



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

DISEÑO Y ESTUDIO DE UN REACTOR A ESCALA BANCO PARA LA BIOOXIDACIÓN DE AZUFRE ELEMENTAL

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

HANS MAURO ALLENDES ARCOS

PROFESOR GUÍA:
DR. TOMÁS VARGAS VALERO

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
DR. FRANCISCO GRACIA CAROCA
DR. CRISTIAN SALGADO HERRERA

SANTIAGO DE CHILE
JUNIO DE 2014

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE:** Ingeniero Civil Químico e
Ingeniero Civil en Biotecnología
POR: Hans Mauro Allendes Arcos
FECHA: 20/06/2014
PROFESOR GUÍA: Tomás Vargas Valero

**DISEÑO Y ESTUDIO DE UN REACTOR A ESCALA BANCO PARA LA
BIOOXIDACIÓN DE AZUFRE ELEMENTAL**

El presente trabajo reporta el estudio realizado en un reactor a escala banco para la oxidación biológica de perlas de azufre elemental, en el cual se genera ácido sulfúrico que será utilizado más adelante en la producción sustentable de fosfatos desde una roca fosfórica. Para lo anterior, se utilizó como punto de partida el cultivo de la arquea *Sulfolobus metallicus* en matraces agitados a 67°C, crecidas sobre perlas de azufre elemental. A partir de esta manipulación, se implementaron fases de escalamiento que contemplaron un reactor agitado tipo batch y su símil en modo continuo, ambos con condiciones de operación derivadas directamente de los matraces.

En modo batch se monitorearon periódicamente el pH, acidez del medio, concentración de sulfato en solución y conteo de células planctónicas. Los resultados obtenidos indicaron un buen escalamiento desde los matraces, con valores similares a trabajos previos que utilizaron aquel sistema de reacción. Además, a partir de lo registrado en el conteo celular, se obtuvo una tasa específica de crecimiento celular (μ) en batch igual a 0,056 [h⁻¹], desde la cual se propusieron 4 flujos de operación para el modo continuo, los cuales fueron de 0,9 – 1,8 – 2,7 y 3,6 [mL/min].

Con ellos en operación, se registraron las mismas variables evaluadas en batch, además de determinar el tiempo requerido para estabilizar el pH, medida usada en la detección de cada estado estacionario. Los registros variaron al aumentar el flujo, observando que las cantidades de ácido, sulfato y células disminuyeron, aumentando el pH en el biorreactor. Por su parte, el tiempo transiente necesario para alcanzar cada estacionario se situó en un rango entre 24 y 40 [horas].

A partir de los resultados de producción de ácido sulfúrico y sulfato en solución, se generó un modelo similar a los utilizados en fermentadores continuos, asumiendo la existencia de dos tipos de células: las adheridas al azufre y las suspendidas en el medio de reacción (planctónicas). El modelo se trabajó ignorando el crecimiento de las arqueas en suspensión, y siguiendo dos casos de estudio: suponer una tasa μ constante para todos los flujos versus un caso de μ variable por flujo. El modelo entregó valores para la tasa específica de crecimiento (el mejor de 0,022 [h⁻¹]), además del rendimiento de producción por arquea (alrededor de 10⁻¹⁰ [g producto/arquea]). Este último resultado fue similar al utilizar ácido sulfúrico o sulfato indistintamente como medidas de producto.

Además, un estudio de la aireación reveló que el sistema poseía un nivel de oxígeno adecuado para la operación, estimando una producción máxima posible de 0,0014 [g/min] de ácido sulfúrico. En conclusión, el sistema implementado resultó ser un exitoso primer acercamiento a la tecnología de reactores utilizando *Sulfolobus metallicus* creciendo sobre azufre elemental a 67°C, y debe someterse a un estudio de ingeniería más acabado, tal que permita realizar una biooxidación de azufre compatible con la necesidad de una lixiviación sostenible de fosfatos.

*Mamá Margarita, hermosa y comprometida guía del hogar,
Papá Patricio, incansable pilar que sostiene nuestro camino,
Geerald, creativo y querendón hermano mayor,
Max, artista genial y soñador hermano menor,
Jared, mi pequeño sobrino regalón, la alegría de la familia,
LOS AMO.*

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia. Gracias a mis padres por apoyarme en cada etapa de mi vida estudiantil, por cuidarme y aguantarme. Gracias a mis hermanos y sobrino por alegrarme cada jornada. Gracias a ustedes y al resto de la familia del sur por darme cariño, apoyo y comprensión.

También quiero agradecer a mis amigos por acompañar mi camino de vida, y estar ahí para los buenos y malos momentos, brindando su amistad, buena onda y sabios consejos. A los amigos de infancia, que hasta hoy los veo y comparto con ellos la pasión por mi Colo - Colo querido; a mis amigos del colegio, en especial Alexis (chika), Oscar (tata) y Diego (morado); a mi amiga Yanita; a mis amigos del IQBT, Marcelo (chelo), Diego (topler), José Luis (wepe), Ma. Fernanda (feña), Rhidi y Nati. Para todos ustedes, y a muchos más que hicieron de la estadía en el Instituto Nacional y en Beauchef una alegre y entretenida experiencia, muchas gracias.

Agradezco además a los profesores Dr. Tomás Vargas V., Dr. Francisco Gracia C., y Dr. Cristian Salgado H., por su disposición constante, su preocupación y la ayuda que siempre me entregaron cuando las dudas inundaban la investigación.

Deseo agradecer a la empresa VALE S.A. por la oportunidad que brindan a estudiantes como yo para desarrollar proyectos de investigación, con lo cual se fortalecen las ciencias y el desarrollo tecnológico tanto de Brasil como de Chile. Además quiero agradecer al Centro Avanzado de Tecnología para la Minería (AMTC) por el apoyo brindado al laboratorio de Biohidrometalurgia y a mi persona, lo cual fue crucial para el desarrollo de la presente tesis.

Expreso mis más sinceros agradecimientos a todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Biohidrometalurgia y Electroquímica, por todos los gratos momentos que compartimos en este año de arduo trabajo. En particular agradezco enormemente la gran ayuda de la Sra. Emma Fonseca P., que fue mi constante mentora en cada etapa de la investigación. También agradecer a Carla por su preocupación y apoyo para que este escrito salga a la luz.

Finalmente, quiero extender un agradecimiento especial a la Fundación Coopeuch, y muy cordialmente a la Sra. Carolina Sorensen M. Estaré siempre agradecido del financiamiento y las continuas gestiones realizadas que facilitaron mi continuidad de estudios.

GRACIAS A TODOS.

Tabla de Contenido

1	Introducción.....	1
1.1	Antecedentes Generales.....	1
1.1.1	El fosfato y el ácido sulfúrico.....	1
1.1.1.1	Mercado creciente de fosfatos.....	1
1.1.1.2	Obtención tradicional de fosfatos.....	2
1.1.1.3	Azufre e industria actual del ácido sulfúrico.....	3
1.1.2	La Biolixiviación: una solución sustentable.....	5
1.1.2.1	Conceptos iniciales.....	5
1.1.2.2	Biooxidación del azufre.....	6
1.1.2.3	Mecanismos de biolixiviación.....	7
1.1.2.4	Microorganismos para biolixiviación.....	9
1.1.2.5	Características de <i>Sulfolobus metallicus</i>	11
1.1.2.6	Etapas del crecimiento celular.....	12
1.1.2.7	Factores que afectan el desarrollo de microorganismos.....	13
1.1.2.8	Aplicación industrial de la biolixiviación.....	15
1.1.3	Diseño de biorreactores en minería.....	17
1.1.3.1	Ingeniería de un biorreactor: modelación básica.....	18
1.1.3.2	Descripción de modelos previos.....	24
1.1.3.3	Modelos previos de un reactor para procesar azufre elemental.....	25
1.1.3.4	Estudio de transferencia gas-líquido en reactores.....	29
1.2	Motivación y Descripción del Proyecto.....	33
2	Objetivos.....	34
2.1	Objetivo General.....	34
2.2	Objetivos Específicos.....	34
3	Metodología.....	35
3.1	Cultivo celular en matraces.....	35
3.1.1	Obtención de perlas de azufre.....	35
3.1.2	Esterilización de las perlas de azufre.....	36
3.1.3	Cultivo de inóculos en matraces sobre perlas de azufre.....	37
3.1.4	Análisis químicos y biológicos.....	37
3.1.4.1	Preparación de muestras diarias.....	38
3.1.4.2	Medición del pH.....	38

3.1.4.3	Ensayos de titulación ácido-base.....	38
3.1.4.4	Determinación de sulfato en solución.....	40
3.1.4.5	Recuento directo de células planctónicas.....	40
3.2	Biorreactor tipo Batch.....	42
3.2.1	Montaje experimental.....	42
3.2.2	Mediciones en batch.....	45
3.3	Biorreactor en Modo Continuo.....	47
3.3.1	Montaje experimental.....	47
3.3.2	Alcanzando el estado estacionario.....	49
3.4	Modelación de la biooxidación de azufre en reactores.....	49
3.5	Estudio de la aireación aplicada al biorreactor.....	51
3.5.1	Toma de datos para el Método Dinámico.....	52
3.5.2	Análisis de la entrega de oxígeno.....	52
4	Resultados.....	54
4.1	Cultivo celular en matraces.....	54
4.2	Biorreactor tipo Batch.....	54
4.2.1	Resultados de medición en el tiempo.....	54
4.2.1.1	Evolución del pH.....	55
4.2.1.2	Evolución en acidez del medio.....	56
4.2.1.3	Evolución de la concentración de sulfato.....	57
4.2.1.4	Cuantificación de arqueas planctónicas.....	58
4.2.2	Determinación de la cinética de crecimiento celular.....	60
4.3	Biorreactor en Modo Continuo.....	62
4.3.1	Estados transientes.....	62
4.3.2	Estudio del estado estacionario.....	63
4.3.2.1	Relación pH – flujo operación.....	64
4.3.2.2	Relación células planctónicas – flujo operación.....	65
4.3.2.3	Relación acidez – flujo de operación.....	65
4.3.2.4	Relación sulfato en solución – flujo operación.....	66
4.4	Modelación de la biooxidación.....	67
4.4.1	Resumen de la modelación.....	67
4.4.2	Resultados de modelación.....	67
4.4.2.1	Importancia de células planctónicas en el crecimiento celular.....	67
4.4.2.2	Rendimientos de producción por biomasa.....	71
4.5	Estudio de la aireación aplicada al biorreactor.....	74

5	Discusión	78
5.1	Cultivo en matraces	78
5.2	Biorreactor tipo Batch.....	79
5.2.1	Diseño y montaje	79
5.2.2	Resultados de medición en el tiempo	79
5.3	Biorreactor en Modo Continuo	85
5.3.1	Escalamiento.....	85
5.3.2	Estados transientes.....	85
5.3.3	Estados estacionarios	87
5.4	Modelación del reactor de biooxidación de azufre	87
5.4.1	Modelos sobre el balance de biomasa	87
5.4.2	Modelos de producción: rendimiento de producto	90
5.5	Estudio de la aireación	93
5.6	Discusión general.....	97
6	Conclusiones.....	100
7	Recomendaciones	102
8	Bibliografía.....	103
9	Anexos.....	108

Índice de Tablas

Tabla 1: Características de algunas especies de microorganismos mesófilos típicos en la industria (24).	10
Tabla 2: Principales características de la especie termófila moderada <i>Sulfobacillus thermosulfidoxidans</i> (19) (24).	10
Tabla 3: Características de <i>Sulfolobus metallicus</i>	11
Tabla 4: Plantas que operan en la actualidad utilizando la tecnología de reactores en modo CSTR (20) (40) (41).	16
Tabla 5: Condiciones iniciales de los reactores batch desarrollados en 1994 (60) y 1995 (61) por Konishi <i>et al.</i>	28
Tabla 6: Resultados del ajuste de datos experimentales y modelación de los reactores batch para los experimentos desarrollados por Konishi <i>et al</i> (60) (61).	28
Tabla 7: Condiciones iniciales de operación en el reactor batch.....	44
Tabla 8: Valores entre el comienzo y fin de la fase exponencial de crecimiento detectada en el reactor batch.	61
Tabla 9: Resultados estacionarios para cada flujo de operación empleado.....	64
Tabla 10: Resumen de los resultados para el balance de biomasa considerando el crecimiento de arqueas suspendidas, evaluando 4 diferentes factores de efectividad ($\eta_{T1}=1$; $\eta_{T2}=0,5$; $\eta_{T3}=0,25$; $\eta_{T4}=0,125$)	69
Tabla 11: Resumen de rendimientos de producción para cada caso de estudio del balance de producto, y su correspondiente coeficiente de correlación.....	74
Tabla 12: Mediciones para estimar el coeficiente combinado de transferencia de oxígeno en el biorreactor (k_{La_i}).....	75
Tabla 13: Cálculos de producción neta y el correspondiente valor de oxígeno utilizado, visto desde el consumo de ácido sulfúrico y de sulfato.	76
Tabla 14: Estimación del requerimiento de oxígeno desde el rendimiento de producción.....	76
Tabla 15: Cuadro resumen de publicaciones que entregan información de utilidad para analizar los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación.....	92
Tabla 16: Rendimientos de biomasa por producto, obtenidos directamente como los recíprocos de los valores presentados en la Tabla 11.	92

Tabla 17: Valores de la tasa específica μ en el caso variable de modelación, considerando el crecimiento de arqueas planctónicas, para cada flujo de operación y factor de efectividad descritos en la investigación.	110
Tabla 18: Valores de la tasa específica μ en el caso variable de modelación, sin considerar el crecimiento de arqueas planctónicas, para cada flujo de operación y factor de efectividad descritos en la investigación.	110
Tabla 19: Diferencia (en porcentaje) de la tasa específica μ para el caso variable de modelación, entre los casos de simplificar o no el crecimiento de arqueas planctónicas, para cada flujo de operación y factor de efectividad.....	111
Tabla 20: Primera medición de la concentración de oxígeno solubilizado en el tiempo.	112
Tabla 21: Segunda medición de la concentración de oxígeno solubilizado en el tiempo.	113
Tabla 22: Flujo de oxígeno utilizado y concentración remanente en el seno del fluido para cada valor de estado estacionario y tipo de producto estudiado.	115
Tabla 23: Flujo de oxígeno utilizado y concentración remanente en el seno del fluido para cada consumo obtenido desde el balance de producto, por cada supuesto y tipo de producto.....	115
Tabla 24: Estimación de la relación superficie disponible de perlas/volumen de reacción para el caso de Pacheco (18) y del presente estudio.....	116

Índice de Figuras

Figura 1: Formas alotrópicas del azufre en función de la temperatura	3
Figura 2: Mecanismos indirectos en la biolixiviación de sulfuros	8
Figura 3: Esquema de Rossi para identificar los factores a tomar en cuenta para diseñar un reactor para la Biohidrometalurgia (43).	17
Figura 4: Representación del sistema simulado por Godoy para la biolixiviación de relaves ricos en fosfato (7).....	29
Figura 5: Montaje experimental del reactor batch de producción de ácido sulfúrico.	42
Figura 6: Esquema teórico de montaje del biorreactor batch. Se nombran todos los componentes del sistema.	43
Figura 7: Dimensionamiento del contenedor de vidrio utilizado para el montaje.....	43
Figura 8: Componentes de aireación y agitación.....	44
Figura 9: Montaje experimental del biorreactor en modo continuo de operación.....	47
Figura 10: Diseño teórico del sistema de reacción en modo continuo	48
Figura 11: Imagen de los 4 matraces utilizados para la preparación de inóculos de <i>Sulfolobus metallicus</i> sobre azufre elemental a 67 °C.	54
Figura 12: Imágenes del recuento directo realizado a las arqueas planctónicas, en el microscopio de epifluorescencia, para cuatro cuadrados de cámara.....	58
Figura 13: Imágenes de las perlas de azufre antes (izq) y después (derecha) de la acción bacteriana en el reactor batch	59

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Curva de crecimiento bacteriano.....	12
Gráfico 2: Monitoreo de pH en el tiempo para el biorreactor batch, entre 0 y 456 horas.....	55
Gráfico 3: Generación de ácido sulfúrico en el tiempo, entre 0 y 456 horas.	56
Gráfico 4: Comparación entre el pH estimado por acidez medida en titulación y el pH detectado por el equipo de medición	57
Gráfico 5: Seguimiento de la generación de sulfato por turbidimetría en el tiempo, entre 0 y 288 horas.	58
Gráfico 6: Seguimiento en el tiempo de las arqueas planctónicas	59
Gráfico 7: Curva de crecimiento logarítmica de arqueas en el tiempo	60
Gráfico 8: Respuesta del sistema de reacción al variar el flujo de operación, determinando el estado estacionario para cada flujo al monitorear el cambio de pH en el tiempo.	63
Gráfico 9: Comportamiento del pH según el flujo de operación para cada estado estacionario... ..	64
Gráfico 10: Conteo de células planctónicas según flujo de operación en el estado estacionario.. ..	65
Gráfico 11: Medida de la concentración de ácido sulfúrico en el sistema según flujo de operación en estado estacionario.	66
Gráfico 12: Concentración de sulfato en solución para cada flujo de operación en estado estacionario.	66
Gráfico 13: Resultados de modelación considerando el crecimiento de arqueas planctónicas, para los distintos factores de efectividad evaluados.....	68
Gráfico 14: Resultados de modelación suponiendo que las arqueas planctónicas no crecen en el medio de reacción, para distintos factores de efectividad.	68
Gráfico 15: Curvas de la tasa específica μ al variar el flujo estacionario, para cada factor η_T y considerando el crecimiento de arqueas planctónicas	70
Gráfico 16: Curvas de la tasa específica μ al variar el flujo estacionario, para cada factor η_T y sin considerar el crecimiento de arqueas planctónicas.....	70
Gráfico 17: Regresión aplicada, según Ecuación 45, para encontrar el rendimiento de producción según los 4 valores de acidez que se describieron para cada estado estacionario estudiado.....	72

Gráfico 18: Regresión aplicada, según Ecuación 45, para encontrar el rendimiento de producción según los 4 valores de sulfato que se describieron para cada estado estacionario estudiado.	72
Gráfico 19: Regresión aplicada, según Ecuación 42, para encontrar el rendimiento de producción según los 4 valores de acidez que se describieron para cada estado estacionario estudiado.	73
Gráfico 20: Regresión aplicada, según Ecuación 42, para encontrar el rendimiento de producción según los 4 valores de sulfato que se describieron para cada estado estacionario estudiado.	73
Gráfico 21: Conversión de azufre en el tiempo, monitoreada según acidez (en azul) y por concentración de sulfato presente en la solución del biorreactor batch (en rojo).	82
Gráfico 22: Estados transientes presentados eliminando el ruido experimental del Gráfico 8	86
Gráfico 23: Solubilidad de oxígeno en agua ácida en función de la temperatura, en equilibrio con 1 atm de aire seco	94
Gráfico 24: Primera curva del Método Directo, utilizada para encontrar el coeficiente de transferencia de oxígeno en el biorreactor.	113
Gráfico 25: Segunda curva del Método Directo, utilizada para encontrar el coeficiente de transferencia de oxígeno en el biorreactor.	114

1 Introducción

La minería es actualmente un interesante campo ocupacional para un ingeniero de procesos. En particular, la búsqueda de nuevas fuentes minerales y procesos de obtención que sean compatibles con un desarrollo sustentable, desde los puntos de vista económico, social y ecológico (1), es un desafío interesante para aplicar los conocimientos adquiridos en las carreras de Ingeniería Civil Química y en Biotecnología. Los resultados de dicha labor pueden contribuir positivamente tanto para la economía, las ciencias y el desarrollo tecnológico de un país o región, además de generar valor para las empresas mineras, las cuales presentan esta idea como motor de innovación y desarrollo.

El informe de tesis que se presenta a continuación recoge algunas de las temáticas anteriores, detallando el estudio de un nuevo proceso de obtención de ácido sulfúrico a partir de la acción oxidativa de organismos procariontes sobre azufre. Este método tiene la opción de ser aplicado a la industria minera, particularmente guiado a la recuperación de fosfatos.

1.1 Antecedentes Generales

1.1.1 El fosfato y el ácido sulfúrico

1.1.1.1 Mercado creciente de fosfatos

El fósforo es un elemento químico (símbolo P) perteneciente al grupo 5A en la Tabla Periódica, de número atómico 15 y masa molar 30,97 [gr/mol] (2), que fue descubierto en 1669 por Hennig Brandt. Desde entonces, se ha obtenido desde varias fuentes, como son la orina, ceniza de huesos y, hacia 1890, desde rocas fosfóricas (3).

El continuo interés en encontrar nuevas fuentes de fósforo se debe a que este elemento está implicado en varias aplicaciones vitales de agricultura y la vida en general, principalmente en su forma de fosfatos. En particular, se estima que el desglose de la demanda actual de fosfatos arroja un 82% utilizado para fertilizantes, un 7% para comida animal y un 1 a 2% como aditivo. Los porcentajes restantes se distribuyen entre detergentes, tratamiento de metales y otras aplicaciones industriales (4).

Siguiendo este detalle, se requiere que las mejoras alcanzadas en agricultura (como resultado de la continua investigación y al desarrollo genético de las plantas) deban ser compensadas con una mayor cantidad de fertilizantes que aseguren la alimentación actual y futura (humana y animal) (5), lo que requiere una obtención sustentable de fosfatos.

Por lo anterior, los países con alta demanda de estos compuestos debiesen contar con una continua evaluación de nuevas fuentes y procesos de obtención. Dichos países están conformados

en un 65% por China, India, Estados Unidos y Brasil. En el caso brasileño, la evaluación planteada se requiere más aun considerando que también forma parte de los países con reservas importantes de fosfatos, pero en baja escala comparada con aquellos de gran disponibilidad (4).

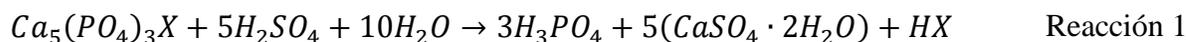
La minera brasileña VALE, que cuenta con la mayor producción de fosfatos para nutrientes en Brasil, además de ser una de las más grandes empresas mineras a nivel mundial (6), está interesada en resolver el dilema planteado. Particularmente, estudios previos de la compañía muestran que ciertos relaves generados de sus actividades mineras poseen fosfato en cantidades interesantes para su recuperación.

A partir de esa información, se ha solicitado la colaboración del Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología de la Universidad de Chile para que, a través de su Laboratorio de Biohidrometalurgia, pueda desarrollar un estudio técnico sobre la posibilidad de recuperar el fósforo presente en los relaves de la empresa, específicamente aquellos que provienen de la minería del hierro.

1.1.1.2 Obtención tradicional de fosfatos

La materia prima desde la cual se abastece la industria química actual de fosfato es fundamentalmente un mineral basado en fosfato de calcio que se encuentra naturalmente en distintos yacimientos, llamada fosforita. Dicho material es un amorfo de la fórmula general $Ca_5(PO_4)_3X$ (X puede sustituirse por F, Cl⁻ u OH⁻), que permite clasificar a las apatitas¹ (7).

Los procesos que se aplican a la roca de fosforita sirven para obtener fósforo elemental y ácido fosfórico. En el caso del fósforo elemental, se utiliza una reducción de la roca con coque y sílice (arena) en hornos eléctricos a 1300°C, temperatura necesaria para que se obtengan vapores que, a posteriori, son condensados y purificados. Por su parte, el ácido fosfórico se produce masivamente cuando la roca es atacada con un ácido (sulfúrico, clorhídrico o nítrico) en presencia de agua. Se prefiere el ácido sulfúrico pues el sulfato cálcico que se forma (Reacción 1) es mejor agente insoluble en agua, y por ende, más fácil de separar (7).



Esta reacción depende fundamentalmente de la cantidad de rocas fosfáticas y del ácido sulfúrico disponible en la planta de tratamiento. Además, dicho sistema aventaja a los antiguos procesos de preparación que usan calor, debido a los altos costos energéticos de estos últimos (7).

¹ La fosforita difiere de las apatitas en que la primera presenta calcio parcialmente sustituido por magnesio, hierro y aluminio, mientras que el grupo (PO₄) se cambia parcialmente por (SiO₃), (CO₃) o uranato (U₂O₇). Como impurezas aparecen, además de materia orgánica, arcillas, caliza y sílice principalmente. Todos estos elementos conforman una roca fosfórica (o phosphate rock).

1.1.1.3 Azufre e industria actual del ácido sulfúrico

El azufre es un elemento químico (de símbolo S) perteneciente al grupo 6A en la Tabla Periódica, de número atómico 16 y masa molar 32,07 [gr/mol] (2). Es comercialmente recuperado en las minas de sal, producido por reducción bacteriana en depósitos sedimentarios de sulfato (8). También el azufre puede ser encontrado en el yeso, en diversos sulfuros minerales como la piritita (FeS_2) y en el gas natural como H_2S , SO_2 y otros compuestos (8).

Existen varias formas alotrópicas del azufre, entre las que se destacan la forma rómbica y la forma monoclinica. El azufre rómbico es el más estable termodinámicamente, presentando una forma anular S_8 plegada. Esta variedad de azufre se caracteriza por ser un sólido amarillo, insípido e inodoro. Si se calienta, se transforma poco a poco en azufre monoclinico (punto de fusión a 119°C), el cual también presenta unidades S_8 (9). Esta información y otras estructuras del azufre se observan en la Figura 1.

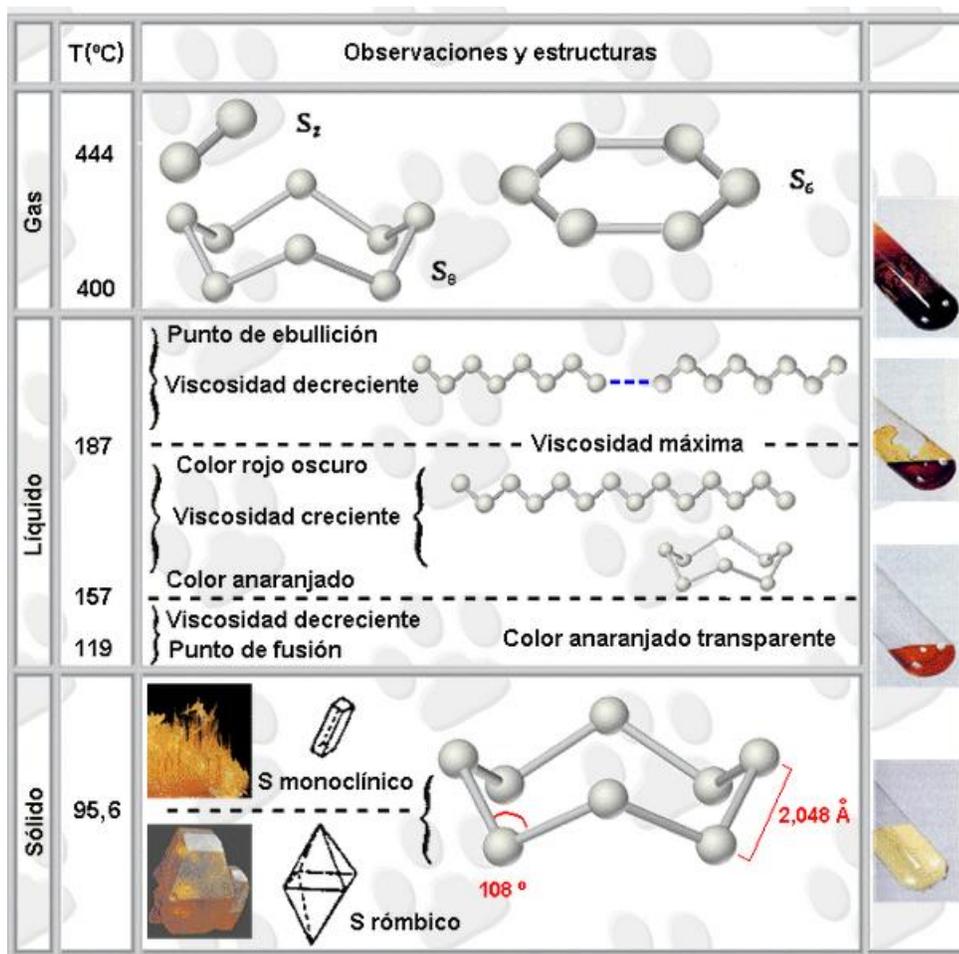


Figura 1: Formas alotrópicas del azufre en función de la temperatura. Si es sólido forma anillos de ocho átomos de azufre (rómbico y monoclinico). Al aumentar la temperatura, se rompe la estructura cíclica y forma cadenas (estado líquido). Cuando es gaseoso, se observan moléculas de S_8 , S_6 , S_4 o S_2 dependiendo de la temperatura (10).

Entre los usos del azufre se destacan la fabricación de pólvora, la vulcanización del caucho natural, producción de fungicidas y fertilizantes. Sin embargo, su principal utilidad yace en la síntesis de ácido sulfúrico, uno de los productos químicos más importantes de la industria (8).

Este ácido es un líquido viscoso, incoloro e inodoro, que se caracteriza por su fuerza ácida y fácil disolución en agua formando iones hidrógeno y sulfato, liberando además gran cantidad de calor. El ácido sulfúrico se utiliza actualmente en variados campos, como son la producción de ácido fosfórico y fertilizantes (32%); síntesis química básica, pigmentos e industria del petróleo (58%); extracción de metales, junto a su refinado y procesamiento (2%); baterías (0,8%); y otros usos industriales como en pulpas y papel (7%) (7).

El ácido sulfúrico se produce actualmente en un proceso que se puede simplificar en tres etapas principales (11):

a) Producción de dióxido de azufre

El azufre elemental es fundido a 140 °C, se añade cal al medio para reducir la acidez, luego filtrado para remover impurezas y así es quemado en exceso de aire seco. De esta forma, se obtiene una mezcla de aire y dióxido de azufre, que vuelve a ser filtrada. La reacción que representa la formación de dióxido se presenta a continuación:



b) Conversión a trióxido de azufre

En esta etapa, el dióxido de azufre se convierte a trióxido gracias a un catalizador. La Reacción 3 describe este proceso:



El catalizador utilizado es una mezcla de pentóxido de vanadio y sulfato de potasio en una base de silicio, formando un soporte poroso por donde circula el reactivo gaseoso.

c) Formación de ácido sulfúrico

El trióxido resultante de la etapa anterior se circula en una torre de absorción, donde reacciona a contracorriente con agua para producir el ácido sulfúrico. La reacción que se produce se describe como:



Aun cuando la tecnología de producción de ácido sulfúrico ha sido mejorada en los últimos años, este tipo de procesos no logran capturar todas las emisiones que producen. De hecho, actualmente se encuentran en operación antiguas tecnologías de producción en países donde las regulaciones son significativamente menos exigentes, como en algunas regiones de Sudamérica, el sur de África y China. Se espera que en el futuro las presiones medioambientales cambien este escenario, momento en el cual se requerirá una inversión muy grande en modernizar dichas plantas (12).

Por lo tanto, es importante desarrollar nuevos métodos y tecnologías para producir ácido sulfúrico, con el fin de eliminar los riesgos actuales de contaminación que se asocian a la industria actual. En particular, la producción sustentable de fosfatos desde una roca fosfórica, proceso que requiere un uso continuo de ácido, debería considerar una tecnología compatible a este objetivo.

1.1.2 La Biolixiviación: una solución sustentable

1.1.2.1 Conceptos iniciales

El proceso físico y químico conocido como lixiviación es un método en el cual un constituyente de interés es recuperado a partir de un sólido, gracias a la acción de un agente lixivante disuelto en un medio líquido (13). Según esta definición, la obtención de ácido fosfórico a partir de rocas fosfáticas, según la Reacción 1, es una lixiviación química en donde el ácido sulfúrico es el agente lixivante, el sólido a solubilizar es la roca fosfática, y los fosfatos son los componentes que interesan ser recuperados. Este proceso requiere un uso continuo de ácido, lo cual requiere tratar con los problemas relacionados a la contaminación causada por las plantas actuales de producción de ácido sulfúrico y el transporte de ácido (falta de infraestructura para su traslado), entre otros (12) (14).

Por ende, se ha planteado la biolixiviación como alternativa para los procesos de tratamiento mineral convencional, lo cual involucraría para las empresas una disminución en los costos por compra de ácido sulfúrico, evitando además los problemas de contaminación asociados a su producción y anulando el efecto del transporte (15).

En el campo de la minería biológica (o biominería), la biolixiviación se entiende como el proceso en el cual una especie química de interés es extraída de un mineral gracias a la acción directa o indirecta de microorganismos (16). En el caso de la biolixiviación de fosfatos, la acción de los microorganismos es indirecta ya que se basa en la producción biológica de ácido sulfúrico, que permite posteriormente la solubilización de la roca fosfática.

Esta nueva idea de procesamiento de minerales, estudiada para una gran variedad de microorganismos acidófilos autótrofos y heterótrofos, es un campo de gran interés para los sectores mineros y especialmente de agricultura, en los cuales se busca investigar la eficacia real y el potencial agronómico que presenta la solubilización de la roca fosfática como fuente de fósforo para ser usada en biofertilización (17).

1.1.2.2 Biooxidación del azufre

La generación de ácido sulfúrico, gracias a la acción catalítica de microorganismos, se enmarca en un concepto conocido como biooxidación, el cual se puede describir como una componente del proceso de biolixiviación que ocurre cuando un mineral de interés no puede ser solubilizado directamente por los microorganismos. No obstante, se facilita la recuperación del mineral mediante la solubilización de la matriz en la que se encuentra atrapado (18) (19). En las secciones siguientes, tal como ocurre en la bibliografía consultada, se utilizan los términos biolixiviación/biooxidación de azufre para explicar el mismo fenómeno de manera indistinta.

Según esta definición, se pueden mencionar dos casos que se desarrollan en la actualidad (14). El primero es la biooxidación de minerales refractarios de metales preciosos (como el oro), en donde se busca la liberación de las partículas desde las matrices de pirita o arsenopirita donde se encuentran, facilitando su tratamiento posterior (cianuración, entre otros) (20). El segundo lo constituye la acción bacteriana sobre minerales sulfurados y/o azufre elemental, permitiendo su conversión a sulfato en solución ácida.

Sobre estos casos, se han presentado numerosas publicaciones en revistas, libros (21) (22) y simposios (en las distintas reuniones de la International Biohidrometallurgy Symposium) (23), en donde se muestra su factibilidad técnica y económica, lo cual ha permitido desarrollar actualmente diversos procesos para la recuperación de oro, cobre y níquel, con perspectiva futura de generar biooxidación y biolixiviación de una amplia gama de sulfuros de cobalto, galio, molibdeno, ente otros (24).

Dentro de los estudios de biooxidación, se han presentado varios reportes sobre la posibilidad de utilizar azufre elemental como fuente de producción de ácido sulfúrico, en los cuales se menciona el tipo de interacción que presentan distintos microorganismos con las partículas de azufre (25) (26), la importancia de diferentes estructuras de azufre para su posterior conversión (27), e incluso cómo se puede aprovechar la biooxidación de azufre para la lixiviación posterior de minerales de hierro ricos en fosfato (15).

