuir los costos energéticos asociados.

Es por dichas razones, que se busca generar un mayor conocimiento acerca de la biooxidación de azufre por *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C. Para lo anterior se realizaron estudios de la cinética de producción de ácido sulfúrico en un cultivo puro de la bacteria en matraces agitados con azufre elemental, donde será monitoreado el pH, y el crecimiento de la población bacteriana adherida al azufre y en solución.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

El principal objetivo del trabajo de título será caracterizar el comportamiento de la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en la biooxidación de azufre a 45°C y determinar los principales factores que influyen en este proceso, para lo cual se tienen como objetivos específicos los indicados a continuación.

### 4.2 Objetivos Específicos

Los objetivos específicos del trabajo de título son los siguientes:

- Determinar la cinética de producción de ácido sulfúrico, como protones y sulfato, en el tiempo, por *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.
- Se determinará la adherencia de la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* al azufre elemental.
- Determinar tanto la evolución del pH en un cultivo de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en azufre elemental a 45°C, así como la viabilidad bacteriana a diferentes pH.
- Se determinará el crecimiento bacteriano tanto adherido al azufre como en solución y se construirá la curva de crecimiento para este microorganismo en las condiciones del estudio.
- Se deducirá una expresión cinética para la oxidación de azufre elemental con este microorganismo a través de datos recolectados de los estudios antes mencionados.
- Se compararán los resultados obtenidos de la oxidación de azufre elemental con la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* con los resultados obtenidos para el mismo proceso con el arquea *Sulfolobus metallicus*.

### 4.3 Alcances

Mediante el presente trabajo de título se busca generar un mayor conocimiento sobre el comportamiento de la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en la biooxidación de azufre usando cultivos puros de esta bacteria y azufre elemental.

Para lo anterior, se medirá la concentración de protones, sulfato y la cantidad de microorganismos en un rango de pH que va de 2,34 a 1. Por lo cual estos resultados pueden no ser extrapolables a otros pH, debido a que pueden haber efectos de inhibición por producto (protones), los cuales no fueron estudiados.

Cabe destacar que para estudiar la producción de protones, sulfato y el crecimiento bacteriano, se requerirán diversos cultivos en las mismas condiciones, uno por cada medición y su duplicado, es por ello que se asumirá que todos los cultivos se comportarán de forma similar para poder analizar los resultados obtenidos, como si se tratase de un único cultivo y su duplicado.

Finalmente se debe considerar que el estudio se realiza a escala de laboratorio y con un cultivo puro de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C, y no representa de forma exacta lo que puede ocurrir a escala industrial, donde existe una gran diversidad de microorganismos y condiciones externas que pueden afectar al proceso, tales como contaminantes que inhiban a los microorganismos, temperaturas inadecuadas, etc.

## 5 METODOLOGÍA

Para el estudio de la biooxidación de azufre se realizaron cultivos puros con la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en azufre en perlas de diámetro de partícula entre 0,355 y 1 [mm] y experimentos controles estériles, ambos en matraces agitados a 100 rpm y una temperatura de 45°C. Se monitoreó periódicamente el pH, la producción de protones y se estimó el azufre disuelto como sulfato en la solución. Junto con lo anterior, se evaluó la adherencia del microorganismo al azufre y se realizó recuento de las células adheridas al azufre y en solución durante el proceso de biooxidación. A continuación se detallan las metodologías utilizadas.

### 5.1 Materiales y Equipos

Los cultivos fueron inoculados con una cepa pura de la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, la que se mantiene 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 las mediciones realizadas.

- Incubación de los cultivos y experimentos control: Shaker con agitación de 100 rpm y temperatura de 45°C.
- Medición de pH: Equipo marca Corning, modelo 340 con electrodo de Ag/AgCl.
- Determinación de la concentración de sulfato: Equipo de espectrofotometría UV-visible. Marca Agilen, modelo 8453, equipado con una lámpara de Tungsteno.
- Recuento de bacterias, para determinación de la adherencia bacteriana al azufre: Microscopio, marca Nikon, modelo Labophot, equipado con filtro de contraste de fase y aumento ocular de 10x y objetivo de 40x. Cámara de recuento de células Petroff-Hausser de 0,02 [mm] de profundidad.
- Recuento de bacterias planctónicas y adheridas por tinción con DAPI: Microscopio de epifluorescencia, marca Zeiss, equipado con los filtro de 365 y 546 [nm]. Cámara fotográfica, marca Nikon, modelo Coolpix 4500 de 4 megapíxeles.

### 5.2 Diseño del experimento

Los experimentos control y los de biooxidación de azufre con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 120 ml con 1,5 gramos de azufre, previamente esterilizados, los que fueron colocados en un agitador orbital a 100 rpm y calefaccionado a 45°C, una vez que fue agregado el medio de



cultivo basal, el inóculo de la bacteria (en el caso de los cultivos) y los nutrientes que esta requiere. Los componentes tanto de los cultivos como de los experimentos de control, deben ser previamente esterilizados y manejados bajo condiciones estériles para garantizar que no se contaminen con otros microorganismos.

Se utilizaron veinte frascos de cultivos con las bacterias, de manera de monitorear la concentración de protones, sulfato y realizar el recuento bacteriano, correspondientes a 10 pH distintos (los experimentos se realizan en duplicado), y era necesario retirar un cultivo y su duplicado para las mediciones de bacterias planctónicas y bacterias adheridas. Los experimentos control, también se realizaron en duplicado usando solo dos matraces para ello, ya que no era necesario retirarlos para realizar las mediciones pertinentes por no tener bacterias.

Ambos experimentos fueron monitoreados periódicamente. En el caso de los cultivos con el microorganismo, se midió para cada uno de los frascos el pH, para lo cual se tomaron 2 [mL] de muestra de la solución. En los experimentos control se tomaron 4 ml de muestra, esto para medir tanto el pH como la concentración de sulfato. Adicionalmente fueron retirados un matraz y su duplicado cuando los pH correspondían a 2,3; 1,8; 1,7; 1,6; 1,5; 1,4; 1,35; 1,2; 1,1 y 1 para realizar mediciones de sulfato, protones, bacterias en solución y bacterias adheridas al mineral.

### **5.3 Implementación de metodología para la obtención de esferas o perlas de azufre**

#### **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.
- Soporte y parrilla metálica.

#### **Obtención de perlas de azufre**

1. Instalar el reactor con el agitador.
2. Agregar el agua destilada al reactor.
3. Posicionar el manto calefactor con el balón sobre el reactor.

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

#### **5.4 Esterilización del azufre elemental**

Con el fin de eliminar a cualquier microorganismo que se encontrara poblando las perlas de azufre elemental previamente sintetizadas, se realizó el siguiente procedimiento.

##### **Materiales**

- Matraz Erlhenmeyer
- Medio de Cultivo MC 2,3 estéril
- 1,5 [g] de azufre elemental

##### **Protocolo de Esterilización de Azufre**

1. En el matraz colocar el azufre y 100 [mL] de medio de cultivo MC 2,3.
2. Llevar este matraz previamente tapado a una olla tapada y sin presión por media hora luego de haber alcanzado la ebullición.
3. Dejar enfriar y repetir el paso 2 en 24 horas.

##### **5.4.1 Cultivos de bacterias en azufre con extracto de levadura**

##### **Materiales y equipos**

- 20 matraces de 120 [mL], con 1,5 [g] de azufre y 50 [mL] de medio de cultivo MC 2,3, esterilizados por calor.
- 1,8 L de Medio de Cultivo Basal (0,4 [g/L] de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,4 [g/L] de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0,056 [g/L] de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a pH 2,3, esterilizado por calor.
- 27 [g] de azufre elemental en perlas de diámetros entre 0,355 y 1 [mm].

- 18 [mL] de solución de extracto de levadura al 1% p/v, esterilizada por filtración.
- Shaker a una agitación de 100 rpm y calefaccionado a 45°C.

Los veinte cultivos tienen la siguiente composición:

- 47 [mL] de medio de cultivo basal (MC) con un pH de 2,3 ajustado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- 1,5 [g] de azufre.
- 1 [mL] de Solución de Extracto de Levadura al 1%.
- 2 [mL] de suspensión de bacterias, de concentración 4,9x10<sup>7</sup> [Bacterias/mL]

#### 5.4.2 Experimentos control

##### Materiales y equipos

- 2 matraces de 120 [mL], con 1,5 [g] de azufre y 50 [mL] de medio de cultivo MC 2,3, esterilizados por calor.
- 98 [mL] de Medio de Cultivo Basal (0,4 [g/L] de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4 [g/L] de MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O y 0,056 [g/L] de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a pH 2,3, esterilizado por calor.
- 3 [g] de azufre elemental.
- 2 [mL] de solución de extracto de levadura al 1% p/v, esterilizada por filtración.
- Shaker a una agitación de 100 rpm y calefaccionado a 45°C.

Los dos cultivos control y los cultivos con bacterias, son realizados en las mismas condiciones, la única diferencia que existe entre ambos es la presencia o no del inóculo bacteriano. Los cultivos control tienen la siguiente composición.

- 48 [mL] de medio de cultivo basal (MC) con un pH de 2,3 ajustado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- 1,5 [g] de azufre.
- 1 [mL] de Solución de Extracto de Levadura al 1%.

## 5.5 Análisis biológicos

### 5.5.1 Determinación de la capacidad de adherencia bacteriana al azufre

#### Materiales y equipos

- 2 matraces Erlenmeyer de 120 [mL].
- 4 [mL] de inóculo puro de la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.
- 34 [mL] de Medio de Cultivo Basal (0,4 [g/L] de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,4 [g/L] de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0,056 [g/L] de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a pH 2,3, esterilizado por calor.
- 3 [g] de azufre elemental.
- 2 ml de solución de extracto de levadura al 1% p/v, esterilizada por filtración.
- Shaker a una agitación de 100 rpm y calefaccionado a 45°C.
- Microscopio de contraste de fases, marca Nikon, modelo Labophot.
- Cámara de recuento de células Petroff-Hausser de 0,2 [mm] de profundidad.

Con el fin de determinar la capacidad de adherencia de las bacterias *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* al azufre, se realizó un experimento en duplicado utilizando para ello dos matraces de 120 Erlenmeyer de 120[mL], a cada uno de ellos se les agregó 1,5 gramos de azufre elemental, 47 [mL] de medio de cultivo basal a pH 2,3 y 2 [mL] de concentrado de bacterias. Una vez agregado el inóculo de bacterias se agitaron los matraces y se extrajeron 20 [ $\mu\text{L}$ ] de cada uno para determinar la concentración inicial de bacterias en solución. Inmediatamente después de sacadas dichas muestras, se llevaron los matraces al shaker a 45°C, donde se mantuvieron hasta el final de la experiencia.

Luego de sacada la primera muestra (tiempo cero), se sacaron nuevamente 20 [ $\mu\text{L}$ ] cada 15 minutos hasta completar una hora, luego cada 30 minutos hasta completar 5 horas (durante el periodo de una toma de muestra y la siguiente, los cultivos e mantuvieron en el shaker de 45°C). Dichas muestras fueron utilizadas para realizar recuento directo de las bacterias en solución y de esta forma determinar el porcentaje de bacterias que se ha adherido al mineral dentro de las primeras dos horas, correspondiente a la diferencia de concentración de bacterias planctónicas iniciales y la de un determinado tiempo.

### 5.5.2 Recuento de bacterias planctónicas y adheridas al mineral mediante tinción DAPI

#### Materiales y equipos

- Cultivos de biooxidación de azufre con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.
- Formaldehído al 37%.
- Reactivo DAPI de concentración 1 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].
- Reactivo Mountaint (5,5 partes de Citifluor, 1 parte de VectaShield, 0,5 partes DAPI a una concentración final de 1 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] en PBS).
- Aceite de cedro.
- Filtro de policarbonato con tamaño de poro de 0,22 [ $\mu\text{m}$ ].
- Placas Petri.
- Portaobjeto.
- Cubreobjeto.
- Microscopio de Epifluorescencia, marca Zeiss, equipado con los filtro de 365 y 546 [nm].
- Cámara fotográfica, marca Nikon, modelo Coolpix 4500 de 4 megapíxeles.

#### Traspaso de las células desde la suspensión a un soporte

Por medio de este procedimiento se traspasan las células suspendidas en la solución a un soporte, dependiendo de la cantidad de células en solución se utiliza una muestra directa o una muestra con dilución 10x o 100x, para que la muestra a analizar, se encuentre entre las  $10^6$  y  $10^7$  [bacterias/mL].

- Fijar las células de 5 [mL] de la suspensión del cultivo de biooxidación con formaldehído al 4% por una hora en hielo.
- En caso de que sea necesario utilizar una dilución 10x, tomar 0,5 [mL] de la solución de la suspensión del cultivo de biooxidación, agregar 4,5 [mL] de medio de cultivo MC 2,3 y agitar.
- En caso que sea necesario utilizar una dilución de 100x, tomar 0,5 [mL] de la solución anterior, agregar 4,5 [mL] de medio de cultivo MC 2,3 y agitar.
- Fijar la muestra diluida de la suspensión con formaldehído al 4% por una hora en hielo.
- Descongelar las muestras fijadas y agitar durante 2 minutos.
- Filtrar las muestras en membranas de policarbonato.
- Guardar muestras en placas Petri en el congelador, hasta ser analizadas por tinción DAPI.

## **Traspaso de las células adheridas a azufre a un soporte**

- Extraer el azufre del matraz a analizar, procurando eliminar los restos de suspensión de biooxidación.
- Lavar el azufre con medio de cultivo basal estéril a pH 2,3.
- Incubar el azufre en 5 [mL] de PBS 1 x con formaldehído al 4% por 1 hora en hielo.
- Descongelar la muestra de azufre.
- Recuperar el azufre y guardar en una placa Petri en el congelador, hasta ser analizadas por tinción DAPI.

## **Recuento celular por tinción DAPI**

- Para realizar el recuento de las bacterias planctónicas, cortar las membranas de policarbonato en que fueron traspasadas las células en 3 cuadros de 1x1 cm aproximadamente, y ubicarlos dentro de una nueva placa Petri.
- Para realizar el recuento de las bacterias adheridas al azufre, sacar parte del azufre donde fueron fijadas las bacterias adheridas de cada muestra y colocar en una nueva placa Petri.
- Teñir las muestras con el reactivo DAPI de concentración 1 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] en PBS 1x.
- Colocar la muestra de la membrana de policarbonato o de azufre, al que fue agregado el reactivo DAPI, sobre el portaobjeto.
- Cubrir la sección del filtro o de azufre con Mountaint.
- Colocar un cubre-objeto sobre el filtro o mineral, y agregar sobre este una gota de aceite de cedro.
- Evaluar la sección del filtro o de azufre, utilizando un microscopio de epifluorescencia con un aumento de 1000x (objetivo 100x y ocular 10x) y filtro de luz UV con una longitud de onda de 365 [nm].

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Capacidad de Adherencia de la Bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* al Azufre Elemental

La capacidad de adherencia de bacterias *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* sobre azufre elemental a 45°C es evaluada por medio del número de estas que permanece libre en solución durante las primeras cinco horas. Así las bacterias adheridas a la superficie del azufre, corresponden a la diferencia de las bacterias totales en la solución entre el tiempo cero y las contabilizadas en un determinado instante.

Como muestra el Gráfico 1 el número inicial de bacterias planctónicas totales fue de  $3 \times 10^9$ , el cual durante los primeros 90 minutos decayó considerablemente hasta  $1,7 \times 10^9$ , alcanzando así una adherencia del 42%. Posteriormente es posible notar una disminución en la tasa de adherencia bacteriana, llegando a contabilizarse a las cinco horas  $1,4 \times 10^9$  bacterias totales libres en solución, lográndose por consiguiente una adherencia del 54% aproximadamente.

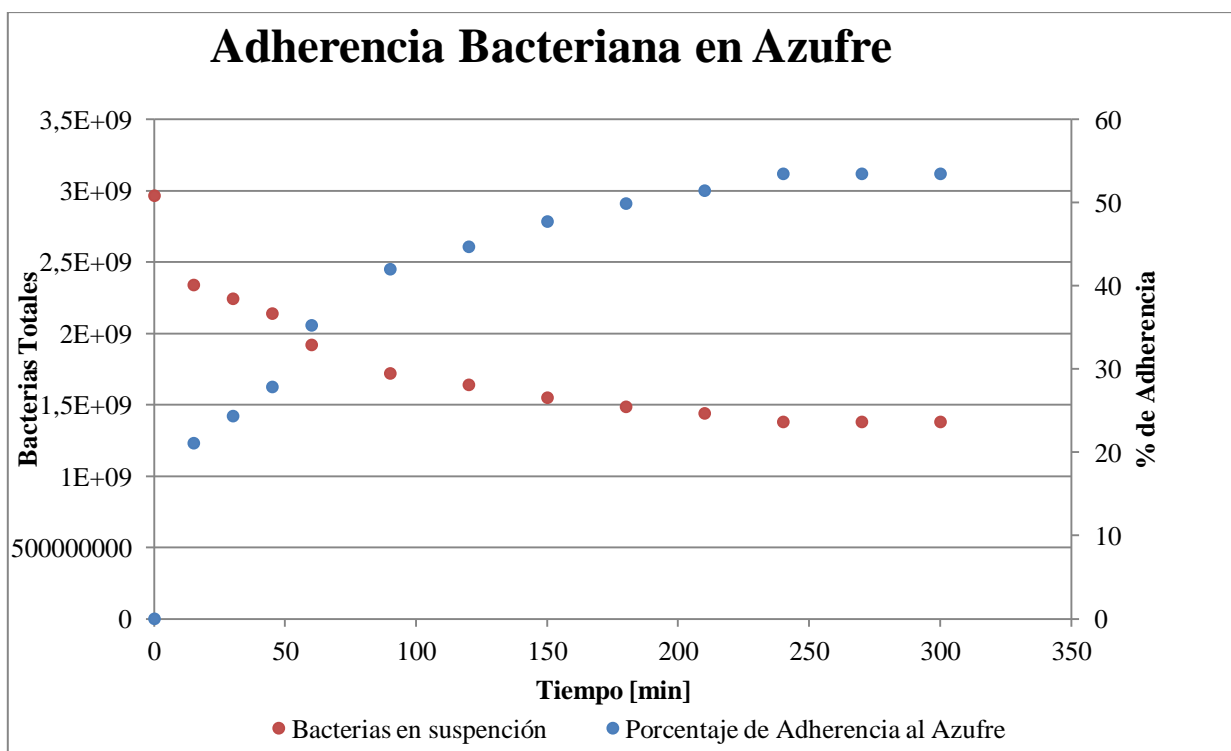


Gráfico 1: Recuento de bacterias planctónicas totales y porcentaje de adherencia de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* sobre azufre a 45°C durante las primeras 5 horas.

## **6.2 Biooxidación de Azufre Elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C**

Con el fin de caracterizar el comportamiento de la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en la biooxidación de azufre a 45°C, se realizaron cultivos de ella en azufre, junto con experimentos controles estériles que no fueron inoculados con el microorganismo. Esto con el fin de observar a cabalidad el efecto del microorganismo en la reacción de oxidación.

Durante los once días que duró la experiencia para ambos casos, se monitorearon periódicamente el pH de la solución con un electrodo de Ag/AgCl, la concentración de sulfato por turbidimetría y la concentración de protones por titulación. Asimismo, en los cultivos de biooxidación se realizaron los recuentos de las bacterias planctónicas y las adheridas al azufre durante el proceso, utilizando para esto tinción DAPI y recuento en el microscopio de Epifluorescencia. Por último se observó el porcentaje de células viables mediante tinción CARD-FISH y observación en el microscopio de Epifluorescencia.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de este estudio.

### **6.2.1 Evolución del pH**

En el Gráfico 2, se muestra la variación del pH en el tiempo para el proceso de biooxidación de azufre a 45°C por acción de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.

Como es posible apreciar, en el cultivo con el microorganismo se presentó una considerable baja del pH desde 2,34 a 0,99 durante el desarrollo del estudio.

Con respecto al experimento control, es posible apreciar que el pH se mantuvo constante durante toda la experiencia, lo que significa que la disminución del pH es debida exclusivamente a la acción de las bacterias, donde los protones serían generados debido a la disociación de moléculas de agua efectuada por los microorganismos ya que estos requieren de los electrones provenientes de dicha reacción para generar la energía necesaria para su crecimiento y reproducción.