Al respecto, se han desarrollado diversos trabajos de investigación en el Laboratorio de Biohidrometalurgia de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile. En ellas, se han abordado hipótesis que buscan comprender la actividad biooxidativa sobre el azufre elemental y otros compuestos sulfurados, como pirita y calcopirita. En el caso del azufre, se han analizado distintas cinéticas de crecimiento para ciertos tipos de microorganismos, estableciendo los mecanismos de reacción en cada sistema (18) (19). Lo anterior permite establecer de manera preliminar la factibilidad técnica de producir ácido sulfúrico gracias a la actividad oxidativa de microorganismos que son típicamente relacionados a la minería.

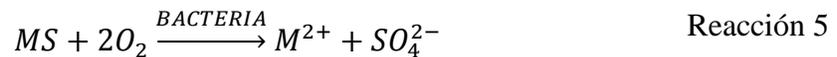
1.1.2.3 Mecanismos de biolixiviación

La definición para biolixiviación de un mineral menciona que la acción de los microorganismos puede efectuarse de manera directa o indirecta. Estas opciones son debatidas actualmente entre la comunidad científica, pues existen varios estudios que apoyan una u otra alternativa, o incluso una ocurrencia simultánea (16) (28). A continuación se describen dichos mecanismos:

a) Mecanismo Directo

Es aquel donde la liberación de la especie de interés se realiza gracias al contacto físico de las bacterias con el mineral, lo cual permite una catálisis enzimática directa para las reacciones involucradas (16).

Según esta explicación, el microorganismo se adhiere a la superficie del mineral y lo ataca enzimáticamente, generando un transporte de electrones desde la parte reducida del mineral, por ejemplo un sulfuro (de fórmula MS), hasta el oxígeno disuelto en el medio. Por ende, la reacción general que identifica este proceso sería (16):

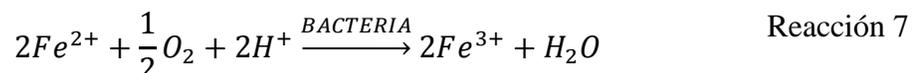
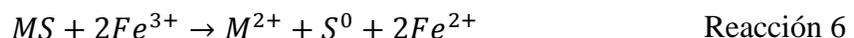


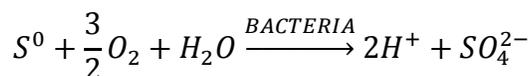
Existen evidencias que demuestran el contacto directo con el mineral. Sin embargo, aún no se comprende en su totalidad el mecanismo de adhesión y la iniciación de la solubilización. Por ejemplo, se ha observado que el microorganismo no ataca la superficie total que limita al mineral, sino que prefiere ciertas zonas que presentan imperfecciones cristalinas, pero no se tiene explicación concreta para esta direccionalidad (29).

b) Mecanismo Indirecto

Es aquel donde se ejecutan reacciones químicas, enzimáticas o no enzimáticas, no existiendo un contacto físico entre los microorganismos y el mineral a solubilizar, aunque estos juegan un rol clave en la formación de reactivos que forman parte en la liberación de la especie de interés (16).

Una diferencia importante para distinguir a este mecanismo del mencionado en el punto a) es que la acción indirecta considera la acción de iones férricos sobre el mineral sulfurado (MS). De esta manera, se forman iones ferrosos y azufre elemental que posteriormente son oxidados biológicamente. Las siguientes reacciones (en serie) caracterizan al mecanismo indirecto (16):





Reacción 8

De lo anterior, se pueden destacar a los iones férricos y/o el ácido como los verdaderos agentes lixiviantes (permiten la solubilización del metal de interés), mientras que el azufre y el oxígeno son los encargados de su regeneración en solución.

Sand y sus colaboradores (30) han profundizado la información acerca del mecanismo indirecto, gracias a estudios realizados sobre las estructuras cristalinas de los minerales a lixiviar. Estos trabajos permiten explicar la formación de compuestos intermediarios detectados en sus ensayos, y cómo la descripción de orbitales moleculares de cada cristal mineral influye en el camino de reacciones químicas que estos siguen hasta su disolución.

Estos caminos, que explicarían el mecanismo indirecto, son conocidos como “mecanismo vía tiosulfato” y “mecanismo vía polisulfuro”. El primero explica la lixiviación de minerales como la pirita, molibdenita y wolframita; el segundo, habla sobre la reactividad de otros tipos de sulfuros, tales como calcopirita ($CuFeS_2$), esfalerita (ZnS) y galena (PbS) (16). La principal diferencia entre una y otra vía, además del tipo de cristal que presenta el mineral, es que en el primero los minerales sólo pueden ser atacados por un oxidante (como el Fe^{3+}), mientras que en el segundo también pueden ser atacados por ácidos, lo cual guía cada serie de reacciones posteriores, permitiendo así la formación de diferentes intermediarios de reacción, tal como se indica en los nombres de las vías. A continuación se presenta un esquema de lo anterior:

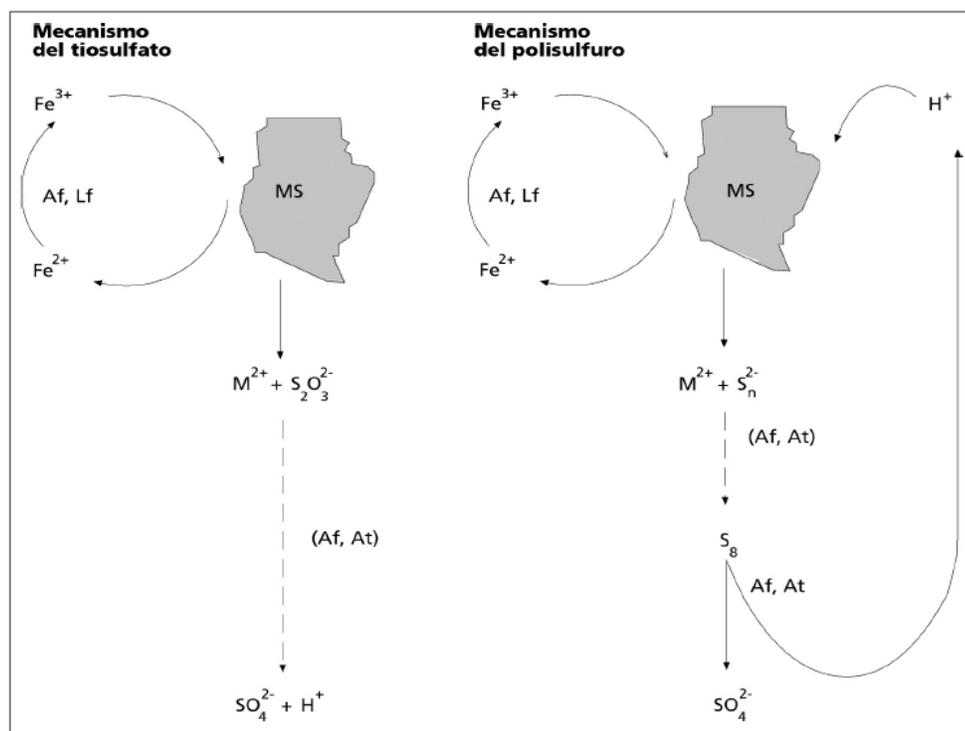


Figura 2: Mecanismos indirectos en la biolixiviación de sulfuros. En la figura se pueden apreciar los dos mecanismos planteados, en los cuales un sulfuro mineral de interés (MS) bajo la acción de microorganismos como *A. ferrooxidans* (*Af*), *L. ferrooxidans* (*Lf*) y *A. thiooxidans* (*At*), puede ser lixiviado hasta alcanzar una forma soluble tanto del mineral (M^{2+}) como del azufre (SO_4^{2-}) (16).

c) Lixiviación cooperativa

Un tercer mecanismo que se ha planteado en los últimos años es la lixiviación cooperativa, en la cual se generan los dos mecanismos anteriores: actúan células adheridas a la superficie del mineral, y otras que se encuentran libres en el medio líquido. Así, un conjunto de células pueden lixiviar compuestos con azufre y, al encontrarse adheridas, liberan al medio especies químicas portadoras de energía para las bacterias que se encuentran suspendidas en el líquido, las que permiten mantener el sistema en constante actividad (16).

1.1.2.4 Microorganismos para biolixiviación

Los microorganismos que permiten la biolixiviación en minería se desarrollan en ambientes acuosos, ligados a las propias minas, que se caracterizan por presentar un bajo pH, altas concentraciones de metales y, en ocasiones, por elevadas temperaturas. En estos medios viven y se reproducen ciertos microorganismos con características únicas, que utilizan las especies reducidas de azufre y ciertos metales en solución como fuente primaria de energía, obteniéndose así la recuperación de especies químicas valiosas (31).

A partir de las condiciones del medio de crecimiento, los microorganismos utilizados en biolixiviación pueden clasificarse en cuatro tipos (31):

a) Microorganismos mesófilos

Este tipo de bacterias presentan un rango de temperatura para su crecimiento entre los 25°C a 40°C, existiendo tanto organismos autótrofos (con CO₂ como fuente de carbono) como heterótrofos (que obtienen carbono de fuentes orgánicas) y mixotróficos (combinación de los comportamientos anteriores) (24).

Estas bacterias son sencillas en cuanto a sus requerimientos de subsistencia y generación de biolixiviación. Una muestra de mineral en agua acidulada, con un buen sistema de aireación asociado, es suficiente para que el crecimiento se favorezca, pues todos los elementos químicos necesarios ya se han entregado al sistema (24).

Entre las especies más utilizadas en estudios y en la industria actual se consideran a *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*. En la Tabla 1 se presentan algunas características de estos tres microorganismos mesófilos:

Tabla 1: Características de algunas especies de microorganismos mesófilos típicos en la industria (24).

Microorganismo	Tamaño y forma	Rango de T (°C)	pH	Fuente energía
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	0,3-0,5 x 1-1,7 [µm] Bacilo	5 – 40 30-35 óptimo	1,2 – 6,0 Óptimo: 2,5 – 3,0	Oxida Fe ²⁺ y S ⁰
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	0,5 x 1,2 [µm] Bacilo	10 – 40 30 – 35 óptimo	0,5 – 6,0 Óptimo: 2 – 3,5	Oxida S ⁰ , no a Fe ²⁺
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	0,2-0,4 x 0,9-1,1 [µm] Espirilo	20 – 45 30 – 35 óptimo	1,2 – 4,5 Óptimo: 2,5 – 3,0	Oxida Fe ²⁺ , no a S ⁰

b) Microorganismos termófilos moderados

Se desarrollan en ambientes ácidos y a temperaturas entre los 45°C a 55°C (32). Han sido aisladas, sobre todo, a partir de sistemas de lixiviación de cobre. El microorganismo más representativo de los termófilos moderados descubiertos ha sido la especie *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Algunos datos de interés sobre esta especie se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Principales características de la especie termófila moderada *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (19) (24).

Tamaño [µm] y forma	Fuentes de energía		pH (pH óptimo)	Rango de T (T óptimo) (°C)
0,6-0,8 x 1,0-3,0	Quimiolitótrofa Sulfuros minerales, S ⁰ , Fe ²⁺	Heterótrofa	1,1-5,0 (1,7-2,4)	20-60 (40-55)
Cilíndrica		Extracto de levadura, glucosa, glutamato		

c) Microorganismos termófilos extremos

Estos microorganismos se desarrollan en ambientes con temperaturas entre los 55°C y 90°C, en los cuales pueden desarrollarse de forma autótrofa y heterótrofa. Bajo la primera condición, catalizan la oxidación de azufre elemental, Fe⁺² y minerales de azufre reducido (24).

Los termófilos extremos entregan altas velocidades de biolixiviación, en especial cuando la concentración de sólidos o la densidad de pulpa son bajas. En general, estos microorganismos presentan como desventaja su sensibilidad a fuerzas que las presionen (atracción debido a una

pared celular que no es rígida), lo que obliga a utilizarlas en procesos de biolixiviación tales como reactores con agitación continua, con densidades de pulpa menores que las utilizadas con microorganismos termófilos moderados (24).

d) Microorganismos heterótrofos

Además de organismos autótrofos, pueden ser encontrados en ambientes naturales especies heterótrofas relacionadas generalmente con los *Acidithiobacillus*. El papel de estos organismos es incierto, aunque se conoce su importancia en la destrucción de ciertos compuestos orgánicos perjudiciales para el desarrollo de los autótrofos (31).

Los organismos heterótrofos que se encuentran implicados en la degradación mineral podrían ser clasificados por su resistencia y capacidad de sobrevivir bajo condiciones muy diversas. Sin embargo, aún se presenta desconocimiento acerca de sus mecanismos metabólicos para reaccionar en los procesos de lixiviación. Por lo tanto, están lejos de ser utilizados en la escala industrial (31).

1.1.2.5 Características de *Sulfolobus metallicus*

Sulfolobus metallicus es una especie reconocida y estudiada desde 1991, cuando fue inicialmente descrita por Huber y Stetter (33). Las características observadas resultaron en una arquea termófila extrema gramnegativa, con una estructura tipo coco irregular, de alrededor de 1,5 [µm] de ancho. Este microorganismo es un miembro del orden de las *Sulfolobales*, y es una arquea aeróbica estricta y quimiolitautótrofa obligada de minerales sulfurosos como la pirita, esfalerita, calcopirita y azufre elemental. Presenta crecimiento entre 50 y 75 °C, en rangos de pH entre 1.0 a 4.5 y de salinidad entre 0 a 3% de NaCl.

Pacheco (18) describe las condiciones óptimas de crecimiento para esta especie usando los datos presentados en la Tabla 3.

Tabla 3: Características de *Sulfolobus metallicus*. La tasa específica de crecimiento presentada corresponde a un rango de valores obtenidos por Nemati *et al* (34) para el crecimiento de esta arquea en pirita.

Género	Especie	Temperatura óptima (°C)	pH óptimo	Tasa específica de crecimiento (h ⁻¹)
<i>Sulfolobus</i>	<i>metallicus</i>	68	1,8	0,018 – 0,025

1.1.2.6 Etapas del crecimiento celular

En un típico proceso batch, como el cultivo en matraces y reactores bien agitados operando en dicha condición, el número de células vivas varía en forma distinta con el tiempo. Primero se tiene una fase de adaptación de las células a su nuevo entorno de cultivo, conocida como “fase lag”, donde no se incrementa el número de células. Después de esto, se observa un periodo de rápido crecimiento, el que se describe como “fase exponencial”, y donde las células crecen a la misma tasa (conocida como tasa específica de crecimiento, μ), además de contar con un metabolismo constante y condiciones equilibradas de crecimiento (35). A continuación se muestra la expresión que identifica a la fase exponencial:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Ecuación 1}$$

En ella se utilizan

- X : Concentración de células (cel/mL).
- t : Tiempo de medición (h).
- μ : Constante específica de crecimiento celular (h^{-1}).

Como es de esperar, en un ambiente cerrado las células no pueden crecer de manera indefinida. Se observa entonces una “fase estacionaria” en el desarrollo celular cuando se acaban las fuentes de energía y/o se acumulan sustancias que inhiban al crecimiento celular. Si el cultivo no puede recuperar una nueva tasa para crecer, se observa una “fase de muerte” que presenta un súbito descenso en la población, resultando exponencial (35). Este comportamiento se puede observar en el Gráfico 1.

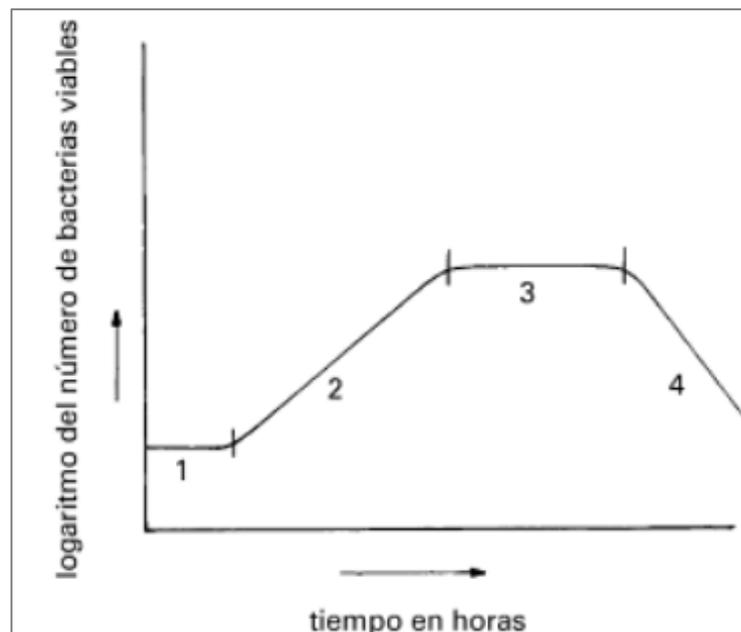


Gráfico 1: Curva de crecimiento bacteriano. 1: fase de latencia (lag). 2: fase logarítmica. 3: fase estacionaria. 4: fase de muerte (36).

En el caso de un crecimiento en un reactor continuo perfectamente agitado (CSTR), sólo un parámetro es requerido para caracterizar la población celular (μ). Es importante mencionar que una aproximación razonable de un crecimiento balanceado se encuentra entonces en la fase exponencial. Consecuente con este hecho, los datos cinéticos que puedan obtenerse de un experimento de crecimiento en modo batch son importantes para centrar las condiciones de operación continua en torno a la fase exponencial de interés (35).

1.1.2.7 Factores que afectan el desarrollo de microorganismos

Varios son los factores que intervienen en la mantención y crecimiento de los cultivos celulares, los cuales pueden extenderse al nivel de producción industrial (31).

a) Tolerancia a los metales

La concentración de metales que puede soportar un microorganismo depende claramente de cada cepa utilizada, aunque aún faltan datos concretos para realizar clasificaciones entre especies. No obstante, son conocidas ciertas cantidades nocivas de metales en solución (31).

Un punto clave para determinar la tolerancia de una especie por sobre otras, es el periodo de adaptación que presentan (fase lag), el cual permite detectar especies que tienen chances de sobrevivir en presencia de metales nocivos.

Estudios desarrollados en *A. ferrooxidans* han demostrado que ciertos elementos como el níquel o el ion uracilo inhiben tanto la oxidación del hierro como la fijación del CO₂, por lo que afectan la producción de enzimas y/o producción del ATP. Esta toxicidad normalmente suele disminuir conforme el pH disminuye, pues se alteran los sistemas de interacción microorganismo/metal.

b) Concentración de iones hidrógeno y potencial electroquímico

La oxidación biológica es altamente dependiente del movimiento de protones y electrones, por lo que es importante conocer las condiciones de pH y potencial electroquímico (Eh) del sistema.

Con respecto al pH, se ha encontrado una cota máxima de 3,0 para que exista crecimiento inicial de los microorganismos (37). Si ya se ha iniciado el crecimiento (bacterias ya adaptadas), esta cota puede aumentar a 6,0 para sobrevivir (en *A. ferrooxidans*) (24). Por otro lado, se ha fijado un límite inferior de 1 para un adecuado desarrollo celular y biolixiviación, pues bajo este valor se observa inhibición del crecimiento, lo que implica un bajo rendimiento de la operación (18) (38).

Por su parte, la oxidación de especies reducidas depende del movimiento o transferencia de electrones, por lo que el potencial eléctrico influye en el metabolismo de la bacteria. De esta manera, la medida del potencial es un indicador de la actividad microbiana: mientras mayor sea el potencial medido en solución, mayor será la actividad microbiana (37).

c) Nutrientes

Se requieren de manera crucial para el desarrollo de los microorganismos. Por ejemplo, el magnesio es necesario para la fijación del CO₂, fósforo se requiere para el metabolismo energético, azufre para la formación de algunos aminoácidos, nitrógeno en forma de amoníaco es vital para el crecimiento de *Acidithiobacillus*, etcétera. De hecho, se conoce que naturalmente las bacterias lixiviantes viven en comunidad con otras especies, intercambiándose los nutrientes suficientes para el desarrollo de cada colonia.

Además de los elementos mencionados (N, P, Mg y S), los microorganismos requieren otros como potasio (K) y calcio (Ca), aunque en cantidades reducidas.

d) Oxígeno y dióxido de carbono

Estos gases son fundamentales para el desarrollo de la comunidad microbiana y de la biolixiviación como tal. En el medio ácido donde se llevan a cabo las reacciones, la solubilidad de O₂ y CO₂ es baja, y se requiere entonces una alta tasa de transferencia de materia, permitiendo que este factor no sea el controlante del sistema de reacción. Por ende, en la mayoría de los casos se suministra al sistema aire mediante burbujeo.

e) Temperatura

Existen dos factores importantes que compiten según rangos de temperatura: el aumento de la velocidad de reacción cuando aumenta la temperatura, y el incremento en la muerte de los microorganismos a causa de la desnaturalización de sus proteínas constituyentes. Acercándose al límite viable, este último efecto resulta dominante, observando una reducción en la capacidad de biooxidación del sistema, llegando al nivel de muerte celular.

Por lo anterior, la alternativa de utilizar organismos con capacidad para oxidar las especies de interés a altas temperaturas (termófilas extremas) resulta prometedora, pues así se obtienen altas velocidades de biolixiviación (18).

f) Tamaño de partícula

No se conoce a cabalidad la química de superficies detrás de la biolixiviación. El tamaño de las partículas resulta crítico, como por ejemplo en la lixiviación en pilas, donde se pueden requerir varios años antes de alcanzar los productos del interior de la roca.

Se conoce que uno de los requerimientos esenciales para llevar a cabo las reacciones de interés es la disponibilidad de sustrato. Se ha mostrado que partículas con fracciones de tamaño más pequeñas facilitan la actividad bacteriana, lo cual tiene sentido si se considera la relación entre la

concentración de sustrato, el tamaño de partícula y la superficie expuesta al ataque de microorganismos.

En este sentido, a medida que el tamaño de partícula se reduce, aumenta el área superficial específica y el área total de reacción, sin necesidad de aumentar la cantidad de sustrato por ingreso de más material al sistema. Altas concentraciones de mineral traen consigo el peligro de un cambio también en la densidad de la solución, lo que puede complicar la transferencia de gases y materia en la zona de reacción.

1.1.2.8 Aplicación industrial de la biolixiviación

Se conoce la práctica de la biolixiviación desde hace siglos, llevada a cabo aun sin la información sobre los microorganismos ni procesos participantes (24), haciendo de esta práctica un tema netamente empírico para los artesanos de la época (20). Sin embargo, en 1947 Colmer y Hinkler (39) aíslan a *Acidithiobacillus ferrooxidans*, dando comienzo a una nueva era de investigación sobre la biolixiviación de distintos minerales, como el hierro y el cobre.

Por otro lado, a comienzos de los años setenta empezaron a visualizarse diversos problemas con la producción convencional de los procesos mineros. La metalurgia extractiva vio incrementado sus costes de energía y mano de obra, la ley de las menas en operación estaba bajando y no existía una mayor disponibilidad de nuevas reservas (24).

Desde entonces fue necesaria la búsqueda de nuevas materias primas para la minería. Los sulfuros metálicos, que presentan importantes reservas a nivel mundial, han sido fuente de numerosa investigación hasta la actualidad. Como ventaja para su extracción, se puede decir que estos minerales son fácilmente concentrables, mientras que el azufre constituyente entrega parte de la energía necesaria para la obtención del metal (24).

Sin embargo, los procesos en los cuales convencionalmente se tratan estos sulfuros presentan algunas desventajas que no permiten su sustentabilidad. Por ejemplo, los procesos pirometalúrgicos son altamente contaminantes por sus emisiones de SO₂, lo cual trae como consecuencia un aumento en la polución por lluvia ácida (24).

Debido a las regulaciones ambientales, surgió entonces el proceso hidrometalúrgico como una solución novedosa al dilema anterior. No obstante, también se presentaron desventajas en el procesamiento de sulfuros, y que afectan el desarrollo y la implementación de estos procesos, como el consumo elevado de reactivos lixiviantes (como ácido sulfúrico), altas presiones y/o temperaturas que se requieren, y los costos por molienda que deben anteceder a la operación (24).

En este escenario, se propuso utilizar la información creciente sobre los microorganismos que participaban en la biolixiviación, para su utilización a escala industrial. El uso comercial de este proceso tuvo como punto de partida la década de los ochenta, época en la cual ya se encontraban en operación 12 plantas de lixiviación in situ y pilas de lixiviación en varios países del mundo, y con importantes producciones anuales, principalmente de cobre (24). Un ejemplo de este trabajo es el caso de la mina Lo Aguirre, en Chile, donde se procesaban alrededor de 16.000 toneladas/día en pilas, entre 1980 y 1996 (20).

En la misma década de los ochenta también se desarrollaron múltiples avances en el estudio de los microorganismos participantes, desde su genética y microbiología hasta el diseño de reactores de biolixiviación de cobre y biooxidación de materiales refractarios (24). En este caso, el uso del proceso BIOX en la Fairview Mine en Sudáfrica (1986) fue la primera aplicación comercial del uso de reactores para biooxidación de minerales refractarios de oro y, a partir de ella, se desarrollaron varios proyectos similares en los años noventa, que siguen en operación hasta la actualidad (ver Tabla 4) (20).

Por varios años se pensó en la biolixiviación utilizando reactores como una tecnología sólo para la recuperación de metales desde minerales de baja ley, relaves de flotación o material de descarte. Hoy en día la biolixiviación es aplicada como el principal proceso en varias operaciones de gran escala (14). En ellas se utilizan reactores continuamente agitados (CSTR) sólo para la biooxidación de minerales refractarios y concentrados, debido a la inversión y gastos operativos de esta tecnología. Esto se espera expandir en el futuro para una gran gama de sulfuros (24).

Tabla 4: Plantas que operan en la actualidad utilizando la tecnología de reactores en modo CSTR (20) (40) (41).

Planta	Año de apertura	Capacidad (ton/día)	Volumen reactor (m³)
Fairview, South Africa	1986	55	1 415
Harbour Lights, Australia	1991	40	980
São Bento, Brazil	1991	300	1 487
Wiluma, Australia	1993	154	4 230
Youanmi, Australia	1994	120	3 000
Ashanti-Sansu, Ghana	1994	960	21 600
Tamboraque, Peru	1998	60	1 570
Beaconsfield, Australia	1999	68	2 310
Laizhou, China	2001	100	4 050

Cada uno de los biorreactores utilizados actualmente se conforma por tanques de acero inoxidable, con agitadores que mantienen los concentrados en suspensión y que aseguren la transferencia eficiente de oxígeno y dióxido de carbono. Una vez que el reactor es inoculado con el(los) microorganismo(s) seleccionado(s), no se requieren inoculaciones adicionales, puesto que el sistema se encuentra continuamente operando. Además de esto, el reactor se complementa con una buena aireación y un eficiente sistema de control de temperatura, por medio de chaquetas externas que transportan agua a diferente temperatura (40).

1.1.3 Diseño de biorreactores en minería

En la sección anterior se han mencionado algunas aplicaciones actuales de la biolixiviación. La construcción de modelos que expliquen el funcionamiento de estos y futuros proyectos se realiza con el objetivo de mejorar el diseño, funcionamiento y control de los procesos, además de permitir un conocimiento suficiente que sea útil para competir con los procesos piro e hidrometalúrgicos actuales (42).

Desde un punto de vista ingenieril, la compleja red de reacciones bioquímicas ligadas a la biolixiviación serían mejor desarrolladas en reactores (14). Por ende, varios tipos de reactores se encuentran en continuo estudio. Rossi (43) presenta un procedimiento esquemático de diseño, basándose en el rendimiento esperado de un reactor de biolixiviación (ver Figura 3). En este planteamiento, se indica una fuerte relación entre el tipo de reactor, datos cinéticos, parámetros característicos de cada sistema y resultados de producción. En particular, su publicación explica el funcionamiento de varios tipos de reactores, siendo mayormente estudiados los reactores tipo tanque agitado y airlift, además de proponer innovadores sistemas de reacción, como por ejemplo los de tipo rotatorio.

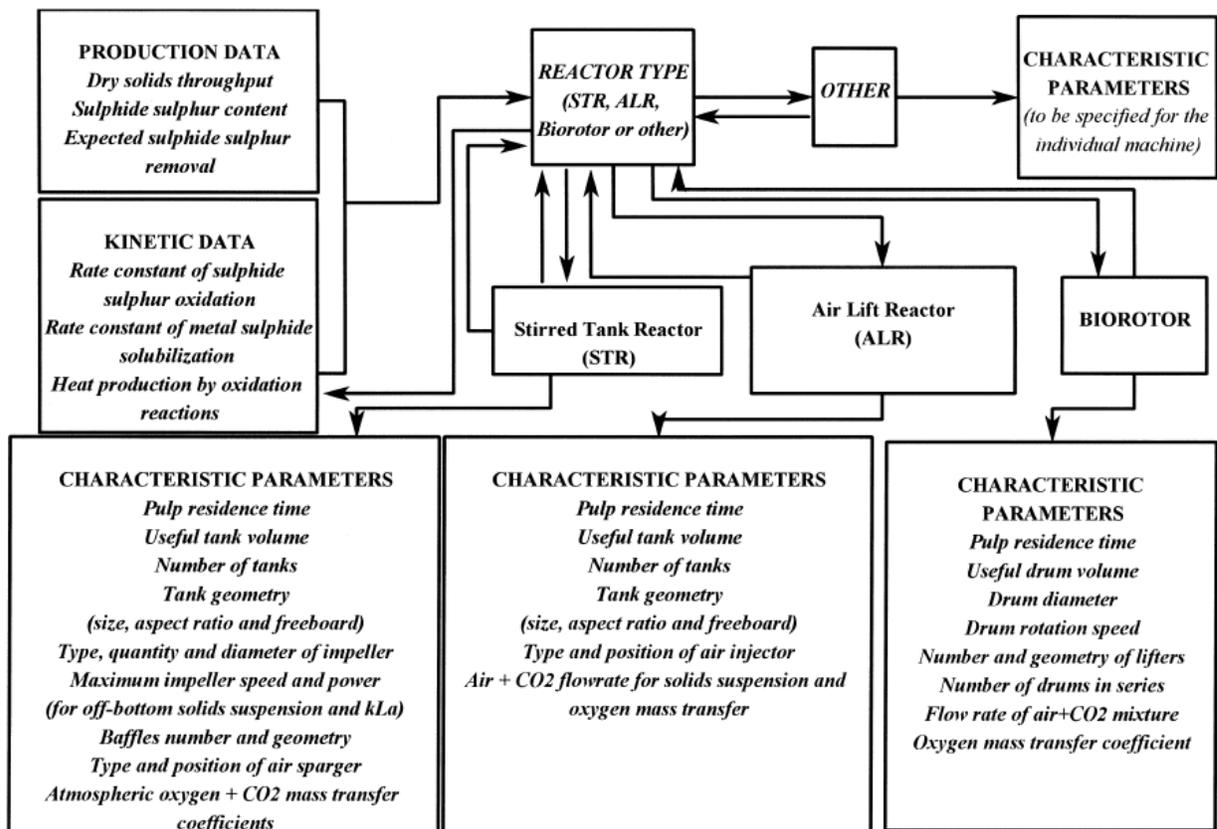


Figura 3: Esquema de Rossi para identificar los factores a tomar en cuenta para diseñar un reactor para la Biohidrometalurgia (43).

Dentro de los reactores tipo tanque agitado, se encuentran los que operan en forma batch y en modo continuo. Debido a los grandes volúmenes de material que se planea procesar a gran escala, la biolixiviación y biooxidación se realizan típicamente en una operación continua, en la cual se busca obtener una alta productividad volumétrica, manteniendo bajo el volumen del reactor (14).

Sin embargo, en comparación con el alto esfuerzo dedicado a la biología, fisiología de los microorganismos y sus cinéticas de crecimiento en matraces, se ha dejado de lado la investigación en torno a los reactores. Según Rossi, los resultados publicados sobre estos para procesos biohidrometalúrgicos sólo representan una pequeña minoría, siendo un 5% del total de investigaciones presentadas en los simposios internacionales del área (43).

1.1.3.1 Ingeniería de un biorreactor: modelación básica

En las aproximaciones modernas requeridas para controlar los procesos en biorreactores, se requieren modelos matemáticos que permitan aproximar el comportamiento de los sistemas en torno a las cinéticas de crecimiento de los microorganismos. Estos modelos son construidos con ayuda de mediciones tomadas durante el funcionamiento del proceso mismo, las que son combinadas con relaciones teóricas que simplifican la complejidad de los procesos celulares y la acción de variados factores medioambientales (44).

Según lo anterior, ciertas suposiciones deben realizarse para simplificar las múltiples variables que se pueden describir en torno al biorreactor. Entre estos supuestos se encuentran (35):

- El mezclado es lo suficientemente bueno (entre agitación mecánica y aireación) para asegurar que la composición en cada fase no varía con la posición dentro del reactor.
- El volumen de reacción al interior del equipo no varía. En otras palabras, el sistema se controla de tal forma que no existen pérdidas de volumen por fugas, evaporaciones, etc.
- Debido a los puntos anteriores, puede suponerse entonces que la cantidad de oxígeno que se encuentra disuelto en el reactor es la misma en todo el volumen de reacción. Esto implica que, si se tiene un sistema de aireación que permite mantener un buen nivel de oxígeno (cercano al nivel de saturación en el fluido), entonces se puede estudiar la cinética celular como un problema independiente de la aireación.
- Análogamente, si se cuenta con un buen mezclado mecánico, puede decirse que la transferencia de calor interna del reactor es eficiente, y cada punto a través del volumen de reacción se encuentra a la misma temperatura.

De esta manera, se puede determinar el funcionamiento ideal de un reactor continuo de biolixiviación según cuatro tipos de balances de masa en torno al volumen de reacción: masa global, biomasa, sustrato principal y producto de interés. A continuación se presenta la modelación completa del sistema, obtenida desde las ecuaciones descritas por Doran (44):

a) Balance de masa global

En primer lugar, se debe tener presente la ecuación general que representa un balance de masa global:

$$\text{entrada} - \text{salida} + \text{generación} - \text{consumo} = \text{acumulación} \quad \text{Ecuación 2}$$

Como la generación y el consumo de materia global sólo se observan en reacciones de tipo nuclear, se pueden despreciar en este balance. Por ende, la expresión anterior se aplica a la masa global del sistema como sigue:

$$F_e \rho_e - F_s \rho_s = \frac{d}{dt} (\rho_s V) \quad \text{Ecuación 3}$$

con

- F_e : Flujo de entrada (mL/min).
- F_s : Flujo de salida (mL/min).
- ρ_e : Suma de densidades de entrada (gr/mL).
- ρ_s : Suma de densidades de salida (gr/mL).
- V : Volumen de reacción (mL).

Lo anterior puede reducirse según los siguientes supuestos:

- Las variables no cambian con respecto al tiempo en estado estacionario.
- La suma de las densidades de entrada y salida con constantes.

Con esto, la expresión anterior se simplifica a:

$$F_e = F_s = F \quad \text{Ecuación 4}$$

Esta sencilla igualdad representa la condición típica de un reactor CSTR.

b) Balance de biomasa

En este caso se puede realizar un balance similar al presentado en la Ecuación 2:

$$\text{entrada cels} - \text{salida cels} + \text{crecimiento} - \text{muerte} = \text{acumulación} \quad \text{Ecuación 5}$$

Debido a la información presentada sobre el modo en que las bacterias/arqueas actúan sobre los minerales (ver sección 1.1.2.3), para fines del modelo se diferencian dos tipos de células: las adheridas al mineral o azufre (de concentración x_A) y las que se encuentran en suspensión, llamadas también planctónicas (de concentración x_S).

Por otro lado, en un biorreactor típico se define un factor de efectividad (η_T), que pondera la dificultad de transferencia de masa debido a la adhesión de los microorganismos al soporte utilizado como fuente de energía²:

$$\eta_T = \frac{\text{velocidad reacción con resistencia transferencia de masa}}{\text{velocidad reacción sin restricción difusional}} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\begin{aligned} \eta_T = 1, & \text{ no existe limitación difusional para la reacción} \\ \eta_T = 0, & \text{ la difusión de reactivos es una gran resistencia para la reacción} \\ \eta_T & \in [0; 1] \end{aligned}$$

Además, se pueden realizar suposiciones que permitan transcribir la Ecuación 5 utilizando los términos antes definidos:

- Salida contiene sólo células en suspensión.
- Tanto células adheridas como planctónicas viven/mueren a la misma tasa (μ y α iguales para arqueas adheridas y en suspensión), ponderada las primeras por la efectividad de transferencia debido a su adhesión.

Así, se obtiene lo siguiente:

$$F x_0 - F x_S + \mu(x_S + \eta_T x_A)V - \alpha(x_S + \eta_T x_A)V = \frac{d}{dt} [(x_S + x_A)V] \quad \text{Ecuación 7}$$

donde

- F : Flujo de operación del reactor (mL/min).
 x_0 : Concentración células en la entrada por unidad de volumen (cel/mL).
 x_S : Concentración células en la salida por unidad de volumen (equivale a las células en suspensión) (cel/mL).
 x_A : Concentración células adheridas por unidad de volumen (cel/mL).
 μ : Velocidad específica de crecimiento celular (h^{-1}).
 α : Velocidad específica de muerte celular (h^{-1}).
 η_T : Factor de efectividad (adimensional).

La Ecuación 7 puede ser reducida agregando supuestos al modelo:

- Las células están en estado estacionario (no existe acumulación).
- La entrada al reactor es estéril ($x_0 = 0$).

² El factor de efectividad total (η_T) se define en reacciones afectadas tanto por la transferencia interna (en este caso la interacción célula/azufre) como externa (capa límite entre el seno del fluido y la superficie de reacción) de materia. Un mayor detalle del significado físico de η_T se obtiene desde el estudio de reacciones heterogéneas (35) (44).

- Velocidad de crecimiento (μ) es mucho mayor a la de muerte, por lo que el valor de α es despreciable.

Debido a esto, la Ecuación 7 se reduce a:

$$F x_S = \mu(x_S + \eta_T x_A)V \quad \text{Ecuación 8}$$

La expresión anterior da cuenta de un crecimiento simultáneo de células adheridas y en suspensión, a una tasa específica que difiere en ambos casos por el factor de efectividad. En el caso de microorganismos que utilizan azufre o sulfuros como fuente de energía, se han referenciado observaciones sobre una posible adaptación de las células suspendidas a compuestos intermediarios de la reacción de oxidación de azufre (posiblemente tiosulfato o sulfitos), en modo batch de operación (45) (46).

Por su parte, se puede reescribir la Ecuación 8 utilizando la definición de factor de dilución, que representa el número de volúmenes que transitan en el reactor por unidad de tiempo:

$$D = \frac{F}{V} \quad \text{Ecuación 9}$$

obteniendo así una expresión para la velocidad μ a partir de:

$$1 + \eta_T \cdot \frac{x_A}{x_S} = \frac{1}{\mu} \cdot D \quad \text{Ecuación 10}$$

Esta ecuación permite encontrar el valor numérico de la tasa específica relacionando parámetros de operación del reactor (D) versus su comportamiento bioquímico ($\frac{x_A}{x_S}$, η_T).

Un caso particular de estudio del sistema se basa en ignorar el crecimiento de arqueas planctónicas, suponiendo que dichas células no obtienen los compuestos intermediarios que requerirían como posibles fuentes de energía, debido a la operación continua del reactor con renovación del medio líquido. En otras palabras, la continua salida de estos compuestos impediría un crecimiento sostenible de arqueas planctónicas en el tiempo. Otros modelos plantean la misma simplificación (ver sección 1.1.3.3).

Con esto, la Ecuación 7 resulta en la siguiente expresión particular:

$$-F x_S + \mu \eta_T x_A V = 0 \quad \text{Ecuación 11}$$

la cual se puede reescribir como:

$$\left(\frac{x_A}{x_S}\right) = \frac{1}{\mu} \cdot \frac{D}{\eta_T} \quad \text{Ecuación 12}$$

c) Balance de producto

El producto de interés generado por el crecimiento celular, en este caso, resulta ser el ácido sulfúrico. Monitorear su formación puede llevarse a cabo por dos métodos: primero, utilizando directamente la titulación ácido base, en donde la concentración ácida se atribuye al ácido sulfúrico presente; y segundo, usando la concentración de sulfato como medida directa de la biooxidación del azufre, evitando el problema de detectar otras posibles especies ácidas intermediarias en solución.

Entonces, al establecer la Ecuación 2, y asumiendo que no existe consumo de ácido sulfúrico y/o sulfato en el sistema estacionario (sólo existe entrada, salida y generación por el trabajo celular sobre el azufre), se tiene la siguiente expresión:

$$F p_0 - F p + (q_P^S x_S + q_P^A \eta_T x_A)V = 0 \quad \text{Ecuación 13}$$

En lo anterior se utilizan las siguientes expresiones:

$$q_P^S = Y_P^{XS} \mu + m_p^S \quad \text{Ecuación 14}$$

$$q_P^A = Y_P^{XA} \mu + m_p^A \quad \text{Ecuación 15}$$

usando

p_0 : Concentración de producto en la entrada (g/mL).

p : Concentración de producto en la salida (g/mL).

q_P^S : Velocidad específica de formación de producto debido al trabajo de las células en suspensión (g producto/cel h).

q_P^A : Velocidad específica de formación de producto debido al trabajo de las células adheridas (g producto/cel h).

Y_P^{XS} : Rendimiento de producto por acción de células en suspensión (g producto/cel).

Y_P^{XA} : Rendimiento de producto por acción de células adheridas (g producto/cel).

m_p^S : Velocidad de formación de producto debido a la mantención de células del sistema en suspensión (g producto/cel h).

m_p^A : Velocidad de formación de producto debido a la mantención de células del sistema adheridas (g producto/cel h).

Nota: el factor [g producto] descrito puede ser interpretado como [g H₂SO₄] ó [g SO₄²⁻].

En estado estacionario, se opera con un crecimiento bacteriano que crece y trabaja activamente debido a la disponibilidad continua de medio fresco que ingresa al sistema. Por ende, la formación de producto está asociada fundamentalmente al crecimiento celular, y se descarta la producción por mantenimiento fisiológico de las células (se desprecia m_p^S y m_p^A) (47).

La Ecuación 13 se puede reescribir entonces como:

$$F p_0 - F p + \mu(Y_P^{XS} x_S + Y_P^{XA} \eta_T x_A)V = 0 \quad \text{Ecuación 16}$$

Aplicando la definición de D y reordenando:

$$p - p_0 = \frac{\mu}{D} (Y_P^{XS} x_S + Y_P^{XA} \eta_T x_A) \quad \text{Ecuación 17}$$

Para simplificar el modelo de estudio del biorreactor, se ha mencionado la importancia de las arqueas adheridas en la biooxidación de azufre, por sobre las que se encuentran en suspensión. Si estas últimas fueran descartadas del balance de biomasa, entonces también pueden simplificarse de la Ecuación 17:

$$p - p_0 = \frac{x_A \mu \eta_T}{D} Y_P^{XA} \quad \text{Ecuación 18}$$

Así, la Ecuación 18 permite obtener el rendimiento de producción por cada arquea que trabaja adherida al azufre, relacionando la producción neta en el biorreactor versus la cinética de crecimiento de las células.

d) Balance de nutriente limitante

La expresión global en este caso se rige por la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} \text{entrada} - \text{salida} - \text{consumo por crecimiento} - \text{consumo por mantención} \\ - \text{formación de producto} = \text{acumulación} \end{aligned} \quad \text{Ecuación 19}$$

La Ecuación 19 se reescribe como:

$$\begin{aligned} F s_0 - F s - \frac{\mu x_S V}{Y_X^S} - \frac{\eta_T \mu x_A V}{Y_X^A} - (m_S^S x_S + m_S^A \eta_T x_A)V \\ - \frac{(q_P^S x_S + \eta_T q_P^A x_A)V}{Y_P^S} = \frac{d}{dt} (s V) \end{aligned} \quad \text{Ecuación 20}$$

con

s_0 : Concentración de producto en la entrada (g producto/mL).

s : Concentración de producto en la salida (g producto/mL).

Y_X^S : Rendimiento de células en suspensión por consumo de sustrato (cel/ g S⁰).

Y_X^A : Rendimiento de células adheridas por consumo de sustrato (cel/ g S⁰).

m_S^S : Velocidad de consumo de sustrato debido a la mantención de células del sistema en suspensión (g S⁰/cel h).

m_S^A : Velocidad de consumo de sustrato debido a la mantención de células del sistema adheridas (g S⁰/cel h).

Y_P^S : Rendimiento de producto por formación de sustrato (g producto/ g S⁰).

En principio, este balance se realiza en conjunto con el de biomasa puesto que el sustrato mineral en cuestión es limitante del crecimiento celular. No obstante, el seguimiento del nutriente limitante requiere un monitoreo de la concentración de mineral (o azufre elemental) que se encuentra al interior del biorreactor (reflejado en el flujo de salida), lo cual es más complicado de realizar debido a que el flujo saliente resulta muy diluido en sólidos, comparado con el seno de reacción. Esto trae consigo que no pueda ser masado el sustrato remanente a menos de que se detenga la operación en el biorreactor. Otra dificultad en el uso de la relación anterior es la dificultad para estimar cada uno de los parámetros a considerar, como rendimientos desconocidos, por lo que resulta ser una expresión de alto costo informático comparado con el resto de ecuaciones.

1.1.3.2 Descripción de modelos previos

En 1995 Haddadin *et al* (48) presentaron un resumen de varios trabajos que trataban sobre el modelamiento de reactores batch, distinguiéndolos en tres clases de modelos. Los primeros, resultan en adaptaciones a las cinéticas de Monod, es decir, sólo toman en cuenta la fase líquida del sistema. La segunda categoría son modelos que lidian con el efecto de la adhesión y desorción celular en minerales como la pirita, calcopirita y en la desulfuración de carbono. Por ende, estos modelos relacionan tanto la fase líquida como la fase sólida. Finalmente, el tercer tipo de modelos resultan a partir del estudio de reactores no ideales (es decir, que no pertenecen a la clasificación típica de reactor tanque agitado).

En la publicación mostrada por Haddadin *et al*, se presentan varios modelos dinámicos que abordan el problema de biooxidación de minerales sulfurados desde distintos ángulos de evaluación: cambio del tamaño de partícula (49), crecimiento celular de bacterias adheridas al mineral y de bacterias en suspensión (50) (51), relación entre crecimiento celular y parámetros de operación (52) y formulaciones para reactores especiales (53). Otras publicaciones con recopilaciones similares pueden ser encontradas en la literatura (54).

El modelamiento que se describe en las publicaciones referenciadas sirvió para nuevas investigaciones. Se han descrito modelos para diferentes reactores continuos de pirita (42) (55) y calcopirita (56) (57).

Además, se ha masificado el uso de ecuaciones que describen un biorreactor para sulfuros metálicos como un sistema “de dos pasos”, en donde primero se modela la oxidación química del mineral por acción del ión férrico, y luego el microorganismo restablece dichos iones gracias a la oxidación del ión ferroso resultante del paso uno (42) (58).

Por ende, actualmente los modelos se han visto incrementados en complejidad. Crundwell (59) ha descrito modelos donde se acoplan los fenómenos de crecimiento bacteriano, reacción heterogénea de tres fases, distribución de tamaño de partículas en la alimentación y cinética de reducción de partículas, lo que da como resultado un modelo complejo que implica la resolución simultánea de ecuaciones algebraicas no lineales y ecuaciones diferenciales en forma integral. Este tipo de estudios se encuentra actualmente en pleno análisis y utilización a escala de laboratorio (42).

1.1.3.3 Modelos previos de un reactor para procesar azufre elemental

Los modelos de reacción anteriormente expuestos presentan como desventaja el complejizar sistemas (usando como sustrato pirita, calcopirita o derivados), no permitiendo su generalización para cualquier tipo de mineral. Esto se debe principalmente a que las investigaciones presentan como horizonte de aplicación procesos concretos de tratamiento de metales refractarios o para la recuperación de cobre.

Un ejemplo de lo anterior es la investigación utilizando azufre elemental como fuente de energía. Varios autores han estudiado la cinética de crecimiento de diferentes microorganismos utilizando azufre elemental como sustrato, aunque no se han aplicado modelos de reactores continuos para una posible producción de ácido sulfúrico.

Espejo y Romero (25) estudiaron las primeras cinéticas bacterianas (en *Acidithiobacillus ferrooxidans*) utilizando azufre elemental como fuente de energía. Observaron que las bacterias adheridas son las que realizan la biooxidación del azufre para su crecimiento, dejando entrever que las bacterias liberadas a la suspensión (como resultado de la duplicación celular) no se replicarían, a menos que cuenten con suficiente energía interna o que puedan aprovechar compuestos intermediarios en la conversión de azufre como fuente de energía.

Utilizando esta información se derivaron algunos modelos para la biooxidación de azufre. Konishi *et al* (60) desarrollaron en 1994 un interesante modelo para *A. ferrooxidans*, que incluía los conceptos de crecimiento celular, biooxidación y adsorción sobre azufre, en un reactor batch.

En dicha modelación se utilizaron los siguientes conceptos:

a) Crecimiento de bacterias totales

En este caso se asumió que las bacterias adheridas al azufre son las únicas que crecen en el sistema, por lo que el aumento de células en el tiempo se puede describir como muestra la Ecuación 21:

$$\frac{dX_T}{dt} = \mu_A X_A \theta_V \left(\frac{W_0}{V} \right) (1 - \alpha)^{\frac{2}{3}} \quad \text{Ecuación 21}$$

usando

- X_T : Concentración de células totales en el volumen de reacción (kg células/m³ solución).
- μ_A : Velocidad específica de crecimiento de las bacterias adheridas al azufre elemental (hr⁻¹).
- X_A : Concentración de bacterias adheridas por unidad de peso de azufre elemental (kg células/kg S⁰).
- θ_V : Fracción de sitios de adsorción en el azufre no ocupados por bacterias (adimensional).
- W_0 : Masa inicial de azufre elemental (kg).
- V : Volumen de reacción sólido-líquido (m³).
- α : Fracción de sólido oxidado en el tiempo (adimensional).

En la expresión anterior:

$$\theta_V = \frac{X_{Am} - X_A}{X_{Am}} \quad \text{Ecuación 22}$$

$$\alpha = \frac{W_0 - W}{W_0} \quad \text{Ecuación 23}$$

donde

X_{Am} : Máxima capacidad de adsorción de bacterias en el azufre por unidad de peso de sustrato (kg células/kg S⁰).

W : Masa de azufre en cada tiempo de reacción (kg).

b) Reacción de azufre elemental

La tasa de oxidación del azufre puede relacionarse con la tasa de crecimiento celular, obteniendo la siguiente relación:

$$-\frac{dW}{dt} = W_0 \left(\frac{d\alpha}{dt} \right) = (1 - Y_A) V \left(\frac{dX_T}{dt} \right) \quad \text{Ecuación 24}$$

con

Y_A : Rendimiento de biomasa sobre masa de azufre (kg células/kg S⁰)

La resolución de Ecuación 21 y Ecuación 24 se realizaron simultáneamente mediante un método de Runge-Kutta no especificado en la publicación. Además, algunos parámetros que se utilizan en las ecuaciones diferenciales descritas se obtuvieron realizando regresiones desde los datos experimentales, como se muestra a continuación:

c) Máxima capacidad de adsorción

Se realizó una prueba preliminar que relacionó bacterias adheridas versus suspendidas (en un intervalo de tiempo determinado), de lo cual se obtuvo un ajuste de valores usando una isoterma de adsorción de Langmuir:

$$X_A = \frac{K_A X_{Am} X_L}{1 + K_A X_L} \quad \text{Ecuación 25}$$

usando

K_A : Constante de equilibrio para la adsorción bacteriana (m³/kg células).

Para encontrar tanto X_{Am} como K_A se utilizó un método de mínimos cuadrados (no descrito en la publicación) utilizando como fuente una serie de datos de células adheridas versus células en suspensión.

Gracias a este ajuste se observó que la concentración en fase líquida de células libres siguió aumentando con el tiempo, mientras que la concentración en la superficie de células adsorbidas por gramo de azufre se acercó a un valor límite, es decir, tiende a la capacidad máxima de adsorción (X_{Am}).

d) Rendimiento de bacterias adheridas

Se obtuvo un rendimiento de crecimiento, definido como la razón entre el número total de células *A. ferrooxidans* formadas por efecto del crecimiento, $(X_T - X_{T0})V$, y la masa de azufre disuelto, αW_0 :

$$Y_A = \frac{(X_T - X_{T0})V}{\alpha W_0} \quad \text{Ecuación 26}$$

donde

X_{T0} : Concentración inicial del inóculo ingresado al sistema (kg células/m³ solución).

e) Células totales en el tiempo

La concentración de células totales por unidad de volumen puede expresarse en términos de la concentración de células en la superficie adsorbida más la concentración en fase líquida de células libres:

$$X_T = X_A \left(\frac{W_0}{V} \right) (1 - \alpha)^{\frac{2}{3}} + X_L \quad \text{Ecuación 27}$$

usando

X_L : Concentración de células en suspensión (kg células/m³).

En la expresión anterior (base además de la Ecuación 21) se asumió un modelo simple de encogimiento de azufre (expresión elevada a 2/3) para representar el cambio en el área superficial de las partículas debido al avance de la reacción.

Finalmente, la fracción de azufre oxidado (α) fue determinada a partir de la cantidad de sulfato presente en el medio acuoso, mientras que la velocidad específica de crecimiento fue obtenida ajustando datos experimentales de crecimiento celular en el tiempo.

En 1995 Konishi et al (61) realizan un trabajo similar de experimentación y modelamiento en azufre elemental, esta vez para la especie *Acidithiobacillus thiooxidans*. Las condiciones iniciales de ambas experiencias son presentadas en la Tabla 5, mientras que los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 5: Condiciones iniciales de los reactores batch desarrollados en 1994 (60) y 1995 (61) por Konishi *et al.*

Micro - organismo	Temp. (°C)	pH inicial	Tamaño azufre (µm)	Volumen de reacción (mL)	Volumen inóculo (mL)	Agitación (RPM)	Flujo de aire (mL/min)
<i>A. ferrooxidans</i>	30	2,0	25 – 63	3000	5	500	3000
<i>A. thiooxidans</i>	30	1,5	Promedio de 29,9	3000	5	500	3000

Tabla 6: Resultados del ajuste de datos experimentales y modelación de los reactores batch para los experimentos desarrollados por Konishi *et al* (60) (61).

Micro - organismo	Tasa específica de crecimiento (d ⁻¹)	Rendimiento celular (Y _A) (cel/gr S ⁰)	Constante de adsorción (K _A) (mL/cel)	Máxima capacidad de adherencia celular (X _{Am}) (cel/gr S ⁰)
<i>A. ferrooxidans</i>	1,6	6,25 x 10 ¹¹	2,15 x 10 ⁻⁹	4,88 x 10 ¹⁰
<i>A. thiooxidans</i>	2,58	2,05 x 10 ¹¹	2,10 x 10 ⁻⁹	4,57 x 10 ¹⁰

A pesar de no ser experimentos en modo continuo, los estudios presentados tienen importancia debido a que entregan un modelo interesante de reactor, introduciendo distintos conceptos y un marco general para proponer un modelo alternativo al que describe la modelación clásica de biorreactores.

Se ha mencionado, sin embargo, que el estudio de modelos en un modo continuo de operación es muy escaso en la literatura actual, y nulo para el caso de azufre elemental. De hecho, Konishi *et al*, en 1997 (55), realizaron un estudio para un reactor de biolixiviación (en este caso, de piritita) utilizando la bacteria termófila extrema *Acidianus brierleyi* a 65 °C, mostrando una modelación tan compleja como la presentada por Crundwell (59), principalmente debido a la identificación de una acción cooperativa de bacterias adheridas y en suspensión sobre el mineral (según el mecanismo presentado en el punto 1.1.2.3). Otros trabajos también siguen dicha línea de investigación (42) (56) (62).

Por su parte, el proyecto Universidad de Chile – VALE S.A. se ha centrado hasta ahora en la aplicación de distintos microorganismos sobre azufre elemental, a través del cultivo en matraces,

para conocer las distintas cinéticas de crecimiento para bacterias termófilas moderadas y termófilas extremas utilizando azufre como fuente de energía (18) (19).

Además, existe un trabajo previo en el proyecto que plantea un sistema compuesto por dos reactores: un reactor de biooxidación de azufre, en el cual se produce ácido sulfúrico por acción de la bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans*; y un reactor de lixiviación de un relave mineral rico en fosfato, en el cual se ejecuta un ataque químico por el ácido producido. Ambos operan en conjunto en ciclo cerrado como lo muestra la Figura 4 (7).

No obstante, este estudio no fue desarrollado utilizando datos experimentales para modelar un circuito establecido, sino que se adaptaron distintos balances de masa con datos de bibliografía para entregar una simulación del progreso de las múltiples reacciones químicas acopladas en el tiempo.

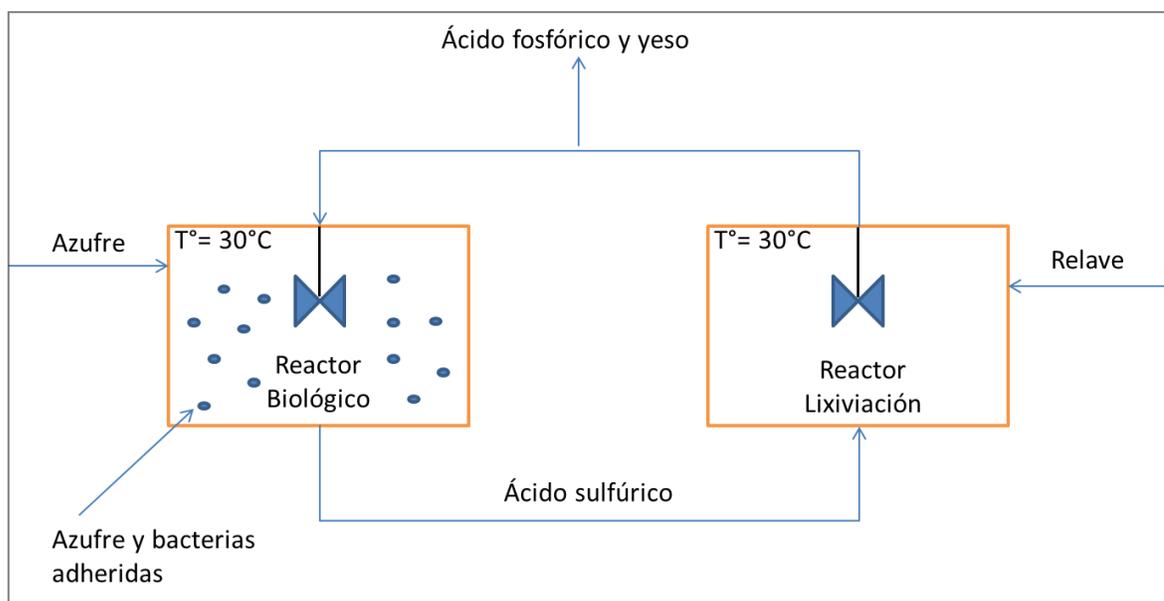


Figura 4: Representación del sistema simulado por Godoy para la biolixiviación de relaves ricos en fosfato (7).

1.1.3.4 Estudio de transferencia gas-líquido en reactores

Anteriormente se ha descrito al CO_2 como la fuente de carbono que comúnmente utilizan las bacterias en minería, mientras que el oxígeno es utilizado para la conversión de azufre en sulfato soluble, además de ser el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria de los microorganismos.

Por lo anterior, el estudio de transferencia gas-líquido tiene una especial importancia en los reactores aeróbicos, similar a los procesos de fermentación aeróbica, donde el gradiente de concentraciones de oxígeno y CO_2 entre la superficie de burbujas de aire (concentración más alta) y el resto de la solución promueve la transferencia gaseosa desde las burbujas hacia el medio y, desde éste, hacia a la célula, que absorbe el componente (44).

Debido a la baja solubilidad de ambos gases en la fase líquida, su transferencia desde las burbujas de aire hacia el medio puede ser la etapa limitante del proceso. Si esta transferencia es lenta, el metabolismo celular se vuelve dependiente de la tasa de suministro de O_2 y CO_2 desde la fase gaseosa. Por este motivo, la transferencia en la interfaz gas-líquido es un eje relevante de estudio para el diseño de un biorreactor (44).

En presencia de movimiento en el seno del medio de cultivo, la tasa de transferencia de masa de un gas es directamente proporcional al área disponible para el proceso de transferencia y a la diferencia de concentraciones (44):

$$N_A = k_L a_i \cdot (C^* - C_L) \cdot V \quad \text{Ecuación 28}$$

En lo anterior

- N_A : Tasa de transferencia del componente A (g/s).
- k_L : Coeficiente de transferencia de masa (m/s).
- a_i : Área interfase gas/líquido disponible para la transferencia de masa (m^2/m^3).
- C^* : Concentración de A en el líquido sobre la interfase gas/líquido (solubilidad) (g/L).
- C_L : Concentración de A en el seno del líquido (lejos de la interfase) (g/L).
- V : Volumen de operación (L).

Un punto fundamental en el diseño de biorreactores es conocer adecuadamente el producto $k_L a_i$ (coeficiente combinado de transferencia de masa gas líquido). Este coeficiente es influenciado por la geometría y tipo de biorreactor, las propiedades de los fluidos y las condiciones de operación (temperatura, presión). La fuerza motriz ($C^* - C_L$) puede ser modificada aumentando la concentración de saturación de la fase gas en el líquido (63).

El coeficiente de transferencia en los procesos de intercambio de gases es usualmente calculado experimentalmente. Típicamente se utiliza al oxígeno como parámetro para definir la velocidad de transferencia de aire al medio de cultivo. Algunos métodos para determinarlo son: el “método por balance de oxígeno”, la “oxidación de sulfito de sodio” a sulfato (en presencia de catalizador Cu^{+2}), y el “método dinámico” (44).

Este Método Dinámico es una medición de cambios en la concentración de oxígeno utilizando un electrodo. Los resultados son interpretados usando un balance de masa “no estacionario” para obtener el valor de $k_L a_i$ luego de la medición en el tiempo.

La ventaja principal de esta técnica es que resulta comparativamente menos costosa que otros métodos, además de entregar mediciones independientes de la solubilidad del oxígeno, y pueden ser llevadas a cabo incluso si C^* es desconocida. En la práctica, el método dinámico es mayormente utilizado en reactores de baja escala, como por ejemplo fermentadores de laboratorio (44). Para la absorción de oxígeno en agua se tiene la siguiente fórmula general:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a_i (C^* - C_L) - Q_0 \quad \text{Ecuación 29}$$

donde

- Q_0 : Consumo de oxígeno que presentan los microorganismos por volumen ($mol O_2 / m^3 s$).

Cuando la entrega de oxígeno alcanza un valor estacionario, se genera una condición en que la fuerza motriz de O₂ transferido es utilizada completamente por los microorganismos, es decir:

$$Q_0 = k_L a_i (C^* - \bar{C}_L) \quad \text{Ecuación 30}$$

con

\bar{C}_L : Concentración de oxígeno en el estado estacionario final (mol O₂/m³).

Al sustituir este resultado en la Ecuación 30 y cancelando el término de solubilidad, se obtiene:

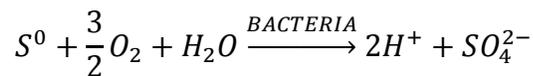
$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a_i (\bar{C}_L - C_L) \quad \text{Ecuación 31}$$

Asumiendo que $k_L a_i$ es constante en el tiempo, se puede integrar la expresión anterior en el tiempo para obtener la siguiente relación:

$$k_L a_i = \frac{\ln\left(\frac{\bar{C}_L - C_{L1}}{\bar{C}_L - C_{L2}}\right)}{t_2 - t_1} \quad \text{Ecuación 32}$$

De esta forma, $k_L a_i$ puede estimarse a partir de varios puntos (C_{L1}, t_1) y (C_{L2}, t_2), graficando la curva $\ln\left(\frac{\bar{C}_L - C_L}{\bar{C}_L - C_{L2}}\right)$ versus $(t_2 - t_1)$, aplicando luego una regresión lineal a dichos datos y obteniendo la pendiente de la recta resultante (44). La Ecuación 32 se puede utilizar para los casos de actividad celular o sin presencia de células. En este último caso se tiene que $\bar{C}_L = C^*$.

Por otra parte, la demanda de oxígeno que requieren las arqueas se puede describir a partir de la Reacción 8:



Según la estequiometría de la reacción, puede obtenerse directamente el oxígeno que se utiliza para la producción de cierta masa de producto (en gramos). En efecto:

$$\text{masa } O_2 = \frac{3}{2} \cdot \frac{M_{O_2}}{M_{\text{producto}}} \cdot \text{masa}_{\text{producto}} \quad \text{Ecuación 33}$$

en la cual

M_{O_2} : Masa molar de O₂ (gr/mol).

M_{producto} : Masa molar de producto (sulfato o ácido sulfúrico) (gr/mol).

Así también, si se conoce el rendimiento de producto por acción de los microorganismos (como por ejemplo Y_P^{XA} descrita en el punto 1.1.3.1), se puede definir el consumo requerido de oxígeno a partir de las ecuaciones:

$$Y_{O_2} = \frac{3}{2} \cdot \frac{M_{O_2}}{M_{producto}} \cdot Y_P^{XA} \quad \text{Ecuación 34}$$

$$N_A^{prod} = \mu \cdot \eta_T \cdot x_A \cdot V \cdot Y_{O_2} \quad \text{Ecuación 35}$$

En las expresiones anteriores:

Y_{O_2} : Rendimiento en consumo de oxígeno por célula (g O₂/cel).

N_A^{prod} : Tasa de transferencia de O₂ por producción (g O₂/h).

La última etapa de evaluación en el estudio de la oxigenación del biorreactor es comparar los valores de N_A para los casos descritos por el Método Dinámico y la Estequiometría de la reacción bacteriana. Si la capacidad de transferencia de oxígeno al líquido es mayor que la cantidad requerida por la reacción, entonces la transferencia propuesta es efectiva para la operación biolixivante.

Además, se pueden realizar estimaciones sobre el número máximo de microorganismos adheridos que pueden consumir oxígeno (x_A^{max}), lo cual es un indicio directo de la cantidad máxima de azufre que puede ser tratado en el biorreactor. Para este fin se debe entender, desde la Ecuación 28, que esta relación puede ser obtenida a partir de la condición de borde C_L igual a 0, es decir, que en estado estacionario no exista O₂ disuelto en el medio, pues todo es instantáneamente consumido por los microorganismos para la producción de ácido sulfúrico.

Lo anterior entrega una transferencia máxima de oxígeno al medio:

$$N_A^{max} = k_L a_i \cdot C^* \cdot V \quad \text{Ecuación 36}$$

Finalmente, comparando Ecuación 36 con Ecuación 35, se puede determinar un número máximo de células que trabajen adheridas al azufre como:

$$k_L a_i \cdot C^* \cdot V = \mu \cdot \eta_T \cdot x_A^{max} \cdot V \cdot Y_{O_2}$$

$$x_A^{max} = \frac{k_L a_i \cdot C^*}{\mu \cdot \eta_T \cdot Y_{O_2}} \quad \text{Ecuación 37}$$

Nota del estudio de aireación: Observar que las expresiones anteriores sirven análogamente al caso de estudio del dióxido de carbono.

1.2 Motivación y Descripción del Proyecto

El trabajo planteado en este trabajo de título sigue la cadena de estudios que han sido desarrollados en la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile, los cuales fueron solicitados por la empresa brasileña VALE S.A. para generar conocimiento sobre la biooxidación del azufre, y su posible aplicación a la recuperación de fosfatos vía lixiviación química. La carencia de estudios concretos sobre este tema resulta ser una primera motivación en el camino para obtener esta nueva fuente de información.

Por su parte, la creciente demanda de fertilizantes a causa del aumento poblacional, por un lado, y la cada vez más baja ley de los minerales fosfatados, por otro, entrega un desafío interesante para buscar nuevas fuentes de fosfatos. Este afán se hace evidente en países como Brasil, en donde se observa un alto grado de dependencia entre la industria del fósforo y la agricultura.

Proponer entonces la biolixiviación como alternativa para explotar nuevas fuentes de fosfato, por ejemplo desde los descartes del procesamiento del hierro, se ha considerado dentro de las alternativas más económicas y medioambientalmente viables (19). El estudio técnico de esta propuesta, que se presupone de un bajo costo de operación (sin la necesidad de compra de ácido sulfúrico), genera una última motivación para justificar el proyecto.

El aporte concreto de la tesis que se presenta a continuación viene dado por la incorporación de la biooxidación de azufre elemental, entendida como formación biológica de ácido sulfúrico, a la ingeniería de reacciones químicas que predominan en el campo de la minería. Este fin se consigue básicamente utilizando un reactor tipo agitado a escala banco que opere en modo continuo, desde el cual se obtengan cantidades constantes de ácido sulfúrico en el tiempo.

El microorganismo seleccionado para el estudio es *Sulfolobus metallicus*, un termófilo extremo que crece óptimamente a 67°C, temperatura interesante de operación pues permite aprovechar la reacción exotérmica de oxidación del azufre (no requiere enfriamiento), además de entregar un flujo caliente de ácido sulfúrico para favorecer la lixiviación química de fosfatos, proyectada en un contenedor separado al reactor de biooxidación.

Para estudiar el reactor biológico, se ha establecido un formato de escalamiento que se inicia con el crecimiento celular en matraces, para luego proseguir con el desarrollo experimental de un reactor tipo batch y posteriormente el de un biorreactor continuo a escala banco. Este trabajo secuencial permite generar un modelo (o ecuación de diseño) que explique idealmente el comportamiento del sistema. Dicho modelo es un derivado de la modelación clásica que presentan otros reactores en el área de bioprocesos, similar a un fermentador aeróbico.

En el modelo final intervienen aspectos tales como: antecedentes cinéticos del crecimiento celular, recolectados en el reactor biológico tipo batch; estudio de la efectividad en la transferencia de oxígeno; y análisis del sistema estacionario para distintos tiempos de residencia aplicados al sistema.

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

Diseñar, montar, operar y modelar un equipo de reacción continuo, a escala banco, que permita producir ácido sulfúrico mediante la biooxidación de azufre elemental bajo la acción de *Sulfolobus metallicus* a 67°C, para su futura aplicación en la lixiviación de relaves mineros que presentan fósforo.