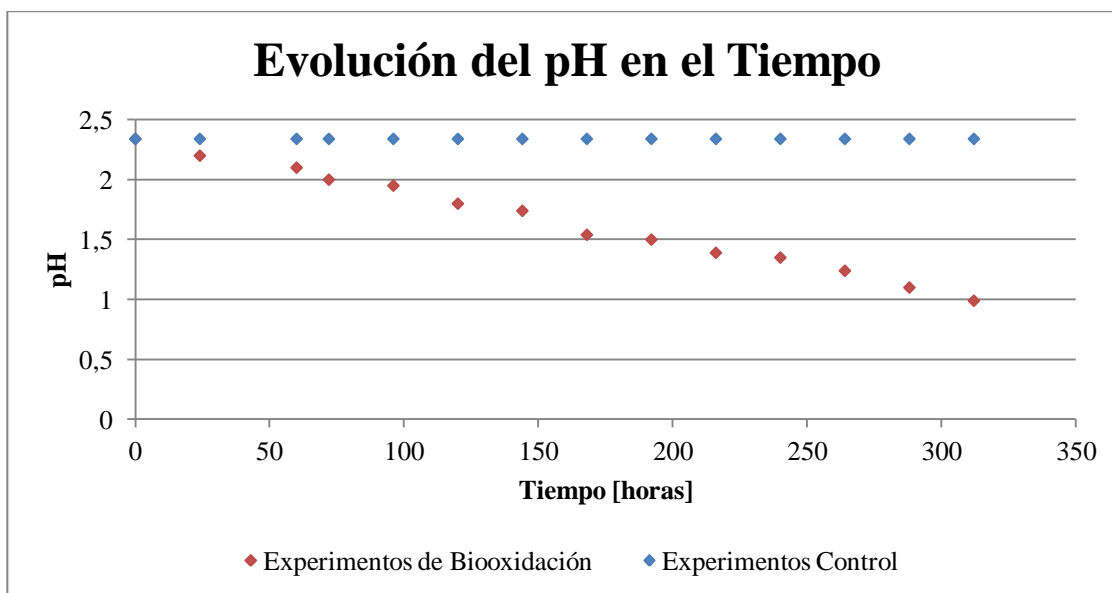


Gráfico 2: Comparación de la variación del pH durante el proceso de biooxidación de azufre a 45°C con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* y el experimento control.

## 6.2.2 Evolución de la Disolución de Azufre

### 6.2.2.1 Evolución de la concentración de sulfato

La disolución de Azufre por biooxidación de azufre se estudió por medio de la variación de la concentración de sulfato en solución mostrada en el Gráfico 3, tanto para el cultivo de biooxidación de azufre con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C, como para el experimento control sin inóculo de la bacteria.

Cabe mencionar que por medio del método de la turbidimetría no es posible determinar la concentración de intermediarios de azufre como polisulfuros, sino solo la concentración de azufre disuelto como sulfato. Es por esto, que se consideró que la evolución en el tiempo del sulfato es representativa de la oxidación de azufre. En el caso del cultivo de biooxidación se observa que en un primer instante la concentración de sulfato aumenta de manera discreta de 886 a 1336 [ppm] durante las primeras 72 horas. Posteriormente se observa un fuerte aumento de la concentración de sulfato, alcanzándose una concentración de 3600 [ppm] a las 312 horas.

Con respecto al experimento control, se observa que la concentración de sulfato se mantuvo relativamente constante e igual a 755 [ppm], esto significaría que el aumento en la concentración de sulfato sería debido a la acción bacteriana sobre el azufre, el cual estaría siendo oxidado por los microorganismos para poder obtener de estas reacciones la energía necesaria para su metabolismo y reproducción.

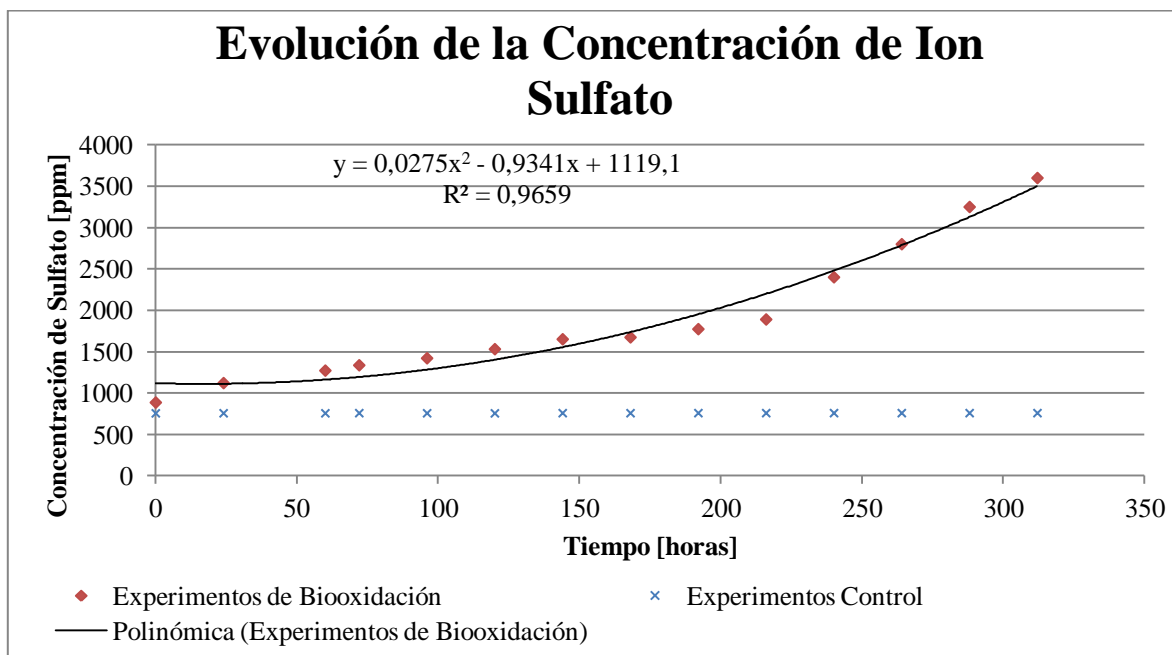


Gráfico 3: Comparación de la variación de la concentración de sulfato en solución medida en el experimento control y la determinada durante el proceso de biooxidación de azufre a 45°C con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*

#### 6.2.2.2 Evolución de la concentración de protones

La disolución de azufre por el proceso de biooxidación, también se estudió por medio de la variación de la concentración de protones y ácido sulfúrico en solución, las cuales fueron obtenidas mediante titulación y son mostradas en el Gráfico 4. En el cultivo de biooxidación se puede observar que dentro de las primeras 72 horas tanto la concentración de ácido sulfúrico como la de protones aumentan de forma lenta, alcanzando una concentración de 0,93 y 0,01 [g/L] respectivamente. Posteriormente esta situación cambia, observándose un aumento sustancial de la concentración de ácido sulfúrico y protones llegando a registrarse una concentración de 10,54 [g/L] de ácido sulfúrico y 0,11 [g/L] de protones.

El experimento control por su parte, muestra una concentración de ácido sulfúrico y protones constante en el desarrollo de la experiencia igual a 0,47 y 0,047 [g/L] para el ácido y los protones respectivamente, lo cual indicaría que el aumento observado en la concentración en el cultivo de biooxidación es debido a la acción de los microorganismos.

A su vez en el Gráfico 5, es posible observar la relación existente entre la concentración de ácido sulfúrico y el pH, donde es posible apreciar que a menor pH, mayor es la concentración de dicho ácido.

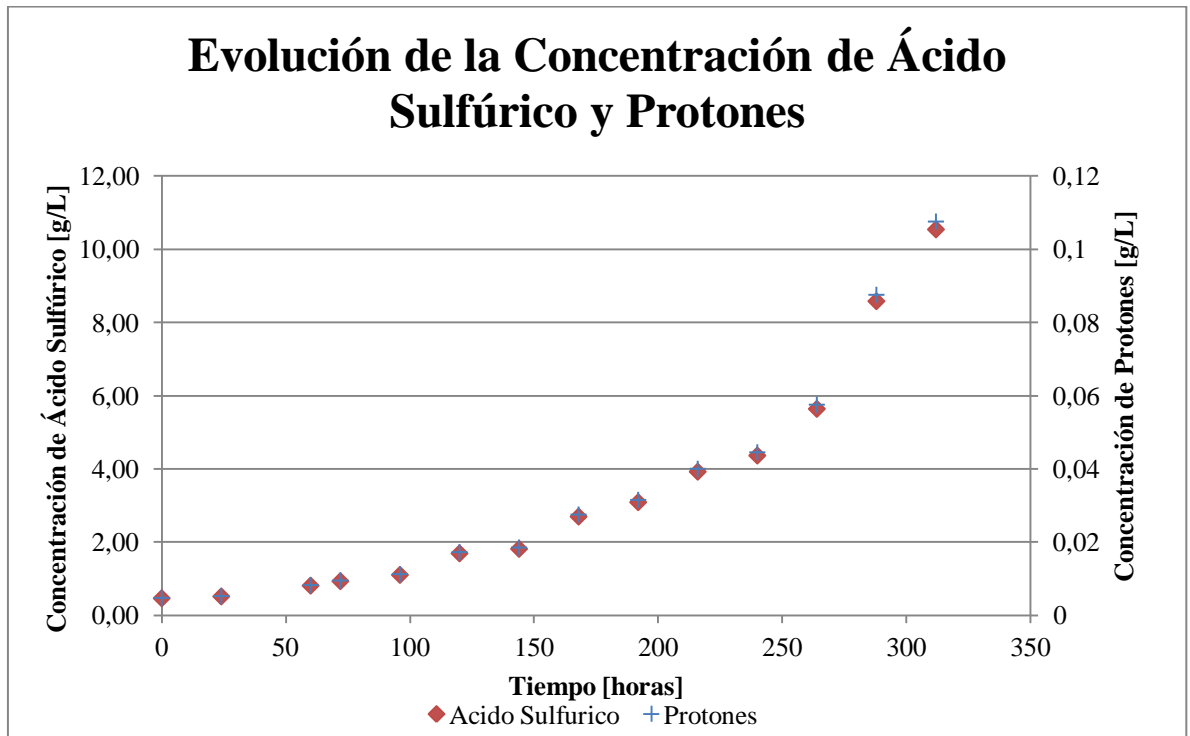


Gráfico 4: Variación de la concentración de Ácido Sulfúrico y Protones en el cultivo de biooxidación con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C

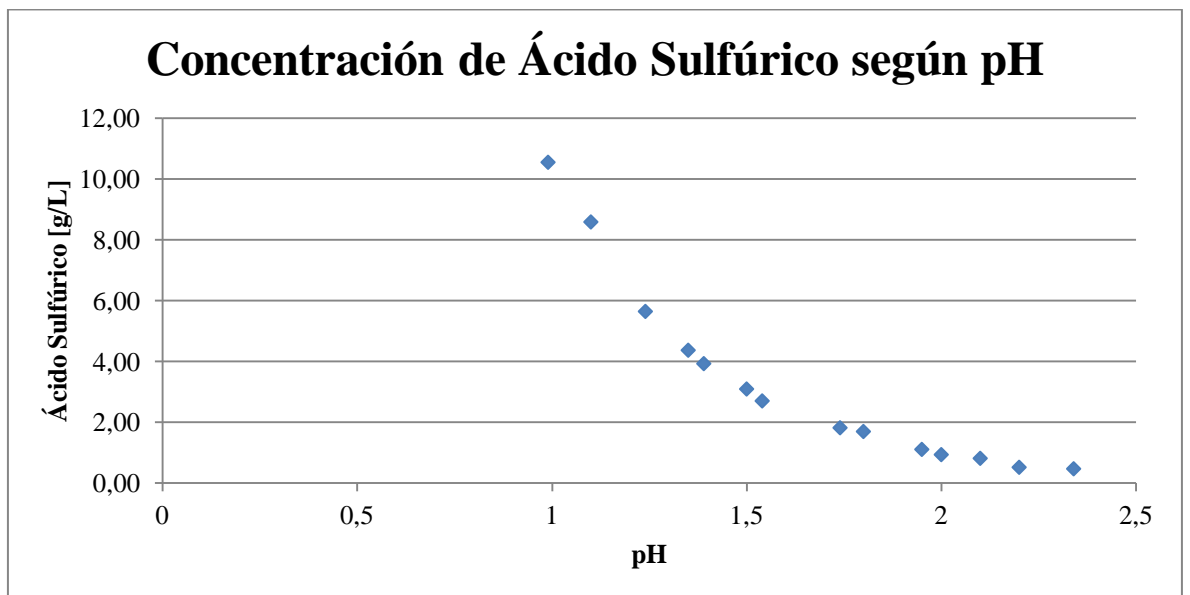


Gráfico 5: Relación entre el pH y la concentración de Ácido Sulfúrico

### 6.2.2.3 Estimación del azufre oxidado

A partir de la concentración de protones medida en el experimento control sin inóculo de la bacteria y la del cultivo de biooxidación, se estimó la evolución de la oxidación de azufre (azufre disuelto) en el tiempo a través de la relación molar dada por la reacción química de la oxidación de azufre, la que es presentada en el Gráfico 6. Es posible ver que la concentración de azufre oxidado en el experimento con bacterias, siguió el mismo comportamiento que la concentración de protones mostrada anteriormente en el Gráfico 4, lo cual era esperable debido a que la oxidación de azufre fue estimada a partir de dicha concentración. De esta forma el azufre oxidado presentó un alza sostenida en el tiempo, teniendo un mayor incremento en su concentración a partir de las 72 horas, alcanzándose una masa de azufre disuelto de aproximadamente 83 [mg].

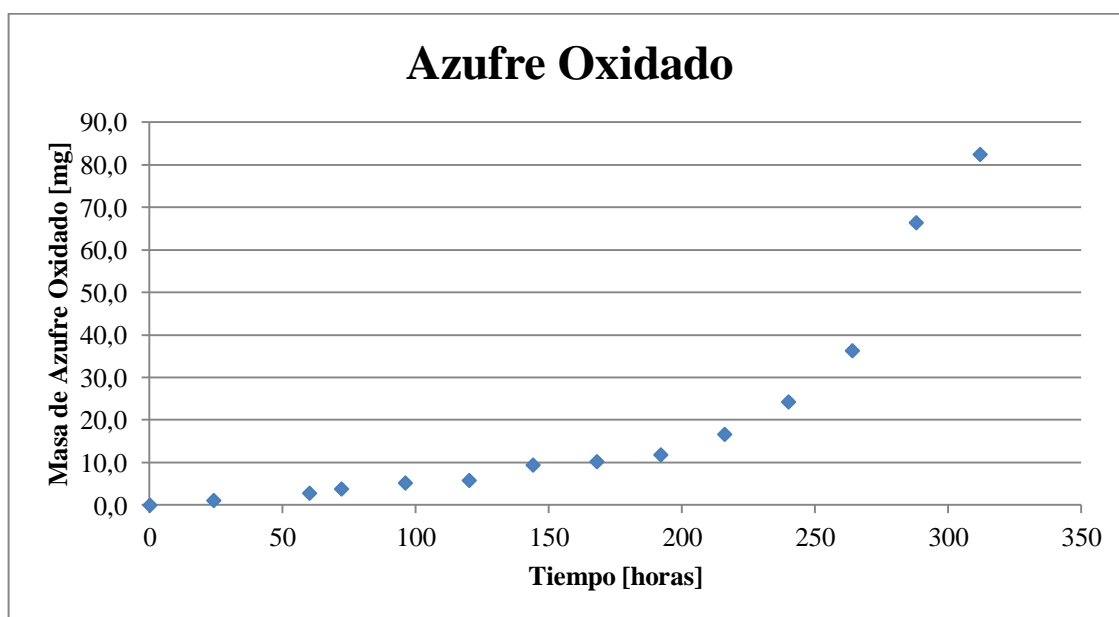


Gráfico 6: Variación de la concentración de azufre oxidado durante el proceso de biooxidación a 45°C con *Sulfolobus thermosulfidooxidans*

### 6.3 Análisis Biológicos

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación tanto de las bacterias planctónicas como de las adheridas a la superficie del azufre, realizadas a los cultivos de biooxidación de azufre con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C.

#### 6.3.1 Cuantificación de las Bacterias Planctónicas

Para evaluar las bacterias que se encontraban libres en solución, en cada monitoreo se tomó una muestra directa de la solución, la cual podía ser diluida o no según fuera el pH en el cual se encontraba la solución. Posteriormente las células presentes en la solución fueron fijadas y filtradas, para luego ser cuantificadas por medio de tinción DAPI y observación al microscopio de Epifluorescencia, proceso que es representado en la Figura 10, correspondiente a la fotografía tomada a muestras de la solución de los cultivos de biooxidación a distintos tiempos, en las cuales es posible ver a las bacterias en forma de bastones y un tono blanquecino brillante.

Los resultados de las bacterias planctónicas cuantificadas durante el estudio son mostrados en el Gráfico 7, en el cual es posible observar que la concentración inicial de estas fue de unas  $4,9 \times 10^7$  [bacterias/mL] equivalente a  $2,45 \times 10^9$  bacterias totales. Entre las 0 y 72 horas se observa un crecimiento celular bajo alcanzando solo al final de este tiempo  $8,3 \times 10^9$  bacterias planctónicas totales, cantidad que desde las 72 y hasta las 216 horas aumentó de forma exponencial con un coeficiente de correlación de 0,9; tal como se ilustra en el Gráfico 8, llegando aproximadamente a una cantidad total de  $6,6 \times 10^{11}$  bacterias planctónicas totales. Posteriormente se apreció una disminución del crecimiento celular llegando así a presentar al final de la experiencia  $3,3 \times 10^{11}$  bacterias planctónicas totales.

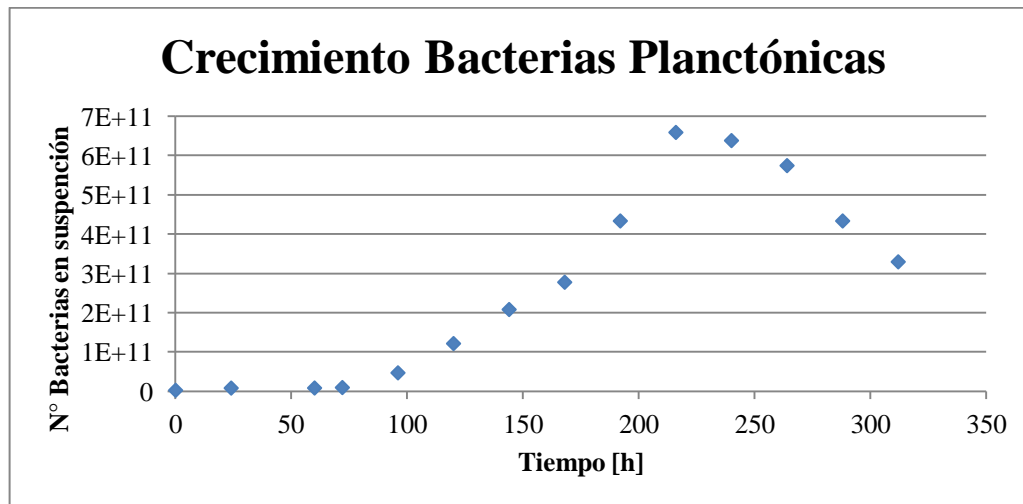


Gráfico 7: Crecimiento de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en Solución a 45°C

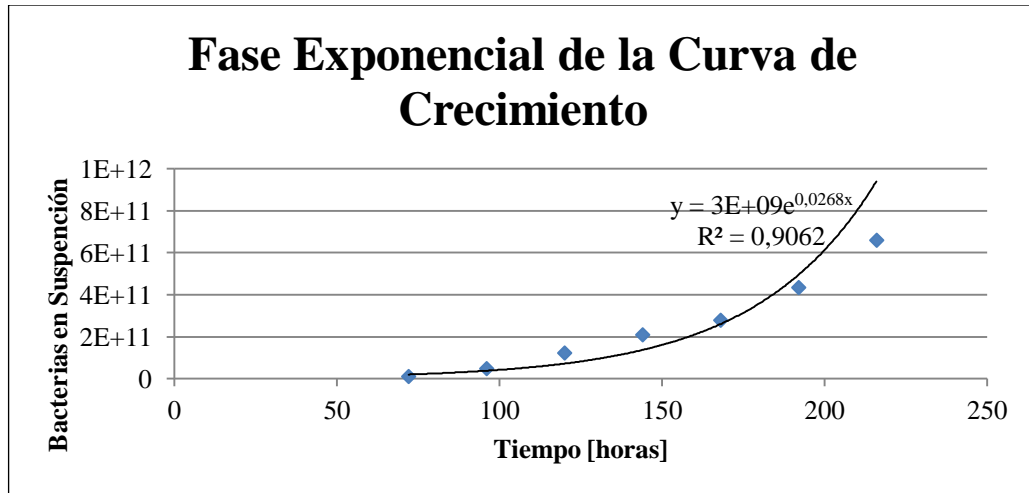


Gráfico 8: Fase Exponencial del Crecimiento de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en Solución a 45°C

Considerando que entre las 72 y las 216 horas el cultivo de biooxidación presentó un crecimiento celular del tipo exponencial, se consideraron dichos datos para realizar una linealización en el tiempo, del logaritmo natural de la razón entre las bacterias totales en cada monitoreo y las bacterias iniciales, la cual se muestra en el Gráfico 9. A partir de la regresión lineal realizada, con un coeficiente de correlación de 0,81, se determinó el valor de la pendiente de la recta correspondiente a la máxima velocidad de crecimiento del cultivo de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en la biooxidación de azufre a 45°C, donde  $\mu_{max}$  resultó ser de  $3,4 \times 10^{-2}$  [horas<sup>-1</sup>], lo que indica que se requieren de aproximadamente 93 horas para duplicar la población bacteriana.

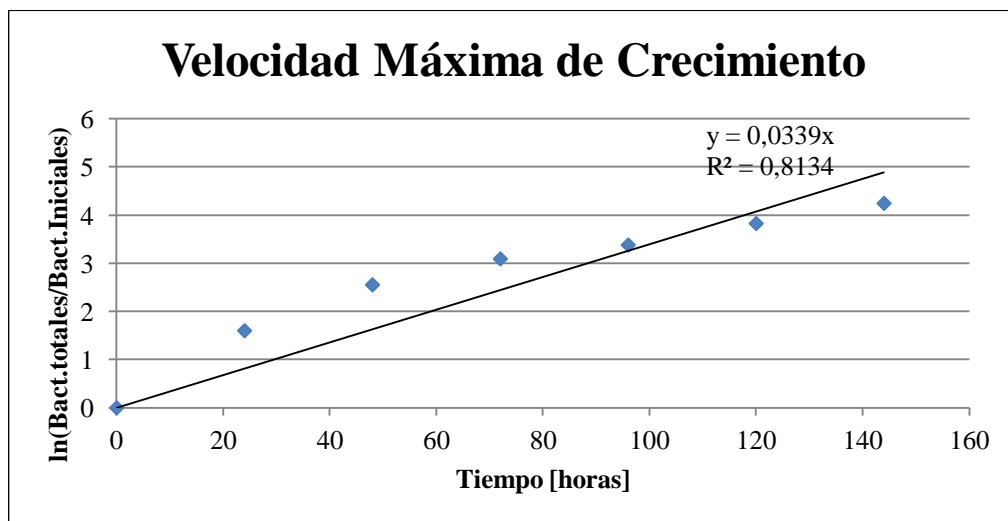


Gráfico 9: Linealización de la Fase Exponencial del Crecimiento Celular de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*

En la Figura 11 se muestran fotografías al microscopio de Epifluorescencia de bacterias planctónicas de las muestras de la solución de los cultivos de biooxidación teñidas con DAPI, en las cuales se puede observar pequeñas zonas teñidas de blanco que corresponden a las bacterias, apreciándose de esta manera el incremento de la población bacteriana en el tiempo.

Las fotografías corresponden a muestras tomadas a las 0, 72, 144 y 216 horas respectivamente.

A su vez, se pueden observar manchas de color blanco de mayor tamaño, las cuales son manchas de DAPI. Estas últimas suceden producto de la mala disolución del DAPI en la solución de tinción.

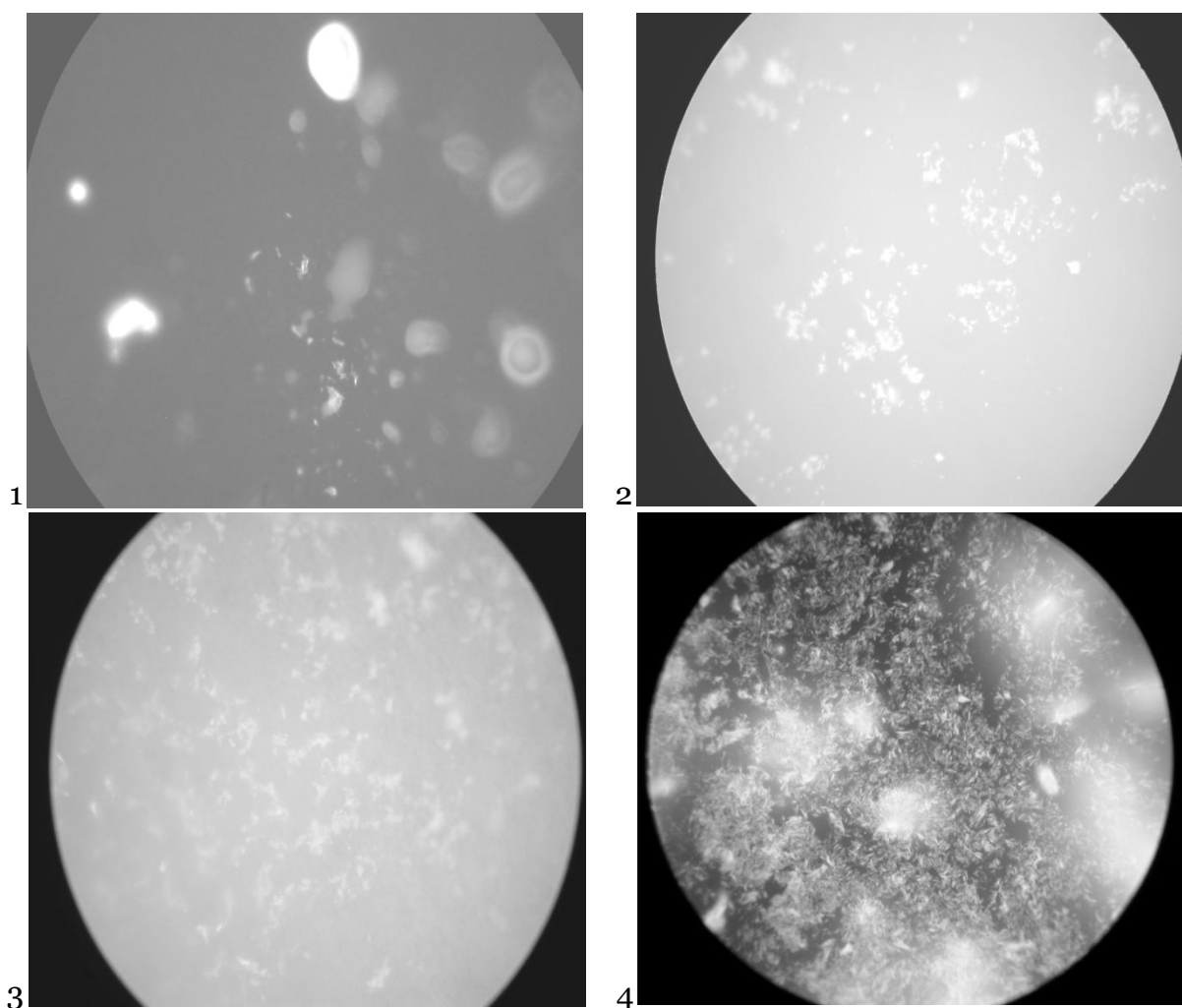


Figura 9: Fotografía al Microscopio de Epifluorescencia de las Bacterias Planctónicas. 1) 0 horas de cultivo, 2) 72 horas de cultivo, 3) 144 horas de cultivo, 4) 216 horas de cultivo.

### 6.3.2 Cuantificación de las Bacterias Adheridas a la Superficie del Azufre

Como se explica en la sección Cuantificación de Bacterias Planctónicas y Adheridas del Anexo B, para determinar el número total de bacterias adheridas a la superficie del azufre, se determinó el área circular promedio de las partículas de azufre, para con ella estimar el radio de estas, luego su volumen y superficie esférica.

Dichos resultados son indicados en la tabla 2 a continuación:

Tabla 3: Características de las Partículas de Azufre Elemental

Característica de la partícula promedio	Valor	Unidad
Área	11.304	[ $\mu\text{m}^2$ ]
Radio circular	60	[ $\mu\text{m}$ ]
Volumen Esférico	904.320	[ $\mu\text{m}^3$ ]
Área Superficial Esférica	45.216	[ $\mu\text{m}^2$ ]

Una vez determinados el volumen y el área superficial de una partícula de azufre, con los datos de la masa del azufre en el cultivo de biooxidación con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C y su densidad, se evaluó el área total disponible para la adherencia de dicha bacteria correspondiente a  $3,83 \times 10^{10} \mu\text{m}^2$ , como es indicado en la siguiente tabla.

Tabla 4: Datos del Azufre Utilizado en los Experimentos

Datos Azufre	Valor	Unidad
Masa total	1,5	[g]
Densidad	1,96	[g/cm <sup>3</sup> ]
Área total	$3,8 \times 10^{10}$	[ $\mu\text{m}^2$ ]

La cantidad de bacterias totales adheridas a la superficie del azufre determinada a partir del área total de azufre disponible y el promedio de las bacterias por área de azufre que pudieron ser contabilizadas mediante tinción DAPI y observación al microscopio de Epifluorescencia se muestran en el Gráfico 10, donde es posible ver que la cantidad bacterias en el sólido durante las primeras 216 horas aumento de manera lineal, alcanzando una población de  $2,2 \times 10^{12}$  bacterias adheridas.

Junto con lo anterior, es posible apreciar una posterior disminución en el número de bacterias adheridas al azufre a partir de las 216 horas, obteniéndose  $1,5 \times 10^{12}$  bacterias adheridas a las 312 horas, tiempo que corresponde al término del estudio.



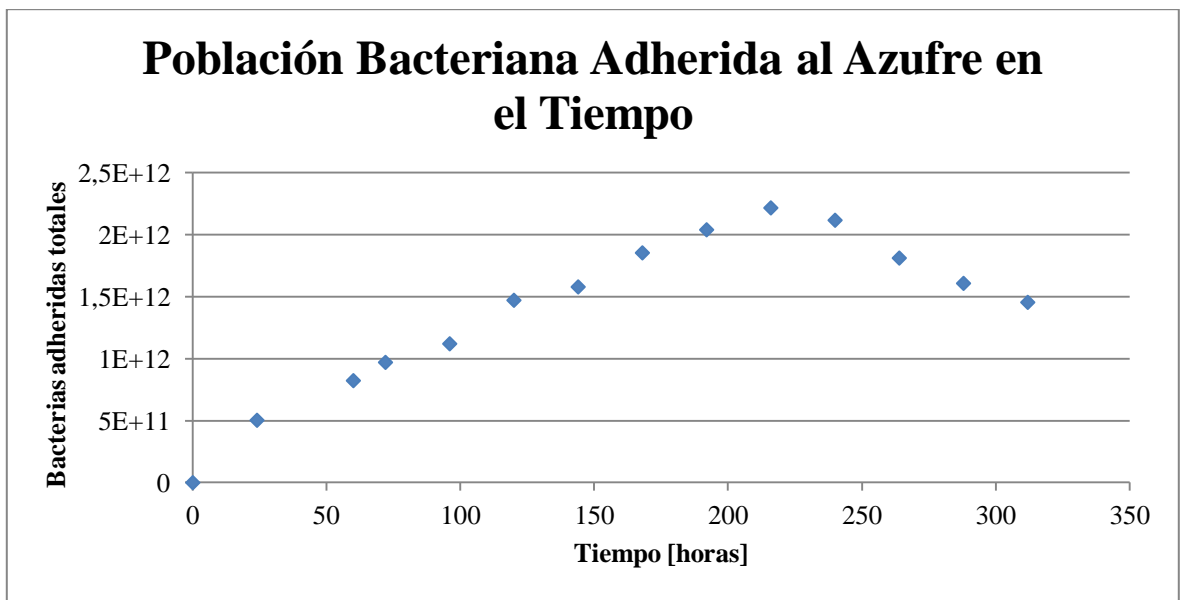


Gráfico 10: Crecimiento de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en Azufre Elemental

A continuación en la Figura 12, se ilustran fotografías al microscopio de Epifluorescencia del azufre contenido en los cultivos de biooxidación en distintos momentos del estudio. En las fotografías se puede apreciar claramente el aumento de la población bacteriana adherida al azufre y como este aumento de la población bacteriana no es uniforme en todo el sólido, sino que se concentra en ciertas zonas del mismo.

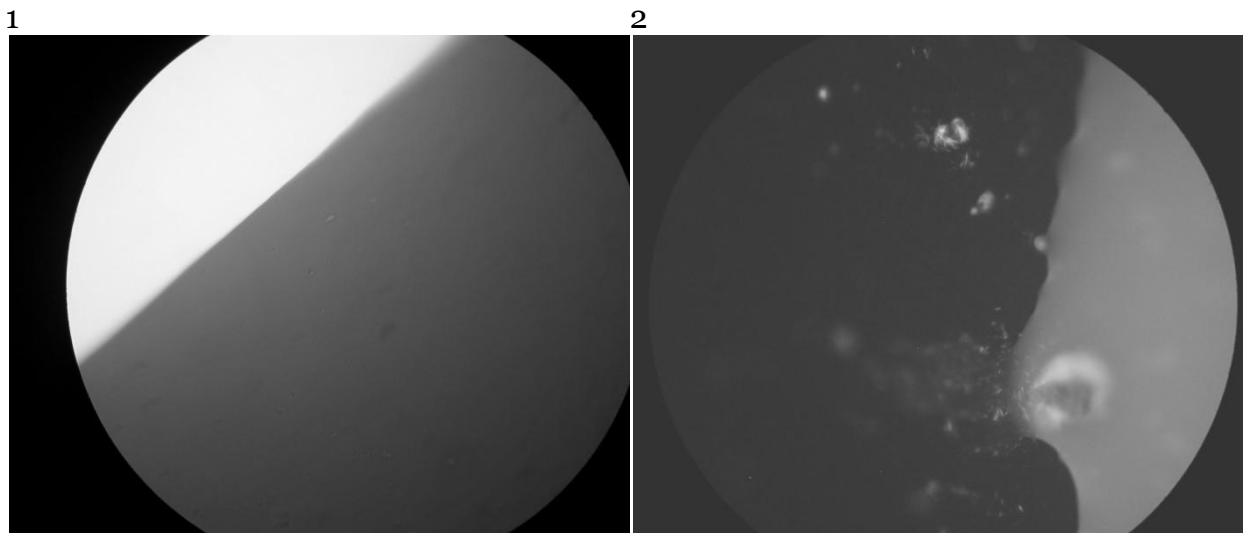


Figura 10: Fotografía al Microscopio de Epifluorescencia de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en Azufre Elemental. 1) 0 horas de cultivo, 2) 24 horas de cultivo

### 6.3.3 Curva de crecimiento

La curva de crecimiento corresponde al crecimiento de todas las bacterias, es decir, considera tanto las bacterias en solución como las bacterias adheridas al azufre, por lo cual esta curva fue obtenida sumando ambas poblaciones bacterianas.

En el Gráfico 11 se muestra la curva de crecimiento para *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en el cultivo de biooxidación de azufre a 45°C, en el cual se puede observar que al igual que en el crecimiento en el sólido el número de bacterias aumentó hasta las 216 horas, donde fue alcanzada la máxima población bacteriana, la que fue de  $2,9 \times 10^{12}$  bacterias y luego de este punto la población bacteriana comenzó a disminuir hasta llegar a ser de  $1,7 \times 10^{12}$  bacterias a las 312 horas.

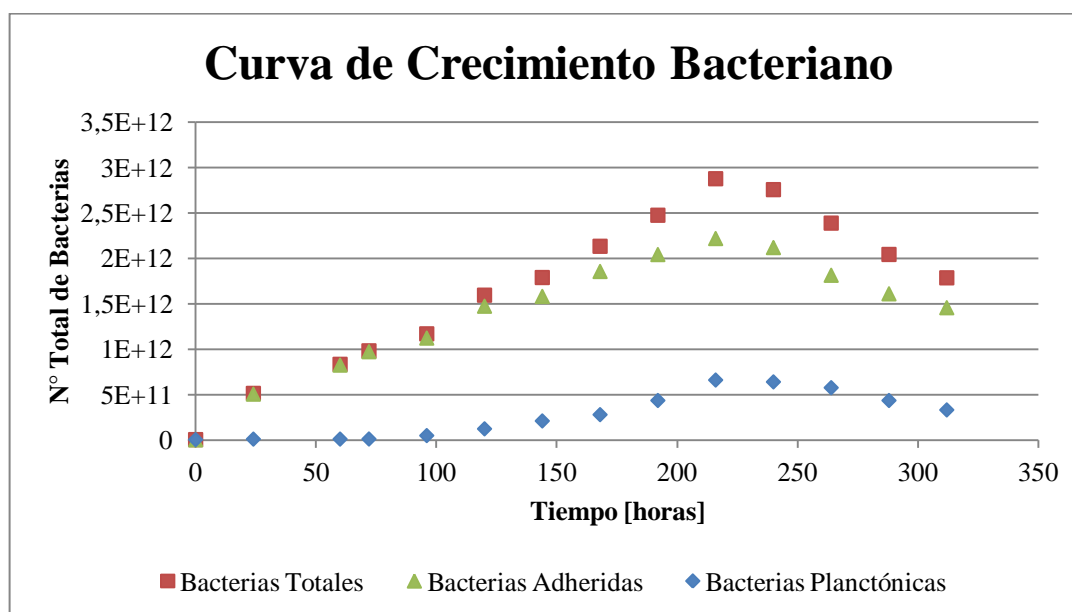


Gráfico 11: Curva de Crecimiento de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en Azufre Elemental a 45°C

### 6.3.4 Cinética de la oxidación de azufre por *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C

Utilizando los datos de la concentración de protones en el tiempo en el cultivo de biooxidación de azufre con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C, fue posible calcular el azufre oxidado y junto con ello la conversión parcial de este proceso (Gráfico 12). Con estos datos y debido a que el proceso se puede caracterizar con el modelo del núcleo sin reaccionar.

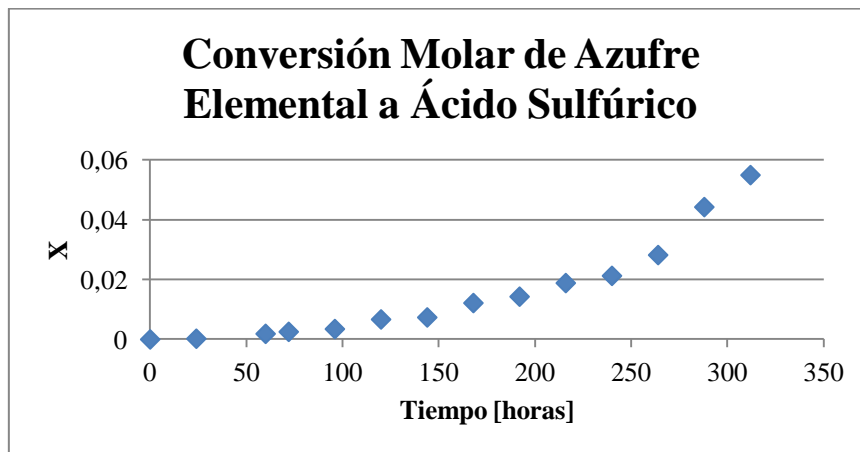


Gráfico 12: Conversión Molar de Azufre a Ácido Sulfúrico

A partir de la conversión es posible aplicar el modelo del núcleo sin reaccionar con y sin ceniza, para analizar que etapas podrían estar controlando el fenómeno de oxidación de azufre, los resultados de dichos análisis se ilustran en los siguientes gráficos.