2.2 Objetivos Específicos

- Conocer la operatividad del cultivo celular en matraces, aprendiendo los materiales y métodos típicos de los trabajos de investigación, y obtener inóculos para el escalamiento posterior.
- Montar, operar y monitorear un reactor tipo tanque agitado en modo batch, con condiciones establecidas desde los matraces y donde se lleve a cabo la biooxidación de azufre por parte de *Sulfolobus metallicus* a 67°C.
- Obtener la curva de crecimiento celular para *Sulfolobus metallicus* a 67°C utilizando el biorreactor propuesto en modo batch de operación.
- Determinar condiciones de operación para el biorreactor en modo continuo de operación, en particular flujos de entrada al sistema, tal que se puedan alcanzar diferentes estados estacionarios.
- Montar, operar y monitorear el biorreactor en modo continuo de operación.
- Proponer una ecuación de diseño para el biorreactor, en base al estudio clásico sobre el modelamiento de reactores para bioprocesos.
- Estudiar la transferencia de oxígeno en el biorreactor, determinando la entrega de oxígeno al medio y si esta es suficiente para el normal desarrollo de los microorganismos y de la reacción de oxidación biológica.

3 Metodología

La metodología descrita a continuación se divide en varias secciones que representan las etapas necesarias para escalar y modelar un reactor de biooxidación de azufre, utilizando la arquea termófila extrema *Sulfolobus metallicus*.

3.1 Cultivo celular en matraces

El cultivo de inóculos utilizados en el reactor se realiza previamente en cuatro matraces agitados a 100 RPM y una temperatura de 67°C, usando *Sulfolobus metallicus* sobre azufre en perlas de diámetro entre 2,36 y 3,32 [mm].

Además de preparar a los microorganismos, el cultivo en matraces cumple también la misión de desarrollar habilidades sobre los procedimientos de monitoreo y medición del crecimiento celular en el laboratorio. Por ende, se logra aprender el monitoreo del pH, de la producción de ácido sulfúrico y de la concentración de sulfato en solución. Junto con lo anterior, se obtiene el aprendizaje sobre el recuento de células en solución durante el proceso de biooxidación, lo que permite más adelante predecir cinéticas de crecimiento.

A continuación se detallan las metodologías aprendidas para el cultivo en matraces, las que posteriormente son replicadas para obtener mediciones en el biorreactor.

3.1.1 Obtención de perlas de azufre

Materiales y equipos

- Azufre p.a. marca Merck.
- 8 [L] de Agua Destilada.
- Estanque de vidrio de 10 [L].
- Plato agitador/calefactor marca Sybron modelo SP18420.
- Agitador vertical Janke & Kinkel modelo RW20.
- Paleta tipo hélice de 4 palas, de acero inoxidable.
- Medidor de temperatura (termocupla) marca Chy modelo (W) 502.
- Vasos de precipitado de 50 [mL].
- Manto Calefactor eléctrico con regulador de voltaje ROMI modelo TDGC-0.
- Tamices tipo Tyler marca Endecotts Ltd.
- Papel Filtro.
- Colador para filtración.
- Campana de extracción.
- Soporte metálico para el agitador.

Obtención de perlas de azufre

1. Instalar el estanque con el agitador vertical y su paleta sobre el soporte metálico.
2. Agregar agua destilada a dicho contenedor.
3. Regular una agitación suficientemente fuerte para que exista un torbellino dentro del estanque que se extienda hasta su base.
4. Encender el manto calefactor a 100 [V] de potencial.
5. Instalar el medidor de temperatura.
6. Regular que el manto calefactor alcance los 90°C.
7. En paralelo, pesar 15 [g] de azufre en polvo en cada vaso de precipitado de 50 [mL].
8. Al alcanzar los 90°C, introducir un vaso de precipitado por vez en el manto calefactor, cuidando que la termocupla se situé al centro de la masa interna de azufre.
9. Encender la campana de extracción.
10. Cambiar el voltaje del manto a 80 [V] cuando la temperatura del mismo vuelva a ser 90°C.
11. Monitorear visualmente el cambio de estado del azufre (S⁰ líquido), situación que se alcanza típicamente cuando la temperatura interna se encuentre entre los 128 y 132°C.
12. Una vez que el azufre se funde, verter rápidamente el contenido sobre el agua destilada en agitación, obteniendo así las esferas o perlas de azufre debido al cambio repentino de temperatura. Para evitar problemas de rápida solidificación, utilizar como respaldo el plato agitador/calefactor a alta T°.
13. Filtrar la solución para separar las perlas de azufre del agua destilada.
14. Llevar el filtro con la perlas de azufre a secado a 30 °C por 24 horas.
15. Utilizar los tamices para separar por granulometría las perlas de azufre, entre los 2,36 y 3,32 [mm] de diámetro.

3.1.2 Esterilización de las perlas de azufre

Con el fin de eliminar microorganismos no deseados poblando las perlas de azufre previamente sintetizadas, se realiza el siguiente procedimiento de esterilización:

Materiales

- Matraz Erlenmeyer.
- Medio de Cultivo Norris 2,3 no estéril.
- 3 [g] de azufre elemental.

Esterilización de Azufre

1. Colocar el azufre masado en el matraz, y 100 [mL] de medio de cultivo Norris 2,3 (proporción del 3% p/v).
2. Sellar el matraz con una tapa de gasa y algodón.

3. Colocar el matraz en una olla tapada, sin presión y que contenga un litro de agua destilada, por media hora luego de haber alcanzado la ebullición del agua.
4. Dejar enfriar por 24 horas, cambiar el medio de cultivo del matraz y repetir el paso 3.

3.1.3 Cultivo de inóculos en matraces sobre perlas de azufre

Materiales y equipos

- 4 matraces Erlenmeyer de 250 [ml].
- 8 [ml] de inóculo puro de *Sulfolobus metallicus* con una población aproximada de 10^8 [células/ml], previamente ambientada a las perlas de azufre elemental a usar en este estudio.
- 12 [g] de perlas de azufre elemental, con diámetro entre 2,36 y 3,32 [mm].
- 392 [ml] de medio Norris (con composición: 0,4 [g/L] de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 [g/L] de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,2 [g/L] de KH_2PO_4) a pH 2,3 ajustado con ácido sulfúrico concentrado, en condición no estéril.
- Shaker giratorio New Brunswick modelo G10, a una agitación de 100 RPM y calefaccionado a 67 °C.

Preparación de los cultivos

1. Preparar cada matraz con la siguiente configuración:
 - 3 [g] de perlas de azufre.
 - 98 [mL] de medio de cultivo Norris.
 - 2 [mL] de inóculo previo.
2. Tapar cada matraz con tapones de gasa y algodón.
3. Disponer los matraces en el agitador calefaccionado para el crecimiento de las arqueas a su temperatura óptima.

3.1.4 Análisis químicos y biológicos

Es importante destacar que los análisis presentados son replicados de manera similar para la operación del biorreactor (modo batch y en continuo), por lo que resultan claves en el estudio presentado en este informe.

3.1.4.1 Preparación de muestras diarias

Antes de iniciar cada medida, deben obtenerse alícuotas de cada matraz (o del biorreactor) de cultivo. Para esto se retira una cantidad fija de muestra, necesaria para el monitoreo periódico de cada variable del sistema.

Procedimiento

1. Reponer el agua evaporada debido al efecto de mantener los cultivos a 67°C.
2. Extraer una cantidad de sobrenadante acorde a las mediciones periódicas.
3. Reponer el volumen extraído con medio de cultivo Norris.
4. Masar cada matraz, anotar dicho valor y almacenarlo nuevamente en el shaker.

3.1.4.2 Medición del pH

Materiales y equipos

- pH-metro Jenco modelo 1671, con electrodo de vidrio.
- 4 tubos Falcon de 10 [mL].
- Micropipeta de 5 [mL].
- Puntas plásticas para micropipetas.
- 8 [mL] de medio de cultivo Norris 2,3 no estéril.

Procedimiento

1. Calibrar el pH-metro a temperatura ambiente.
2. Extraer 2 [mL] de la muestra obtenida de los matraces o el biorreactor.
3. Colocar cada alícuota en un tubo Falcon.
4. Medir el pH de cada muestra, sumergiendo el electrodo del pH-metro al interior del tubo. Esta medida resulta en el pH de cada matraz de cultivo.

3.1.4.3 Ensayos de titulación ácido-base

Para la determinación cuantitativa de la biooxidación del azufre elemental hacia ácido sulfúrico, es necesario evaluar la concentración de ácidos y de sulfato en solución.

Materiales y equipos

- Bureta de 10 [mL].
- Hidróxido de sodio en concentración 0,1 [N].
- Agua destilada.
- Colorante “anaranjado de metilo”.
- Matraz Erlenmeyer de boca ancha de 250 [mL].
- Soporte para bureta.
- Agitador Hanna modelo HI180.
- Magneto de teflón.
- Pipeta total de 2 [mL].
- Probeta de 100 [mL].

Medición de acidez

1. Ambientar la bureta con hidróxido de sodio.
2. En el matraz agregar 98 [mL] de agua destilada.
3. Agregar 2 [mL] de muestra.
4. Agregar 2 gotas del colorante anaranjado de metilo.
5. Colocar un magneto y agitar.
6. Llenar la bureta hasta el punto 0 con hidróxido de sodio 0,1 [N] y colocarla en el soporte.
7. 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.
8. 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 y posibles protones en solución a partir de las siguientes ecuaciones:

$$Normalidad_{H_2SO_4} = \frac{Normalidad_{NaOH} \cdot Volumen\ titulante}{Volumen\ de\ muestra} \quad \text{Ecuación 38}$$

$$\begin{aligned} Concentración\ H_2SO_4(g/L) \\ = Normalidad_{H_2SO_4} \cdot Peso\ Equivalente_{H_2SO_4} \end{aligned} \quad \text{Ecuación 39}$$

$$Concentración\ molar\ H^+ = Normalidad_{H_2SO_4} \quad \text{Ecuación 40}$$

$$pH = -\log(Concentración\ molar_{H^+}) \quad \text{Ecuación 41}$$

3.1.4.4 Determinación de sulfato en solución

Materiales y equipos

- $\text{BaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$.
- Cloruro de sodio (NaCl) de concentración 240 [g/L] en solución, con HCl al 0,3%.
- Glicerina 1:1 con agua des-ionizada.
- Agua des-ionizada.
- Espectrofotómetro UV-visible, marca Agilen, modelo 8453.
- Software computacional ChemStation UV-visible.
- Computador.
- Matraces aforados de 25 [mL].

Medición por turbidimetría

1. En un matraz aforado agregar agua des-ionizada hasta alcanzar la mitad del volumen del contenedor.
2. Agregar 1 [mL] de la solución de biooxidación a medir.
3. Agregar 2,5 [mL] de glicerina 1:1. Agitar.
4. Agregar 1,25 [mL] de NaCl 240 [g/L]. Agitar.
5. Aforar a 25 [mL] con agua desionizada. Agitar.
6. Agregar 0,075 [g] de $\text{BaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$.
7. Agitar durante un minuto.
8. Medir concentración en espectrofotómetro UV-visible a 500 [nm] contra blanco, cada un minuto hasta completar 4 minutos (contando el primer minuto de agitación del punto 7). Esta medición es llevada a cabo por el software instalado en el computador.
9. Obtener 4 puntos de medición. Como cada muestra se analiza en duplicado, finalmente se obtiene un promedio de concentración de sulfato con 8 valores entregados por el equipo.

3.1.4.5 Recuento directo de células planctónicas

Materiales y equipos

- Microscopio de Epifluorescencia, marca Zeiss, modelo AxioLab.A1.
- Software computacional AxioVision40 vol. 4.8.2.0.
- Computador.
- Cámara Neubauer mejorada Merienfeld, de 0,2 mm de profundidad, para recuento de células.
- Micropipetas de 20 y de 200 [μL].
- Puntas.
- Mechero.
- Etanol.

Procedimiento

1. Limpiar la zona donde se trabaja con etanol.
2. Encender el mechero.
3. Tomar 8 [μL] de la muestra.
4. Colocar la muestra sobre la cámara de recuento de 0,2 mm de profundidad.
5. Posicionar la cámara de recuento para ser observada en el microscopio con un aumento ocular de 10x y objetivo 40x.
6. Encender el computador e iniciar el software.
7. Contar las células presentes en cada cuadro de la cámara, en al menos 5 cuadrados, si hay baja densidad celular se cuenta en los cuadrados grandes y si hay alta densidad se cuenta en los cuadrados pequeños.
8. Se promedia el número de células por el número de cuadrados cuantificados y este valor se multiplica por $1,25 \times 10^6$ o $2,00 \times 10^7$ según se haya realizado el conteo en cuadrados grandes o pequeños, respectivamente.
9. El valor obtenido corresponde a la concentración aproximada de “células/mL” de la muestra.

3.2 Biorreactor tipo Batch

Se trabaja en un reactor agitado mecánicamente. Los experimentos en este reactor se llevaron a cabo operándolo en forma continua para la fase gas y en modalidad batch para las fases líquida y sólida.

3.2.1 Montaje experimental

La distribución de los componentes del sistema en modo batch y las conexiones montadas en el laboratorio se muestran en la Figura 5:

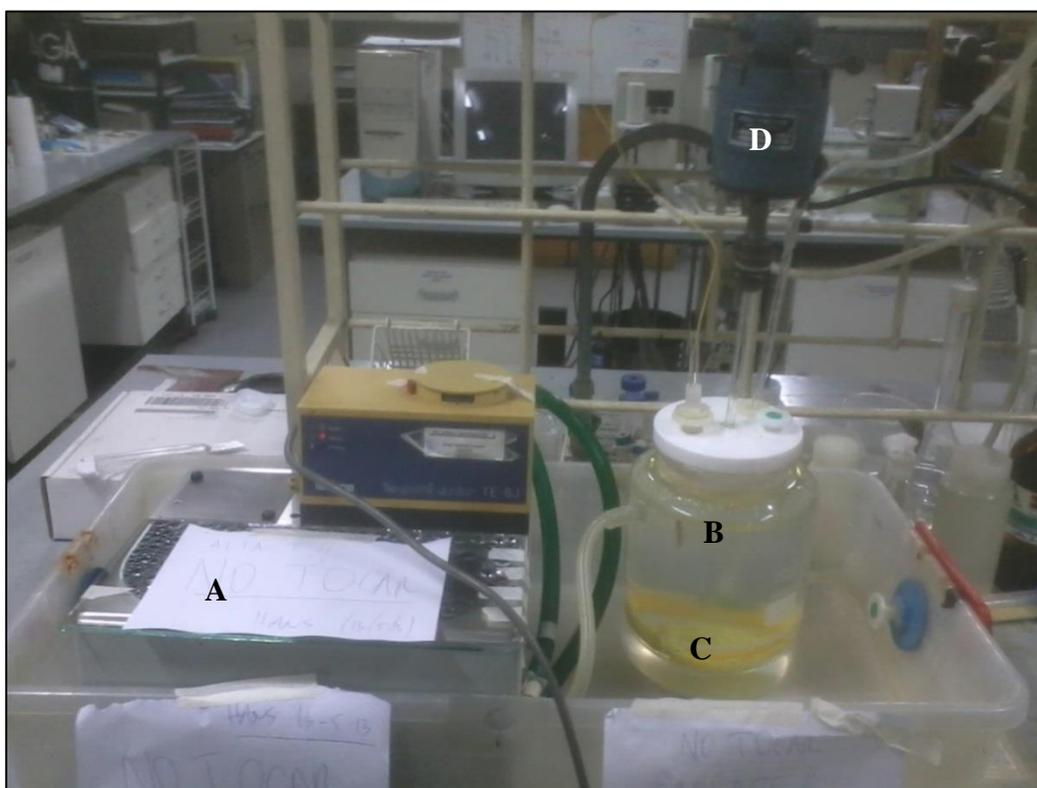


Figura 5: Montaje experimental del reactor batch de producción de ácido sulfúrico. Se observa un baño termostático de agua que permite mantener la temperatura del reactor en 67°C (A), y el tanque agitado donde se encuentran las perlas de azufre (B), con aireación (C) y agitación mecánica respectiva (D).

El sistema se compone de un biorreactor Schott Duran de vidrio pírex no estéril. El volumen de la fase líquida está comprendido en un rango entre 1,8 y 2 litros, dependiendo de la evaporación diaria a la cual se expone dicha fase. La temperatura del reactor se controla en $67 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$, gracias a un baño termostático Techne (modelo TE-8J) que guía agua destilada caliente a la chaqueta externa que presenta el reactor, además de una termocupla que registra la temperatura interna. El reactor se opera en modalidad batch para la fase líquida (medio de cultivo Norris) y sólida (perlas de azufre elemental), y en forma continua para la fase gas (aire).

Un esquema que permite entender las conexiones del sistema se presenta en la Figura 6:

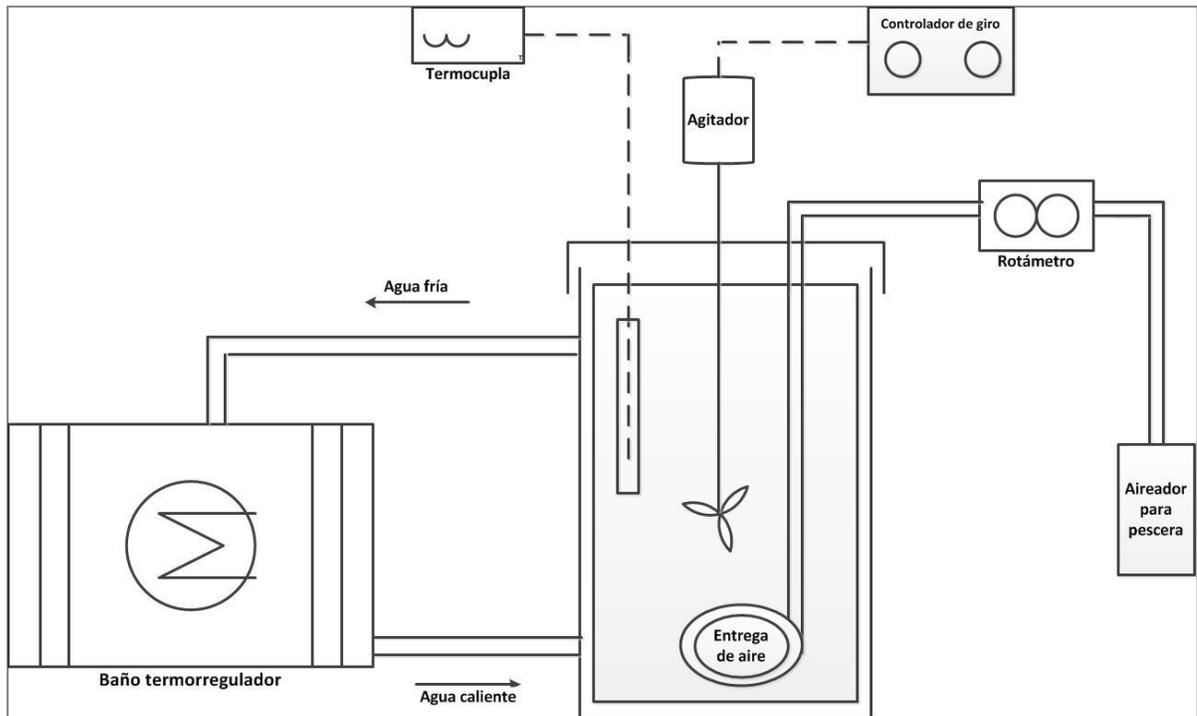


Figura 6: Esquema teórico de montaje del biorreactor batch. Se nombran todos los componentes del sistema.

El medio líquido y las perlas se agitan mecánicamente por una paleta de vidrio de tres aletas, lo cual se acopla a un difusor de aire en el interior del recipiente. Las dimensiones del contenedor se muestran en la Figura 7, mientras que las medidas de paleta y difusor se encuentran en la Figura 8.

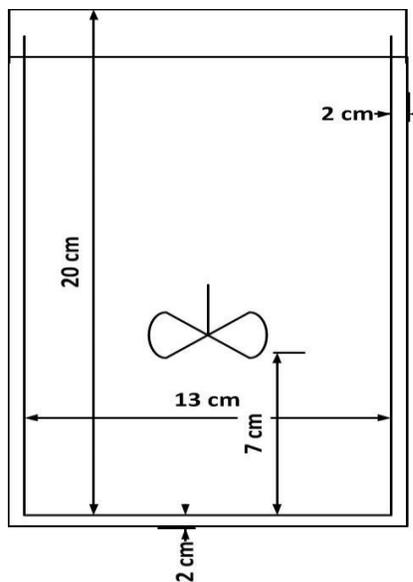


Figura 7: Dimensionamiento del contenedor de vidrio utilizado para el montaje.

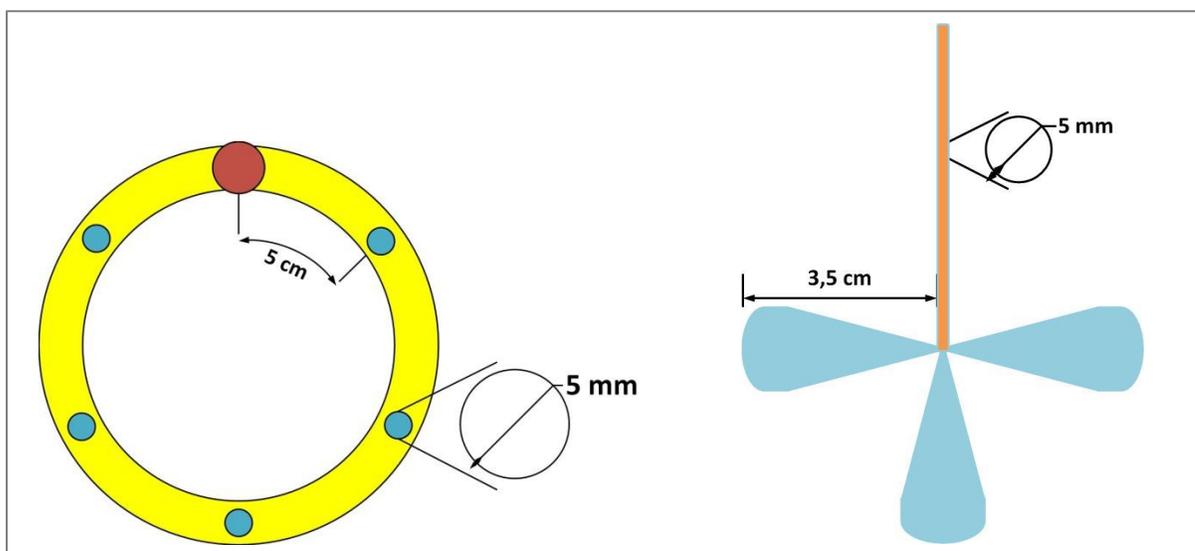


Figura 8: Componentes de aireación y agitación. A la izquierda se muestra el distribuidor de aire, una manguera con 5 orificios equiespaciados cada 5 [cm]. A la derecha se muestra un agitador de vidrio que posee tres paletas verticales.

Para inocular el reactor, previamente se realiza un crecimiento de *Sulfolobus metallicus* en matraces. Este crecimiento se lleva a cabo en 4 matraces, hasta que se alcance en cada uno de ellos un pH en el rango 1,1 – 1,3, momento en el cual se filtran los sobrenadantes, y se obtiene un inóculo inicial de $7,4 \cdot 10^6$ [arqueas/mL].

El reactor se prepara primero instalando el aireador circular dentro del recipiente. Posteriormente se ingresan al sistema 60 [g] de perlas de azufre elemental, de diámetro entre 2,36 y 3,32 [mm], seguido de un inóculo de aproximadamente 5 [mL] de concentrado de arqueas, producto del filtrado de los matraces. Finalmente, se ingresa al sistema medio de cultivo Norris 2,3 no estéril, hasta alcanzar un volumen de operación de 2 [L]. Se enciende el sistema de entrega de calor, y al alcanzar los 67°C se inicia el tiempo de medición.

El flujo de aire se fija en 1 [L/min], conocida gracias al método de probeta invertida, y monitoreada por un rotámetro, marca Veto \$ Cía. (modelo 1208). El aire, que contiene los gases necesarios para el crecimiento y respiración celular (CO_2 y O_2) se suministraba gracias a un aireador para peceras, marca Shark (modelo RS-510). Además, se emplea una agitación de 200 RPM, suficiente para lograr la suspensión completa de las perlas de azufre. El agitador utilizado es de marca Cole-Parmer modelo 60626, con controlador de giro modelo 4550-30.

En la Tabla 7 se presentan las características iniciales de operación del biorreactor batch.

Tabla 7: Condiciones iniciales de operación en el reactor batch.

Temp. (°C)	Flujo aire [L/min]	Giro [RPM]	Volumen (L)	Masa S_0 (g)	Diámetro partículas [mm]	Células iniciales [cel/mL]
67	1	200	2	60	Entre 2.36 y 3,32	$7,4 \times 10^6$

3.2.2 Mediciones en batch

a) Reposición del agua evaporada

Para realizar un seguimiento periódico al biorreactor, primero se repone el agua evaporada diariamente.

Procedimiento

1. Medir la altura de descenso del volumen del biorreactor, utilizando una pipeta de vidrio en la que se conozca su graduación en centímetros.
2. Calcular el volumen de agua evaporada, asumiendo que la densidad es $1 \text{ [gr/cm}^3\text{]}$ y que el área transversal del reactor es circular.
3. Reponer dicho valor con agua destilada.

Al restablecer el volumen en 2 [L], se mantiene en agitación durante una hora hasta que vuelva a homogenizarse el sistema. A continuación se retiran 120 [mL] de muestra del mismo, usando una bomba peristáltica prevista para dicha labor, y una probeta de 1000 [mL]. Este volumen es repuesto luego con medio de cultivo Norris a pH 2,3 no estéril, con fin de preservar la fase líquida.

b) Medición de pH

El pH del reactor disminuye a medida que se oxida azufre elemental, lo cual se registra con un pH-metro externo. Se utiliza un equipo no integrado al reactor con el objeto de preservar la integridad del electrodo del mismo, el cual puede constantemente deteriorarse por el movimiento de azufre, microorganismos que se adhieran a este y/o perder la calibración por efecto de la temperatura.

Las mediciones (en duplicado) se realizan inmediatamente al retirar muestra diaria del reactor, usando 4 [mL] de sobrenadante del equipo repartidos en dos tubos Falcon de 10 [mL], en los cuales se ingresa directamente el electrodo de medición. Se registran ambos valores de pH, y su promedio corresponde al valor diario.

c) Medición de ácidos y sulfato en solución

Se siguen los mismos protocolos utilizados en matraces, realizando duplicados para cada medición diaria.

d) Crecimiento celular

El crecimiento celular se monitorea inicialmente filtrando un volumen de 100 [mL] de solución proveniente del reactor, lo cual permite concentrar las arqueas para su posterior resuspensión y conteo.

Materiales y Equipos

- Equipo de filtración Millipore de 250 [mL].
- Membrana Millipore con tamaño de poro de 0,22 [μm].
- Tubos Eppendorf de 1000 [μL].
- Materiales descritos en sección 3.1.4.5.
- Matraz de 50 [mL].

Procedimiento

1. Filtrar 100 [mL] de la muestra diaria de biorreactor.
2. Resuspender la/las membrana/s de filtración necesarias en el matraz de 50 [mL], utilizando 5 [mL] de medio Norris 2,3 no estéril.
3. Realizar diluciones de 2, 5, 10 ó 100 veces en agua destilada, dependiendo de la turbidez de la resuspensión celular.
4. Seguir el procedimiento de conteo descrito en la sección 3.1.4.5.

3.3 Biorreactor en Modo Continuo

Para entrar en modo continuo de operación, se mantienen los parámetros del modo batch, empleando ahora un flujo de entrada y salida al sistema gracias a dos bombas peristálticas de la misma potencia. Los flujos de operación se proponen una vez que el crecimiento celular es determinado en batch, además de conocer la capacidad de las bombas. En esta investigación se utilizan los flujos de 0,9; 1,8; 2,7 y 3,6 [mL/min].

3.3.1 Montaje experimental

La distribución de los componentes del sistema en modo continuo y las conexiones realizadas en el laboratorio se muestran en la Figura 9.



Figura 9: Montaje experimental del biorreactor en modo continuo de operación. Se utiliza el mismo diseño que en batch, agregando sistemas de entrada de medio de cultivo y salida de la solución ácida producida en el biorreactor.

Un plano conceptual que presenta de mejor manera el montaje anterior se presenta en la Figura 10.

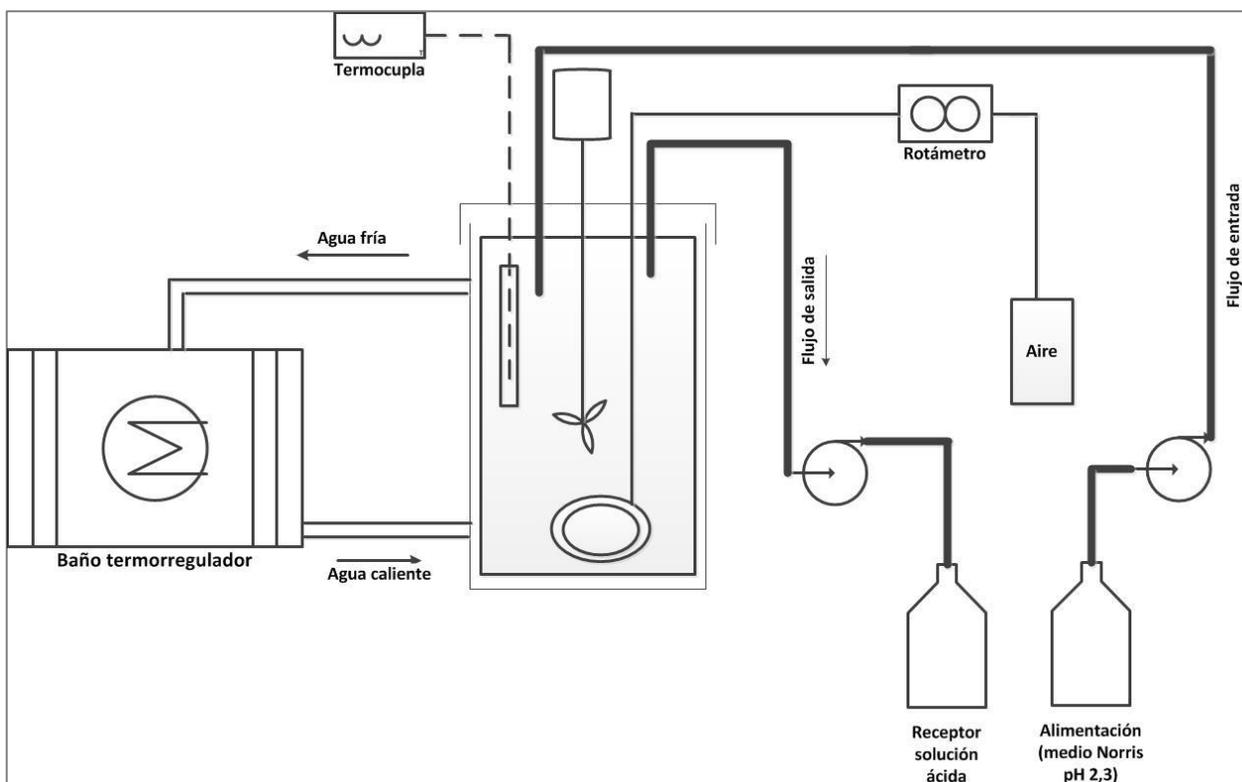


Figura 10: Diseño teórico del sistema de reacción en modo continuo. Se puede apreciar que tanto la entrada como la salida del sistema se realizan en la parte superior del contenedor de reacción, por lo que el volumen del sistema se puede autorregular sólo con el movimiento de fluidos. La salida se realiza en modo “overflow”.

El sistema se compone de los mismos materiales con los que se desarrolla el reactor batch, agregando al sistema una entrada y una salida, ambas mangueras Masterflex Tygon (modelo 06509-14) seleccionadas para lograr el control de los flujos a estudiar. El movimiento de fluidos se desarrolla por las bombas peristálticas antes nombradas (marca Cole-Parmer modelo 7554-20), las cuales tienen velocidades de flujo variables, que son determinadas empíricamente. Se agrega además al sistema receptáculos de entrada y salida, donde la primera tiene medio de cultivo Norris 2,3 no estéril, y la segunda recibe el líquido ácido proveniente del biorreactor, que es una mezcla principalmente de medio de cultivo desgastado en nutrientes, arqueas en suspensión, ácido sulfúrico producido y azufre en polvo sin reaccionar.

El volumen diario del reactor se regula de forma natural, debido a que tanto la entrada como la salida se encuentran en la sección superior del reactor, dejando la salida de fluido por overflow. En términos de operación, la fase líquida y gaseosa se encuentran en modo continuo, pero las perlas de azufre se mantienen en batch. En este sentido, el comienzo del modo continuo se inicia a partir de un estado batch previo, para aprovechar la colonización completa de las perlas por parte de las arqueas y utilizar los valores de crecimiento obtenidos en el estado previo.

Importante es destacar que, en el momento en que se alcanza el estado estacionario con un flujo determinado, inmediatamente comienza el proceso para un nuevo estado (aprovechando las mismas perlas colonizadas), reduciendo así el tiempo de investigación.

El resto de parámetros, como la agitación y el flujo de aireación se mantienen constantes, es decir 200 [RPM] y 1 [L/min], respectivamente.

3.3.2 Alcanzando el estado estacionario

Un estado estacionario es definido como tal cuando las características del mismo no varían con el tiempo. Como propuesta de estado estacionario, se propone utilizar la variación de pH en el tiempo, debido a que este valor resulta el más simple de monitorear, además de presentar directa relación con la concentración de ácido sulfúrico, sulfato en solución e indica de manera simple que el cultivo al interior del medio de reacción prospera (18).

Por ende, la metodología de determinación de estado estacionario se basa en monitorear diariamente el pH del biorreactor, 2 a 3 veces al día, hasta que alcance un valor que no se altere en un rango mayor a 0,02 unidades de pH, en un intervalo de tiempo mayor a 24 horas de medición seguida. Debido a las mediciones que se realizan, se puede esperar un rango superior a 40 horas de funcionamiento del estado estacionario antes de extraer alícuotas para las mediciones posteriores.

Las variables a controlar cuando se detecta el estado estacionario son: pH, acidez, concentración de sulfato en solución y el número de células planctónicas, medidas utilizadas para pronosticar la concentración de ácido sulfúrico que puede producirse, además de ser variables importantes para establecer un modelo del biorreactor en modo continuo de operación.

La principal diferencia en las mediciones con respecto al caso batch es la toma de muestras. En el caso continuo, se aprovecha el flujo de salida del reactor para captar los 120 [mL] requeridos en las mediciones, volumen que se repone al instante por medio de cultivo Norris 2,3 no estéril. Por ende, debido a esta manipulación el estado estacionario formalmente finaliza cuando se extrae cada muestra.

3.4 Modelación de la biooxidación de azufre en reactores

En la Introducción se ha presentado la formulación típica de un biorreactor, en la cual se destaca el uso de tres balances de masa que poseen expresiones sencillas de utilizar: masa global (Ecuación 4), biomasa (Ecuación 10) y producto de interés (Ecuación 17).

La primera ecuación es sólo la definición de reactor perfectamente agitado, base de la modelación posterior. Las otras dos expresiones permiten evaluar parámetros importantes sobre la operación continua del biorreactor, como la tasa específica de crecimiento de *Sulfolobus metallicus* en el medio (μ) y los rendimientos de producción celular (Y_P^{XA}, Y_P^{XS}), que además de entregar la productividad también permiten conocer la demanda de oxígeno que presenta el sistema de reacción.