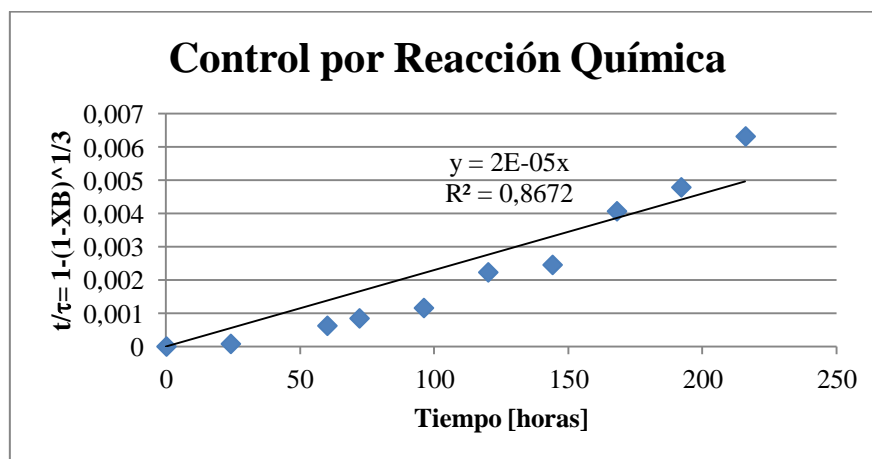


Gráfico 13: Ajuste Modelo del Núcleo sin Reaccionar; Control por la Reacción Química

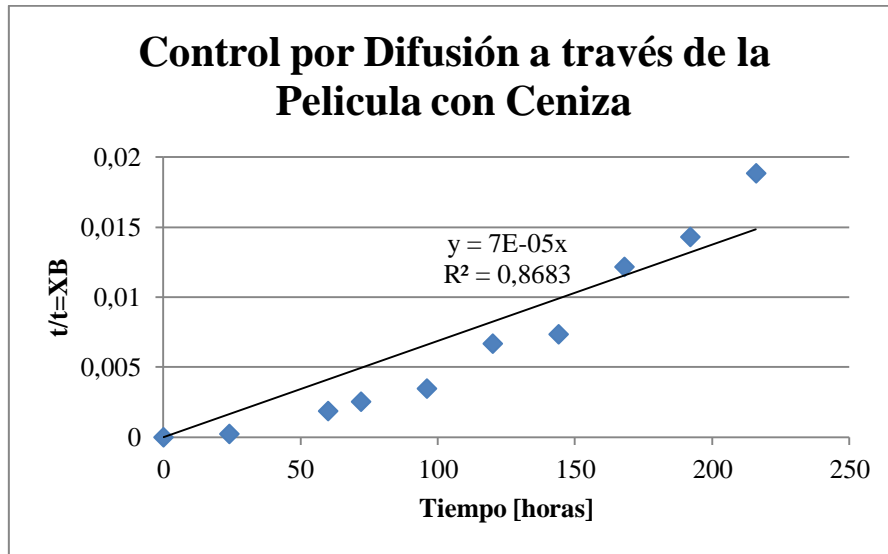


Gráfico 14: Ajuste Modelo del Núcleo sin reaccionar; Control por Difusión en la Película

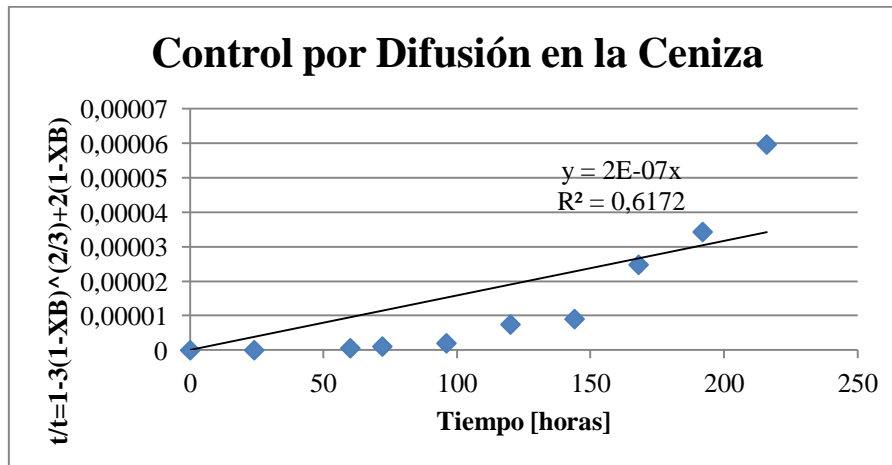


Gráfico 15: Ajuste Modelo del Núcleo sin Reaccionar; Control por Difusión en la Ceniza

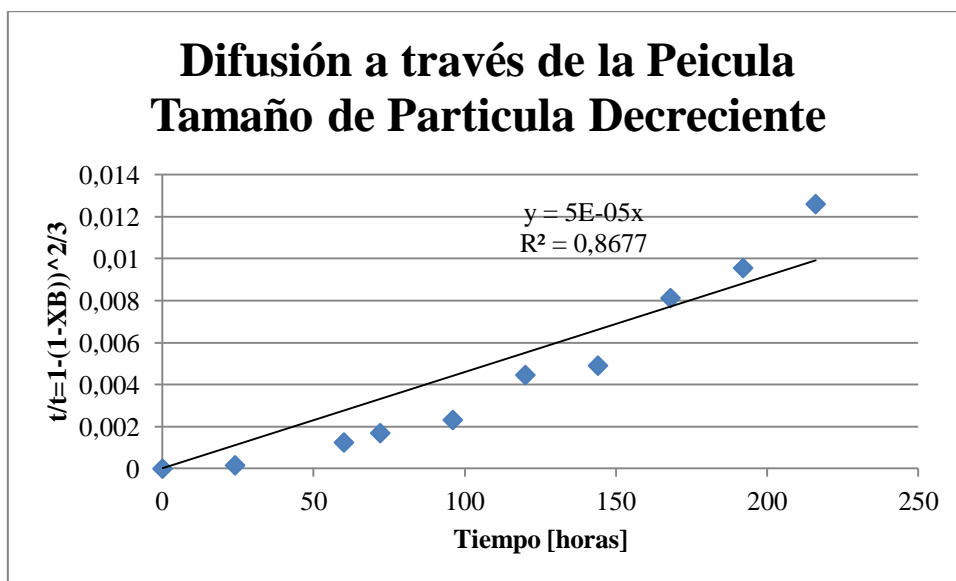


Gráfico 16: Ajuste Modelo del Núcleo sin Reaccionar; Control por Difusión en la Película con Tamaño de Partícula Decreciente

Debido a que ningún modelo se ajustó adecuadamente y que la conversión presentaba un comportamiento exponencial, se intuye que la cinética de la reacción puede estar influenciada por la concentración de bacterias en la superficie del azufre, debido a que la conversión de azufre elemental a ácido sulfúrico mostró durante el desarrollo del experimento un comportamiento creciente el cual es atípico en los procesos de lixiviación convencionales, por lo que se deduce que el factor que predominante en la oxidación del azufre sería el crecimiento celular, por lo que las bacterias serán consideradas como un reactante.

A su vez no fueron considerados los casos de control de ceniza y control por la difusión en tamaño de partícula constante, debido que durante la biooxidación de azufre no se genera ceniza, por lo cual el modelo del núcleo sin reaccionar con tamaño de partícula constante no representa la fenomenología de dicho proceso.

El sistema a analizar posee las siguientes características:

- Sistema heterogéneo, contiene tanto azufre sólido como el medio de cultivo para el crecimiento bacteriano.
- El azufre al ser oxidado reduce su tamaño y no hay formación de ceniza.
- La concentración de los reactantes (oxígeno y azufre) es constante en el tiempo.
- El número de bacterias adheridas al sólido aumenta en el transcurso del tiempo.

De manera de tomar en consideración dichas características se utilizó el modelo del núcleo sin reaccionar con tamaño de partícula decreciente y se considero  $C_{Bact}$  como la concentración de bacterias en la superficie del azufre entre las 0 y las 216 horas la cual es de carácter lineal con respecto al tiempo. Luego de las 216 horas comienza la fase de inhibición y muerte celular por pH por lo cual los datos a partir de ese momento no fueron considerados en el modelo.

Para el fenómeno de biooxidación de azufre elemental en perlas con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* tendremos las siguientes etapas:

1. Difusión de reactivos del seno de la solución a la superficie de la capa de exopolímeros: Esta etapa corresponde a la difusión del reactivo oxidante ( $O_2$ ) hacia la superficie del biofilm formado por las células adheridas a las perlas de azufre elemental, donde ocurrirá la reacción química.
2. Reacción química: Es cuando ocurre la reacción química y se forman tanto los intermediarios como los productos: Corresponde a la etapa de reacción entre el reactante y el sólido en la superficie reactiva.
3. Difusión de los productos solubles desde la zona de la reacción al seno de la solución: En esta etapa tanto los intermediarios como los productos difunden desde la zona de reacción al seno de la solución de biooxidación.

En el siguiente Gráfico se muestra el número de bacterias adheridas a la superficie del azufre elemental durante el proceso de biooxidación.

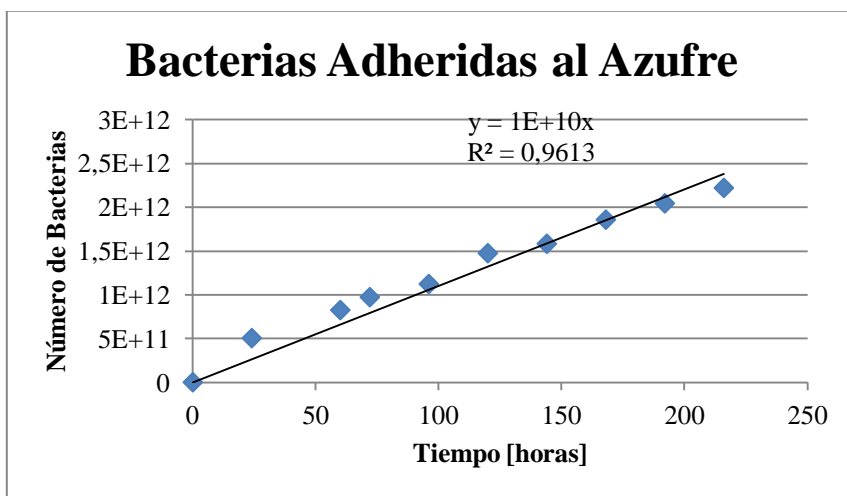


Gráfico 17: Crecimiento Bacteriano en Azufre Elemental

A su vez debido a que tanto la difusión en la película (independientemente de la presencia de ceniza) y la reacción química presentan ajustes similares, en ambos casos se tomo en consideración la concentración superficial de bacterias. A continuación se muestra el desarrollo matemático de ambos casos:

### 6.3.4.1 Control por reacción química

De manera análoga a lo ilustrado en la sección Reacciones heterogéneas tenemos que:

$$-\frac{1}{4\pi r_c^2} \frac{dN_B}{dt} = -\frac{b}{4\pi r_c^2} \frac{dN_A}{dt} = bk_s C_{Ag} * C_{Bact} \quad (\text{Ec. 26})$$

Donde  $C_{Ag}$ , corresponde a la concentración de oxígeno, la cual es contante, por lo tanto:

$$-\rho_B \int_R^{r_c} dr_c = bk_s C_{Ag} \int_0^t C_{Bact} * dt \quad (\text{Ec. 27})$$

$$-\rho_B \int_R^{r_c} dr_c = C_{Ag} bk_s \int_0^t t * C_{Bact} * dt \quad (\text{Ec. 28})$$

Donde  $C_{Bact}$ , corresponde a la concentración de bacterias en la superficie del azufre.

$$C_{Bact} = \frac{\text{N}^\circ \text{Bacterias en el Azufre}}{\text{Área total del azufre}} = \frac{10^{10} * t}{A_{total}} \quad (\text{Ec. 29})$$

Como  $A_{total}$  permanece relativamente constante en los tiempos estudiados.

$$\Rightarrow \frac{t^2}{2} = \frac{\rho_B * A_{total}}{b * k_s * 10^{10} * C_{Ag}} (R - r_c) \quad (\text{Ec. 30})$$

$$t = \sqrt{K_1 * (R - r_c)} \quad (\text{Ec. 31})$$

Donde:

$$K_1 = \frac{2 * \rho_B * A_{total}}{b * k_s * 10^{10} * C_{Ag}} \quad (\text{Ec. 32})$$

Por lo que el tiempo de conversión completa sería:

$$\tau = \sqrt{K_1 * R} \quad (\text{Ec. 33})$$

Entonces:

$$\frac{t}{\tau} = \sqrt{1 - \frac{r_c}{R}} = \sqrt{1 - (1 - X_B)^{1/3}} \quad (\text{Ec. 34})$$

### 6.3.4.2 Control por la difusión en la película

De forma análoga a lo ilustrado en la sección 1.12 anterior tenemos que:

$$-\frac{1}{S_{ex}} \frac{dN_B}{dt} = -\frac{1}{4\pi R^2} \rho_B 4\pi R^2 \frac{dR}{dt} = -\rho_B \frac{dR}{dt} = bk_g C_{Ag} C_{Bact} \quad (\text{Ec. 35})$$

$$\int_{R_0}^R R dR = \frac{bD}{y\rho_B} \int_0^t t * C_{Ag} * C_{Bact} * dt \quad (\text{Ec. 36})$$

$$\Rightarrow \frac{t^2}{2} = \frac{y * \rho_B * A_{total}}{b * D * 10^{10} * C_{Ag}} \left[ 1 - \left( \frac{R}{R_0} \right)^2 \right] \quad (\text{Ec. 37})$$

$$t = \sqrt{K_2 \left[ 1 - \left( \frac{R}{R_0} \right)^2 \right]} \quad (\text{Ec. 38})$$

Con:

$$K_2 = \frac{2 * y * \rho_B * A_{total}}{b * D * 10^{10} * C_{Ag}} \quad (\text{Ec. 39})$$

Por lo que el tiempo de conversión completa será:

$$\tau = \sqrt{K_2} \quad (\text{Ec. 40})$$



De esta forma:

$$\frac{t}{\tau} = \sqrt{1 - \left(\frac{R}{R_0}\right)^2} = \sqrt{1 - (1 - X_B)^{2/3}} \quad (\text{Ec. 41})$$

En el Gráfico 18, se muestra la razón entre un tiempo de biooxidación (t) y el necesario para una conversión del 100% ( $\tau$ ) en función del tiempo, tanto para el control por la reacción, como para el control por difusión en la película.

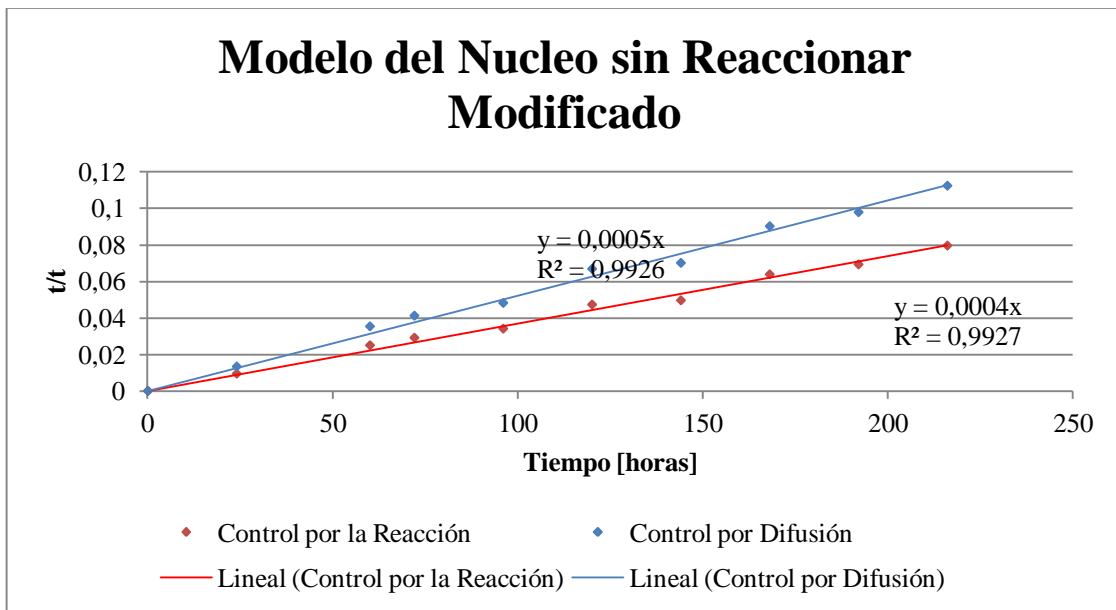


Gráfico 18: Modelo Cinético para los Resultados de Oxidación de Azufre con *Sulfolobus thermosulfidoxidans* a 45°C

Por otro lado para poder diferenciar que etapa es la controlante es necesario calcular la constante cinética en el tiempo inicial y la constante cinética a partir del modelo del núcleo sin reaccionar, debido a que los ajustes alcanzados en el control por la reacción química y la difusión en la película son elevados y muy similares, las cuales resultaron ser

$$C_{O_2} * k_{s,nucleo} = 1,2 * 10^{-13} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{bact} * \text{min}} \right]$$

$$C_{O_2} * k_{s,inicial} = 1,9 * 10^{-8} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{bact} * \text{min}} \right]$$

Al evaluar mediante el modelo del núcleo sin reaccionar modificado la oxidación de azufre elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45° (Gráfico 18), se consideró que la etapa limitante en el proceso corresponde al control por la difusión en la película orgánica, debido a que al comparar la constante cinética obtenida mediante el modelo del núcleo sin reaccionar con la constante cinética obtenida en el tiempo inicial, se tiene que dicha constante disminuye al avanzar el proceso de biooxidación, lo que implicaría que sería el fenómeno difusivo el que estaría controlando dicho proceso.

Las barreras difusionales pueden deberse a que la capa de exopolímeros donde ocurre la reacción de oxidación es altamente hidrofóbica, por lo que las moléculas de oxígeno tendrían problemas para difundir.

Debido a que la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* mostró una gran capacidad azufre oxidante y una adherencia considerable (mayor al 50%), se intuye que el mecanismo de oxidación del azufre elemental sería el mecanismo de lixiviación cooperativo, ya que es la reacción de oxidación que ocurre en la superficie del azufre la que controla este proceso, pero esta reacción genera intermediarios que son oxidados por las bacterias planctónicas, por lo que ambos tipos de bacteria están colaborando en la oxidación del azufre elemental.

A partir de la pendiente de  $t/\tau$  en el tiempo para el control tanto por la reacción como por la difusión en la película, se determinaron los tiempos de conversión completa los que son mostrados en la siguiente tabla.

Tabla 5: Tiempos de Conversión Completa para las Resistencias de la Reacción Química y la Difusión en la Película

$\tau_{\text{reacción}}$	2500 horas
$\tau_{\text{dif.película}}$	2000 horas

Por lo que el tiempo de conversión completa sería de 2000 horas, ya que el proceso estaría controlado por la difusión del oxígeno en el biofilm.

A su vez se definió el rendimiento de la oxidación de azufre  $Y_{S/B}$ , como la masa de azufre oxidada por la masa de bacterias adheridas al azufre. En el Gráfico 19, se puede observar la evolución del rendimiento de la oxidación de azufre elemental por *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, en el cual se observa que el rendimiento permanece relativamente constante durante las primeras 192 horas, para luego aumentar de manera considerable hasta el fin del estudio, alcanzándose un rendimiento de  $0,08 \left[ \frac{g_{\text{azufre}}}{g_{\text{bacterias}}} \right]$ .

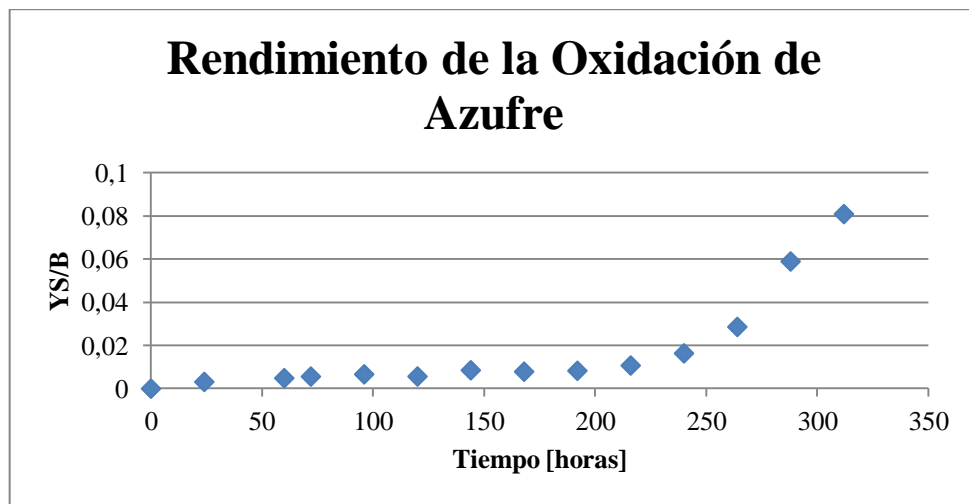


Gráfico 19: Rendimiento de la Biooxidación de Azufre con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C

#### 6.4 Análisis cualitativos de los cultivo de biooxidación y experimento control

En las siguientes figuras se muestran imágenes fotográficas tanto de los cultivos de biooxidación de azufre con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C como de los experimentos control, tomadas a los distintos tiempos en los que fueron realizados los monitoreos de los parámetros fisicoquímicos y biológicos durante el estudio.