El procedimiento sobre el manejo de la información monitoreada se caracteriza como sigue:

1. Para cada uno de los 4 flujos evaluados (0,9; 1,8; 2,7; 3,6 [mL/min]), se determina el estado estacionario por la medición de pH diario. De dicho estado se obtienen tres medidas que lo caracterizan: acidez del sobrenadante, concentración de sulfato en solución y número de células planctónicas, todas en el estado estacionario. Además, puede contabilizarse el tiempo transiente que demora cada flujo.
2. Como se observa en las expresiones anteriores, un dato de importancia para el modelo es el número de arqueas adheridas al azufre (de concentración x_A). Dicho valor no se puede conocer directamente en el biorreactor, pues su determinación demoraría cada ciclo estacionario, y no se aprovecharían las perlas de azufre para la evaluación de todos los flujos. Por ende, utilizando la información de superficie total disponible de azufre, se pronostica una concentración de células adheridas por volumen de reactor igual a $1,27 \cdot 10^{11}$ [arqueas/L reactor] (ver Anexo A).
3. En las ecuaciones de biomasa y de producción se puede observar una relación entre las células adheridas/planctónicas y el flujo de operación, para una tasa específica de crecimiento, un factor de efectividad y un valor particular de rendimiento.

Por ende, el sistema planteado de dos ecuaciones no tiene solución con esta serie de parámetros desconocidos. Una alternativa para estudiar el biorreactor con la información recopilada es determinar la importancia de las arqueas adheridas por sobre las planctónicas en la producción de ácido sulfúrico.

En otras palabras, este enfoque se desarrolla siguiendo el crecimiento celular considerado por la Ecuación 10, y comparándolo con la simplificación empleada en la Ecuación 12. Se busca entonces contrastar los valores obtenidos de la tasa específica de crecimiento μ en ambos casos, concluyendo entonces si las células suspendidas ejercen o no una influencia importante en el crecimiento celular para el sistema planteado.

En esta decisión se supone inicialmente que el valor μ no varía en cada estado estacionario y, por lo tanto, puede ser obtenido directamente de una regresión a los datos conocidos. Una segunda alternativa es comparar las ecuaciones antes mencionadas, pero esta vez determinando una tasa de crecimiento variable para cada flujo de operación.

Lo anterior se aplica manipulando el factor de efectividad, que tiene un rango conocido entre 0 y 1, para describir distintos valores de μ y Y_p^{XA} , y así definir la mejor combinación para modelar el sistema, debido a la falta de información del proceso.

4. Así es como se plantea desarrollar dos tipos de tratamiento de datos, en los cuales se utilizan 4 valores propuestos arbitrariamente para el factor η_T (0,125; 0,25; 0,5 y 1):
 - a) Asumir que μ es constante en el biorreactor, lo cual permite realizar regresiones lineales de Ecuación 10 y Ecuación 12 para obtener su valor según η_T .
 - b) Análogamente, asumir que μ es variable en cada flujo de operación, y así obtener una colección de tasas de crecimiento para cada valor de η_T .

5. Se comparan los resultados anteriores, de lo cual se concluye sobre el efecto que ejercen las arqueas planctónicas en el sistema de reacción.
6. Para manipular la ecuación de producción, y encontrar el valor del rendimiento Y_p^{XA} , se despreja el efecto de las arqueas planctónicas sobre la producción de ácido sulfúrico (lo cual debiese estar respaldado por el punto anterior). Así, se utiliza la Ecuación 18 para los casos de μ constante y μ variable. Para este último, el considerar una tasa variable de crecimiento equivale a reemplazar la Ecuación 12 en Ecuación 18, tal como sigue:

$$p - p_0 = \frac{x_A \cdot \left(\frac{D}{\eta_T} \cdot \frac{x_S}{x_A}\right) \cdot \eta_T}{D} Y_P^{XA}$$

$$p - p_0 = Y_P^{XA} \cdot x_S \quad \text{Ecuación 42}$$

7. Las ecuaciones que describen la producción por parte de los microorganismos se pueden trabajar además con dos variables de producción: acidez y concentración de sulfato, pues ambas son magnitudes que indican la conversión de azufre en el sistema.

A partir de todo lo anterior, comparando regresiones lineales, sus coeficientes de correlación e información de antecedentes previos, se puede dar una opción de la mejor combinación de valores para modelar el reactor de biooxidación, en función del crecimiento de células y de la producción de ácido. El manejo propuesto resulta simple ya que utiliza sólo regresiones lineales entre los datos estacionarios, evitando mayor complejidad de recursos versus los modelos revisados en Antecedentes Generales, requiriendo sólo una planilla tipo Excel para efectuar cada estimación.

3.5 Estudio de la aireación aplicada al biorreactor

Como un estudio secundario al modelo de biorreactor, se puede estimar la cantidad de oxígeno que el sistema necesita para su desarrollo, y compararlo a la entrega gaseosa por parte del aireador. Para esto se realiza un monitoreo (en el biorreactor en modo batch) de la concentración de oxígeno disuelta en el tiempo. El objetivo de esto es estimar el valor del coeficiente de transferencia de masa combinado ($k_L a_i$), con el cual se puede conocer la entrega de O_2 al sistema (por la Ecuación 28).

Por otro lado, gracias a los valores monitoreados de ácido sulfúrico y sulfato en solución, la relación estequiométrica de reacción, y los rendimientos de producción pronosticados por la modelación, se pueden obtener requerimientos de oxígeno (usando Ecuación 33 y Ecuación 35).

Con estos, se puede diagnosticar al sistema de aireación, de lo cual además pueden extrapolarse cantidades máximas de microorganismos a alimentar, lo cual es señal de la cantidad de azufre a tratar en el biorreactor (ver Ecuación 37).

3.5.1 Toma de datos para el Método Dinámico

Materiales y equipos

- Biorreactor en modo batch (mismas condiciones de operación a 67°C).
- Medidor de oxígeno disuelto Hanna modelo HI-8410.
- Balón de nitrógeno.

Procedimiento

1. Cortar el suministro de aire al biorreactor.
2. Cambiar la fase líquida por medio de cultivo Norris 2,3 no estéril fresco. Perlas de azufre permanecen en el fondo del equipo.
3. Ingresar gas N₂ al medio, manteniendo la agitación típica del biorreactor, durante 20 minutos, utilizando el aireador circular del sistema.
4. Pasados los 20 minutos, sin cortar aún el nitrógeno, ingresar el electrodo del medidor de oxígeno disuelto al medio. Esto sirve para que el aparato responda a la temperatura interna de reacción.
5. Extraer rápidamente el electrodo, cambiar el líquido buffer del mismo y reingresarlo al biorreactor.
6. Monitorear que el nivel de O₂ alcance un valor mínimo entre 0 - 0,4 [mg/L].
7. Cortar el suministro de N₂ y reinstalar el suministro de aire.
8. Monitorear el cambio en concentración de oxígeno durante 40 minutos, o hasta alcanzar una concentración superior a los 3 [mg/L] de O₂, señal de la saturación en el medio líquido.

3.5.2 Análisis de la entrega de oxígeno

El diagnóstico sobre la transferencia y disponibilidad de oxígeno para la reacción de biooxidación se lleva a cabo evaluando tres etapas principales: la masa de oxígeno que se burbujea, la cantidad que efectivamente se transfiere al medio líquido y el total utilizado por la reacción.

Para la primera etapa, basta determinar la masa de O₂ en el burbujeo a partir del flujo de aireación y la concentración de oxígeno en el aire, que es conocida a 25°C (21% del aire atmosférico).

Con respecto al oxígeno transferido efectivamente al sistema se aplica el Método Dinámico. Para esto, se ingresa nitrógeno al biorreactor en modo batch para extraer el oxígeno, retirándolo una vez alcanzado un nivel mínimo. Luego, se reubica la aireación usada normalmente y comienza el monitoreo de la concentración de oxígeno en el tiempo, durante los 40 minutos de medición, hasta alcanzar un valor estacional. A partir de esto, se puede graficar y obtener una regresión lineal que entregue el valor de $k_L a_i$. Lo anterior se aplica en dos experiencias para determinar este valor en duplicado.

La tercera etapa corresponde a obtener la cantidad de oxígeno que se utiliza en la reacción de biooxidación de azufre. Esto puede ser visto desde dos perspectivas: observando cada estado estacionario encontrado, determinando así el correspondiente flujo de oxígeno utilizado (Ecuación 33); o evaluando el consumo de O_2 a partir del valor de rendimiento de producto (Y_P^{XA}) desde el modelo del biorreactor, convertirlo a rendimiento de oxígeno (Y_{O_2}) (Ecuación 34) y así estimar el requerimiento del sistema (Ecuación 35).

A partir de las tasas de consumo, es posible estimar la cantidad de O_2 disuelto que no es utilizado en la reacción, en base a la Ecuación 28 y el $k_L a_i$, y que permanece en el medio luego de alcanzar cada estado estacionario (C_L). Dependiendo de este valor, puede concluirse si la transferencia de oxígeno es adecuada para el medio de reacción, y permite estimar además la disponibilidad de oxígeno en el biorreactor, lo cual tiene directa relación con la máxima cantidad de azufre que podría ser tratado bajo las condiciones de operación y crecimiento celular propuestas.

Lo anterior puede estimarse en base a la máxima cantidad de células adheridas que podrían desarrollarse con el valor límite del gradiente de concentración de oxígeno en la fase líquida (C_L igual a cero), utilizando la Ecuación 37 para su determinación. De ahí, puede entonces obtenerse la superficie y, por ende, la masa de azufre límite que cubrirán dichas arqueas.

4 Resultados

4.1 Cultivo celular en matraces

Gracias a los trabajos previos sobre el tema, se puede afirmar el éxito en el crecimiento celular de *Sulfolobus metallicus* en matraces, punto de partida para el biorreactor. Por ende, se realizó un escalamiento simple para adoptar las condiciones en matraces como características de operación del reactor batch. Además, se utilizaron matraces para generar pre inóculos que se usarían en el biorreactor y también como insumo de aprendizaje de la metodología de monitoreo.

Es por estas razones que se procuró mantener en el biorreactor: un nivel de agitación que permita desplazar las perlas en el contenedor respectivo (200 RPM), aunque no lo suficientemente fuerte como para que se dispersen libremente en todo el volumen de reacción (similar al movimiento del shaker); regular una temperatura óptima de crecimiento; y mantener la relación entre el medio de cultivo y perlas de azufre (3% p/v).



Figura 11: Imagen de los 4 matraces utilizados para la preparación de inóculos de *Sulfolobus metallicus* sobre azufre elemental a 67 °C.

4.2 Biorreactor tipo Batch

4.2.1 Resultados de medición en el tiempo

El biorreactor se analizó de forma batch, estableciendo parámetros de crecimiento en el tiempo, para luego aplicar este conocimiento a un reactor de operación continua.

Con este fin se monitoreó el comportamiento de la arquea termófila *Sulfolobus metallicus* en la biooxidación de azufre a 67°C, utilizando el tanque de vidrio preexistente en el laboratorio (de 2L), con condiciones determinadas por un escalamiento sencillo entre un matraz y el contenedor

final. Se realizó un cultivo de arqueas en azufre, aunque sin una muestra control, debido a que la funcionalidad de la arquea en la biooxidación ya ha sido establecida (18).

Durante los días que duró la experiencia en el biorreactor batch, se monitorearon periódicamente el pH de la solución con un electrodo de vidrio, la concentración de protones por titulación y la concentración de sulfato por turbidimetría. Asimismo, se realizó un recuento diario de bacterias planctónicas en el microscopio de Epifluorescencia

A continuación se muestra el comportamiento observado en el biorreactor operado en batch:

4.2.1.1 Evolución del pH

En el Gráfico 2 se muestra la variación del pH en el tiempo para el proceso de biooxidación de azufre a 67°C por acción de *Sulfolobus metallicus*, con un monitoreo realizado por un pH-metro externo al sistema.

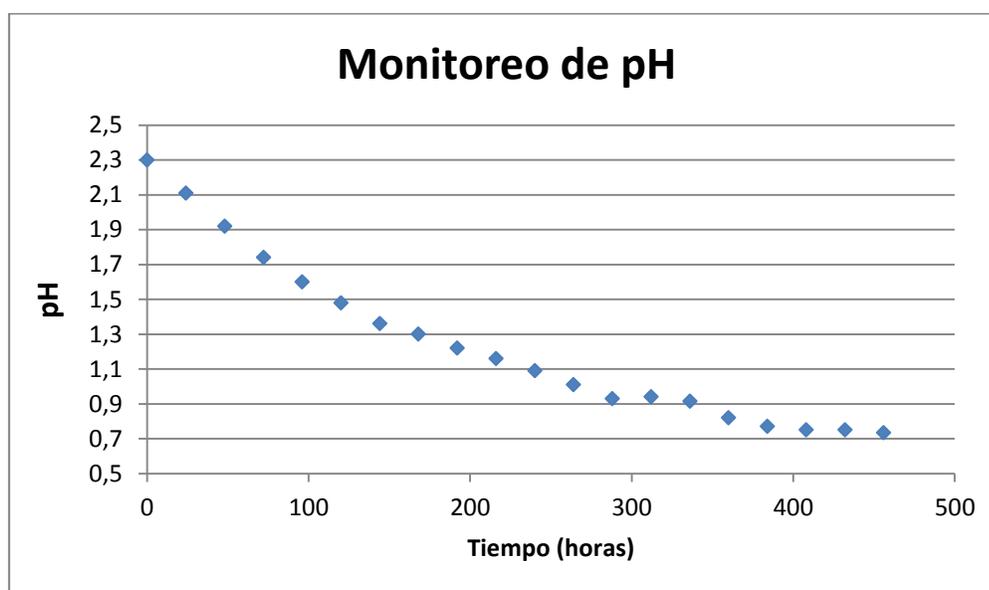


Gráfico 2: Monitoreo de pH en el tiempo para el biorreactor batch, entre 0 y 456 horas.

Como se observa, en el biorreactor se presentó una baja considerable de pH, desde 2.3 a 0.74, durante el desarrollo del estudio (456 horas). Esta disminución es debida a la acción de las arqueas, donde los protones serían generados desde la disociación de moléculas de agua, por efecto de la formación de sulfato en el medio.

4.2.1.2 Evolución en acidez del medio

Se estudió la variación de la concentración de ácidos en solución, en forma de protones libres y ácido sulfúrico. Para este seguimiento, sin embargo, se asume que el ácido detectado en la titulación ácido base pertenece a ácido sulfúrico, lo cual se presenta en el Gráfico 3.

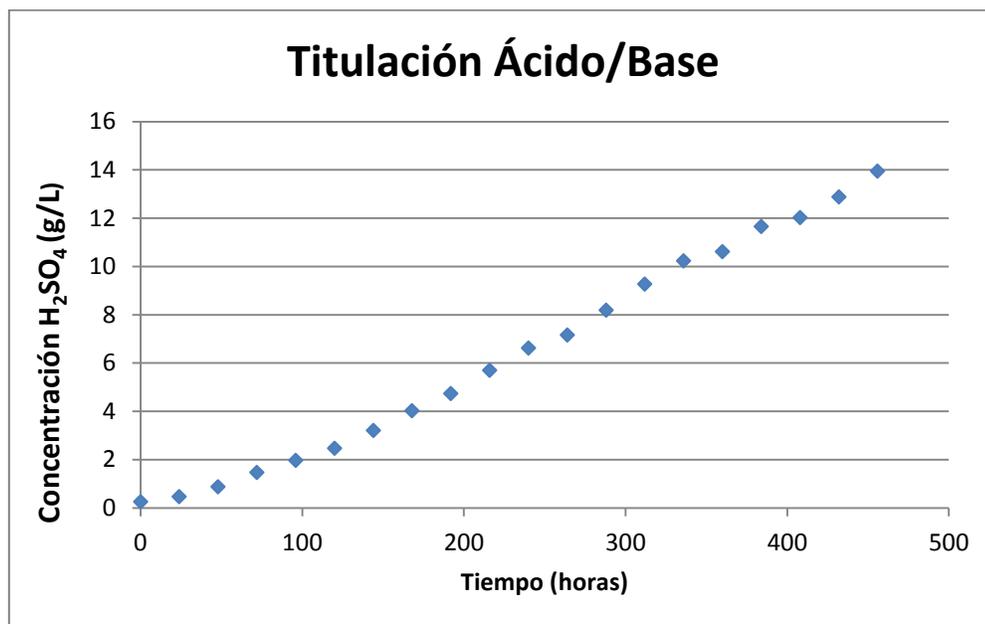


Gráfico 3: Generación de ácido sulfúrico en el tiempo, entre 0 y 456 horas.

Se puede observar que la concentración de ácido sulfúrico prevista aumenta sostenidamente en la operación batch, desde los 0,25 [g/L] de ácido que posee el medio de cultivo Norris inicial ingresado al biorreactor, hasta los 13,95 [g/L] a las 456 horas, con un inicio lento en las primeras 48 [horas].

Estos valores se determinaron en base al consumo de hidróxido de sodio realizado en la titulación, obteniéndose la normalidad del ácido sulfúrico a partir de la Ecuación 38, que luego puede ser convertida a concentración de ácido sulfúrico en [g/L] con el peso equivalente de este compuesto (Ecuación 39). Por su parte, utilizando la Ecuación 40 se puede calcular un valor de concentración esperado de protones en solución [mol/L], por lo que se puede estimar un valor de pH si se utiliza la Ecuación 41.

Con lo anterior es posible observar la relación existente entre concentración de ácido sulfúrico y el pH medido en el biorreactor. Para esto, un resultado de interés es conocer la comparación entre el pH monitoreado por el pH-metro y el que prevé la titulación ácido base. El Gráfico 4 presenta ambas mediciones, donde cada una inicia en el valor del medio de cultivo puro (de pH 2,3). En el transcurso del tiempo estos valores varían en una magnitud casi constante, finalizando el caso medido por el equipo en un pH de 0,74 y la estimación en 0,55 a las 456 horas del ensayo batch.

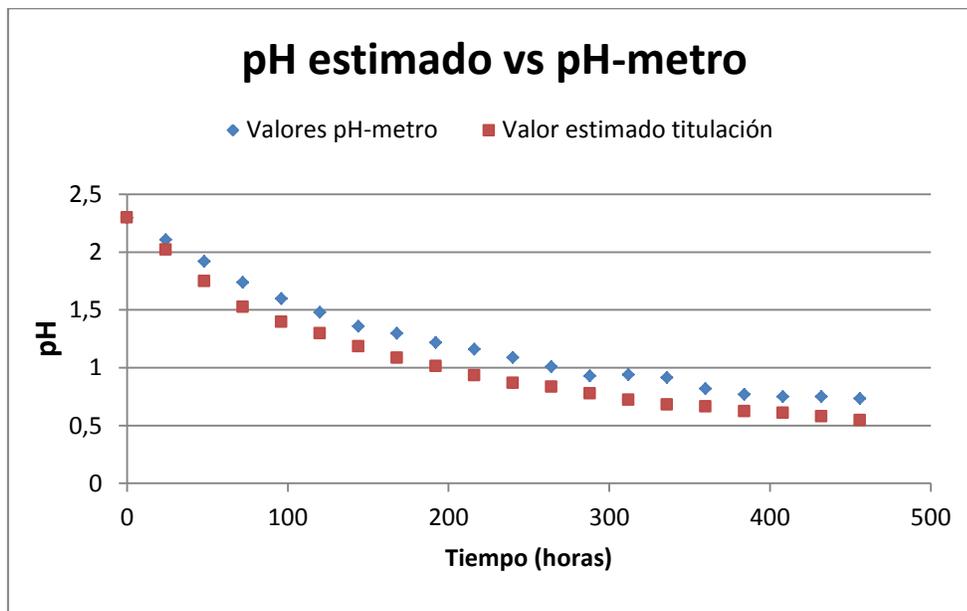


Gráfico 4: Comparación entre el pH estimado por acidez medida en titulación y el pH detectado por el equipo de medición. Se observa un comportamiento similar, e incluso los datos reportados son parecidos en el transcurso de la medición.

4.2.1.3 Evolución de la concentración de sulfato

La concentración de ión sulfato determinada mediante turbidimetría se puede observar en el Gráfico 5. En el biorreactor batch con presencia del arquea se observó un aumento lineal y sostenido durante el tiempo de evaluación, que resultó de 288 horas debido a la mayor complejidad de su evaluación versus los registros presentados previamente. El cambio en concentración fue desde los 857 [ppm] (0,86 [g/L]) hasta los 9850 [ppm] (9,9 [g/L]) aproximadamente.

Cabe mencionar que por medio del método de turbidimetría no es posible determinar la concentración de intermediarios de azufre, sino sólo la concentración de azufre disuelto como sulfato. Es por lo anterior que se considera a este ión como medida representativa de la oxidación de azufre elemental en el tiempo.

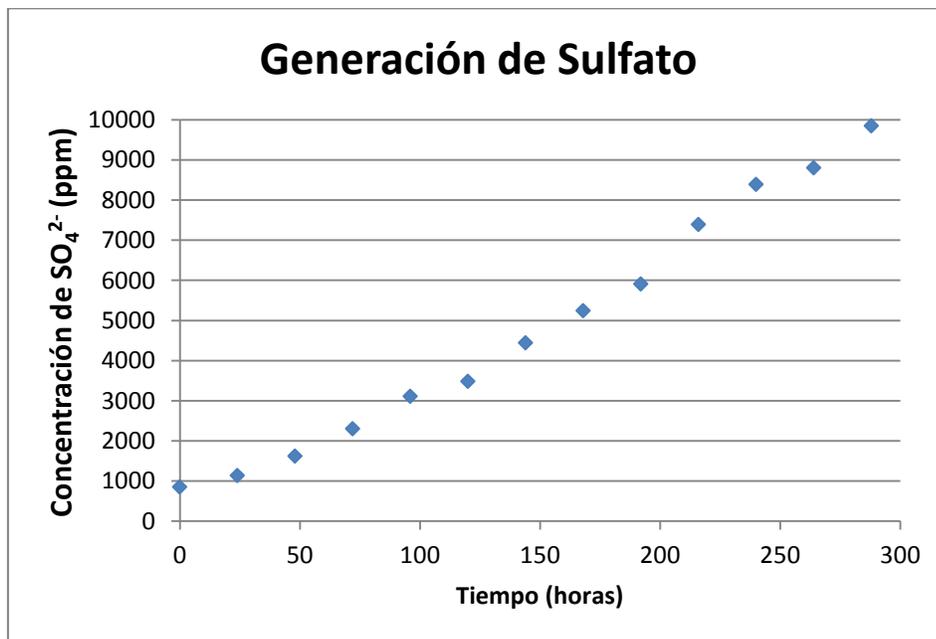


Gráfico 5: Seguimiento de la generación de sulfato por turbidimetría en el tiempo, entre 0 y 288 horas.

4.2.1.4 Cuantificación de arqueas planctónicas

Con el objetivo de evaluar la concentración y proliferación de las células planctónicas, se tomaron muestras directas desde el biorreactor batch, se filtraron y, dependiendo de la medición, se diluyeron, para posteriormente ser cuantificadas mediante recuento directo por cámara tipo Neubauer en el microscopio de epifluorescencia. En la Figura 12 se puede apreciar una fotografía de la evolución en el crecimiento de *Sulfolobus metallicus* suspendidas en el biorreactor.

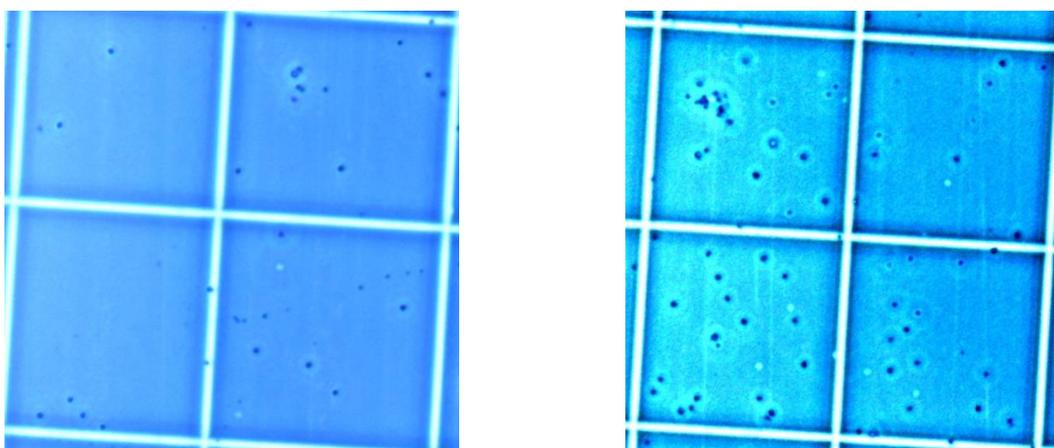


Figura 12: Imágenes del recuento directo realizado a las arqueas planctónicas, en el microscopio de epifluorescencia, para cuatro cuadrados de cámara. Se observan las bacterias como puntos oscuros. A la izquierda se presenta un conteo realizado 96 horas después de iniciado el experimento batch, mientras que a la derecha se observa el mismo conteo pero a las 192 horas desde el inicio.

Por su parte, en la Figura 13 se presentan imágenes del ataque que sufren las perlas de azufre por parte de los microorganismos, sacadas con el aumento natural del microscopio, sin lentes adicionales en combinación (aumento < 10x), buscando registrar algún cambio físico en las perlas.

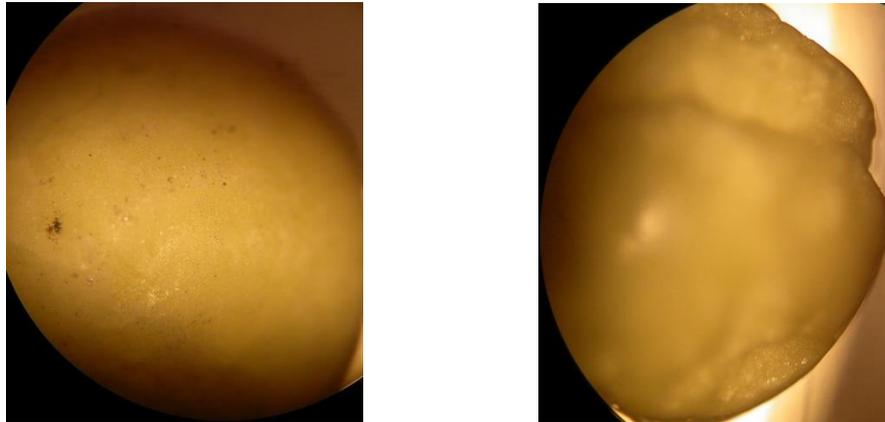


Figura 13: Imágenes de las perlas de azufre antes (izq) y después (derecha) de la acción bacteriana en el reactor batch. Se observan zonas de ataque sobre las perlas (que inicialmente son lisas), lo que indica un cambio físico en las perlas producto de la acción de *Sulfolobus metallicus*.

Por otra parte, la proliferación de arqueas suspendidas puede ser observada en el Gráfico 6. La concentración inicial de células fue de $7,4 \cdot 10^6$ [arqueas/mL] equivalentes a $1,5 \cdot 10^{10}$ células totales en suspensión. Este valor aumenta de manera importante (desde las 168 horas) y se obtiene un máximo a las 216 horas de cultivo, correspondiendo a una concentración de $1,1 \cdot 10^9$ [arqueas/mL] ($2,1 \cdot 10^{12}$ arqueas totales) en el biorreactor. A partir de las 216 horas, las células desaparecen levemente, y en los tres últimos puntos de medición las células planctónicas se estabilizan entre $6 - 8 \cdot 10^8$ [arqueas/mL], que corresponden a un rango entre $1,2 - 1,6 \cdot 10^{12}$ arqueas totales en suspensión.

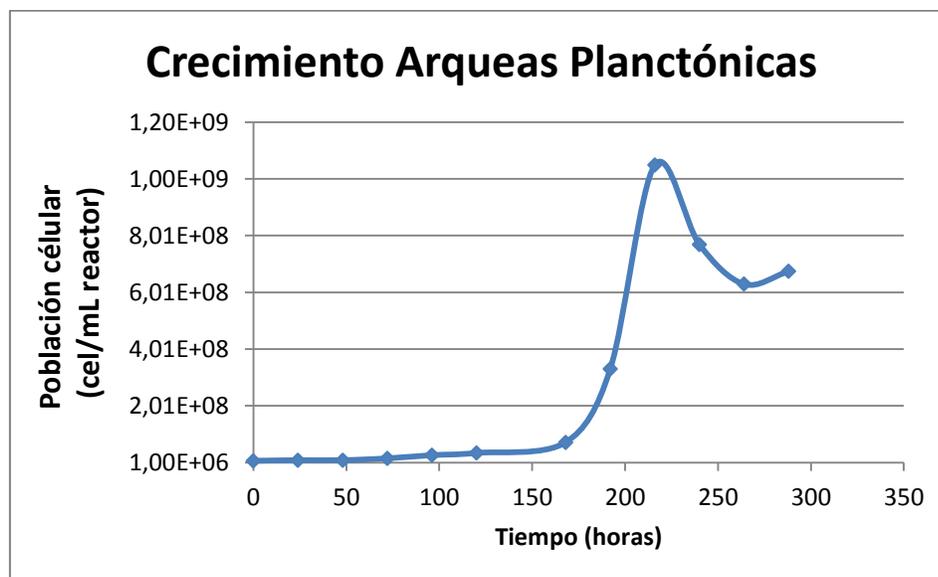


Gráfico 6: Seguimiento en el tiempo de las arqueas planctónicas. Los primeros puntos parecen ser constantes, pero dicha observación se aleja de la realidad, pues existen importantes diferencias en las mediciones (aproximadamente 10 veces entre el primer y séptimo puntos).

4.2.2 Determinación de la cinética de crecimiento celular

A partir de la cuantificación de arqueas planctónicas en el tiempo, es posible describir una cinética de crecimiento referencial para *Sulfolobus metallicus* al interior del biorreactor batch.

Para esto, se debe tener presente un supuesto importante. Se ha detectado en experiencias previas que tanto células adheridas como en suspensión tienen la habilidad de crecer en un medio batch (45) (46). No obstante, para obtener una estimación inicial de la tasa de crecimiento, se asumió un desarrollo preferencial de aquellas arqueas que se adhieren a su fuente de electrones y, por ende, de energía (en modo batch). Luego, se puede despreciar el crecimiento de células en suspensión propiamente tal.

Como segunda idea, cabe destacar el hecho de que la reproducción celular de arqueas adheridas se supone como una división en la cual se generan dos nuevas células: una célula adherida fija, y otra que escapa al seno del medio de reacción, por lo que se convierte en una nueva célula planctónica.

Por lo tanto, gracias a los conceptos expuestos anteriores, se puede suponer inicialmente que el cambio en arqueas planctónicas se debe efectivamente a la reproducción de arqueas adheridas sobre las perlas de azufre, y una curva de crecimiento diseñada a partir del conteo presentado en el Gráfico 6 da cuenta de la velocidad a la cual las bacterias adheridas se estarían reproduciendo.

Con lo anterior en mente, se puede rediseñar el Gráfico 6 para generar una curva semi-logarítmica que permita seguir eficientemente el crecimiento celular, tal como se muestra en el Gráfico 1 de crecimiento bacteriano. En este sentido, el Gráfico 7 es resultado de aquel manejo numérico.

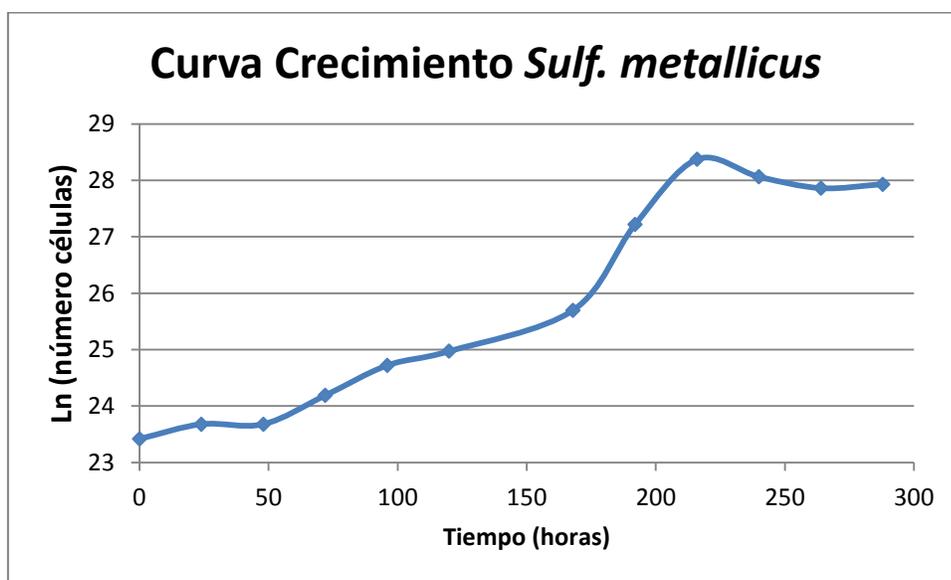


Gráfico 7: Curva de crecimiento logarítmica de arqueas en el tiempo. Se observa una fase de crecimiento exponencial entre las 168 y las 216 horas de medición, mientras que una fase de latencia en las primeras 168 horas, y una fase estacionaria desde las 216 horas hasta el final de la medición (288 horas).

En dicha curva se puede apreciar una fase exponencial de crecimiento de las células (manteniendo agitación, aireación y temperatura constantes) entre las 168 y las 216 horas (esto se relaciona además a lo observado en el Gráfico 6). También es posible identificar una fase de latencia durante las primeras 168 horas (se observa sólo un leve crecimiento celular), y una fase estacionaria desde las 216 horas hasta el fin de la experiencia. En esta última se presenta en realidad un descenso en el conteo celular (Gráfico 6), que para fines de la representación logarítmica del Gráfico 7 se expresa como la finalización del crecimiento exponencial.

Un resumen de los valores límites de la fase exponencial detectada en el Gráfico 7 se observa en la Tabla 8.

Tabla 8: Valores entre el comienzo y fin de la fase exponencial de crecimiento detectada en el reactor batch.

Horas	Ln (n° células)
168	25,69
216	28,37

Asumiendo un crecimiento de tipo Monod, se puede utilizar la versión integrada de la Ecuación 1 como sigue:

$$\mu = \frac{\ln(x) - \ln(x_0)}{t - t_0} \quad \text{Ecuación 43}$$

$$\mu = 0,056 [h^{-1}]$$

El valor obtenido es resultado de suponer un crecimiento exclusivo de arqueas adheridas. Se debe recordar que es una primera aproximación, y carece de precisión pues en su cálculo no se utilizó ningún conteo de células adheridas, por lo que sirve netamente como una referencia inicial para los estudios posteriores.

4.3 Biorreactor en Modo Continuo

En la sección 4.2.2 se encontró una velocidad específica de crecimiento (μ) para *Sulfolobus metallicus* en el biorreactor batch equivalente a $0,056 \text{ [h}^{-1}\text{]}$. Este dato es importante pues permite ser utilizado para definir un factor de dilución “D” para el cual los microorganismos pueden crecer a la misma tasa específica observada en batch.

En un biorreactor continuo perfectamente agitado (CSTR), con sólo un tipo de crecimiento celular en suspensión (como en fermentación clásica), se relaciona el factor D y la tasa de crecimiento μ como sigue:

$$D = \frac{F}{V} = \mu \quad \text{Ecuación 44}$$

Es importante señalar que la modelación descrita en Antecedentes Generales (sección 1.1.3.1) es un caso más complejo de análisis que un fermentador ideal, por ende el desarrollo necesario para alcanzar las expresiones de Ecuación 10 y Ecuación 17 difiere de la expresión anterior, por lo que sólo es usado para fines de estimación inicial de flujo.