Por medio de estas fotografías se busca analizar de forma cualitativa los procesos de biooxidación del azufre, observando en lo posible alguna diferencia apreciable entre las soluciones de los cultivos de biooxidación y la de los experimentos control.

En la Figura 13 se muestran los matraces de los experimentos control al inicio y final del estudio, los cuales contenían exactamente los mismos compuestos de los cultivos de biooxidación, salvo el inóculo bacteriano. En esta figura es posible observar que los experimentos control se mantuvieron incoloros durante todo el estudio, lo que implicaría que no se desarrollaron bacterias en él, cumpliendo con lo esperado, debido a que estos cultivos no fueron inoculados.

1)



2)



Figura 11: Fotografía de los Experimentos Control al Inicio (1) y Final de los Experimentos (2)

Por su parte los experimentos de biooxidación son ilustrados en la Figura 14, en la cual se aprecia que los experimentos de biooxidación en el tiempo cero, eran transparentes al igual que los experimentos control, pero estos se fueron tornando opacos con el tiempo, lo cual tiene relación con el crecimiento de la población bacteriana que se desarrollaba en dichos matraces y con el azufre disuelto en la solución debido a la oxidación bacteriana del azufre elemental contenido en los matraces. Es posible apreciar la oxidación del azufre en la boca del primer matraz de biooxidación, en la cual se observa un polvillo de color amarillo, el cual es un remanente del azufre oxidado.

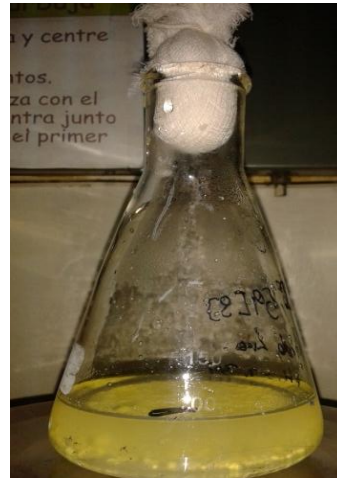
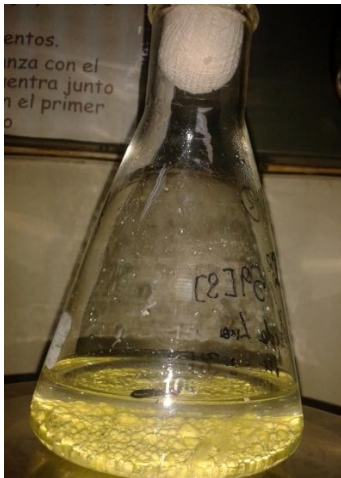


Figura 12: Fotografía de los Cultivos de Biooxidación con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. A la derecha: Cultivos en tiempo inicial y su duplicado; A la izquierda: Cultivos en su tiempo final y duplicado

A su vez es importante destacar que si bien los experimentos control y los experimentos de biooxidación en el tiempo cero son transparentes, se puede observar que los experimentos de biooxidación son levemente más opacos que los experimentos control lo que puede deberse a que los primeros poseen un inóculo bacteriano el cual le da cierta opacidad a la solución.

## 7 DISCUSIONES

### 7.1 Capacidad de Adherencia de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* sobre azufre elemental

Como se mostró en el Gráfico 1, la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* presentó una capacidad de adherencia relativamente elevada en la superficie del azufre elemental, alcanzándose un porcentaje de adherencia de un 54% en las cinco primeras horas.

A su vez se sabe que la bacteria del mismo género *Sulfobacillus acidophilus* alcanzó un porcentaje de adherencia de 72% en las primeras dos horas en minerales de pirita, que es significativamente mayor a la alcanzada por *S.thermosulfidooxidans* en azufre (Liberona I., 2012).

Por lo que es posible apreciar que bacterias del mismo género, es decir, bacterias que poseen características similares tienen adherencias considerablemente distintas dependiendo del sólido en el cual este sucediendo el fenómeno de adhesión. Otra explicación a esta diferencia está en las mismas bacterias, ya que puede ser que *S.acidophilus* tenga mayor afinidad por el azufre que *S.thermosulfidooxidans* debido a enzimas o proteínas propias de este microorganismo.

Sin embargo, aún no se han desarrollado estudios acerca de la capacidad de adherencia de la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en pirita u otros minerales, por lo que a priori no se puede aseverar que la menor adherencia es exclusiva responsabilidad de la naturaleza del sólido, del microorganismo en sí, ni una combinación de ambos.

A pesar de lo anterior, sí se han realizado estudios que ilustran la diferencia de la capacidad de adherencia en azufre y pirita de la arquea azufre oxidante *Sulfolobus metallicus* (Pacheco., 2013), en los cuales se aprecia que la capacidad de adherencia de esta bacteria es mayor en la calcopirita que en el azufre elemental. Una explicación a esta diferencia en la adherencia se encuentra en las propiedades de la superficie del azufre elemental, las que dificultan la adherencia de las arqueas al mismo ya que es conocido que los microorganismos que crecen adheridos a minerales tienden a hacerlo en zonas específicas de los mismos tales como fracturas, las cuales son zonas de inestabilidad electrónica, que facilitan el ataque al mineral por parte de los microorganismos. Por lo tanto, si el azufre elemental posee debido a su estructura, una menor cantidad de estas zonas, menor también será la adherencia.

Lo expuesto anteriormente implica que la adherencia alcanzada en el azufre elemental por *S.thermosulfidooxidans* tardó más de lo habitual (cinco horas en contraste de las dos horas que tardaron el resto de los ensayos mencionados), lo que pudo deberse a la duración de 72 horas de la fase de adaptación de estas bacterias, mostrada en el Gráfico 6. Esta adaptación depende de las condiciones en que se encuentran los microorganismos, los cuales pueden no tener activas rutas

metabólicas necesarias para la síntesis de proteínas requeridas para la adhesión. Además se debe tomar en cuenta que muchas de las bacterias inoculadas para los estudios de adherencia pudieron estar inactivas, debido al proceso de concentración mediante filtración previo al ensayo, lo que pudo repercutir en la tasa de adherencia alcanzada.

Debido a que esta tasa de adherencia inicial es cercana al 50%, no se puede concluir sobre el predominio del mecanismo de lixiviación por contacto o el indirecto en relación al proceso de oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico, ya que la cantidad de bacterias en suspensión y las adheridas es similar. Situación que cambia a lo largo del experimento como se observa en el Gráfico 10, donde es posible apreciar que la cantidad de bacterias adheridas al azufre es mayor que las bacterias en suspensión a partir de las 24 horas, lo cual indica que la actividad oxidativa debe ser desarrollada mayormente por las células adheridas, que liberan intermediarios a la solución que son utilizados como nutrientes por las células que se encuentran en suspensión, y sería justamente la liberación de estos intermediarios lo que permitiría el desarrollo de las células planctónicas.

Lo mencionado anteriormente resulta razonable debido a que son las bacterias adheridas las que generan las sustancias extracelulares (EPS) que facilitan el ataque electroquímico. Estas sustancias extracelulares generan una mayor atracción electrostática entre las bacterias y la superficie del azufre, produciéndose así un estrecho contacto entre ellos y la consecuente oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico.

Al considerar que la conversión alcanzada en el proceso de biooxidación es de un 34%, se deduce que a pesar de que la capacidad de adherencia inicial por unidad de superficie disponible es considerablemente menor que la alcanzada por la bacteria del mismo género *S.acidophilus* en piritita, la bacteria *S.thermosulfidooxidans* posee una gran capacidad oxidativa, por lo que la disminución de la adherencia al comparar estas bacterias puede deberse, además de las teorías antes mencionadas, a:

- La formación del biofilm es más lenta en el caso de *S.thermosulfidooxidans*.
- *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* no presenta tanta afinidad por la superficie del azufre elemental en perlas.
- Debido a la agitación y a la baja afinidad antes mencionada, las células que se encontraban adheridas al azufre fueron removidas de la superficie del mismo, mientras que las que se encontraban en suspensión se adherían a la superficie del sólido, generando de esta manera un equilibrio en las primeras horas del experimento.

Por último, como ha sido señalado en estudios anteriores, donde se observó una directa relación entre la adherencia a un mineral y la tasa de disolución de este, debido a que la adherencia bacteriana es la que permite la formación de las sustancias exopoliméricas que propician el ataque electroquímico al mineral y a que una mayor adherencia implica que una mayor superficie es cubierta por estas sustancias, de esta forma se logra una mayor disolución de un mineral ante una menor cantidad de bacterias adheridas, resulta necesario estudiar la factibilidad de

utilizar otra fuente de azufre que sea más afín con estas bacterias, o en su defecto, utilizar bacterias con una mayor capacidad de adherencia al azufre elemental.

## 7.2 Análisis Fisicoquímicos

El cultivo de oxidación de azufre con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* presentó una disminución del pH (Gráfico 2), fenómeno que no fue observado en los experimentos control, lo que se puede explicar debido a la acción azufre-oxidante de esta bacteria, la cual rápidamente comenzó a poblar y oxidar las perlas de azufre elemental presentes en los cultivos, para de esta forma obtener la energía necesaria para su metabolismo y desarrollo, utilizando para ello protones provenientes de las moléculas de agua presentes en la solución de oxidación con la consiguiente disminución del pH.

Por otra parte, el pH no varió en los experimentos control debido a que el azufre no es oxidado químicamente, por lo que todo estaría indicando que la oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico estaría ocurriendo y sería mediada por la acción de las bacterias.

Junto con lo anterior, en las Figuras 13 y 14 se muestran las fotografías tomadas a los experimentos control y cultivos de oxidación de azufre elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, las cuales evidencian por medio de la tonalidad de las soluciones una mayor oxidación de azufre en presencia de la bacteria, ya que los experimentos control no variaron su tonalidad, mientras que los cultivos de biooxidación van adquiriendo un color blanquecino (el cultivo se torna opaco) debido a la presencia de extracto de levadura y de los microorganismos, que además de encontrarse adheridos al azufre, se encontraban creciendo en la solución debido a la existencia de intermediarios de la reacción de oxidación de azufre elemental, los cuales también pudieron haber contribuido a la tonalidad alcanzada en los cultivos de oxidación.

La medición de la acidez permite determinar la concentración de protones en solución y la concentración de ácido sulfúrico en la misma, lo que puede ser observado en el Gráfico 4. Al evaluar por medio de la concentración de protones totales disueltos la oxidación de azufre elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C, se observa que ésta se dio durante todo el proceso. No obstante se presentaron dos etapas con diferentes tasas de disolución del azufre.

La primera está comprendida entre las 0 y las 72 horas, en la cual la concentración de protones y la producción de ácido sulfúrico aumenta discretamente de forma lineal, teniéndose de esta forma una baja tasa de disolución (la tasa de disolución es prácticamente 0), esta etapa corresponde justamente a la fase de adaptación de las bacterias planctónicas, por lo cual es posible que la baja tasa de disolución sea debido a que el metabolismo de las bacterias aun no se encontraba completamente activo, por lo que las rutas metabólicas de la oxidación del azufre no se encontrarían completamente desarrolladas (rutas descritas para *A. ferrooxidans*,



pero que se sospecha pueden ser validas también para *S.thermosulfidooxidans* (Espinoza et al., 2010)), es decir aún se estarían activando las vías genéticas que permitirían la formación de las enzimas que participarían en la oxidación del azufre. A su vez, en esta etapa es donde cobra mayor relevancia la adherencia bacteriana inicial al azufre, ya que son estas bacterias, las que poblarían y oxidarían el azufre en primera instancia; por lo tanto, se tiene que al no ser considerablemente elevada la adherencia bacteriana inicial, el número de bacterias que son capaces de adherirse y comenzar la oxidación del azufre es menor. A su vez en esta etapa esta iniciándose el crecimiento en el azufre, lo que también influye en la baja tasa de oxidación registrada.

La segunda etapa se observa entre las 72 y las 312 horas, en la cual tanto la concentración de protones como la producción de ácido sulfúrico aumentaron exponencialmente. Es decir, esta etapa se caracteriza por presentar una mayor tasa de oxidación de azufre, lo que se debe a que el azufre ya se encuentra poblado por los microorganismos y a su vez estos microorganismos ya se encuentran completamente adaptados a las condiciones del cultivo, ya que la mayor parte de estos crecieron en él, por lo que la maquinaria metabólica de estas bacterias ya estaría desarrollada, por tanto, la disolución del azufre es realizada de manera más óptima.

En los experimentos control se puede observar que tanto la concentración de protones, como la concentración de ácido sulfúrico permanecen constantes e iguales a 0,005 y 0,47 [g/L] respectivamente, hasta el término del estudio. Mientras que los cultivos de biooxidación presentaron aumentos sostenidos en ambas concentraciones, alcanzándose de esta forma una concentración máxima de 10,54 [g/L] de ácido sulfúrico y 0,11 [g/L] de protones, ambas logradas a las 312 horas de cultivo. Por lo que al igual que las mediciones de pH, las mediciones de acidez, revelaron que el azufre no es oxidado químicamente, por lo que requiere la presencia de microorganismos azufre-oxidantes.

En el Gráfico 5 es posible observar la relación entre el pH y la concentración de ácido sulfúrico, la cual resulta ser de carácter inverso, es decir, a menor pH mayor es la concentración de ácido sulfúrico, lo que cumple con lo esperado debido a que son los protones provenientes del ácido los responsables de la disminución del pH.

A su vez es importante destacar que la evolución del pH calculada a partir de los protones en la solución corresponde en gran medida a la evolución del pH monitoreado con el equipo de medición de pH, como se ilustra en el Gráfico 20, lo que indicaría principalmente dos cosas:

- La mayor cantidad de intermediarios de la reacción de oxidación de azufre elemental son del tipo  $S_xO_y$ , por lo que la cantidad de protones sería el dato más fidedigno para estudiar la reacción de oxidación.
- Los errores experimentales de los ensayos de titulación no son significativos ya que se acercan a la realidad.

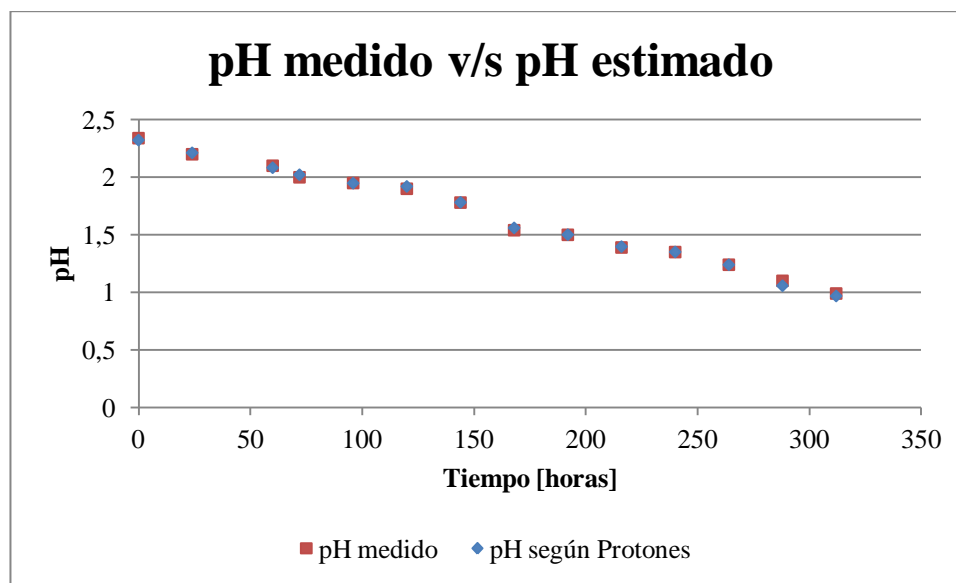


Gráfico 20: Comparación entre el pH medido y el pH estimado mediante la concentración de protones en solución

En cuanto a la evolución de la concentración de sulfato en la solución, como se puede observar en el Gráfico 3, está al igual que la evolución de la concentración de protones y ácido sulfúrico presentó un comportamiento creciente durante todo el estudio, sin embargo, esta curva presenta dos etapas con distintas tasas de crecimiento. La primera de carácter lineal durante las primeras 72 horas de cultivo y la segunda de carácter exponencial desde las 72 hasta las 312 horas de cultivo, tiempo en el cual se alcanzó la máxima concentración de sulfato correspondiente a 3600 [ppm].

La explicación de estas fases es exactamente la misma mencionada con anterioridad para la evolución de la concentración del ácido sulfúrico y los protones. Además que es justamente sulfato, el resultado final de la oxidación de azufre elemental y por tanto, su concentración en el tiempo debe aumentar conforme sucede la reacción sin importar la presencia de intermediarios de la reacción.

A su vez al observar el experimento control, se aprecia que el sulfato permanece constante e igual a 886 [ppm] durante todo el estudio, por lo cual se estima que todo el azufre disuelto por sobre esta cantidad, corresponde a azufre elemental que fue oxidado por las bacterias y que por tanto en ausencia de estos microorganismos, la disolución de azufre elemental no se desarrollaría.

A partir de la ecuación química de oxidación de azufre elemental, se tiene que la relación entre los moles de sulfato y protones debería ser de 1:2. Esto no se vio reflejado en los datos experimentales como se ilustra en la Tabla 6.

Tabla 6: Relación molar entre sulfato y protones

Tiempo [horas]	Moles de Sulfato
	Moles de Protones
0	0
24	1,78
48	1,15
72	0,99
96	0,86
120	0,93
144	0,68
168	0,36
192	0,35
216	0,30
240	0,40
264	0,38
288	0,30
312	0,27

Lo anterior, puede deberse a la presencia de intermediarios de la reacción de oxidación de azufre elemental, ya que ésta limitaría la producción de sulfato y, por lo tanto, también limitaría la producción de ácido sulfúrico. A su vez, otro factor que pudo influir en que esta relación no se cumpliera a cabalidad es la absorción de azufre por parte de las bacterias, sin embargo, se ha estudiado que estas no absorben más del 5% del azufre oxidado por lo que su efecto sería irrelevante (Shivvers et al., 1973)

En cultivos previos de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en azufre a 45°C, los que pueden apreciarse en el Gráfico 21, se observó una tendencia decreciente del pH entre las 0 y las 220 horas; sin embargo, luego de alcanzado un pH de 0,7; este comienza a aumentar hasta equilibrarse en un pH cercano a 1,4; a partir del cual comienza nuevamente a descender. Esto se puede deber a que a pH menores a 0,7 las bacterias comienzan a inhibirse por la acidez e incluso lisarse, lo último conlleva la salida del citoplasma celular (pH 7 aproximadamente) y la consecuente subida del pH observada en el gráfico.

A su vez es posible apreciar que el tiempo requerido para que el pH disminuya de 2,34 a 0,99 disminuyó de 312 horas a 182 horas, lo que se debe principalmente a que el azufre elemental ya se encontraba poblado de microorganismos debido a la antigüedad del cultivo.

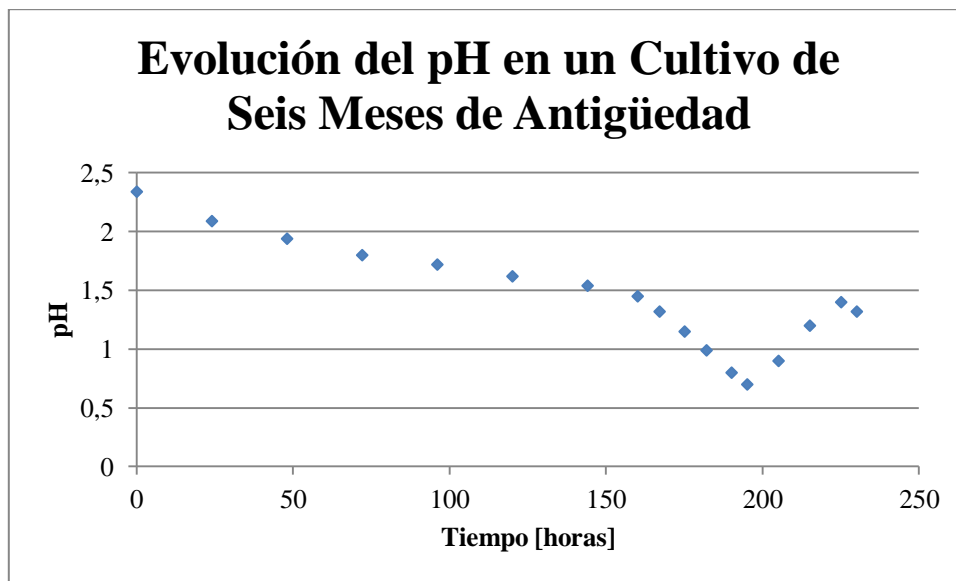


Gráfico 21: Evolución del pH en un cultivo de seis meses de antigüedad con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en azufre a 45°C

### 7.3 Análisis Biológicos

Los resultados obtenidos en el cultivo de oxidación de azufre elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C, respecto a la evolución de las bacterias totales planctónicas durante el proceso ilustrada en el Gráfico 7, indican que durante las primeras 72 horas prácticamente no hubo crecimiento bacteriano. Esto puede deberse a variadas razones, por ejemplo, puede deberse al estado inicial de las bacterias, las cuales pudieron haberse encontrado inactivas producto de la filtración, o, a que si bien se encontraban activas éstas se encontraban en la etapa de adaptación al cultivo, ya que este cultivo posee un pH (2,34) distinto al que las bacterias se encontraban anteriormente (pH 1,4).

A su vez en los cultivos de biooxidación de azufre, este último se encontraba inicialmente despoblado, por lo tanto las bacterias para poder iniciar su crecimiento y desarrollo deben adherirse a éste, ya que como se ha mencionado anteriormente estos microorganismos dependen de la oxidación del azufre para obtener la energía para su desarrollo y multiplicación.

Todos esos factores pudieron influir en la ocurrencia de la etapa de adaptación observada en dicho Gráfico. Por otra parte, la duración de esta fase, además de las razones anteriormente nombradas, depende de la viabilidad de las bacterias, ya que éstas provenían de cultivos que alcanzaron un pH bajo 1,4; lo que pudo afectar tanto al DNA, como a las vías metabólicas de estos microorganismos, impidiendo su reproducción, por lo tanto, al haber un menor número de bacterias viables más lenta es la multiplicación de las mismas.

Luego a partir de las 72 horas, se observa un crecimiento celular del tipo exponencial, el que puede deberse a la capacidad azufre-oxidante de la bacteria, así como a la presencia en el cultivo de extracto de levadura y sales tales como el sulfato de amonio, sulfato de magnesio y fosfato potásico, por lo que todos estos nutrientes habrían dado las condiciones propicias para su desarrollo. Como es posible ver en el Gráfico 6, la bacteria, *S.thermosulfidooxidans* oxidó rápidamente el azufre elemental presente para obtener la energía requerida para su metabolismo y crecimiento, asimismo dado que el azufre comenzó a ser disuelto desde tempranas horas, se fueron liberando intermediarios de la oxidación de azufre elemental a la solución, permitiendo así el desarrollo bacteriano en la misma.

Junto con lo anterior, es posible advertir que el mayor aumento en el número total de bacterias planctónicas se dio entre 192 y 216 horas, tiempo en el cual se alcanzó el máximo número de bacterias que equivale a  $6,6 \times 10^{11}$  bacterias. Posteriormente el número de bacterias comenzó a decaer hasta el fin del estudio, lo que coincide con la disminución del pH bajo 1,4.

Es importante notar que en dicho Gráfico no se observa una fase estacionaria del crecimiento celular, esto puede deberse a que la influencia del pH, es tal, que después de cierto punto las bacterias comienzan rápidamente a lisarse, imposibilitando de esta manera el registro de esta etapa del crecimiento celular, debido a su brevedad, que no fue detectada debido a la escala de tiempos utilizada en el estudio.

Por otro lado, al ser evaluada la cantidad total de bacterias que se encontraba adherida a la superficie del azufre durante el proceso, como se puede observar en el Gráfico 10, a las 24 horas el número de bacterias fue de aproximadamente  $5 \times 10^{11}$ , lo cual implica que las bacterias del inóculo inicial ( $2,5 \times 10^9$  bacterias) no solo se habrían adherido al azufre ( $1,4 \times 10^9$  bacterias, correspondientes al 54% de adherencia alcanzado a las 5 horas), sino que estas bacterias adheridas se habrían multiplicado. A su vez las bacterias en solución por su parte también se pudieron multiplicar y adherir al azufre, ambos fenómenos explicarían el fuerte aumento de bacterias adheridas al azufre a las 24 horas.

Asimismo, fue posible apreciar que dicha cantidad aumentó considerablemente hasta las 216 horas, hora a la cual se registró la máxima cantidad de bacterias adheridas la cual resultó ser de  $2,2 \times 10^{12}$  bacterias. Posterior a las 216 horas de experimentación el número total de bacterias adheridas al azufre comenzó a disminuir, lo que nuevamente coincide con el descenso del pH por bajo 1,4; lo que implicaría que las bacterias comenzarían a lisarse a partir de dicho momento.

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, lo que se explicaría porque las células adheridas al momento de duplicarse pueden liberar la nueva célula a la solución, o porque las células adheridas se despegan de la superficie del azufre debido a la agitación o a que las células planctónicas se duplican en la solución al haber en esta última intermediarios de azufre reducido como nutrientes. (Gautier et al., 2008)

A su vez al analizar las fotografías de las células adheridas es posible notar su aumento en el tiempo, además de notar que crecen formando conglomerados (Figura 12), lo que puede ser explicado por la preferencia de estas células a cierto tipo de estructura molecular del azufre elemental y a zonas fraccionadas de este.

También al observar las curva de crecimiento celular en el Gráfico 11, es posible notar que el efecto del pH fue mayor en las bacterias planctónicas, es decir la inhibición y muerte celular afectó más a estas bacterias, lo que puede deberse a que las bacterias adheridas al azufre se encuentran más protegidas de los agentes externos o inhibidores al encontrarse adheridas formando un biofilm, a su vez las bacterias pueden estar adheridas a fracturas del azufre elemental y que por efectos difusivos estén más resguardadas frente al ataque de protones y radicales.

A su vez se observa que la cantidad de bacterias planctónicas es considerablemente menor que la cantidad de bacterias adheridas a la superficie del azufre, por lo cual la curva de crecimiento, que es el resultado de la suma de ambas cantidades, posee la forma de la curva de crecimiento de las bacterias adheridas al azufre, mostrando de esta forma un comportamiento lineal entre las 0 y las 216 horas de cultivo, tiempo en el cual se alcanzó el máximo número de bacterias totales que resultó ser igual a  $2,9 \times 10^{12}$  células. A partir de ese momento comienza a disminuir el número de microorganismos llegando a ser de  $1,8 \times 10^{12}$  células a las 312 horas de cultivo.

Si bien el número de bacterias adheridas es considerablemente mayor que el número de bacterias planctónicas, estas últimas además de realizar la oxidación de los intermediarios de la reacción de oxidación, otorgan importante información acerca del estado de los microorganismos, es decir, que tan activo está su metabolismo, por lo cual al momento de analizar los datos es de suma relevancia tomar en consideración el comportamiento de la curva de crecimiento de estas bacterias.

El que se haya estimado un número de bacterias adheridas y en suspensión elevado durante el proceso de oxidación de azufre elemental y el que los datos obtenidos hayan seguido una tendencia clara (los gráficos no muestran comportamientos erráticos), implicaría que los resultados obtenidos muestran el comportamiento real de estas bacterias durante el proceso de oxidación. Sin embargo las cantidades de bacterias fueron obtenidas mediante recuento en el microscopio de Epifluorescencia y tinción DAPI, por lo cual pueden haber estado sujetas a diversos errores experimentales dentro de los cuales destacan:

- Errores en el recuento: Estos errores pueden haberse ocasionado gracias a que si bien se escogieron distintas zonas representativas y con carga celular uniforme en la observación al microscopio y se contabilizaron al menos 6 de estas zonas, estas son solo una aproximación del número de bacterias y no corresponden a la realidad.
- Tinción DAPI no es capaz de distinguir células vivas viables y muertas.

- A su vez por mas que se agitó la solución de tinción, igualmente se produjeron manchas de DAPI como las mostradas en las figuras 10 y 11 , las cuales no permitieron contabilizar zonas de los filtros (bacterias en solución) y del azufre (bacterias adheridas), lo cual pudo llevar a errores en dichas estimaciones ya que en estas manchas pudieron haberse encontrado zonas con alta o baja densidad de bacterias, lo cual pudo afectar la elección de estas zonas o el recuento de las bacterias en caso de que se hallaran pequeñas manchas en las zonas ya seleccionadas.
- A su vez debido a que el conteo de las bacterias se realizó de manera manual y debido únicamente a la observación, esto pudo ocasionar errores en las estimaciones del número de bacterias, debido a que se pudieron contar de manera incorrecta los microorganismos por ejemplo, por errores de criterio cuando las bacterias se encontraban aglomeradas.

A pesar de lo anterior cabe destacar que estos errores fueron normalizados, ya que las distintas áreas seleccionadas también tenían divisiones o sub áreas donde se contabilizaban los microorganismos y debido a que se utilizaron los promedios de las bacterias en estas sub áreas para obtener el número total de bacterias de la zona se minimizaron los errores antes mencionados. Por otra parte, como se mencionó anteriormente se obtuvieron gráficas con tendencia clara lo que también muestra la poca relevancia de estas fuentes de error.

#### **7.4 Conversión del Proceso**

Considerando la concentración de ácido sulfúrico en la solución y la masa inicial de azufre elemental se puede determinar la conversión, que indica la cantidad de azufre elemental que es oxidado a ácido sulfúrico durante el proceso en presencia de *S. thermosulfidooxidans* a 45°C, tal como se muestra en el Gráfico 22, en el cual se puede apreciar que la conversión aumenta levemente durante las primeras 72 horas de cultivo, presentando en este intervalo de tiempo un comportamiento lineal, el cual puede ser debido a que las bacterias en solución se encontrarían en su fase de adaptación y a que las bacterias adheridas se encontrarían poblando el azufre y formando el biofilm necesario para realizar el ataque al mismo.

Luego de las 72 horas la conversión aumenta exponencialmente hasta el final del estudio lo cual se debe principalmente a que las bacterias en solución se encuentran en la fase exponencial de su crecimiento y a que el azufre elemental ya se encuentra mayormente poblado, alcanzándose una conversión máxima de 34% a las 312 horas de cultivo. Sin embargo no es posible aseverar que esta sería la máxima conversión alcanzada por el sistema ya que corresponde al último dato experimental.

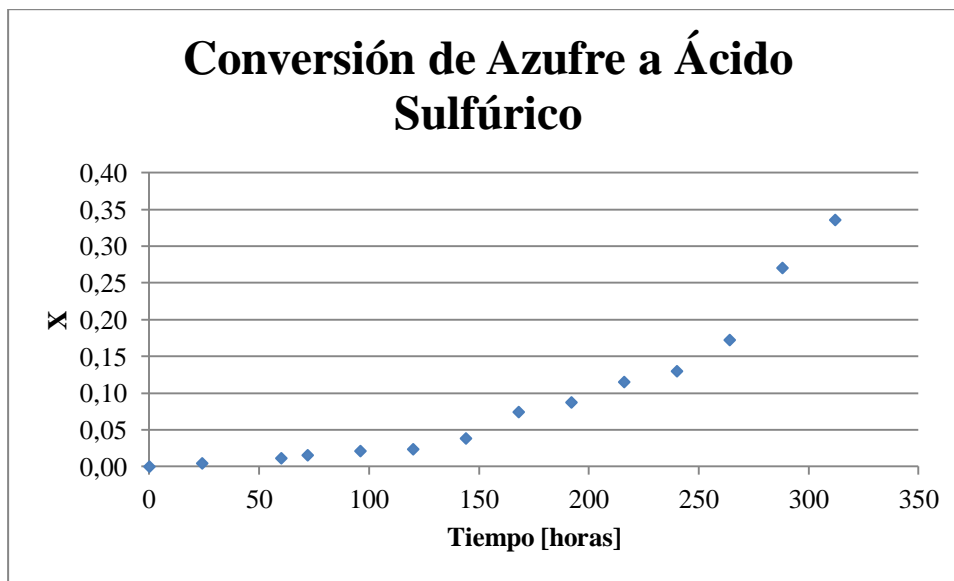


Gráfico 22: Evolución de la conversión de azufre elemental a ácido sulfúrico con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C

A su vez es importante apreciar que si bien en el gráfico de crecimiento celular se observa que a partir de las 216 horas comienzan a desaparecer las bacterias, esto no afectó al pH, como tampoco a la concentración de protones o ácido sulfúrico en solución, por consiguiente tampoco tuvo efecto alguno en la conversión. Lo anterior puede deberse a que si bien ya habría comenzado la lisis celular, esta no habría sido lo suficientemente significativa para afectar los valores de los indicadores antes nombrados; sin embargo, si esta situación continuara, lo más probable es que un mayor número de células se inhibirían (inhibición por producto) estancando la conversión o inclusive disminuyéndola, ya que el citoplasma de las células saldría al medio, neutralizando protones, por lo que la cantidad de éstos últimos en solución se reduciría, disminuyendo la conversión y aumentando el pH.

A su vez es posible observar que el momento en el cual se alcanza el mayor número de microorganismos no corresponde al momento donde es alcanzado el máximo nivel de conversión. Esto puede deberse a que si bien el número de bacterias se ha reducido, aún hay una cantidad de bacterias apropiadas y metabólicamente activas capaces de oxidar el azufre elemental, por lo que el factor de inhibición o muerte celular no provocó un descenso de la conversión en los tiempos de cultivo analizados. A su vez la fase de adaptación de los microorganismos antes nombrada también pudo afectar a este retardo en los peaks de crecimiento y conversión.

Por lo tanto, la oxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico parece estar ligada al crecimiento celular, pues en general a medida que hay una mayor concentración de células, mayor es la producción de ácido y a pesar del retardo de los peaks, la conversión parece estar intrínsecamente relacionada a las fases de crecimiento celular, ya que la tendencia en la producción de ácido sulfúrico es un reflejo de la tendencia mostrada por la curva de crecimiento de las bacterias planctónicas antes de la fase de muerte celular. Por lo que la producción de ácido



sulfúrico estaría relacionada tanto con el número de bacterias, como con la actividad de las mismas, además de otros factores que afectan la capacidad oxidativa de estas bacterias.

Un factor importante que afecta tanto el crecimiento celular como la capacidad oxidativa de los microorganismos es la acidez, la cual es la responsable de la inhibición y la muerte celular por debajo de un pH de 1,4; si bien este fenómeno no afectó de manera aparente la producción de ácido sulfúrico y la conversión del proceso en los tiempos estudiados, no debe ser desestimado por las razones anteriormente nombradas.

La presencia de intermediarios de la reacción de oxidación de azufre pudo influir en que las curvas producción de ácido sulfúrico y conversión no presentaran exactamente el mismo comportamiento que las curvas de crecimiento, ya que si existiese un número importante de intermediarios, estos impedirían la correcta cuantificación de la oxidación del azufre.

Por último un indicio que da cuenta de la relevancia de la actividad bacteriana es que si la conversión solo dependiera del número de bacterias, la tendencia de la proliferación total celular debería ser idéntica a la tendencia presentada en la conversión, sin embargo la tendencia de esta última está relacionada con las fases experimentadas por las bacterias planctónicas lo cual da un indicio claro de la relación con la actividad bacteriana.

#### **7.5 Comparación de la oxidación de azufre elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C y *Sulfolobus metallicus* a 67°C**

El comportamiento de la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en la oxidación de azufre elemental a 45°C se comparó con el que tuvo la arquea termófila extrema *Sulfolobus metallicus* con el mismo azufre pero a una temperatura de 67°C. La información acerca del microorganismo termófilo extremo fue obtenida del estudio realizado como trabajo de memoria por Rachel Pacheco y que lleva por título “Estudio de la oxidación de azufre elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67°C” (Pacheco 2012). Los gráficos de dicho estudio se encuentran en el Anexo F.

El estudio de biooxidación con *Sulfolobus metallicus* se realizó igualmente con perlas de azufre elemental y de la misma granulometría que las utilizadas para la biooxidación con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Sin embargo, los cultivos de las arqueas termófilas extremas fueron mantenidos a una temperatura de 67°C, mientras que el de las termófilas moderadas a 45°C, ya que esas son las temperaturas propicias para el desarrollo de dichos microorganismos. Junto con lo anterior, los cultivos con *Sulfolobus metallicus* no contenían extracto de levadura ya que este no es necesario en el metabolismo de este microorganismo. A su vez para el análisis de la actividad oxidativa de estos microorganismos se utilizaron las mismas metodologías.

Al observar el Gráfico 24, se puede apreciar que la capacidad de adherencia inicial de las arqueas fue de un 53,2% valor muy similar al alcanzado por las bacterias, el cual resultó ser de un 53,5%. Lo anterior indicaría que la capacidad de adherencia al azufre parece depender mayormente de la estructura del mismo que de los microorganismos en sí. Lo anterior puede deberse a que los microorganismos tienden a adherirse en zonas de desequilibrio electrónico, las cuales pueden ser más escasas en el azufre elemental en perlas lo que explicaría la situación antes mencionada.

También es importante notar que la adherencia alcanzada por *S. metallicus* fue lograda en un menor lapso de tiempo en comparación a la bacteria *S.thermosulfidooxidans*, lo que se puede deber a que la etapa de filtración necesaria para concentrar los microorganismos y de esta manera poder desarrollar el ensayo de adherencia, afectó de mayor manera a las bacterias, inactivándolas en mayor medida, alentando de esta manera el proceso de adherencia.

En el Gráfico 25, se muestra la evolución del pH durante el proceso de oxidación de azufre elemental con la arquea termófila extrema *Sulfolobus metallicus*, en el cual se puede observar que el mínimo pH alcanzado a temperatura ambiente fue de aproximadamente 1 a las 216 horas de cultivo, lo cual resulta relevante ya que este valor es muy similar al alcanzado por la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C, el cual resultó ser de 0,99; pero éste fue alcanzado a las 312 horas de cultivo, tiempo considerablemente mayor al tiempo requerido por las arqueas para llegar al mismo valor. Lo anterior puede deberse a la mayor temperatura a la que crecen las arqueas, ya que se sabe que la temperatura tiene un efecto positivo en la actividad catalítica en general, por lo que el tiempo requerido para oxidar el azufre sería menor y por consiguiente el pH disminuiría más rápidamente.

Otra posible razón es la condición inicial de los microorganismos, en el Gráfico 26, se puede apreciar que la curva de crecimiento de las arqueas planctónicas muestra una fase de adaptación muy breve, de tan solo 24 horas, valor que es mucho menor que el presentado por las bacterias *S.thermosulfidooxidans* que fue de 72 horas. La duración de la fase de adaptación no solo da cuenta del mayor tiempo que las bacterias requerirán para reproducirse, sino que implica que estas últimas tienen menos activo su metabolismo en comparación con las arqueas, por lo que un menor número de microorganismos y un metabolismo más lento llevan directamente a una menor tasa de oxidación y por lo tanto un decrecimiento más lento del pH.

Por otro lado, al observar el Gráfico 27, se aprecia que la producción de ácido sulfúrico y protones por parte del arquea *Sulfolobus metallicus* fue similar a la exhibida por la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* donde la primera alcanzó concentraciones máximas de 9,11[g/L] y 0,093 [g/L] para el ácido y los protones respectivamente, mientras que la bacteria alcanzó concentraciones máximas de 10,54 [g/L] y 0,11 [g/L] para el ácido sulfúrico y los protones respectivamente. Con respecto al tiempo necesario para que estos microorganismos alcanzaran estos valores se tiene que el arquea y la bacteria requirieron 216 y 312 horas respectivamente. Las razones del porque las arqueas nuevamente requirieron menos tiempo para alcanzar una producción de ácido y protones dada son las mismas explicadas anteriormente para el pH.