Dado lo anterior, utilizando la Ecuación 44 y un volumen de reacción de 2000 [mL], entonces se alcanzaría la misma tasa μ hallada en batch, ahora en estado estacionario, cuando se opere el biorreactor con un flujo de:

$$F = \mu \cdot V = 0,056 \cdot 2000 = 112 \left[\frac{\text{mL}}{\text{h}} \right] \approx 1,8 \left[\frac{\text{mL}}{\text{min}} \right]$$

Conocido este valor, se propuso estudiar flujos de producción altos y cercanos a él. En principio, un fermentador clásico sufre el “lavado” de biomasa desde el biorreactor al utilizar flujos mayores al previsto. Sin embargo, como se ha descrito, las células que permiten la biooxidación de azufre permanecen mayormente adheridas a las perlas dentro del reactor, y por ende la producción de ácido sulfúrico continúa en el tiempo, siempre que las perlas se mantengan íntegras en el volumen de reacción.

Por ende, se definieron 4 flujos a operar, que correspondían a las velocidades de alimentación del medio de cultivo, los cuales son fijados por las condiciones del experimento (y la capacidad de las bombas). Los flujos establecidos, en torno al estimado idealmente, fueron de 0,9 – 1,8 – 2,7 y 3,6 [mL/min].

4.3.1 Estados transientes

El seguimiento y determinación de cada estado estacionario se realizó según un control diario al pH del biorreactor en modo continuo, ya que posee un sencillo manejo de laboratorio para su monitoreo. El Gráfico 8 presenta el cambio del pH en el biorreactor dependiendo del flujo

utilizado (estado transiente), donde los tiempos finales corresponden al momento en que se determinaba un estado estacionario.

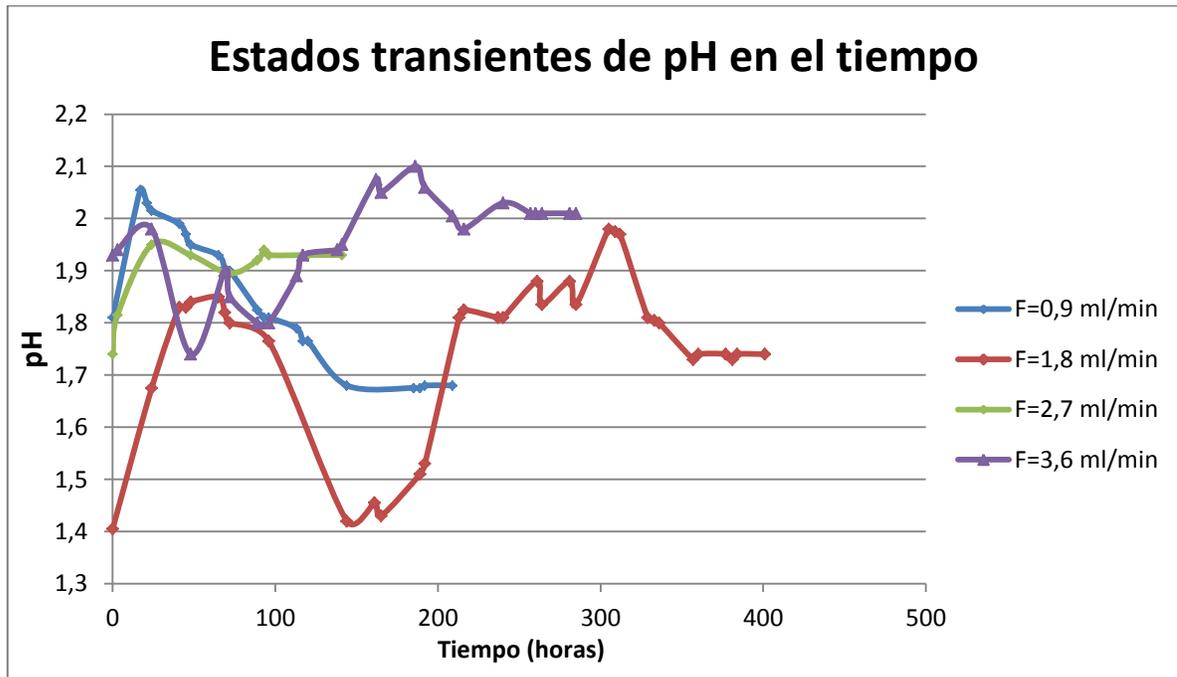


Gráfico 8: Respuesta del sistema de reacción al variar el flujo de operación, determinando el estado estacionario para cada flujo al monitorear el cambio de pH en el tiempo.

La medición se realizó alcanzando el estado estacionario del flujo más bajo (0,9 [mL/min]), e inmediatamente comenzó el seguimiento para el próximo flujo, y así sucesivamente (para 1,8; 2,7 y finalmente 3,6 [mL/min]). Este procedimiento se justificó en el hecho de preservar lo más posible la integridad del azufre elemental utilizado, la cantidad de arqueas adheridas y el tiempo del ensayo en continuo.

Los estados transientes siguieron diferentes comportamientos, según el funcionamiento del montaje experimental, en particular por problemas en el transporte de los flujos de entrada y salida. Por lo anterior, cada estado estacionario registrado se cumplió cuando se logró estabilizar cada flujo del sistema, ya sea modificando la ubicación de las bombas, o reemplazando mangueras que se encontraban colapsadas por partículas de azufre y/o arqueas. Un ejemplo de esto es el bloqueo de la manguera de salida, que traía como consecuencia la falta de control del volumen interno, que típicamente se auto-regulaba por la salida en overflow del sobrenadante.

4.3.2 Estudio del estado estacionario

Una vez resuelto cada caso transiente, se lograron definir los diferentes estados estacionarios buscados. A continuación se muestra la Tabla 9 con los resultados para cada flujo propuesto:

Tabla 9: Resultados estacionarios para cada flujo de operación empleado.

Flujo de operación [mL/min]	Tiempo Transiente [h]	pH	Acidez [g/L ácido]	Concentración sulfato [ppm SO ₄ ²⁻]	Nº células planctónicas estacionario
0,9	144	1,68	1,2	1816	1,76 · 10 ¹⁰
1,8	357	1,74	1,1	1645	1,28 · 10 ¹⁰
2,7	89	1,93	0,6	1142	8,8 · 10 ⁹
3,6	257	2,01	0,5	1073	5,8 · 10 ⁹

Por su parte, las curvas de cada variable monitoreada versus el flujo de operación utilizado en el biorreactor se muestran en los siguientes puntos.

4.3.2.1 Relación pH – flujo operación

En el Gráfico 9 se presenta la relación entre el pH y cada flujo utilizado en el sistema. Se aprecia un crecimiento no lineal del pH estacionario al aumentar el flujo de operación, lo cual es resultado de incrementar el recambio de medio de cultivo en el sistema, acercándose al valor de pH del medio Norris en sí (de pH 2,3).

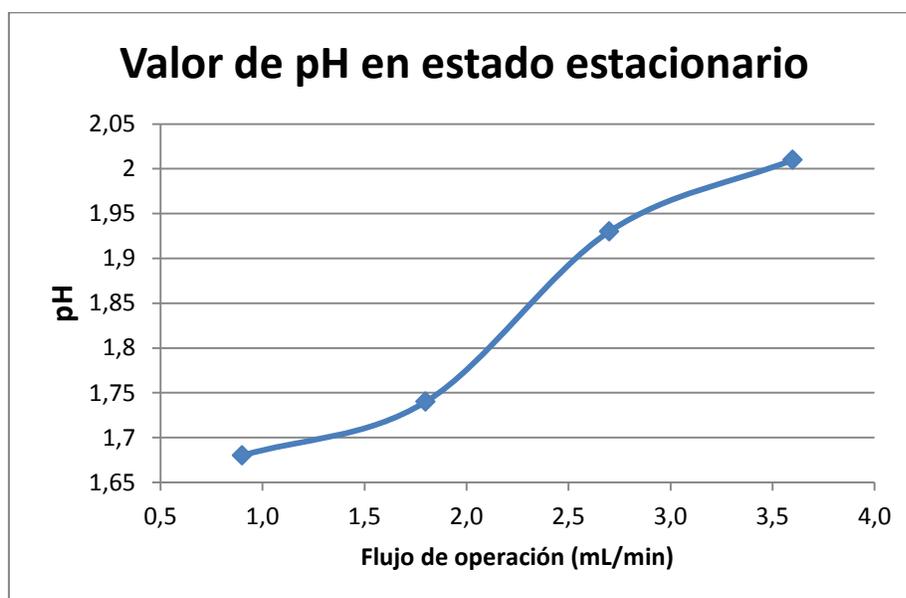


Gráfico 9: Comportamiento del pH según el flujo de operación para cada estado estacionario.

4.3.2.2 Relación células planctónicas – flujo operación

Cada estado estacionario se obtiene según una cantidad de arqueas suspendidas derivadas esencialmente de la proliferación de arqueas adheridas, por lo que conocer la cantidad de células planctónicas puede ser utilizado como una medida de crecimiento celular, similar a lo supuesto en batch. Además, el tener indicios de un posible crecimiento autónomo de arqueas suspendidas (18) (45), hace aún más importante conocer el valor final de estas en el sistema.

En el Gráfico 10 se observa la relación entre las arqueas planctónicas y el flujo al que se opera el biorreactor. En el horizonte de flujos altos que se propuso estudiar, el intervalo de células que se encuentra en suspensión va comprendido entre $5,8 \cdot 10^9$ y $1,76 \cdot 10^{10}$ [células], indicando una presencia continua de arqueas en el sistema, además de corroborar que el sistema no fue lavado al 100% y, además, continua la proliferación de células adheridas.

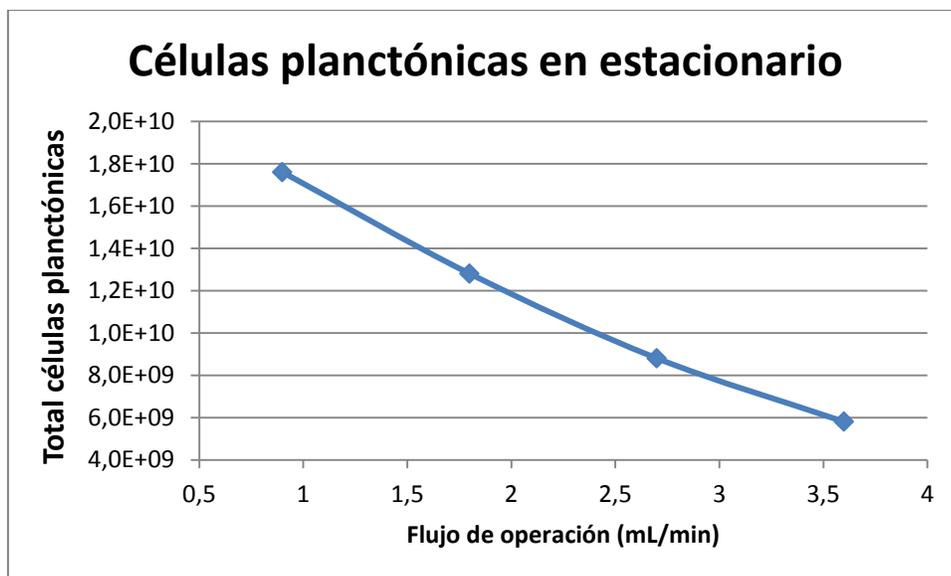


Gráfico 10: Conteo de células planctónicas según flujo de operación en el estado estacionario.

4.3.2.3 Relación acidez – flujo de operación

La variación de acidez en el biorreactor continuo se presenta en el Gráfico 11. En él se puede observar un descenso no lineal de la concentración ácida al aumentar el flujo de operación, lo cual es importante para señalar un criterio de operación del biorreactor, que compare la cantidad de ácido que se pretende obtener en el tiempo (flujo de obtención) versus la concentración requerida para el ataque químico a rocas fosfóricas.

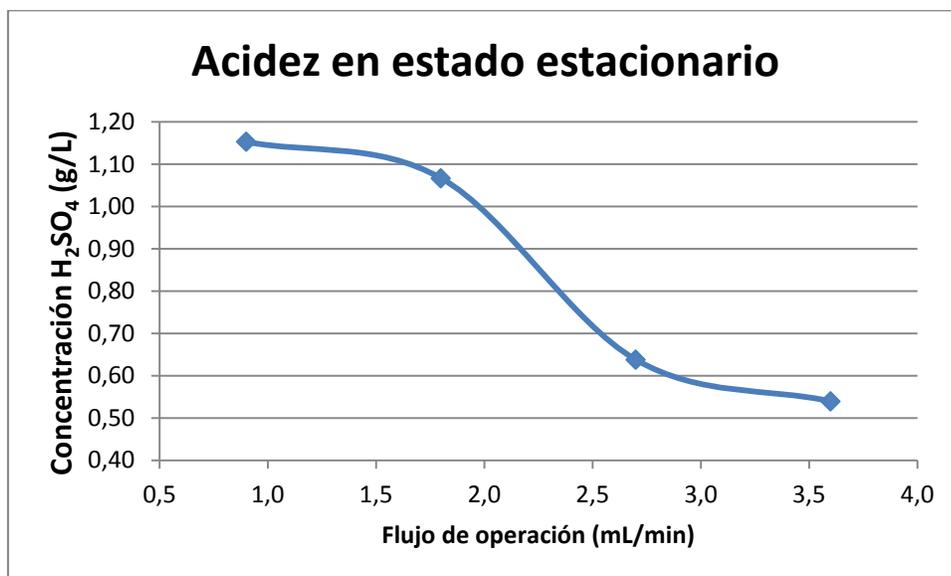


Gráfico 11: Medida de la concentración de ácido sulfúrico en el sistema según flujo de operación en estado estacionario.

4.3.2.4 Relación sulfato en solución – flujo operación

A continuación se muestra el Gráfico 12 que relaciona la concentración de sulfato en solución versus el flujo de operación del biorreactor. Se observa un descenso en la cantidad de sulfato detectado a medida que el flujo aumenta, siendo análoga esta variación a la que entrega la titulación acido-base en el Gráfico 11, e inversa a la que presenta el pH en Gráfico 9.

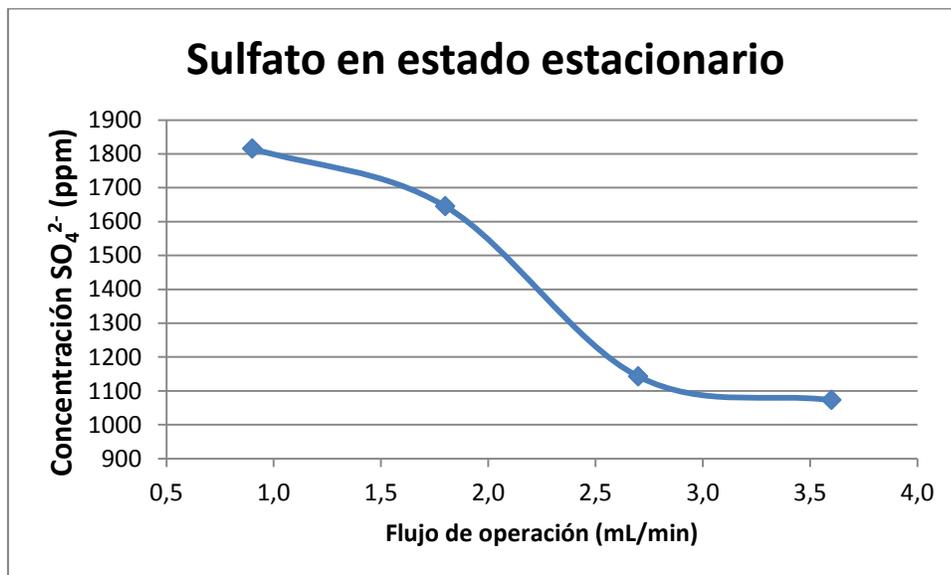


Gráfico 12: Concentración de sulfato en solución para cada flujo de operación en estado estacionario.

4.4 Modelación de la biooxidación

4.4.1 Resumen de la modelación

Para estudiar el biorreactor en modo continuo se asumió un modelo en torno a las ecuaciones presentadas en la sección 1.1.3.1, es decir, se utilizó el concepto clásico de biorreactores. Las expresiones que rigen aquel estudio se resumen en 3 balances de masa que permiten describir el cambio de las especies de interés en el biorreactor en estado estacionario, las que se presentan en Ecuación 4, Ecuación 10 y Ecuación 17, siendo la primera trivial para el sistema estudiado, lo cual deja dos ecuaciones restantes que describen al equipo.

Una variable de importancia es el factor de efectividad (η_T), no sólo porque define los posibles efectos de resistencia en la transferencia de masa que afectan a la biooxidación de azufre con arqueas, sino también pues numéricamente tiene relevancia al momento de generar un modelo a partir de datos experimentales.

Con esto en mente, la modelación del biorreactor se llevó a cabo en una serie de estudios comparativos, para conocer la relación entre las distintas variables, y cuales rigen el sistema estudiado. Es así como, en una primera etapa, se busca evaluar si el crecimiento de arqueas suspendidas es relevante o no para la cinética global del proceso, lo cual ayudaría a simplificar los balances de biomasa y producto. Para este fin se modelan arbitrariamente 4 valores del factor de efectividad: 1; 0,5; 0,25 y 0,125.

En una segunda etapa, ya con lo anterior resuelto, se propuso estudiar la productividad de *Sulfolobus metallicus* (Y_p^{XA}) calculada desde la ecuación de producción (Ecuación 18). Se evaluó además la diferencia en el resultado al utilizar la cantidad de ácido sulfúrico detectada por titulación versus la concentración de sulfato en solución, ambos indicadores de la conversión química del azufre en el biorreactor.

4.4.2 Resultados de modelación

4.4.2.1 Importancia de células planctónicas en el crecimiento celular

Con el fin de comparar la generación de biomasa considerando o no el crecimiento de arqueas planctónicas en el sistema, se utilizaron las expresiones de Ecuación 10 (considera las células suspendidas) y Ecuación 12 (simplificación), para así encontrar velocidades específicas de crecimiento celular.

En primera instancia, se asumió que dicha tasa no variaba con los flujos aplicados, por lo que sólo era afectada por η_T , generándose curvas de 4 puntos, donde cada uno representa un flujo de operación. Esto se puede observar en Gráfico 13 y Gráfico 14, respectivamente, y cada eje presenta un término de la regresión lineal aplicada.

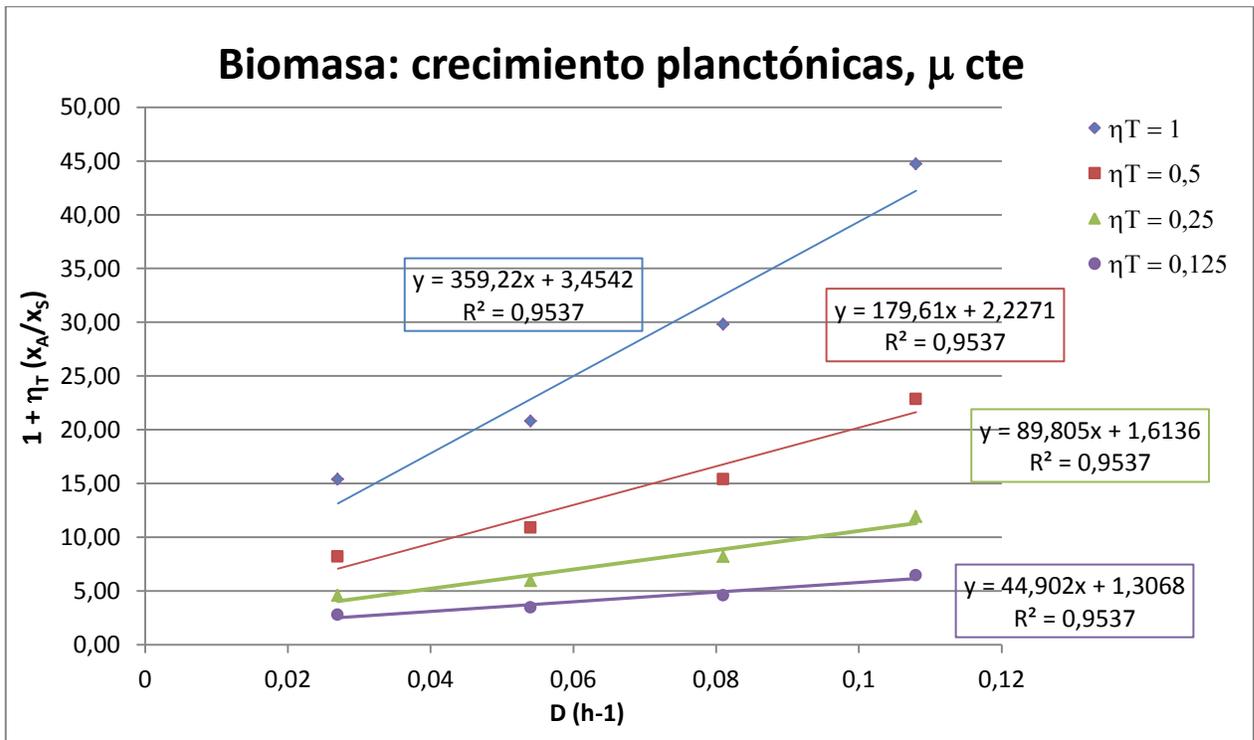


Gráfico 13: Resultados de modelación considerando el crecimiento de arqueas planctónicas, para los distintos factores de efectividad evaluados. Cada tasa específica μ (constante en el proceso) es obtenida como el recíproco de cada pendiente.

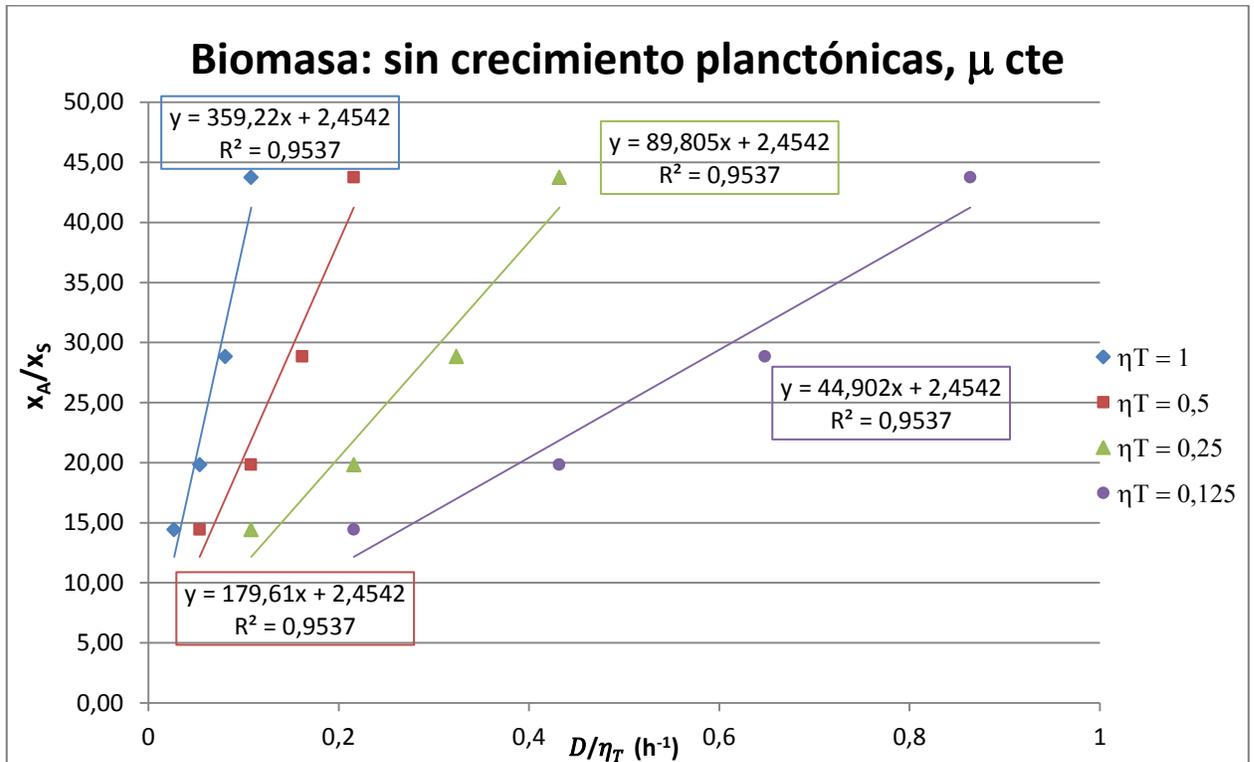


Gráfico 14: Resultados de modelación suponiendo que las arqueas planctónicas no crecen en el medio de reacción, para distintos factores de efectividad. Cada velocidad específica μ (constante) es obtenida como el recíproco de las pendientes de cada regresión lineal ajustada.

Un resumen de los valores presentados en Gráfico 13 y Gráfico 14 se puede apreciar en la Tabla 10, donde se presentan los 4 valores de la tasa específica μ , simplemente aplicando el valor recíproco de las pendientes de cada regresión lineal.

Tabla 10: Resumen de los resultados para el balance de biomasa considerando el crecimiento de arqueas suspendidas, evaluando 4 diferentes factores de efectividad ($\eta_{T1}=1$; $\eta_{T2}=0,5$; $\eta_{T3}=0,25$; $\eta_{T4}=0,125$). Se observa además que el producto entre μ y cada η_T permanece constante.

	η_{T1}	η_{T2}	η_{T3}	η_{T4}
μ con planctónicas [h^{-1}]	0,0028	0,006	0,011	0,022
μ sin planctónicas [h^{-1}]	0,0028	0,006	0,011	0,022

Observando los resultados de la Tabla 10, además de los altos valores de correlación en cada caso de estudio (ver coeficientes en Gráfico 13 y Gráfico 14), se puede observar que ambas curvas entregan los mismos resultados. Por ende, para el biorreactor estudiado, y con las condiciones de operación utilizadas, la Ecuación 12 podría ser una buena simplificación del balance de biomasa al descartar el crecimiento de arqueas planctónicas.

Sin embargo, el resultado anterior revela un cuestionamiento debido a la exactitud de los valores obtenidos. Es así como, en una segunda instancia, se decide modelar el balance de biomasa considerando esta vez que la tasa de crecimiento μ varíe tanto por flujo como por η_T . Se utilizan las expresiones de Ecuación 10 y Ecuación 12, de las cuales se obtienen una serie de curvas que representan las tasas específicas de crecimiento celular de cada estado estacionario según el factor de efectividad que se evalúa.

Los resultados de esta nueva modelación se presentan en el Gráfico 15 (considerando el crecimiento de células en suspensión), mientras que el Gráfico 16 presenta el balance de biomasa simplificado. En el Anexo B se presentan tablas con los valores numéricos de cada tasa específica según flujo y factor η_T .

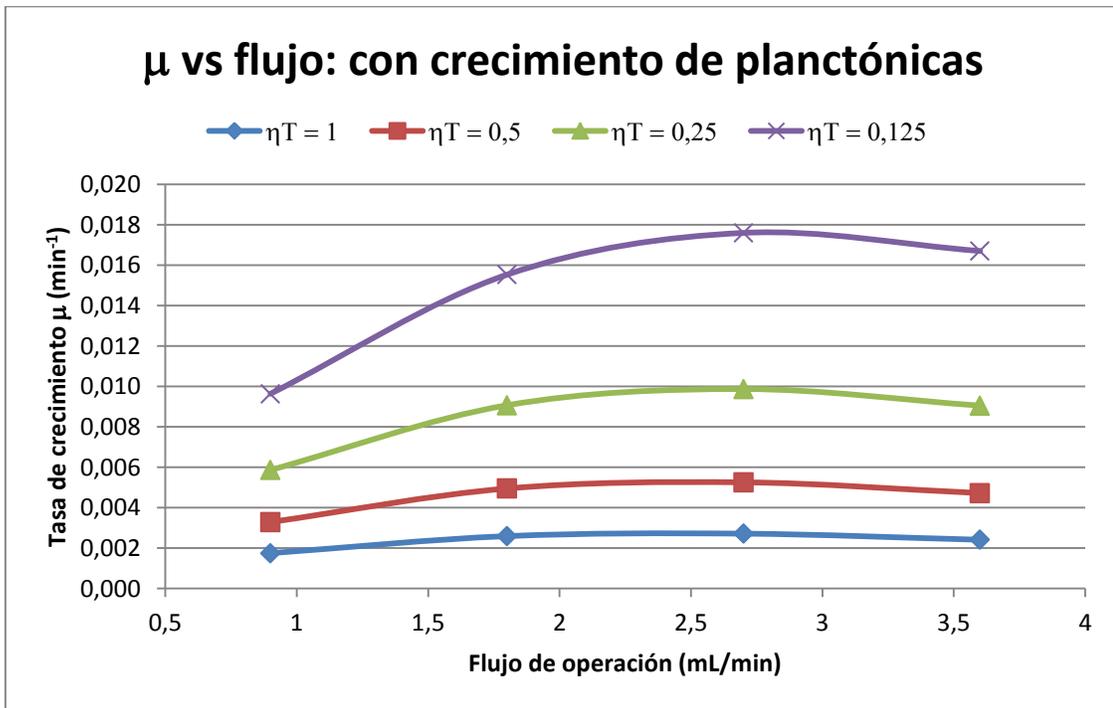


Gráfico 15: Curvas de la tasa específica μ al variar el flujo estacionario, para cada factor η_T y considerando el crecimiento de arqueas planctónicas. Se observa un aumento sostenido en la magnitud de μ cuando se modela el sistema con un valor inferior de factor de efectividad.

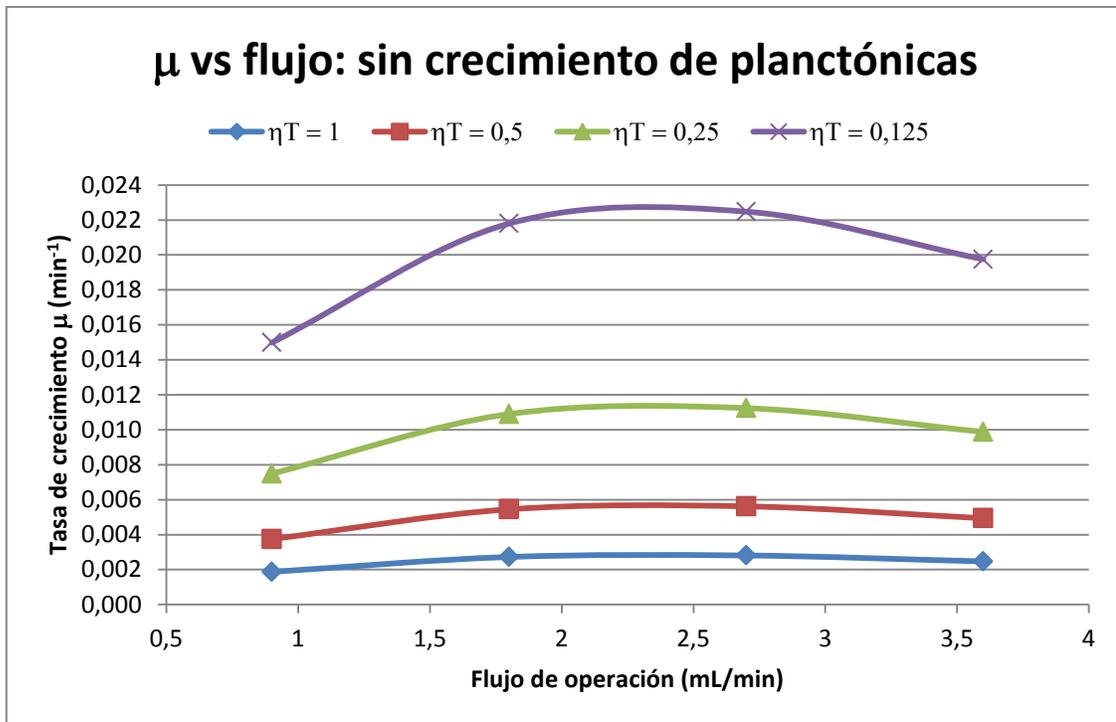


Gráfico 16: Curvas de la tasa específica μ al variar el flujo estacionario, para cada factor η_T y sin considerar el crecimiento de arqueas planctónicas. Se observa un aumento sostenido en la magnitud de μ cuando se modela el sistema con un valor inferior de factor de efectividad.

Se observa en los dos gráficos previos que, tanto la tendencia de la tasa específica μ como los valores que se obtienen, difieren levemente en ambos supuestos y, según las tablas indicadas en el Anexo B, el rango donde se encuentran son relativamente los mismos. En otras palabras, comparando los resultados de los casos de μ constante y μ variable, el no considerar el crecimiento de arqueas planctónicas no afectaría al modelo de biomasa en estado estacionario. Esto no significa que este supuesto siempre sea apropiado.

Además, los mayores valores de la tasa específica se obtuvieron con el factor de efectividad más bajo, es decir 0.125, observado en todos los casos de balance de biomasa modelados.

4.4.2.2 Rendimientos de producción por biomasa

El resultado anterior para el balance de biomasa implica además la posibilidad de simplificar el balance de producto, pues permite suponer que la acción de arqueas en suspensión es despreciable versus la de células adheridas al azufre, para efectos de la producción de ácido sulfúrico.

Lo anterior es de utilidad puesto que la Ecuación 17 de producción presenta dos parámetros desconocidos (los rendimientos Y_P^{XS} y Y_P^{XA}), y por ende la utilización de la Ecuación 18 se hace relevante en este caso, donde se sitúa a las células adheridas como las productoras principales de ácido sulfúrico en el biorreactor, y permite entregar una solución inicial para el sistema en estudio.

Por ende, se aplicaron regresiones lineales para la Ecuación 18, en los casos en que el parámetro μ fuera constante y que variase por cada flujo. En el primer caso, un dato interesante que entrega cada balance de biomasa estudiado en el punto anterior es que el producto entre μ y su correspondiente η_T se mantiene constante en 0,0028 [h⁻¹]. Con este valor se puede reescribir la Ecuación 18 como sigue:

$$p - p_0 = \left(\frac{0,0028 x_A}{D} \right) Y_P^{XA} \quad \text{Ecuación 45}$$

Con respecto al segundo caso, considerar la tasa μ variable equivale a utilizar la Ecuación 42, en donde la velocidad específica de crecimiento fue reemplazada en forma algebraica sobre la ecuación de producción.

A continuación se presentan los resultados utilizados en la obtención del rendimiento de producto por célula [g producto/arquea], para el caso de modelación con μ constante en Gráfico 17 y Gráfico 18, según regresiones lineales obtenidas desde la Ecuación 45. Importante es notar que este trabajo puede realizarse tanto con el ácido medido por titulación como por el sulfato en solución (en g/L), ambos detectados en cada estado estacionario (Tabla 9).