Con respecto a las formas de las curvas de producción de ácido sulfúrico y protones, se tiene que ambos microorganismos presentaron comportamientos similares, sin embargo, las bacterias presentan un retardo en la evolución de ambas concentraciones en relación a las arqueas, fenómeno que puede explicarse por la duración de la fase de adaptación antes mencionada.

Al observar el Gráfico 28 se aprecia que la producción de sulfato de *S. metallicus* presentó un comportamiento inusual ya que este permaneció relativamente constante desde las 72 horas de cultivo alcanzando un valor máximo de 3600 [ppm]. Por otro lado, la bacteria *S. thermosulfidooxidans* mostró un aumento en la concentración de sulfato a lo largo de todo el estudio, alcanzando una concentración máxima 3600 [ppm] al igual que el caso del arquea, pero esta fue alcanzada a las 312 horas de cultivo.

Con respecto al comportamiento inusual mostrado en el caso del arquea se presume que éste se podría deber a errores experimentales, debido a que el sulfato proviene de la oxidación del azufre elemental, por lo que la medida de este compuesto debe ir en directa relación con la concentración de protones, lo que no solo no ocurrió, sino que el sulfato presenta una concentración mucho mayor que la esperada por la estequiometría de la reacción de oxidación, la que muestra que la relación molar de protones y sulfato debiera ser 2:1 e incluso menor debido a la presencia de intermediarios de azufre reducido que no pueden ser medidos por el método de turbidimetría.

La conversión alcanzada por *S. thermosulfidooxidans* fue de un 34% a las 312 horas de cultivo, mientras que la conversión alcanzada por la arquea fue de un 29% a las 216 horas de cultivo, como se observa en el Gráfico 29. A pesar de que el valor obtenido para la arquea es menor que el alcanzado por la bacteria, el tiempo en el que se alcanzó la conversión del 34% fue mayor. Luego si se hubiera detenido el experimento a las 216 horas la conversión alcanzada por *S. thermosulfidooxidans* habría sido del 12%. 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.

Sin embargo, es necesario mencionar que luego de que el arquea *S. metallicus* alcanzó su máxima conversión, ésta comenzó a disminuir rápidamente por lo cual, esta es claramente la más alta conversión que este microorganismo puede alcanzar en este sistema, mientras que el máximo valor de conversión alcanzado por la bacteria *S. thermosulfidooxidans* corresponde al último punto del estudio, por lo cual a priori no se puede decir que éste es el máximo valor de conversión que puede lograr este microorganismo.

Al observar la curva de crecimiento de *S. metallicus* ilustrada en el Gráfico 26, se puede ver que el máximo número de arqueas alcanzado durante el experimento es de  $6 \times 10^{10}$  células, el cual es considerablemente menor que el máximo número de células alcanzado durante el experimento con *S. thermosulfidooxidans*, el cual resultó ser de aproximadamente  $3 \times 10^{12}$  bacterias. Esto puede indicar, que si bien las bacterias se tardaron más en estar activas, éstas parecen tener una mayor afinidad por la

superficie del azufre elemental, lo que también explicaría la mayor conversión alcanzada por este microorganismo.

Por último con respecto a los resultados entregados por los modelos cinéticos utilizados para estudiar el comportamiento de estos microorganismos, estos no son comparables a simple vista ya que son conceptualmente diferentes en aspectos fundamentales, ejemplos de estas diferencias son:

- El modelo utilizado para evaluar la actividad del arquea supone un tamaño de partícula constante de azufre mientras que el modelo utilizado para evaluar la actividad de la bacteria supone un tamaño decreciente en el tamaño de las partículas de azufre elemental.
- El modelo usado para evaluar la actividad de *S.thermosulfidooxidans* toma en cuenta el aumento de la concentración de bacterias en el sólido, mientras que el modelo utilizado para evaluar la actividad de *S.metallicus* no considera dicho factor.

Sin embargo si se consideraran ambos modelos como equivalentes se tiene que para el arquea (Gráfico 30) el tiempo de conversión total es de 1818 horas y la etapa controlante sería la reacción química, debido a que es esa recta la que presenta un mayor ajuste, a diferencia del proceso con la bacteria, que estaría controlado por la difusión del oxígeno en el biofilm y que presentaría un tiempo de conversión completa de 2000 horas.

## 8 DISCUSIÓN GENERAL

El cultivo de oxidación de azufre elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C evidenció la capacidad azufre-oxidante de esta bacteria, dada la alta tasa de oxidación biológica del azufre elemental percibida mediante un rápido incremento de la concentración de protones y sulfato de las soluciones de oxidación, así como también por el abrupto descenso del pH, a diferencia del experimento control sin microorganismos donde tanto el pH como la concentración de sulfato y protones se mantuvieron constantes.

Junto con esto, se determinó que la bacteria termófila moderada *S. thermosulfidooxidans* presenta una buena adherencia a la superficie del azufre, llegando a ser esta de un 54% en las cinco primeras horas. Esta relativamente rápida adherencia sería propicia para lograr mayores tasas de oxidación, así como junto con el alto número de bacterias planctónicas y adheridas al azufre durante el estudio de oxidación mostrarían un importante aporte al mecanismo de lixiviación cooperativo y por tanto a la disolución del azufre elemental, el cual es muy estable y no se oxida de forma espontánea.

Al observar la evolución de las concentraciones de azufre se apreció un temprano incremento en la concentración de azufre en solución en forma de sulfato, el que partió en aproximadamente 886 [ppm] y llegó a unos 3600 [ppm] a las 312 horas, mientras que la concentración de azufre en el experimento control sin dicha bacteria se mantuvo constante e igual a 886 [ppm], lo que indicaría que la oxidación del azufre es debido exclusivamente a la acción del microorganismo.

Conjuntamente, las bacterias planctónicas presentes en la solución pueden oxidar intermediarios de la reacción de oxidación de azufre elemental, por lo cual contribuyen a la generación de ácido sulfúrico. Sin embargo, la mayor cantidad de bacterias se encuentran adheridas al azufre y a su vez son estas bacterias las que en primer lugar están en contacto directo con el azufre elemental, el cual representa la principal fuente de energía para el proceso de oxidación, y en segundo lugar son las responsables de la generación de los intermediarios (provenientes de la oxidación primaria en la superficie del azufre elemental) que permiten el crecimiento de las bacterias en solución y por lo tanto, son responsables indirectamente de su contribución al proceso.

Durante el proceso de oxidación de azufre elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C se percibió una importante relación entre el pH y el desarrollo de las bacterias, debido a que los productos finales de dicha oxidación son el sulfato y los protones, donde estos últimos provocan la disminución en el pH. Constatándose que a pH menores a 1,4 tanto las bacterias adheridas como las bacterias en solución comenzaban a desaparecer, como se observa en el Gráfico 11, lo que conllevaría a la larga, si se mantiene la disminución en el pH, a un estancamiento en el proceso de oxidación de azufre elemental. De esta forma, se espera que de haber extraído la solución antes de tan importante descenso del pH, se hubiera evitado la

muerte de las bacterias adheridas, las cuales son las mayores responsables de la oxidación, aumentando la eficiencia y conversión del proceso.

Al evaluar la producción de ácido sulfúrico por la oxidación de azufre elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C con el modelo del núcleo sin reaccionar modificado con tamaño de partícula decreciente, fue posible advertir que la oxidación biológica del azufre presenta un mayor rendimiento en cuanto al tiempo que se requiere para su completa disolución en presencia del arquea termófila extrema *Sulfolobus metallicus* que con la bacteria termófila moderada *S.thermosulfidooxidans*. El tiempo necesario para una oxidación del 100% sería de 2000 horas con el microorganismo termófilo moderado, y este disminuiría considerablemente hasta un  $\tau$  de 1818 horas en presencia del arquea termófila extrema. Asimismo se logró establecer que el proceso de oxidación con *S.thermosulfidooxidans* estaría controlado principalmente por la difusión del oxígeno en el biofilm, a diferencia de la oxidación de azufre elemental con *S. metallicus* la cual estaría controlada por la reacción química.

Los resultados de la oxidación porcentual de azufre elemental mostraron que la mayor disolución de azufre se logró en el cultivo de oxidación con el microorganismo termófilo moderado a 45°C siendo ésta de un 34%, mientras que con la arquea termófila extrema a 67°C se alcanzó tan sólo un 29%. Dichos resultados, se deberían posiblemente a que la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* poseería mecanismos enzimáticos más eficientes para la oxidación de azufre, por lo que sería más apta para este proceso. A su vez, se observó que el número de microorganismos adheridos y en solución alcanzados en el proceso de oxidación fue mayor en el caso de *S.thermosulfidooxidans*, por lo cual, al haber un mayor número de microorganismos en dicho cultivo mayor también será la conversión alcanzada.

En cuanto al pH, se ha reportado que un valor óptimo de éste para el crecimiento de la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* es de aproximadamente 2 (Norris et al., 1996). No obstante estudios previos de oxidación de azufre con este microorganismo muestran que la mayor población de bacterias tanto adheridas como en suspensión se produce a un pH de 1,4; sin embargo, como se observó en el Gráfico 11, a partir de las 216 horas se registró una constante disminución en el número de bacterias, tanto adheridas como planctónicas, causada justamente por la disminución del pH, por lo cual este valor de pH debería corresponder a una condición de operación de manera de retrasar la muerte celular, lo que puede ayudar a lograr mayores tasas de generación de ácido sulfúrico, mejorando así el rendimiento y conversión del proceso.

El efecto de la disminución en el número de bacterias producto del descenso en el pH no alcanzó a repercutir negativamente en el rendimiento y conversión del proceso, debido a que el número de bacterias seguía siendo elevado por lo cual la oxidación continuó, sin embargo si el pH hubiera seguido disminuyendo implicaría que una cantidad significativa de las bacterias morirían y por lo tanto, el proceso de oxidación se mantendría constante o se detendría por completo, pudiendo incluso ocurrir una disminución del rendimiento y conversión del proceso debido a la subida del pH por la lisis de las bacterias.

## 9 CONCLUSIONES

El proceso de biooxidación de azufre elemental a ácido sulfúrico a 45°C, requirió de la presencia de la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* para que la reacción ocurriera, debido a que en ausencia de esta bacteria, no se observó la oxidación de azufre en las condiciones experimentales estudiadas.

La capacidad azufre-oxidante de *S.thermosulfidooxidans* fue apreciable a partir de la evolución del pH, así como también a partir de la concentración de los iones sulfato y protones durante el proceso de biooxidación, el que presentó una alta tasa de oxidación del azufre elemental, comparativamente al experimento control que no fue inoculado con este microorganismo. Asimismo, se determinó que esta bacteria termófila moderada posee una capacidad de adherencia a la superficie del azufre elemental de un 54% en las primeras cinco horas, valor que se explica por las características del azufre utilizado, ya que células adheridas a la superficie del azufre crecen formando conglomerados lo que indica preferencia de estas células por ciertas estructuras del azufre.

La conversión del proceso de biooxidación de azufre elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C, fue influenciada tanto por la presencia de intermediarios como por la acidez del medio, lo que generó un retardo entre el peak de conversión y el peak de crecimiento y que el comportamiento de la conversión no fuera exactamente igual al comportamiento del crecimiento microbiano. A su vez se obtuvo una concentración máxima de ácido sulfúrico de 10,54 [g/L] a las 312 horas de cultivo, mientras que el máximo número de microorganismos registrados fue a las 216 horas de cultivo y resultó ser de  $2,9 \times 10^{12}$  bacterias.

El proceso de biooxidación de azufre elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C estuvo controlado principalmente por la difusión del oxígeno en el biofilm. Considerando que la etapa limitante de la biooxidación más importante fue la difusión en el biofilm, se requieren de unas 2000 horas equivalentes de 84 días para la completa oxidación del azufre.

Al comparar la oxidación de azufre elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C, este mismo proceso pero en presencia del arquea termófila extrema *Sulfolobus metallicus* y a una temperatura de 67°C, se observó que con el microorganismo termófilo moderado se logró una mayor oxidación del azufre elemental, alcanzándose una conversión de 34% a las 312 horas de cultivo, mientras que en el cultivo con el arquea termófila extrema se alcanzó una conversión de un 29% a las 216 horas de cultivo, lo que se debió exclusivamente a las diferentes características y capacidades de los microorganismos, tales como adherencia, crecimiento en el azufre elemental y capacidad oxidativa. A su vez el proceso de biooxidación con ambos microorganismos está controlado por la reacción necesitándose para el caso del arquea 1818 horas equivalentes a 76 días para la completa oxidación del azufre, tiempo considerablemente menor que el necesario

para que la bacteria complete dicho proceso, lo cual se explica por las diferencias metabólicas de los microorganismos.

La alta capacidad azufre-oxidante, el mayor crecimiento de las bacterias adheridas y que el crecimiento de las bacterias planctónicas es debido a la presencia de intermediarios de la reacción de oxidación de azufre elemental, indican que el mecanismo de biooxidación de azufre con *S. thermosulfidooxidans* sería el mecanismo cooperativo.

Por último debido a la alta conversión alcanzada y a que el ácido sulfúrico es capaz de lixiviar fosfatos contenidos en un relave mineral, es necesario establecer condiciones de operación apropiadas en relación a la acidez para optimizar el proceso de biooxidación, por lo que es recomendable continuar los estudios de biooxidación de azufre elemental para determinar la factibilidad de su aplicación a nivel industrial.



## 10 RECOMENDACIONES

De manera de seguir o mejorar la investigación acerca de la factibilidad de implementar la biooxidación de azufre para la producción de ácido sulfúrico a nivel industrial se recomienda lo siguiente:

- Estudiar la inhibición bacteriana debido a la disminución del pH, de manera de poder relacionar ésta variable con la cinética de oxidación del azufre elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.
- Realizar un análisis previo de la viabilidad y estado de los microorganismos de manera de asegurar que estos últimos están en óptimas condiciones para realizar la biooxidación.
- Identificar y cuantificar la cantidad de intermediarios de la reacción de oxidación de azufre elemental de manera de determinar exactamente la capacidad oxidativa del microorganismo.
- Optimizar la granulometría del azufre elemental utilizado, de manera de maximizar la adherencia bacteriana, para de esta forma obtener mayores tasas de oxidación, de lo contrario estudiar la factibilidad de utilizar otra fuente de azufre más afín con los microorganismos.
- Estudiar la posibilidad de utilizar un consorcio bacteriano para la oxidación de azufre a ácido sulfúrico, para evaluar las mejoras que puede conllevar dicho cambio.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

Alcántara S. Estudio de la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfooxidantes. 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.

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.

Brierley CL., Briggs AP., 2002. Selection and sizing of biooxidation equipment and circuits En: Mineral processing plant design, practice, control. Society of Mining Engineers. Littleton, Cob. 1540-1568.

Bridget, T., Johnson D.B., 1998. Reduction of Soluble Iron and Reductive Dissolution of Ferric Iron - Containing Minerals by Moderately Thermophilic Iron-Oxidizing Bacteria. Applied and Environmental Microbiology 64: 2181-2186.

Cabrera G. Precipitación de iones metálicos contaminantes mediante bacterias azufre-oxidantes y sulfato-reductoras. Memoria para optar al título de Doctor en Química. Facultad de Química, Universidad de Cádiz. 2005.

Clark D.A., Norris P. R., 1996. Oxidation of mineral sulphides by thermophilic microorganisms. Minerals Engineering vol. 9: 1119-1125.

Colmer AR., Hinkle ME., 1947. The role of microorganisms in acid mine drainage. A preliminary report. Science 106:253-256.

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

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: 25 de Octubre de 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., Escobar B., Jedlicki E., Uribe P., Badilla R., 1988. Oxidation of Ferrous Iron and Elemental Sulfur by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied Environmental Microbiology* 53:1694-1699.

Espinosa J., Revah S., Le Borgne S., 2010. Rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimiolitotóxicas, relevancia ambiental y biotecnología. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXIV:101-120.

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](http://www.captura.uchile.cl/bitstream/handle/2250/7297/Gautier_V.pdf?sequence=1)> [Consulta: 2 de Enero de 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

Gómez, Jesús. Presentación: Unidad 3: Nutrición, metabolismo, crecimiento y control de microorganismos. [En línea] <<http://www.slideshare.net/jochoa/6crecimientomicrobiano-1719474>>. [Consulta: 15 de Septiembre de 2012]

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.

Imai K., 1978. On the mechanism of bacterial leaching. En: *Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena* Academic Press New York 50: 275-294.

Jaque, I. Estudio de la Biolixiviación de Pirita por un cultivo de *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C. Memoria de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero civil en Biotecnología. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile. 2012.

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.

Microbiología industrial. Crecimiento celular, Universidad de Navarra. [En línea] <<http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-3.htm>>. [Consulta: 12 de Agosto de 2012]

Mora, A. Memoria de Ingeniero Civil en Biotecnología. Estudio de la dinámica de poblaciones bacterianas en procesos de biolixiviación mediante CARD-FISH. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile. 2010.

Mustin C., Berthelin J., Marion P., Donato P., 1993. 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.

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

Norris, P., Clark, D., Owen, J. y Waterhouse, S (1996). Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral sulphide oxidizing bacteria. *Microbiology* 142: 775-783.

Pacheco, R. Estudio de oxidación de azufre elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67°C. Memoria de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero civil en Biotecnología. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile. 2013.

Parker A., Klauber C., Kougiannos A., Watling H. R., van Bronswijk W., 2003. An X-ray photoelectron spectroscopy study of the mechanism of oxidative dissolution of chalcopyrite. *Hydrometallurgy* 71, 265-276.

Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R., 2002. Fluorescence In Situ Hybridization and Catalysed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 68:3094-3101.

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

Rawlings., 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol* 56: 65-91.

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.

Sampedro A. Técnicas de fluorescencia en microscopía y citométrica Nistal. 1ª Ed. España, Servicio de publicaciones Universidad de Oviedo. 1995.pp 132-136

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

Schippers A., Jozsa P-G., Sand W., 1999. Bacterial leaching of metal sulfide proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. Appl Environ. Microbiol 65:319-321.

Sekar R., Pernthaler A., Pernthaler J., Warnecke F., Posch T., Amann R., 2002. An Improved Protocol for Quantification of Freshwater Actinobacteria by Fluorescence In Situ Hybridization. Applied Environmental Microbiology 69:2928-2935.

Shivvers D., Brock T., 1973. Oxidation of elemental sulfur by 1997 Sulfolobus acidocaldarius. Journal of bacteriology, 114: 706-710. 1973.

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.

Studel, 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.

Suzuki, 2001.Microbial leaching of metals from sulphide minerals. Biotechnol. Adv. 19:119-132.

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: 5 de Enero de 2012]

Watling H., 2006. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on cooper 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 waste water. Process Biochemistry 45, 1624-1631.

Yahya A., Johnson D., 2002. Bioleaching of pyrite at low pH and low redox potentials by novel mesophilic Gram-positive bacteria. Hydrometallurgy 63, 181-188.

## 12 ANEXOS

### A. Determinación de la adherencia bacteriana al azufre

Para estudiar la adherencia bacteriana al azufre elemental, se calcula a diferentes tiempos la concentración de células en solución mediante recuento directo de bacterias usando para ello un microscopio de contraste de fase y una cámara de recuento Petroff-Hausser. Son contadas las bacterias de cada muestra unas cinco veces en distintos cuadrados de la cámara de recuento, dichas cantidades son promediadas y el valor resultante correspondiente a  $\overline{Bacterias_t^{contadas}}$ , se multiplica por  $1,25 \times 10^6$  o  $2,00 \times 10^7$ , según se haya realizado el conteo en cuadros grandes o pequeños respectivamente. La cantidad total de bacterias en la solución ( $Bacterias_t^{totales}$ ) corresponde al producto entre la concentración de bacterias determinada y el volumen de la solución en el matraz ( $V_{total\ matraz}$ ).