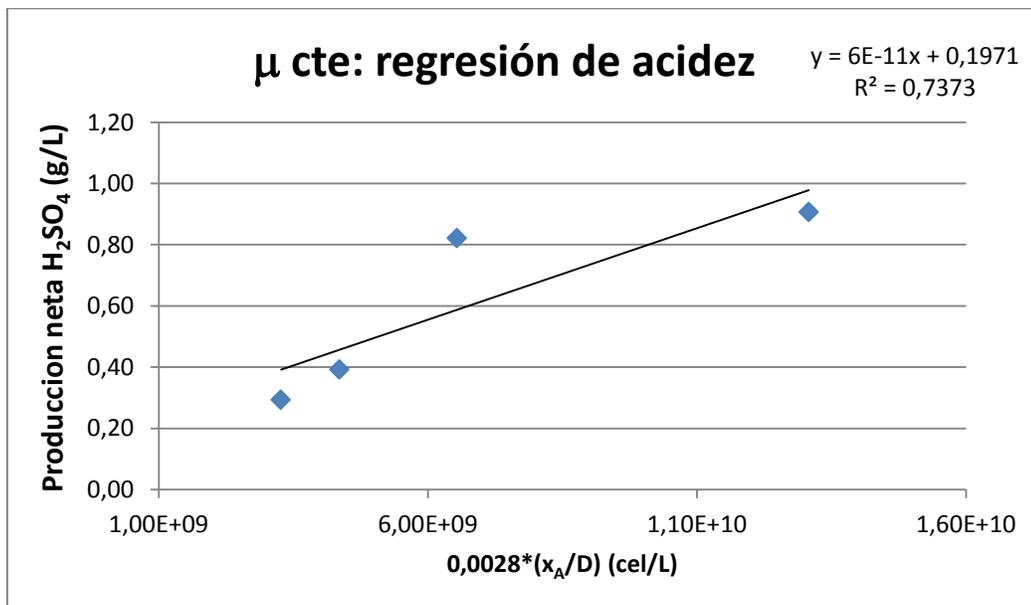


Gráfico 17: Regresión aplicada, según Ecuación 45, para encontrar el rendimiento de producción según los 4 valores de acidez que se describieron para cada estado estacionario estudiado.

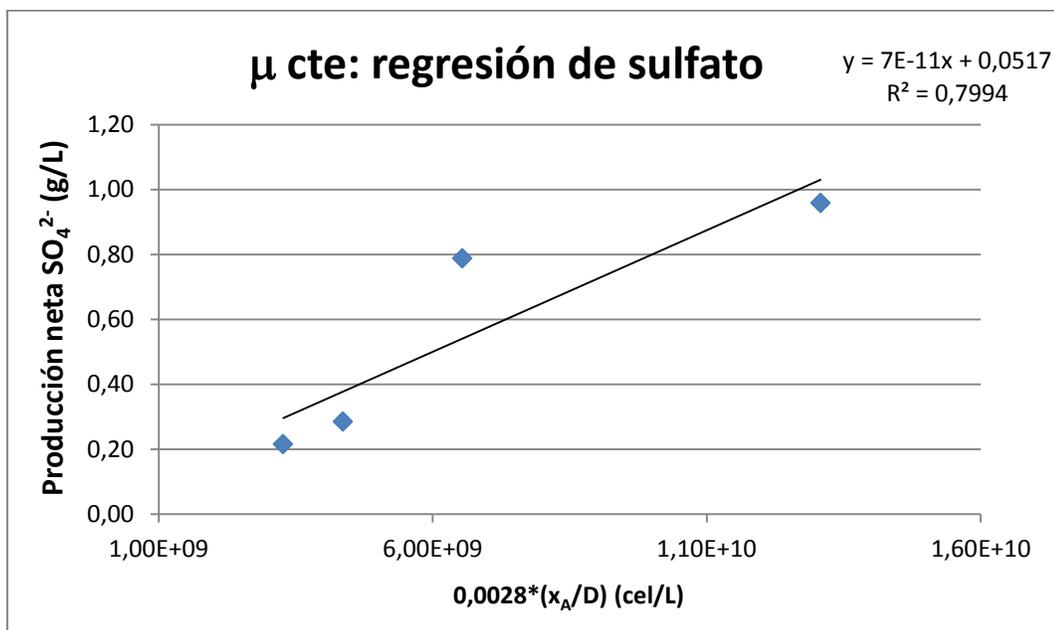


Gráfico 18: Regresión aplicada, según Ecuación 45, para encontrar el rendimiento de producción según los 4 valores de sulfato que se describieron para cada estado estacionario estudiado.

Por su parte, los resultados de producción usando la Ecuación 42 se muestran en Gráfico 19 y Gráfico 20, en donde también se realizaron regresiones lineales tanto para el ácido sulfúrico como para el sulfato en solución.

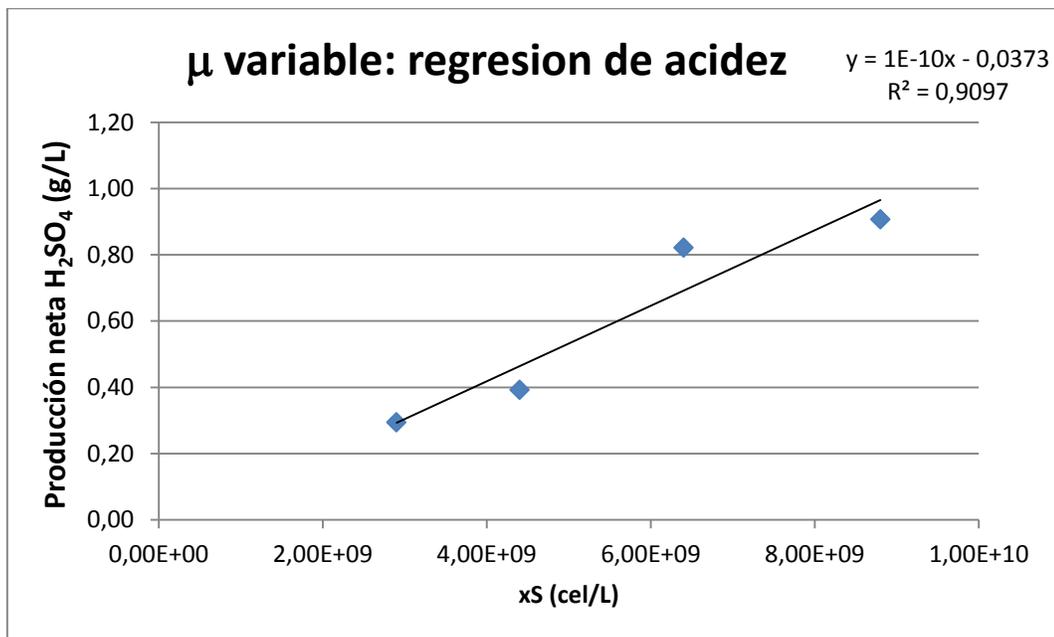


Gráfico 19: Regresión aplicada, según Ecuación 42, para encontrar el rendimiento de producción según los 4 valores de acidez que se describieron para cada estado estacionario estudiado.

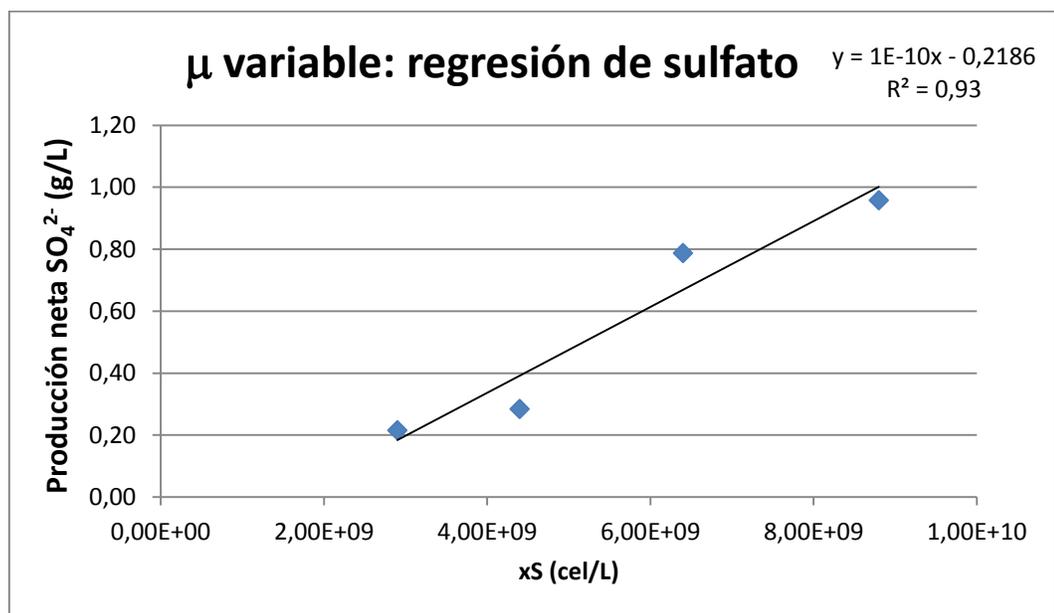


Gráfico 20: Regresión aplicada, según Ecuación 42, para encontrar el rendimiento de producción según los 4 valores de sulfato que se describieron para cada estado estacionario estudiado.

El objetivo de las regresiones lineales fue encontrar el rendimiento de producto por arquea adherida en el sistema (Y_p^{XA} obtenido desde la pendiente), parámetro representativo de la operación en el biorreactor. Es por esto que se muestra a continuación un cuadro resumen con los resultados de cada regresión, considerando la variabilidad de la tasa específica μ y el tipo de producto referido (acidez, sulfato).

Tabla 11: Resumen de rendimientos de producción para cada caso de estudio del balance de producto, y su correspondiente coeficiente de correlación.

	Tipo de producto	Rendimiento producción Y_p^{XA} [g producto/arquea]	Coeficiente de correlación
Modelo con μ constante	Ácido sulfúrico	$6 \cdot 10^{-11}$	0,7373
	Sulfato	$7 \cdot 10^{-11}$	0,7994
Modelo con μ variable	Ácido sulfúrico	10^{-10}	0,9097
	Sulfato	10^{-10}	0,93

De lo anterior se desprende que los rendimientos de producción son similares en ambos casos de utilización de μ y de tipo de producto medido. En este sentido, esto podría indicar que ambos métodos son indiferentes en cual es mejor. Sin embargo, el segundo caso entregó coeficientes de correlación más altos que el primero, por lo que este eventualmente puede ser un método más eficaz para relacionar la biomasa con la producción.

4.5 Estudio de la aireación aplicada al biorreactor

El estudio de la transferencia de masa de oxígeno al biorreactor determina si todos los resultados y modelación presentados anteriormente son dependientes o no del intercambio de O_2 , pues la modelación clásica de biorreactor trae como condición implícita que no existan problemas en disponibilidad de oxígeno.

En una primera etapa, se debe conocer la cantidad de oxígeno entregado por el aireador de peceras utilizado en el montaje. Para esto, basta conocer el flujo de aire que ingresa al sistema y la concentración de oxígeno atmosférico. El aire suministrado por el aireador es de:

$$F_{AIRE} = 1 \left[\frac{L}{min} \right]$$

La composición volumétrica del aire tiene un 21% de oxígeno (aprox.) a 25°C (2), por lo que el flujo de O_2 se estima como:

$$F(O_2) = 0,21 \left[\frac{L}{min} \right]$$

Por otro lado, a 1 atmósfera de presión y 25°C, un mol de oxígeno (considerado como gas ideal) se relaciona con su volumen como sigue:

$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T \quad \text{Ecuación 46}$$

Lo anterior permite evaluar el volumen ocupado por un mol de oxígeno como:

$$V = 0,082 \cdot (273 + 25) = 24,4 [L]$$

Puede obtenerse entonces la masa molar de O₂ que el aireador entrega al biorreactor por minuto con una simple proporción:

$$N(O_2) = \frac{0,21 [L] \cdot 1[mol]}{24,4 [L]} = 0,0086[mol]$$

Finalmente, se puede calcular el flujo másico de O₂:

$$N(O_2) = 0,0086 \left[\frac{mol}{min} \right] \cdot 32 \left[\frac{g}{mol} \right] = 0,275 \approx 0,28 \left[\frac{g O_2}{min} \right]$$

En segundo término, para estimar la cantidad de oxígeno que se transfiere efectivamente al medio de reacción, se utilizó el Método Dinámico para el biorreactor en modo batch, que permitió encontrar valores de $k_L a_i$ y, a partir de dicho parámetro, determinar flujos de transferencia por parte del sistema de aireación.

El resultado de dos mediciones (duplicados) se presenta en la Tabla 12. En el Anexo C se encuentra el detalle desarrollado para la evaluación numérica de los coeficientes de transferencia de masa.

Tabla 12: Mediciones para estimar el coeficiente combinado de transferencia de oxígeno en el biorreactor ($k_L a_i$).

	$k_L a_i$ estimado [s ⁻¹]
Estimación 1	0,0017
Estimación 2	0,0019

Así, ambas estimaciones entregan un valor promedio para el coeficiente $k_L a_i$, según la geometría del aireador de manguera, velocidad de agitación y tipo de agitador utilizados en el sistema de reacción, resultando en 0,0018 [s⁻¹].

Una tercera etapa de evaluación permite determinar la cantidad de oxígeno requerida en la reacción de biooxidación de azufre. Para este fin se logró determinar el O₂ utilizado por dos métodos: evaluando el consumo de cada estado estacionario por medio de su producción; y a través del rendimiento obtenido por los modelos, de lo cual se encontraron requerimientos de oxígeno.

A continuación se presentan los consumos individuales según flujo de operación, donde se muestra el O₂ utilizado en gramos por minuto, obtenidos según la Ecuación 33:

Tabla 13: Cálculos de producción neta y el correspondiente valor de oxígeno utilizado, visto desde el consumo de ácido sulfúrico y de sulfato.

Flujos [mL/min]	Concentración ácido sulfúrico (g/L)	Producción ácido sulfúrico (g/min)	O₂ utilizado (g O₂/min)
0,9	0,91	$8,2 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$
1,8	0,82	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$7,2 \cdot 10^{-4}$
2,7	0,39	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$5,2 \cdot 10^{-4}$
3,6	0,29	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$5,2 \cdot 10^{-4}$
Flujos [mL/min]	Concentración sulfato (g/L)	Producción sulfato (g/min)	O₂ utilizado (g O₂/min)
0,9	0,96	$8,6 \cdot 10^{-4}$	$4,3 \cdot 10^{-4}$
1,8	0,79	$1,4 \cdot 10^{-3}$	$7,1 \cdot 10^{-4}$
2,7	0,28	$7,7 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^{-4}$
3,6	0,21	$7,7 \cdot 10^{-4}$	$3,9 \cdot 10^{-4}$

Por su parte, puede determinarse desde la Ecuación 34 un requerimiento de oxígeno por cada arquea que se encuentra en el sistema, para los rendimientos encontrados en el modelo. Además, la Ecuación 35 permite el cálculo del O₂ que las arqueas consumen para producción, información que se presenta en la Tabla 14:

Tabla 14: Estimación del requerimiento de oxígeno desde el rendimiento de producción.

		Rendimiento producción [g/arquea]	Rendimiento de O₂ [g O₂/arquea]	O₂ utilizado [g O₂/min]
Modelo con μ constante	Ácido sulfúrico	$6 \cdot 10^{-11}$	$2,9 \cdot 10^{-11}$	$3,4 \cdot 10^{-4}$
	Sulfato	$7 \cdot 10^{-11}$	$3,5 \cdot 10^{-11}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$
Modelo con μ variable	Ácido sulfúrico	10^{-10}	$4,9 \cdot 10^{-11}$	$5,7 \cdot 10^{-4}$
	Sulfato	10^{-10}	$5,0 \cdot 10^{-11}$	$5,8 \cdot 10^{-4}$

Para el cálculo de los requerimientos de oxígeno se utilizó la mejor tasa específica de crecimiento determinada por el modelo de biorreactor y sus variaciones (μ de 0,022 [h⁻¹] para η_T de 0,125).

En el Anexo C se muestran también, a partir de los consumos de O₂, valores de la concentración de oxígeno remanente en el seno del fluido (C_L). Esto es importante de calcular, puesto que es un indicio inicial para evaluar la posibilidad de aumentar la cantidad de azufre capaz de reaccionar con el oxígeno disponible en solución.

Se aprecia de hecho que la mayoría de las mediciones, tanto para la determinación directa del consumo de oxígeno por producción, como por las provenientes de los modelos, entregan un valor de concentración C_L mayor a cero, y menor al valor de saturación en medio ácido a 67°C (3,2 [mg O₂/L]). Sólo un valor de producción entregó un valor negativo, el proveniente del flujo

1,8 [mL/min], lo cual no se considera como un gran error debido a que la precisión de las mediciones en laboratorio no es suficiente para determinar diferencias importantes en la pequeña concentración de O₂ buscada.

Independiente de esta excepción, la disponibilidad de oxígeno en el medio vía la concentración C_L podría ser un indicio para una mejora en la cantidad de azufre que puede ser tratado en el biorreactor, para las mismas condiciones de operación establecidas en la presente tesis. Es así como, en primera instancia, puede utilizarse la Ecuación 37 para expresar un valor máximo de arqueas que pueden estar adheridas al azufre. Por su parte, en el Anexo A se encuentra la relación existente entre arqueas adheridas y masa inicial de azufre en el biorreactor, dado el diámetro particular de perla utilizado en esta experiencia.

Con esto, igualando las dos expresiones anteriormente descritas, puede encontrarse una relación numérica que permite predecir una cantidad máxima de azufre para cargar el biorreactor:

$$x_A(M_t) = 2,06 \cdot 10^9 \cdot M_t = \frac{k_L a_i \cdot C^*}{\mu \cdot \eta_T \cdot Y_{O_2}}$$

$$M_t = \frac{k_L a_i \cdot C^*}{2,06 \cdot 10^9 \cdot \mu \cdot \eta_T \cdot Y_{O_2}} \quad \text{Ecuación 47}$$

Asumiendo valores constantes para μ y Y_{O_2} (0,022 [h⁻¹] en el mejor caso y $2,9 \cdot 10^{-11}$ [g O₂/arquea] para el primer rendimiento de O₂ presentado en la Tabla 14), además de los datos encontrados por el Método Dinámico, se puede extrapolar un máximo de azufre en perlas (2,76 [mm] de diámetro medio) que pueden ser cargados según:

$$M_t^{max} = \frac{0,0018 \left[\frac{1}{s} \right] \cdot \frac{3600 [s]}{1 [h]} \cdot 3,2 \left[\frac{mg O_2}{L} \right] \cdot \frac{1 [g O_2]}{1000 [mg O_2]}}{2,06 \cdot 10^9 \left[\frac{arqueas}{g S^0 \cdot L} \right] \cdot 0,022 \left[\frac{1}{h} \right] \cdot 0,125 \cdot 2,9 \cdot 10^{-11} \left[\frac{g O_2}{arquea} \right]}$$

$$M_t^{max} = 126,2 \approx 126 [g S^0]$$

Con lo anterior, se obtuvo que el sistema podría teóricamente operar con 126 gramos iniciales de azufre en perlas, lo cual es aproximadamente el doble de la masa con la que operó en principio el biorreactor (60 [g] iniciales). Esto equivale, en términos de células adheridas, a $2,6 \cdot 10^{11}$ [arqueas] (ver Anexo A, punto ii), las cuales permiten una producción máxima de 0,0014 [g/min] de ácido sulfúrico, obtenidos desde Ecuación 35 y Ecuación 33 con los datos mencionados en el párrafo anterior.

5 Discusión

A continuación se describen en detalle el análisis y discusión de los resultados obtenidos en cada una de las etapas de la investigación realizada en el presente trabajo de tesis.

5.1 Cultivo en matraces

El estudio del cultivo de *Sulfolobus metallicus* en matraces de 250 [mL] a 67°C no fue considerado directamente en los objetivos de esta memoria. Por ende, se intentó emular el sistema de cultivo diseñado por Pacheco (18), y así obtener inóculos celulares para ser utilizados posteriormente en el estudio del biorreactor. Según los resultados reportados en dicha publicación, se demostró la factibilidad del crecimiento de arqueas en el sistema, para un tamaño de partículas de azufre definido (entre 0,355 y 1 [mm]), agitación a 67°C en shaker y medio de cultivo específico, siendo comparada positivamente en otros trabajos (19).

En este sentido, los matraces desarrollados para iniciar el trabajo actual fueron diseñados con perlas de azufre de diámetro distinto a los producidos por Pacheco (entre 2,30 y 3,32 [mm]), y por ende se esperaba un crecimiento celular y variables con comportamientos diferentes entre estos cultivos (perlas más grandes indican una población adherida total menor y adhesión completa en mayor tiempo).

No obstante, lo anterior no fue mayormente considerado para desarrollar los inóculos del reactor, pues el objetivo fue simplemente generar biomasa. Es más, cambiar el diámetro de perlas permitió establecer un cultivo que desde el principio se desarrolle en perlas grandes, y la composición de perlas 3% p/v mantuvo al sistema sin la preocupación de efectos de atrición por roce. Otro factor de escalamiento previsto fue el nivel de agitación (de 200 RPM aproximadamente), que permitía mantener en movimiento la fase sólida de azufre, pero de manera suave y sin dispersar las perlas en todo el volumen.

Por lo anterior, se consideraron aptas las arqueas crecidas en el sistema propuesto, y así se utilizaron como inóculo para el biorreactor en modo batch. Desde los 4 matraces sólo fue monitoreado el cambio de pH en el tiempo, realizando un cambio del medio líquido en el momento en que el pH alcanzaba valores cercanos a 1,0, que es el valor descrito por Pacheco como mínimo apto para el crecimiento en los matraces medidos a temperatura ambiente (18).

Por su parte, el manejo de matraces permitió además conocer las metodologías de monitoreo de las diferentes variables: pH, acidez, conteo celular y medición de sulfato en solución. Al respecto, se decidió mantener dichos procedimientos para el estudio del biorreactor, utilizando duplicados en cada caso con el fin de obtener valores confiables.

5.2 Biorreactor tipo Batch

5.2.1 Diseño y montaje

En la sección Metodología se encuentra descrito el sistema batch propuesto para la biooxidación de azufre utilizando *Sulfolobus metallicus* a 67°C. Se ha mencionado el hecho de que su planteamiento se basó en una analogía para un matraz, con el mismo nivel de agitación, temperatura, porcentaje en peso de perlas de azufre (3%), y con aireación adicional (aireador de pecera) para ser distribuida en todo el volumen de reacción, que se fijó en 2000 [mL]. Por ende, no fue utilizado ningún criterio formal de escalamiento de biorreactores y sólo se decidió adoptar los valores mencionados, donde la aireación permitiría idealmente asegurar la transferencia de oxígeno a las arqueas, y que su crecimiento no dependiese de ello. Esto corresponde a un primer acercamiento de un reactor batch perfectamente agitado para la biooxidación de azufre, utilizando básicamente los materiales existentes en el laboratorio, y la información conocida de la formulación en matraces.

En conjunto con lo anterior, los protocolos de medición utilizados, en particular los volúmenes de alícuotas y reactivos de medición, también se mantuvieron en relación a lo utilizado en matraces (18). Esto se debió al hecho de generar resultados que fuesen comparables con los obtenidos en trabajos previos, además de la posibilidad que entrega cada tecnología de medición presente en el laboratorio, como los electrodos de pH y el espectrofotómetro.

5.2.2 Resultados de medición en el tiempo

a) Medición de pH

En primer término, el biorreactor batch presentó una disminución importante del pH, observado en el Gráfico 2 (desde 2,3 a 0,74), fenómeno que se atribuye a la acción de las arqueas pues estas permiten la formación de sulfato en el medio, el cual disocia las moléculas de agua y forma ácido sulfúrico en solución. Esto indica además que las arqueas desarrollan su efecto azufre oxidante, es decir, es un indicio para decir que las células están poblando las perlas de azufre elemental.

Según el rango y la forma en que se comporta la curva de descenso de pH, no se observan efectos inhibitorios en los microorganismos, a pesar de las 456 horas de duración de la experiencia en batch. Este resultado es importante puesto que aumenta el tiempo en que el sistema puede permanecer como no inhibido o en fase estacionaria en el crecimiento de las células, comparadas con Pacheco (264 horas) (18) y el trabajo de Lira con la bacteria *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (en torno a las 300 horas) (19). Además, se observa la opción de operar el biorreactor con un pH más bajo que la condición óptima de crecimiento de *Sulfolobus metallicus*, lo cual interesa para definir a futuro un rango de operación de pH en el biorreactor en modo continuo. No obstante, el sistema no debiese operar a pH bajos a 1,0, pues en aquel rango sí se han observado problemas en el crecimiento de las arqueas, y no se recomienda (18).

Se debe tener presente un hecho con respecto al seguimiento del pH en el biorreactor, y es el no presentar un electrodo inserto en el sistema. El dispositivo de pH se encontraba en el exterior, y las muestras se medían retirando rápidamente dos tubos con medio líquido desde el biorreactor al pH-metro (duplicado de medición). Esto se considera un factor que pudo afectar la calidad de la medición, pues las muestras no se encontraban a 67°C exactamente.

b) Medición de acidez

La medición de acidez por titulación (descrita en el Gráfico 3) en el biorreactor batch reflejó un comportamiento análogo a lo que acontece con el pH, obteniendo una presencia creciente de ácido sulfúrico en solución, debido a la actividad metabólica de *Sulfolobus metallicus* sobre el azufre elemental. La tendencia presentada en esta curva muestra durante las 48 horas iniciales una concentración baja de ácido, y a partir del tercer punto se observa una tendencia lineal de producción que se mantuvo en el resto del tiempo de medición.

La observación anterior se puede relacionar al periodo de adaptación de los microorganismos, pues durante las primeras 48 horas las arqueas debieron asimilar el cambio fisicoquímico que implicaba el escalamiento desde el matraz al biorreactor, aunque este periodo no es observado en el Gráfico 2 de pH. El cambio de las condiciones del medio, además del inicio de la adhesión celular al azufre elemental, justifica este tiempo. Comparado a Pacheco (18), el tiempo de adaptación celular observado por acidez es de 24 horas más, lo cual puede ser resultado del volumen de reacción empleado y del número de perlas que deben ser pobladas.

En el resto de la medición, se observó un aumento lineal de la concentración de ácido sulfúrico, alcanzando un valor de 13,95 [g/L] a las 456 horas, sin que exista al final alguna reducción de la concentración de ácido, lo que hubiese indicado inhibición de la producción. Esta concentración final supera la alcanzada por Pacheco (de 9,11 [g/L]) a las 216 horas, tiempo en que comienza la inhibición detectada en matraces. Esto significa que, cuando las arqueas se adhieren al azufre, producen una cantidad neta mayor de ácido que en matraces, a pesar de que ambos sistemas cuentan con la misma concentración de azufre en forma de perlas. Esto puede ser indicio de que el escalamiento resulta un éxito.

Además de las observaciones previas, la medición de acidez permite determinar una concentración estimada de protones en solución, la que se complementa a los valores de titulación presentados en el Gráfico 3. Esta concentración estimada puede ser transformada en valores de pH, y comparada con la que el pH-metro entregó durante el tiempo de evaluación del biorreactor batch, situación presentada en el Gráfico 4.

Así, si se compara el pH estimado con el que detecta el equipo, se corrobora un hecho interesante que ya registró Lira con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en matraces (19), y es que la evolución en el tiempo del pH registrado por el equipo es correspondiente con la evolución de la acidez medida por titulación. En otras palabras, se observa en el transcurso del tiempo que los valores presentados en el Gráfico 4 varían de forma leve entre ellos, y en una magnitud casi constante, finalizando las 456 horas de medición con el equipo registrando un valor de pH de 0,74 y la estimación por acidez en 0,55. Esta diferencia parece importante desde el punto de vista del equilibrio bioquímico de la célula, pero se entiende que en dicho rango de operación no es

recomendable trabajar con *Sulfolobus metallicus*, según los efectos de inhibición del crecimiento celular indicados por Pacheco (18).

Además, la cercanía entre ambos pH en el Gráfico 4 indica que los intermediarios que podrían encontrarse en solución son del tipo S_xO_y , por lo que otras especies ácidas no debiesen encontrarse en un reactor de biooxidación de azufre, además de señalar a la titulación como un buen método para monitorear el progreso de la actividad de las arqueas sobre el azufre elemental, cercano a la evaluación del equipo de medición de pH.

c) Concentración de sulfato

Con respecto a la evolución en el biorreactor de la concentración de sulfato en solución, se puede observar en el Gráfico 5 que este ion presentó un crecimiento similar al obtenido por titulación. En este caso, se observó un aumento leve en su concentración en las primeras 24 horas, y a partir de dicho punto creció sostenidamente durante el tiempo de medición (288 horas) hasta alcanzar un valor de 9,9 [g/L], el cual no se evidencia como máximo, y por ende se piensa que podría haber aumentado en el resto de tiempos de medición, no evaluados por falta de tiempo de trabajo.

El comportamiento anterior dista del obtenido por Pacheco en su estudio en matraces, en donde el sulfato alcanzó un valor máximo de 3,6 [g/L], manteniéndose constante durante el resto de dicho monitoreo. En dicha publicación, la metodología utilizada es diferente en cuanto a los volúmenes de los reactivos y de muestra, lo cual hace pensar que el procedimiento modificado para la presente memoria es más adecuado para el estudio de la concentración de sulfato. En otras palabras, el método requiere volúmenes menores de los reactivos usados para su determinación, lo cual puede minimizar la variabilidad de cada muestra.

d) Conversión en el reactor

La conversión química se define por la siguiente relación:

$$\text{conversión} = \frac{\text{moles de } S^0 \text{ que reaccionan}}{\text{moles } S^0 \text{ al inicio}} \quad \text{Ecuación 48}$$

La variación de azufre no logró ser monitoreada en este trabajo, debido a la complejidad que representaba manipular este elemento desde el biorreactor. Gracias a que se establecieron mediciones tanto del ácido sulfúrico por titulación, como de la concentración del ion sulfato por turbidimetría, fue posible estimar la conversión de azufre elemental en el biorreactor batch por cualquiera de esos dos métodos, de acuerdo a la relación molar entre reactante y producto presentada en la Reacción 8, la cual es 1:1. El avance de la reacción en el tiempo se presenta en el Gráfico 21.

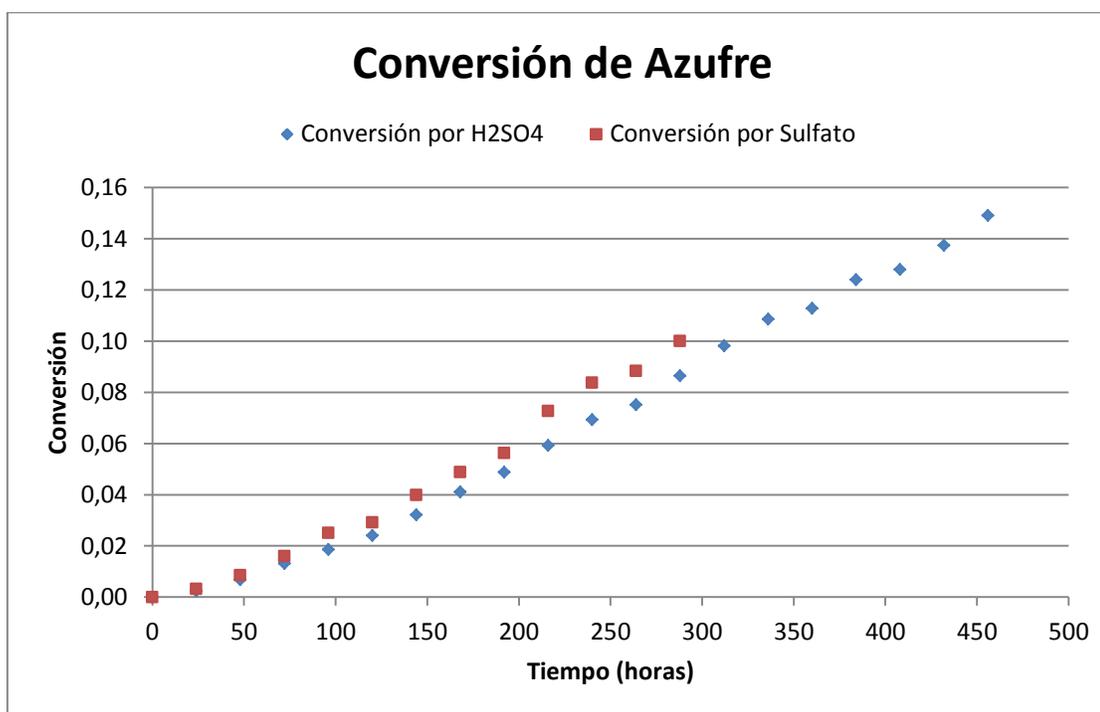


Gráfico 21: Conversión de azufre en el tiempo, monitoreada según acidez (en azul) y por concentración de sulfato presente en la solución del biorreactor batch (en rojo). Ambas curvas se referencian según la relación presentada en la Ecuación 48.

Según ambos métodos, la conversión en el tiempo aumentó de forma lineal y progresiva, con una ligera diferencia entre ellos. Los valores alcanzados por cada método son similares al cabo de las 288 [horas] de reacción, obteniendo un valor de 0,09 para la conversión por ácido, y 0,1 para el caso del sulfato. Por lo anterior, sumado al hecho de que la medida de acidez es un buen parámetro de monitoreo, se puede decir que los valores entregados de concentración de sulfato en solución por turbidimetría fueron bien estimados en el presente trabajo. Esta similitud, en contraste a la observación realizada por Pacheco (18), puede ser utilizada para continuar modificando y precisando el protocolo de medición de sulfato.

La conversión estimada por acidez continuó incrementándose en el tiempo restante de medición, entre las 288 y 456 horas, donde en este último tiempo alcanzó su máximo valor, que fue de 0,15 (15%), valor que no se registra como un límite, por lo que se puede pensar que la conversión en el tiempo debiese seguir aumentando.

Este porcentaje es bastante inferior a lo que reportó Pacheco en matraces (29% a las 216 horas (18)). No obstante, se cuestiona la manera en que Pacheco da cuenta de la conversión en su reporte, pues en otra publicación Lira (19) habla de una “conversión de proceso”, que se calcula de forma diferente a la conversión molar como tal³, y la cual se compara positivamente con Pacheco. Por ende, se cree que el valor de 29% presentado por dicho trabajo no habla de una relación molar entre reactante y producto.

³ La “conversión del proceso” que se presenta es calculada como (gramos ácido producido)/ (gramos azufre inicial), la cual no presenta una relación molar entre reactantes y productos.

Más allá de este conflicto de definición, Pacheco generó una comparación de matraces utilizando granulometrías pequeñas (tamaño entre 0,355 y 1 [mm]) y gruesas (tamaño sobre 2 [mm]), en donde se demostró un cambio más rápido de pH en los matraces con perlas de azufre más pequeñas (18). Sin embargo, no se lograron sintetizar perlas de azufre del tamaño recomendado en este trabajo de tesis, puesto que la obtención de perlas se realizó con una metodología distinta, en particular referente a la manipulación del azufre líquido.

Al respecto, se pensó inicialmente analizar si los resultados de Pacheco podrían ser similares a los del biorreactor batch, el cual es un contenedor de mayor volumen que un matraz, y donde se iban a utilizar perlas más grandes. Más formalmente, la idea fue estudiar la importancia de mantener una razón “superficie/volumen de reactor” (superficie total perlas/volumen reacción) en el escalamiento, y comparar ambos trabajos.