Las siguientes ecuaciones muestran el cálculo de bacterias totales para el conteo realizado en cuadro grande y chico respectivamente.

$$Bacterias_t^{totales} = \overline{Bacterias_t^{contadas}} * (2 * 10^7) * V_{total\ matraz} \quad (Ec. 42)$$

$$Bacterias_t^{totales} = \overline{Bacterias_t^{contadas}} * (1,25 * 10^6) * V_{total\ matraz} \quad (Ec. 43)$$

A partir del cálculo de bacterias totales en la muestra para un determinado tiempo ( $Bacterias_t^{totales}$ ) y el inicial ( $Bacterias_{t=0}^{totales}$ ) se evalúa la capacidad de adherencia bacteriana al azufre, la que está dada por:

$$\%Adherencia_t = \frac{Bacterias_{t=0}^{totales} - Bacterias_t^{totales}}{Bacterias_{t=0}^{totales}} * 100 \quad (Ec. 44)$$

### B. Cuantificación de Bacterias Planctónicas y Adheridas

A partir de los datos obtenidos del recuento de células en solución en el microscopio de Epifluorescencia, es posible determinar la concentración total de bacterias planctónicas en un tiempo ( $[Bact. P_t^{totales}]$ ) está dada por el promedio de las bacterias contadas por área de filtro ( $[Bact. \bar{P}]_{\acute{a}rea}$ ), multiplicado por un factor para conversión a concentración volumétrica ( $\alpha_{\acute{a}rea/volumen} = 1,734 * 10^7$ ), y dividido por el volumen de la muestra de la solución tomada para la fijación de las bacterias en solución a la membrana de policarbonato ( $V_{muestra\ DAPI}$ ), como se indica a continuación:

$$[Bact. P_t^{totales}] = \frac{[Bact. P]_{\text{área}} * \alpha_{\text{área/volumen}}}{V_{\text{muestra DAPI}}} \quad (\text{Ec. 45})$$

A partir de los datos de la cantidad de bacterias planctónicas reales se determina la velocidad máxima de crecimiento de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en un cultivo de biooxidación de azufre. Luego, el logaritmo de la razón entre las bacterias totales en un cierto tiempo ( $[Bact. P_t^{totales}]$ ) y la cantidad inicial de ésta ( $[Bact. P_{t=0}^{totales}]$ ) es igual a la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) por el tiempo de cultivo. Así, realizando una linealización de dichos datos se obtiene la máxima velocidad de crecimiento, correspondiente a la pendiente de dicha recta como se aprecia en la ecuación a continuación:

$$\ln \left( \frac{[Bact. P_t^{totales}]}{[Bact. P_{t=0}^{totales}]} \right) = \mu_{max} * t \quad (\text{Ec. 46})$$

Para determinar la cantidad de bacterias adheridas al azufre se debe calcular la superficie total disponible para el crecimiento bacteriano, esto a partir de la estimación del área promedio de las partículas del azufre, la que es obtenida a partir de la evaluación de éstas en el microscopio de Epifluorescencia, colocando una gradilla ocular de 1 [mm<sup>2</sup>] con divisiones internas cada 1  $\mu\text{m}$ . Considerando que el área promedio de las partículas evaluadas corresponde a la de un círculo, se estima el radio de las partículas ( $A_{\text{circular}}^{\text{part.azufre}}$ ) desde:

$$A_{\text{circular}}^{\text{part.azufre}} = \pi * r_{\text{part.azufre}}^2 \quad (\text{Ec. 47})$$

Con dicho radio se calcula el área esférica ( $A_{\text{esférica}}^{\text{part.azufre}}$ ) y volumen esférico ( $V_{\text{esférico}}^{\text{part.azufre}}$ ) de una partícula de azufre, según:

$$A_{\text{esférica}}^{\text{part.azufre}} = 4 * \pi * r_{\text{part.azufre}}^2 \quad (\text{Ec. 48})$$

$$V_{\text{esférico}}^{\text{part.azufre}} = \frac{4}{3} * \pi * r_{\text{part.azufre}}^3 \quad (\text{Ec. 49})$$

Luego, el área total de azufre disponible ( $A_{total}$ ) está dada por la masa de azufre en la muestra ( $m_{azufre}$ ), la densidad promedio de ésta ( $\rho_{azufre}$ ), el área y volumen esféricos de la partícula, según:

$$A_{total} = \frac{m_{azufre}}{\rho_{azufre}} * \frac{A_{esférica}^{part.azufre}}{V_{esférico}^{part.azufre}} \quad (\text{Ec. 50})$$

Así, la cantidad de bacterias totales adheridas al azufre ( $Bacterias_t^{totales\ adheridas}$ ) se calcula con el promedio de bacterias por área de azufre ( $Bacterias_t^{área}$ ) y el área total del azufre, como se muestra en la ecuación a continuación:

$$Bacterias_t^{totales\ adheridas} = Bacterias_t^{área} * A_{total} \quad (\text{Ec. 51})$$

## C. Análisis Químicos

Para la realización de la determinación cuantitativa de la oxidación del azufre elemental a ácido sulfúrico, fue necesaria la determinación de la concentración de sulfato y protones en la solución, los protocolos para determinar dichas cantidades se describen a continuación.

### C.1 Determinación de Sulfato en solución por Turbidimetría

#### Materiales y equipos

- $BaCl_2 \cdot x H_2O_2$ .
- 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.



## Medición del sulfato

- En un matraz aforado de 100 ml agregar 10 [mL] de la solución de biooxidación.
- Agregar 10 [mL] de glicerina 1:1. Agitar.
- Agregar 5 [mL] de NaCl 240 g/L. Agitar.
- Aforar a 100 [mL] con agua desionizada. Agitar.
- Agregar 0,3 [g] de  $\text{BaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}_2$ .
- Agitar durante un minuto y luego dejar reposar por un minuto.
- Medir concentración en espectrofotómetro UV-visible a 500 [nm] contra blanco.

## C.2 Ensayos de Titulación

### Materiales y equipos

- Bureta
- Hidróxido de sodio 0,1 [N].
- Agua destilada.
- Colorante anaranjado de metilo.
- Matraz Erlenmeyer de boca ancha.
- Soporte para bureta.
- Agitador

### Medición de los protones en solución

- En el matraz agregar 98 [mL] de agua destilada.
- Agregar 2 [mL] de muestra de solución de biooxidación.
- Agregar 10 gotas del colorante anaranjado de metilo y colocar un magneto y agitar la muestra.
- Llenar la bureta hasta el punto 0 con hidróxido de sodio y colocarla en el soporte.
- Agregar una gota de hidróxido de sodio a la vez al matraz hasta apreciar un cambio de color. Anotar el volumen de hidróxido de la bureta correspondiente a este punto.
- Agregar una gota más de hidróxido de sodio, si no cambia el color, el valor anterior corresponde al volumen de titulación, de lo contrario anotar este nuevo valor. Repetir esto hasta que no se observe cambio de color en la mezcla.

De esta forma se puede obtener la concentración de ácido sulfúrico y protones en solución a partir de las siguientes ecuaciones:

$$Normalidad_{H_2SO_4} = \frac{Normalidad_{NaOH} * Volumen_{NaOH}}{Volumen_{H_2SO_4}} \quad (Ec. 52)$$

$$Concentración_{H_2SO_4} = Normalidad_{H_2SO_4} * Peso Equivalente_{H_2SO_4} \quad (Ec. 53)$$

$$Concentración_{H^+} = \frac{Concentración_{H_2SO_4}}{Peso Molecular_{H_2SO_4}} \quad (Ec. 54)$$

$$pH = -\log (Concentración_{H^+}) \quad (Ec. 55)$$

#### D. Gráficos de la oxidación de azufre elemental con *Sulfolobus metallicus*

En el presente Anexo se muestran los resultados gráficos del estudio de la oxidación de Azufre elemental con la arquea termófila extrema *Sulfolobus metallicus*, donde este último estudio fue realizado como trabajo de memoria por Rachel Pacheco y que lleva por título “Estudio de la oxidación de azufre elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67°C” (Pacheco., 2012).

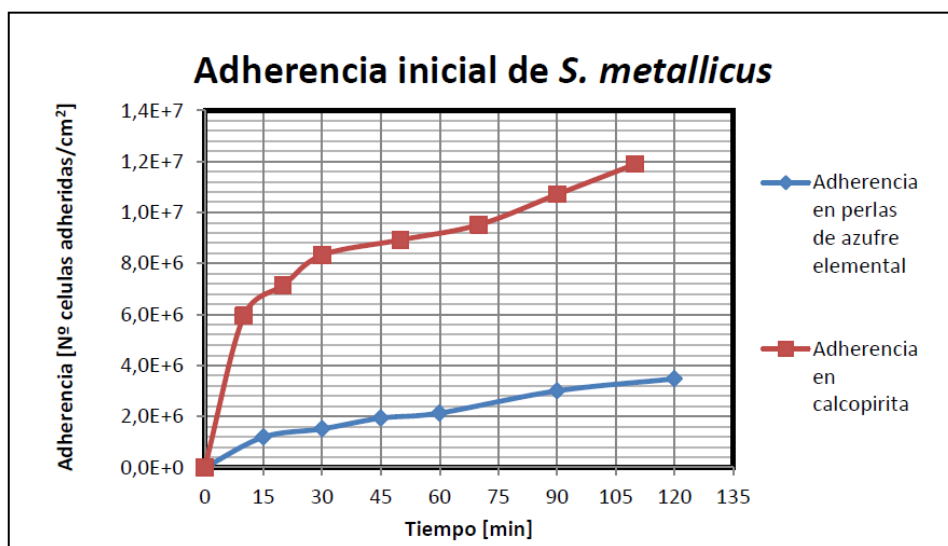


Gráfico 23: Adherencia al Azufre Elemental de *Sulfolobus metallicus* (Pacheco., 2012)

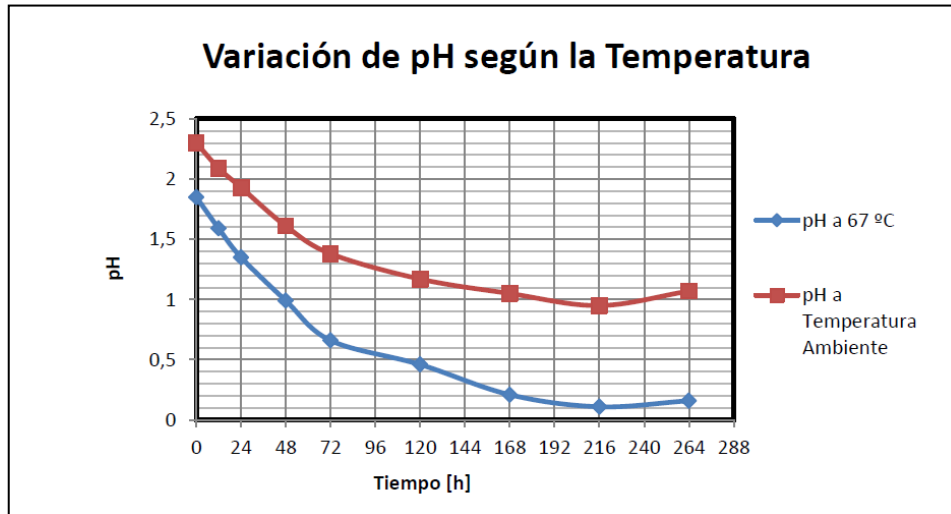


Gráfico 24: Variación del pH en el Proceso de Oxidación de Azufre Elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67°C (Pacheco., 2012)

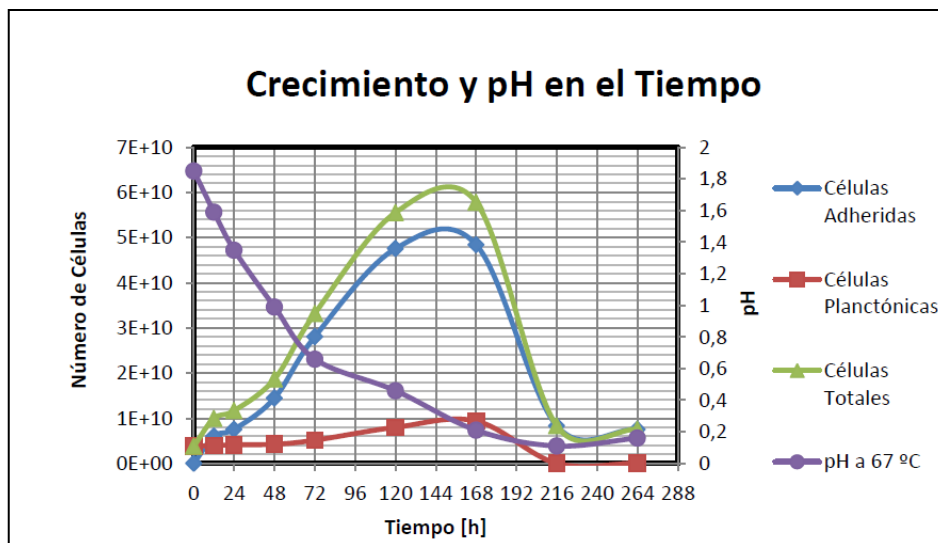


Gráfico 25: Crecimiento Celular de *Sulfolobus metallicus* en Azufre Elemental a 67°C (Pacheco., 2012)

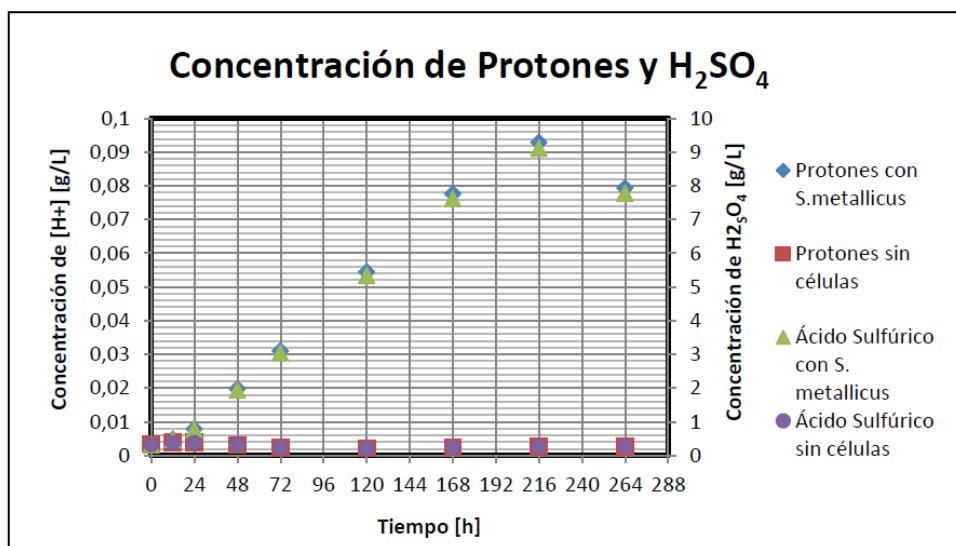


Gráfico 26: Concentración de Ácido Sulfúrico y Protones en la Oxidación de Azufre Elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67°C (Pacheco., 2012)

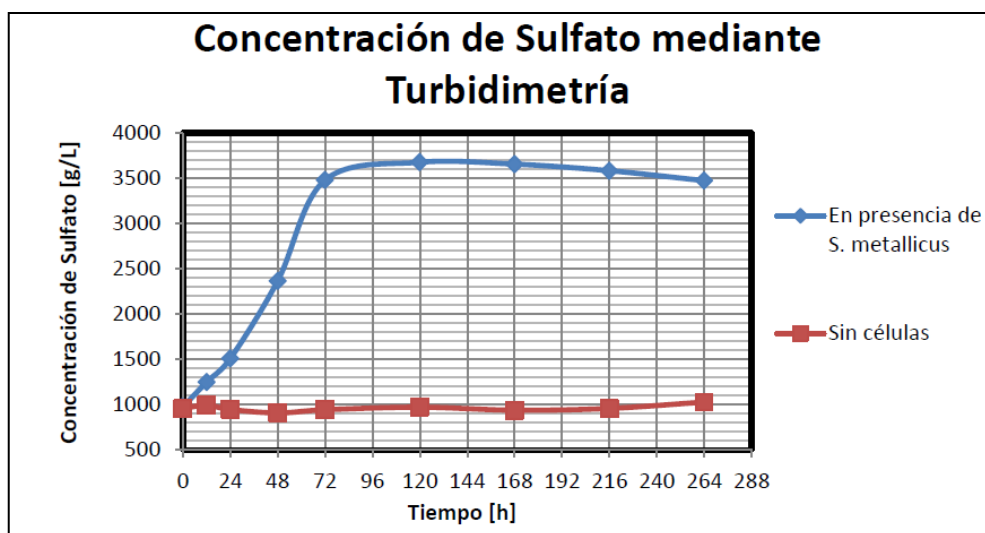


Gráfico 27: Concentración de Sulfato en la Oxidación de Azufre Elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67°C (Pacheco., 2012)

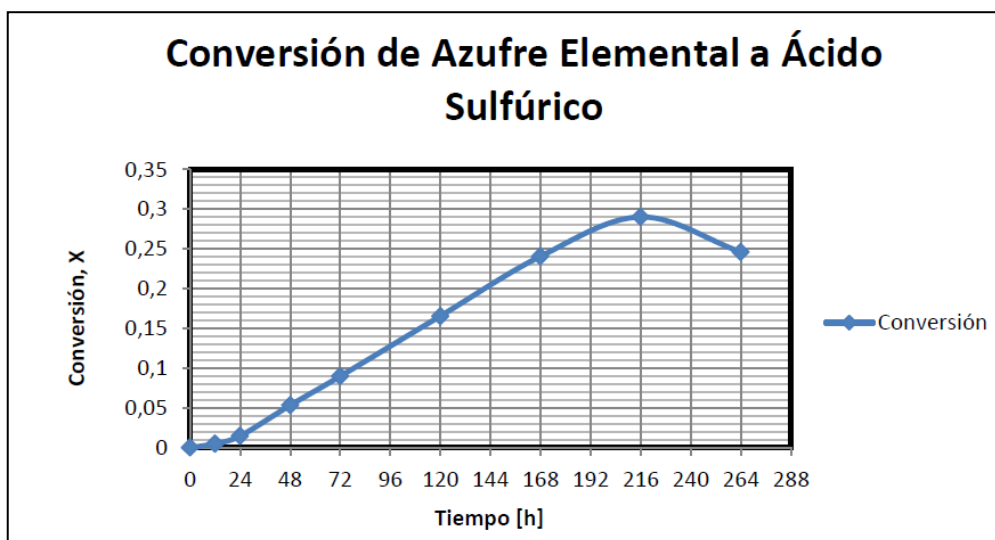


Gráfico 28: Conversión del Proceso de Oxidación de Azufre Elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67°C (Pacheco., 2012)

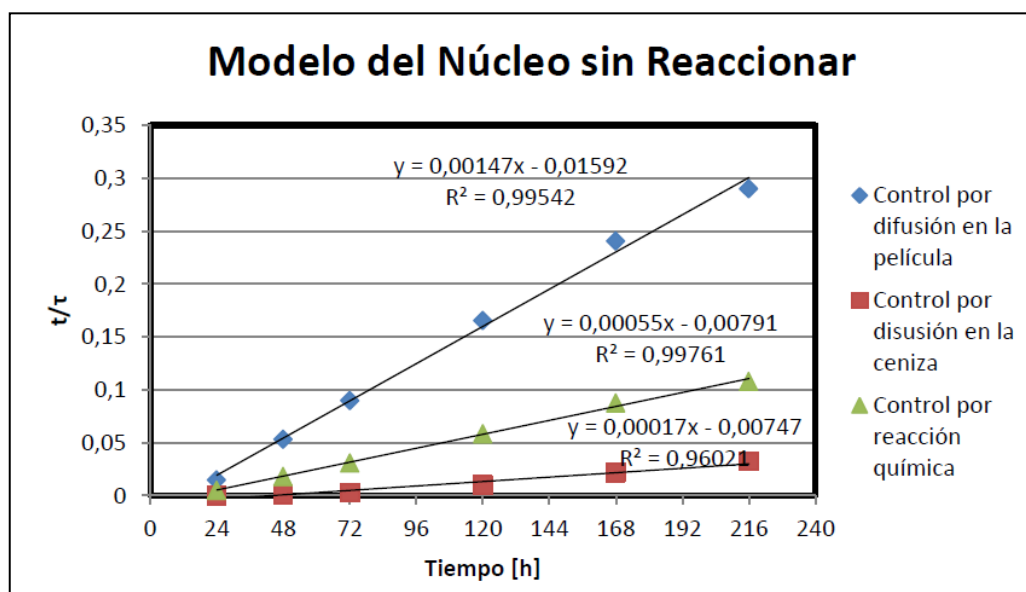


Gráfico 29: Modelo del Núcleo sin Reaccionar para la Oxidación de Azufre Elemental con *Sulfolobus metallicus* a 67°C (Pacheco., 2012)