En este sentido, en el caso de Pacheco se obtuvo una razón superficie/volumen reactor aproximada de 146 [mm²/mL reacción], mientras que en el caso del biorreactor batch ese valor es sólo de 31 [mm²/mL reacción], es decir, casi 5 veces menos (ver Anexo D). Esto significa que las arqueas suspendidas en 2000 [mL] cuentan con una superficie de azufre para adherencia menor al presentado en matraces, debido al mayor tamaño de las perlas. En otras palabras, aumentar simultáneamente el volumen de reacción y el tamaño de perlas no fue compatible para escalar el comportamiento observado en matraces, lo cual se refleja en una posible menor conversión.

Para mantener la razón entre superficie y volumen de reactor bastaba con utilizar el mismo tamaño de partícula, pero amplificando la masa en gramos en la misma proporción que el volumen de reacción, según el cálculo presentado en el Anexo D.

e) Cuantificación celular en el biorreactor

El conteo de células se llevó a cabo por medio de recuento en cámara de Neubauer, la cual fue observada en el microscopio de epifluorescencia tal como se muestra en la Figura 12. En ella fue posible visualizar, además de la cuantificación, el notorio cambio en el número de células con el paso de los días de monitoreo, gracias a la visualización en computador. Esto mejora la observación que se realizaba en el laboratorio con el microscopio convencional.

Por otro lado, el cambio en las perlas de azufre fue observado en la Figura 13, donde se aprecia una perla promedio antes y después de la operación del biorreactor batch. Las fotografías mostradas, tomadas sólo con el aumento natural del microscopio y no con un lente superior, muestran las diferencias superficiales en zonas características de la perla, lo cual ya había sido descrito por Pacheco, y que dan cuenta de la acción bacteriana sobre ella. Sin embargo, un conteo de células adheridas no se llevó a cabo, pues el método presentado en trabajos previos (tinción con reactivo DAPI) (18) (19) no fue conveniente para individualizar las arqueas de interés versus otros tipos de posible contaminación celular, o presencia de burbujas de aire.

Así, los resultados obtenidos respecto a la evolución de las arqueas en el sistema se referenciaron sólo a células en suspensión, de acuerdo al Gráfico 6. Esta figura, sin embargo, no es apropiada para observar el crecimiento celular, puesto que los primeros 7 puntos registrados parecen constantes, lo cual es efecto del formato del eje de ordenadas. En realidad, la diferencia en

número de células entre el inicio y el final de aquellos 7 puntos es aproximadamente de 10 veces. Por ende, la curva de crecimiento semi-logarítmica presentada en el Gráfico 7 es un mejor método para evaluar el crecimiento.

Como se mencionó en la sección Resultados, la idea de evaluar la cantidad de células planctónicas es un indicio del crecimiento exclusivo de las células adheridas, gracias al supuesto de una duplicación en la cual una célula hija se mantiene adherida, y otra se libera a la solución. Esto, sumado al hecho de que se desprecia el crecimiento de bacterias planctónicas, permite entonces estimar inicialmente una tasa específica de crecimiento que da cuenta de la fase exponencial de *Sulfolobus metallicus* en el biorreactor batch. Este supuesto entra en contradicción con la observación realizada por Shrihari *et al* (45), donde se demostró que *Acidithiobacillus ferrooxidans* no sólo puede sobrevivir, sino que también proliferar en un medio sin azufre, pero que presenta los compuestos intermediarios de la reacción de biooxidación en solución. No obstante, para fines estimativos iniciales, se acepta como válido este razonamiento.

A partir de esto, se obtuvo un valor de $0,056 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ para dicha tasa, el cual puede ser comparado a lo registrado por Pacheco, siendo un indicio para acreditar esta forma de obtención de μ^4 . Así, puede obtenerse un valor inicial de referencia sobre el crecimiento celular, y puede ser usado para fijar valores tentativos de flujo para un biorreactor continuo, conforme al diseño clásico de fermentadores. En otras palabras, se propone un flujo teórico en el cual las células puedan crecer a una velocidad similar a la encontrada en batch.

Es importante mencionar que esta manera de diseñar reactores es diferente a la que se aplica comúnmente para reactores químicos, pues en el caso presentado se concentra el escalamiento en el desarrollo de las arqueas, lo cual permite definir condiciones de operación que aseguren la conversión química del azufre.

Por último, en el Gráfico 7 se observa además una fase de latencia en las primeras 168 horas, mientras que a las 216 horas se presentó una fase estacionaria en el crecimiento de *Sulfolobus metallicus*. La fase de latencia, sin embargo, no fue una etapa en la cual no existiera crecimiento celular, sino que presentó una tasa mucho más baja que la detectada entre las 168 y 216 horas, lo cual se debe a que, en dicho tiempo inicial, las arqueas probablemente se encontraban poblando íntegramente los 60 gramos de azufre, y dado el gran volumen de las perlas, el tiempo de adhesión total fue mayor a los revisados con anterioridad (18).

Como se revisó en los resultados para la producción de ácido y concentración de sulfato, las 48 horas iniciales del experimento en batch presentan una conversión casi nula, indicio de que en dicho tiempo existió la verdadera “latencia” de los microorganismos, es decir, en ese período comenzó la adaptación del inóculo inicial al biorreactor, lo cual se puede observar en el Gráfico 7 con una diferencia muy baja en el conteo celular, y que se aprecia además en el trabajo de Pacheco (18).

La fase estacionaria se obtuvo una vez que el sistema agotase los nutrientes esenciales que entregaba inicialmente el medio Norris en batch, aunque la producción de ácido no se ve afectada

⁴ No se tienen mayores referencias sobre la velocidad específica de crecimiento de *Sulfolobus metallicus* a 67°C utilizando como fuente de energía azufre elemental en perlas, por lo que esta información es importante para posteriores investigaciones al respecto.

por este comportamiento celular. Este hecho fue observado por Pacheco, quien lo atribuía a una producción de ácido no directamente ligada al crecimiento celular (18). En este caso, parece existir la misma observación, aunque las tendencias en el tiempo de una y otra publicación varían, principalmente al no encontrar una fase de muerte celular como lo registra la referencia consultada.

5.3 Biorreactor en Modo Continuo

5.3.1 Escalamiento

La propuesta de un modo continuo de operación se realizó en base al valor de μ estimado en batch para el crecimiento de las arqueas adheridas ($0,056 \text{ [h}^{-1}\text{]}$). Se planteó así un flujo F que permitiese en los 2000 [mL] de reacción el mismo desarrollo celular que en batch, igualando la tasa de dilución a la de crecimiento. Con esto se obtuvo un flujo de operación de $1,8 \text{ [mL/min]}$.

En relación a dicho cálculo, la teoría para obtener un flujo como el anterior es más simplificada que en el caso de células inmovilizadas. Al no contar con registros bibliográficos que den cuenta de un diseño de biorreactor en minería como un análogo a un fermentador, se decidió trabajar bajo esta propuesta y estudiar el efecto que tienen flujos superiores sobre el sistema. En un caso de fermentador ideal, valores mayores al crítico lavan el reactor, lo cual no se debería esperar en el caso de inmovilización de células (44).

Se propusieron entonces 4 flujos de operación para estudiar la biooxidación en continuo, como múltiplos del flujo encontrado en batch. De esta manera se esperaba contar con altos flujos para facilitar su monitoreo, pues las bombas peristálticas utilizadas se lograron operar en este rango. No resultó factible operar el sistema con flujos inferiores a $0,9 \text{ [mL/min]}$.

5.3.2 Estados transientes

Para estudiar el cambio del sistema en el tiempo se controló el pH del medio de reacción, por ser un parámetro sencillo de monitorear y confiable para seguir el avance de la reacción de biooxidación, tal como se observó en el biorreactor batch y en trabajos anteriores (18) (19).

Se ha descrito en Resultados la manera en que se alcanzó cada estado estacionario, utilizando el mismo azufre en perlas para las 4 experiencias. Al respecto, es importante notar el supuesto de que las partículas en el tiempo no reducían su tamaño de forma considerable, permitiendo siempre operar el sistema con el mismo tamaño de perlas de azufre, y así todos los estados estacionarios fueron obtenidos con un tamaño medio similar.

Por otra parte, el biorreactor en modo continuo presentó como respuestas diferentes comportamientos transientes, según lo observado en el Gráfico 8. Se pueden ver diferentes ascensos y descensos de cada curva en el tiempo, los cuales se justifican por los problemas en el

montaje del sistema, particularmente la falta de control que se tuvo en el transporte de fluidos, detectado como el punto clave a mejorar en la operación. Desde el punto de vista dinámico se esperaba que el biorreactor, idealmente bajo un cambio escalón en flujo, exhibiera una respuesta enfocada hacia un nuevo estado estacionario, y en un tiempo menor al que presentaron los 4 flujos descritos.

En este sentido, si se quiere estudiar en concreto el tiempo de respuesta del sistema para un cambio en el flujo, se puede eliminar el ruido que presentan las curvas mostradas, e iniciar cada “estado transiente” en el momento en que se observa una tendencia regular en el pH del medio. Esto se aprecia en el Gráfico 22:

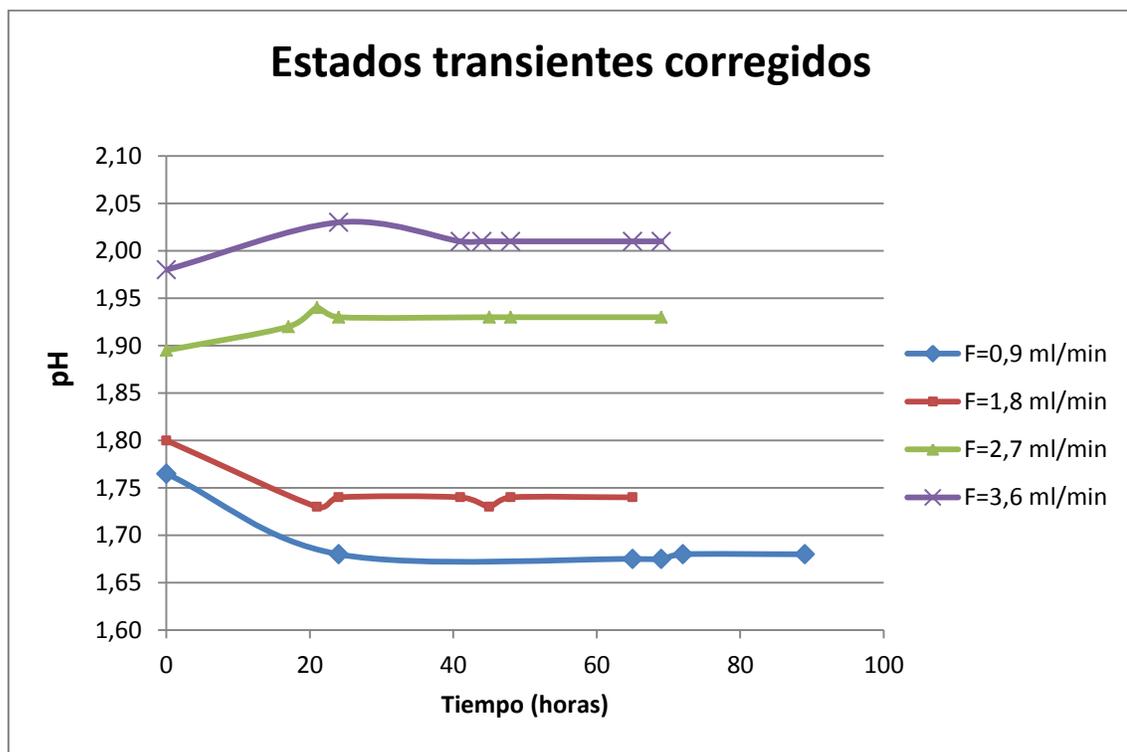


Gráfico 22: Estados transientes presentados eliminando el ruido experimental del Gráfico 8. Se observa un rango de tiempos transientes entre 24 y 40 horas, tiempo en que el biorreactor estabiliza su pH.

Cada curva anterior presenta una etapa transiente entre 24 y 40 horas, tiempo en el cual se consigue estabilidad en el pH del medio. Al respecto, no se lograron encontrar publicaciones que den algún detalle con respecto al estado transiente de sus sistemas de reacción.

Debido a los tiempos de trabajo, tampoco fue posible desarrollar un estudio predictivo del tiempo en que el estado transiente se estabilizaría, es decir, que lograrse predecir la respuesta dinámica del biorreactor. Un análisis más acabado del sistema debiese considerar este detalle.

5.3.3 Estados estacionarios

Una vez alcanzados los 4 estados estacionarios, se muestra la relación entre flujos estacionarios y resultados de monitoreo en Gráfico 9, Gráfico 10, Gráfico 11 y Gráfico 12. Se puede observar que las curvas de producción (pH, acidez, sulfato) siguen una tendencia irregular, en forma tipo sigmoidea, mientras que la curva que relaciona la cantidad de arqueas suspendidas es una recta invertida.

Este comportamiento reafirma lo observado en el modo batch, dando cuenta de que los cambios en producción no siguen la misma tendencia que la variación en número de células. Ahora bien, las tendencias de ascenso o descenso en cada curva fueron coherentes con el hecho de que los flujos variasen, es decir, aumentar el flujo de operación trae consigo un mayor recambio del medio líquido en el sistema, diluyendo cada especie y aumentando el pH del medio, acercándose al valor 2,3 del medio Norris.

No fue posible evaluar flujos inferiores debido a los tiempos de trabajo y a la capacidad de las bombas. Esto puede resultar interesante de estudiar pues se pueden obtener cantidades más concentradas de ácido sulfúrico, lo cual sería eventualmente más útil para atacar, en proyección, una mayor cantidad de rocas fosfóricas. En el presente estudio se obtuvieron rangos de acidez en estado estacionario entre 0,5 y 1,2 [g/L], lo cual pertenece a una baja concentración de ácido sulfúrico al comparar estos valores al caso de biorreactor batch, donde se superan los 13 [g/L] y sin alcanzar un límite en producción.

Como el presente trabajo es una primera aproximación sobre un biorreactor continuo de producción de ácido por acción biológica sobre azufre, no se cuenta con referencias sobre la producción ideal de ácido, lo cual debiese ser función de la concentración de fosfatos que se esperaría recuperar en una etapa siguiente del procesamiento que pretende el proyecto. Reducir el flujo puede concentrar el ácido en la salida del reactor, pero trae como consecuencia que en producción continua de fosfatos se trabaje con flujos muy pequeños.

5.4 Modelación del reactor de biooxidación de azufre

5.4.1 Modelos sobre el balance de biomasa

En la sección Resultados se explicó la idea de modelación aplicada al biorreactor continuo. Se aprecia una estructura simple de implementar, básicamente utilizando la información encontrada a partir de las mediciones típicas que han sido realizadas en trabajos previos (18) (19), sin un manejo matemático complejo y cercano a los conceptos biológicos del proceso.

Al respecto, el resto de modelos mencionados en Antecedentes Generales se enfocan en procesos con sustratos más complejos (pirita, calcopirita, etc.), en los cuales tanto bacterias adheridas como planctónicas tienen relevancia importante para cada sistema al utilizar diferentes fuentes de energía desde los sustratos minerales, como el azufre y el hierro. Esto, sumado a la mayor

complejidad para resolver numéricamente dichos métodos, hizo que se descartaran para el estudio en curso, que fue enfocado para ser una primera aproximación del biorreactor a diseñar.

Antes de analizar los resultados de la modelación en sí, es importante destacar el uso de una concentración fija de células adheridas (expresada como x_A) igual a $1,27 \cdot 10^{11}$ [arqueas/*L reactor*]. Lo anterior supone que las perlas preservan su tamaño en cada estado estacionario y, por ende, existe una superficie disponible constante para la adhesión celular. Además, las tasas de crecimiento μ buscadas en los balances de biomasa dan cuenta de estados transientes en donde las perlas se colonizan completamente y, a partir de ese momento, se generan los equilibrios bioquímicos que implican estados estacionarios del sistema. Por cierto, esta relación entre perlas colonizadas en su totalidad y el equilibrio del sistema no ha sido demostrada ni por este ni por trabajos previos.

Por su parte, la manera en que se abordaron las variantes de modelación se explica por la incertidumbre que se tiene sobre el proceso. El reactor implementado en el laboratorio no presenta referencias previas, ni existe mayor información sobre *Sulfolobus metallicus* como especie participante en la biooxidación de minerales en reactores. Por lo anterior, el estudio se enfocó en conocer la respuesta que tienen las ecuaciones del modelo, gracias a la estimación de la tasa μ y el rendimiento Y_P^{XA} , dependiendo de ciertos supuestos que sean relevantes desde el punto de visto científico.

En primer lugar, se resolvió modelar Ecuación 10 y Ecuación 12, que representan al balance de biomasa considerando y despreciando el crecimiento de arqueas plantónicas, a la hora de determinar una tasa específica de crecimiento. Para evaluar dicha condición, originalmente se pensó comparar las regresiones lineales obtenidas desde ambas ecuaciones, dejando constante μ para todos los flujos de operación, lo cual se traduce en encontrar una pendiente que ajustara los datos experimentales según el factor de efectividad η_T respectivo.

En este sentido, los resultados que se muestran en la Tabla 10, y los coeficientes de correlación respectivos para cada regresión (Gráfico 13 y Gráfico 14), presentaron un comportamiento exactamente igual, lo cual daba a entender que el crecimiento de arqueas suspendidas era un factor que no debía tomarse en cuenta para el balance de biomasa.

Sin embargo, que los valores hayan resultado exactamente iguales hizo sospechar sobre el manejo matemático de las expresiones. Por ende, dado que los cálculos se encontraban integrados en una planilla tipo Excel, se probaron arbitrariamente distintos valores para la razón x_A/x_S , que se mostraba como el único término variable. Al cambiar este parámetro, sin embargo, no se observó ninguna diferencia entre las gráficas asociadas a Ecuación 10 y Ecuación 12.

Se determinó entonces que existía un error con algún supuesto inicial, y se determinó que asumir una tasa de crecimiento constante representaba una restricción fuerte para la ecuación de biomasa. El asumir μ constante se entendía porque, para cada flujo estacionario, se mantenían idealmente los mismos 60 [g] de azufre en perlas con su superficie externa completamente colonizada. Por su parte, la tasa específica de crecimiento se relaciona con el sustrato limitante según la ecuación de Monod (44):

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{k_S + S}$$

en la cual

- μ : Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).
- μ_{max} : Máxima velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).
- S : Concentración de sustrato limitante (g/L).
- k_S : Constante de velocidad media (es el valor de S cuando $\mu = \mu_{max}/2$).

Según la Ecuación 49, y dado que el sustrato limitante (en este caso el azufre) no cambiaba en el sistema, entonces el valor de μ no tendría razón para variar, más aun considerando que constantemente el biorreactor renovaba el medio de cultivo y las condiciones operacionales no se mostraron invasivas con los microorganismos.

No obstante, para fines del modelo en estudio, el asumir una tasa μ constante fue redundante con imponer una concentración constante de arqueas adheridas (dos restricciones para una ecuación). En otras palabras, resultó que las mismas arqueas adheridas crecían a la misma tasa para un determinado η_T , independiente del flujo de operación y de la cantidad de arqueas planctónicas que se encuentren en cada estacionario, entregando así resultados idénticos.

Debido a que el número de arqueas adheridas no pudo medirse experimentalmente en cada estado estacionario, se pensó entonces en considerar una tasa específica de crecimiento que variase con cada flujo de operación, y así reevaluar la importancia de considerar el crecimiento de arqueas planctónicas para el balance de biomasa.

En este nuevo escenario, al utilizar Ecuación 10 y Ecuación 12 se obtuvieron curvas que muestran la variación de la tasa específica μ según el flujo de operación. Cada curva, a su vez, fue resultado de un valor de efectividad η_T . El Gráfico 15 (considerando el crecimiento de células en suspensión) y el Gráfico 16 (balance de biomasa simplificado) representan cada condición, de donde se observa una diferencia leve pero apreciable entre ambos supuestos.

Además, en el Anexo B se entregan los resultados numéricos de cada tasa encontrada, y de la cual se puede deducir una diferencia porcentual que va en aumento a medida que disminuye η_T , alcanzando el 25% de variación aproximada de μ para el mismo flujo de operación y un factor de efectividad de 0,125 (ver Tabla 19). Esta importante diferencia, no obstante, puede considerarse como fruto de lo bajo en el orden de magnitud que posee la tasa específica de crecimiento.

Por ende, como una medida inicial de modelación se estableció que, para el sistema descrito y flujos de operación estudiados en el presente trabajo de tesis, es válido el asumir que sólo las arqueas adheridas crecen, y las células planctónicas pueden ser descartadas del balance de biomasa.

Esta observación no debe ser una generalización del sistema. Siguiendo la misma temática de variar aleatoriamente la razón x_A/x_S en planillas tipo Excel, se puede demostrar que los valores de μ son notablemente diferentes. Por ende, sólo puede ser visto como un supuesto inicial, que

permite trabajar con más holguras el balance de producto. Con esta precaución, la Ecuación 12 parece una buena simplificación para el sistema en estudio.

Una vez aceptada la reducción propuesta del balance de biomasa, se puede realizar otro tipo de comparación, esta vez entre las curvas que representan el caso de μ constante (Gráfico 14) y μ variable (Gráfico 16).

A pesar de haber mencionado el hecho de que el considerar una tasa constante parece forzar la solución del sistema, los valores entregados por esta corresponden al mismo rango que los obtenidos para el caso de μ variable. En efecto, considerar el caso constante, según los resultados numéricos, equivale a asumir la mayor tasa de crecimiento evaluada en cada curva del caso variable. Esto, sumado a los buenos coeficientes de correlación que presenta el modelo con tasa constante, implica que en los altos flujos a los cuales se ha operado el biorreactor continuo, una tasa constante de crecimiento puede aún ser considerada para desarrollar el modelo de producción, o al menos podría esperarse que entregue resultados similares al caso variable.

Como se ha constatado en las curvas previas, obtener velocidades específicas de crecimiento celular se encuentra fuertemente influenciado por el factor de efectividad. A medida que dicho factor disminuye, los valores registrados de la tasa μ van en aumento en cada caso de modelo, obteniendo los valores mayores con un factor η_T de 0,125. Esto indica una fuerte asociación entre la transferencia de masa solución/azufre/célula y el éxito en el crecimiento de las arqueas, lo cual finalmente mantiene al sistema en operación.

Esta idea es respaldada por Pacheco (18) y Lira (19), quienes utilizan la Teoría de Núcleo Sin Reaccionar (derivada de reacciones heterogéneas), para evidenciar que la etapa limitante en el proceso descrito presenta un componente de difusión de reactivos y otro de la reacción química en sí, no concluyendo claramente sobre cuál tipo de control es el predominante. Es por esta razón que el factor de efectividad tiene una importancia central, pues permite evaluar la difusión tanto del oxígeno como de los nutrientes esenciales hacia la interfase microorganismo/azufre.

Las tasas de crecimiento encontradas corresponden, según el modelo de biorreactor clásico, al crecimiento simultáneo de arqueas planctónicas y adheridas. Por ende, los resultados tendrán validez en la medida que el modelo pueda ser contrastado con la realidad, donde se debería corroborar una resistencia alta en transferencia de masa, además de un crecimiento de arqueas suspendidas en el sistema.

5.4.2 Modelos de producción: rendimiento de producto

El estudio sobre el modelo de producción fue realizado considerando el caso de una tasa específica μ constante, como también el caso de tasa variable por flujo, para así obtener resultados de interés que guíen futuras investigaciones. Así, se generaron curvas de regresión lineal desde los balances de producción, utilizando los datos de concentración neta de ácido sulfúrico o sulfato en cada estado estacionario, pues según la Tabla 13, ambos indicadores de conversión química entregaron valores cercanos entre ellos (producción neta).

A partir de dichas regresiones, se pueden obtener valores del rendimiento de producción por biomasa (g producto/arquea), las cuales se presentan en la Tabla 11. Se observa una similitud inicial entre los valores registrados por cada caso de modelo (presentan órdenes de magnitud comparables), aunque tienen diferencias porcentuales. En efecto, si se observa el rendimiento de biomasa por ácido sulfúrico, se tiene una diferencia de alrededor del 40% entre el modelo con μ constante y el de μ variable. Asimismo, la diferencia al utilizar el sulfato es de un 30%, y en ambos casos de producto se obtuvo un valor mayor de rendimiento al suponer μ variable.

Otra observación interesante es que, en cada caso de μ , ambos productos evaluados presentaron un rendimiento similar, lo cual se justifica pues la relación molar y másica entre sulfato y ácido sulfúrico sólo varía por dos iones hidrógeno. Se cumple una relación estrecha entre ambas variables debido a que se trabaja con concentraciones bajas de producción, versus lo visto en el biorreactor batch (donde se superan los 10 [g/L]). Por ende, para los estados estacionarios se generaron valores diluidos pero confiables de ambos tipos de producto.

En este sentido, una idea inicial para decidir cuál de los dos modelos entrega resultados más certeros es comparar los coeficientes de correlación obtenidos para ambos casos, presentados en la Tabla 11. El coeficiente mayor para las regresiones en el caso variable, habla de un cálculo con datos que se ajustan linealmente con mayor precisión, y es resultado además de sólo una regresión lineal, versus las dos que se deben realizar en el método de μ constante. Por ende, la segunda modelación parece una mejor estimación.

Además, para realizar un diagnóstico sobre la calidad de los rendimientos de producción que entregan los modelos, se compararon los resultados obtenidos con la información más cercana de referencias previas sobre el fenómeno. La Tabla 15 muestra valores encontrados de publicaciones anteriores que ayudan a comparar los resultados obtenidos.

Los rendimientos presentados en dicha tabla son los recíprocos de los obtenidos por el presente modelo, por lo que basta invertir los valores de este último para compararlos. La nueva información de rendimientos del modelo se observa en la Tabla 16.

La información presentada en la Tabla 15 muestra tres trabajos realizados con *Sulfolobus metallicus* desarrollados netamente en fase experimental, mientras que el resto se llevaron a cabo con una parte experimental y otra de modelación, en modo batch de operación. Al respecto, los primeros tres muestran un rango total para la tasa específica de crecimiento μ de *Sulfolobus metallicus* entre 0,016 y 0,056 [h^{-1}], lo cual es útil para evaluar la tasa más apropiada que representa al biorreactor continuo.

Al observar los resultados mostrados en el Anexo B, se puede mencionar que los valores de μ más cercanos al rango anterior fueron obtenidos cuando se supuso un valor del factor de efectividad de 0,125. Por su parte, las publicaciones que presentan modelos de reactor de la Tabla 15 (los últimos tres) entregan valores de μ alejados del rango de las primeras. Esto se debe a dos situaciones: primero, a que utilizan otras especies celulares; y segundo, pues los modelos son diferentes al usado en este trabajo.

Tabla 15: Cuadro resumen de publicaciones que entregan información de utilidad para analizar los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación. En particular, se muestran la tasa específica de crecimiento para microorganismos utilizados en biooxidación y el rendimiento de biomasa.

	Y_P^{XA}	$\mu [h^{-1}]$
Biorreactor batch: sulfato (presente trabajo)⁵	$1,8 \cdot 10^{11}$ [cel totales/g SO_4^{2-}]	0,056 (fase exponencial)
Biorreactor batch: ácido sulfúrico (presente trabajo)⁵	$2,1 \cdot 10^{11}$ [cel totales/g H_2SO_4]	0,056 (fase exponencial)
Pacheco (matraz) (cálculo aproximado) (18)	$1,54 \cdot 10^{11}$ Yield como [cel/g H_2SO_4]	0,016 (adheridas)
Nemati <i>et al</i> 2000 (batch) (34)	$3,2 - 6,5 \cdot 10^{10}$ Yield como [cel/g pirita]	0,018 – 0,025 (planctónicas)
Las referencias anteriores fueron realizadas utilizando <i>Sulfolobus metallicus</i>		
Konishi <i>et al</i> 1994 (batch) <i>A. ferrooxidans</i> (60)	$6,25 \cdot 10^{11}$ Yield como [cel/g S^0]	0,067 (adheridas)
Konishi <i>et al</i> 1995 (batch) <i>A. thiooxidans</i> (61)	$2,05 \cdot 10^{11}$ Yield como [cel/g S^0]	0,11 (adheridas)
Gourdon y Funtowicz 1998 (batch) <i>A. thiooxidans</i> (62)	$4,9 \cdot 10^{11}$ Yield como [cel/g S^0]	0,042 (planctónicas)

Tabla 16: Rendimientos de biomasa por producto, obtenidos directamente como los recíprocos de los valores presentados en la Tabla 11.

Producto descrito	Yield (μ cte) [cel/ g producto]	Yield (μ variable) [cel/ g producto]
Ácido sulfúrico	$1,67 \cdot 10^{10}$	10^{10}
Sulfato	$1,43 \cdot 10^{10}$	10^{10}

A su vez, los rendimientos encontrados para el biorreactor continuo resultaron menores que los expuestos en la Tabla 15, lo que puede atribuirse a operar altos flujos, lo cual diluye la concentración en el biorreactor, mientras que los casos presentados en dicha tabla fueron realizados en modo batch. No obstante, los valores obtenidos en las publicaciones son

⁵ Se calculan en base a los valores obtenidos a las 216 horas de cultivo (incluyen células adheridas, obtenidas desde Pacheco, más arqueas planctónicas), versus el inicio del biorreactor batch.

relativamente similares en órdenes de magnitud a los modelados en el presente trabajo, y los rendimientos de Nemati *et al* (34) se encuentran cercanos a los del modelo.

Los últimos tres valores mostrados en la Tabla 15 son rendimientos enfocados a la concentración de sustrato y no de producto. Si se busca compararlos, basta observar la razón molar entre azufre y producto, que es 1:1 según la Reacción 8. Esto resulta en multiplicar los rendimientos presentados en la Tabla 16 por 3 (relación en gramos), y así se convierten en rendimientos por sustrato. No obstante, dichas referencias entregan valores mayores (diferencia de 1 orden de magnitud), por lo que definitivamente comparar con ellos no es óptimo.

Es importante destacar que la información presentada en la Tabla 15 es sólo de carácter referencial, puesto que cada trabajo de investigación fue llevado a cabo bajo distintas condiciones de cultivo, tamaño de partículas, especies celulares, modelación, etcétera, y sirven básicamente para fijar límites a los resultados encontrados en la presente tesis.

Dada las condiciones de la investigación en curso, fueron encontrados valores para el rendimiento de producto por arquea adherida en el sistema (Y_P^{XA}), comparables a publicaciones previas y que pueden ser utilizados para futuros modelos donde se requiera descubrir otros parámetros desconocidos, según la Ecuación 17. En condiciones más bajas de flujo, sin embargo, o con valores más certeros de la cantidad de células adheridas en el sistema, se deben revisar los supuestos tras la modelación. La resolución simultánea del balance de biomasa y de producción parece ser la mejor alternativa para dar una mejor estimación de las variables del sistema de reacción.

Es necesario además establecer parámetros en el balance de producción que den cuenta de la realidad del proceso. Se ha visto en referencias previas que las células adheridas son las que utilizan el azufre elemental para la producción ácida, mientras que los microorganismos suspendidos usarían compuestos intermediarios de la reacción (45). A su vez, la producción de ácido debiese estar directamente ligada a la cantidad de azufre disponible en el sistema. Estas situaciones deben expresarse en el balance de producto, para lo cual se requiere una modelación más compleja.

5.5 Estudio de la aireación

En el presente trabajo el estudio de la aireación se centró en el oxígeno como elemento limitante para el proceso de biooxidación del azufre. Es así como se buscó relacionar la cantidad de O_2 ingresada por el aireador de pecera con su transferencia efectiva al medio líquido, además del porcentaje de oxígeno utilizado por la reacción en cada estado estacionario monitoreado. En este seguimiento, primero se obtuvo un valor estimado del O_2 que ingresa por el aireador (0,28 [g O_2 /min]), lo cual se establece en base al porcentaje volumétrico de oxígeno en el aire (21%), y a una temperatura ambiente de 25°C, considerándolo como un gas ideal.

Por su parte, para diagnosticar la concentración de oxígeno disuelto en el tiempo se utilizó el Método Dinámico en duplicado para el biorreactor en modo batch. De esta forma, se podría

conocer si la entrega de oxígeno por parte del aireador era suficiente para el crecimiento celular, o si existieron problemas de transferencia de oxígeno no considerados.

Con respecto a esta medición (por el electrodo específico), los duplicados desarrollados entregaron un valor promedio del coeficiente combinado de transferencia de oxígeno $k_L a_i$ de $0,0018 \text{ [s}^{-1}\text{]}$, con una concentración de saturación de oxígeno en el medio líquido (C^*) de $3,2 \text{ [mg O}_2\text{/L]}$ (ver Anexo C). Una publicación interesante para comparar estos parámetros es la entregada por Boogerd *et al* (64), en donde se planteó estudiar el cambio en el coeficiente de transferencia combinado según temperatura y en tres diferentes combinaciones de aireación/agitación. Lo anterior fue desarrollado en un medio líquido ácido a pH 2.

En dicho trabajo fue reportada una fórmula para estimar la solubilidad de O_2 en agua saturada de aire a 1 atm (C^*), considerando el efecto que causa la existencia de vapor de agua en el medio de reacción, según la ley de Henry (64):

$$C^* = \frac{55,55 \cdot C_{\text{aire}} \cdot (1 - C_{\text{vapor}}^*)}{H_{\text{Ox}}} \quad \text{Ecuación 50}$$

En lo anterior

C^* : Solubilidad de oxígeno en el líquido ácido (mol $\text{O}_2\text{/L}$).

C_{aire} : Concentración de oxígeno en el aire (atm).

C_{vapor}^* : Presión de vapor de agua en equilibrio con el líquido (atm).

H_{Ox} : Constante de Henry para el oxígeno (L atm/mol).

Dicha expresión permitió graficar la solubilidad de O_2 en función de la temperatura, tal como se observa en el Gráfico 23:

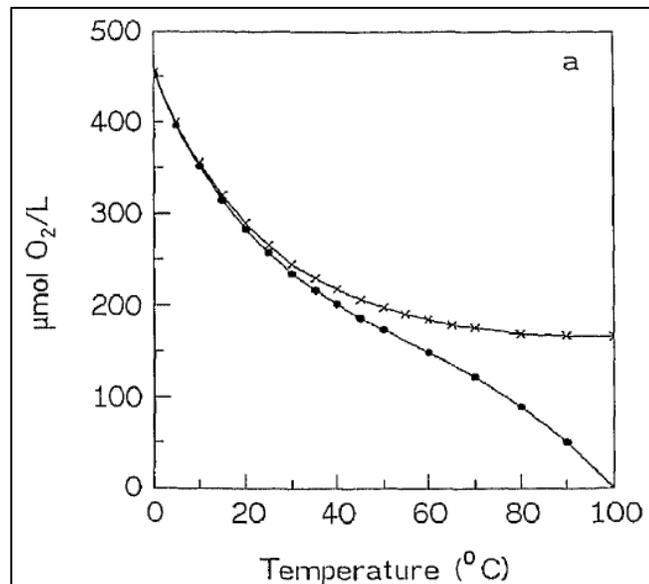


Gráfico 23: Solubilidad de oxígeno en agua ácida en función de la temperatura, en equilibrio con 1 atm de aire seco. La curva superior indica un valor obtenido por la Ley de Henry, mientras que la curva inferior entrega el mismo resultado pero considerando la influencia del vapor de agua, tal como lo indica la Ecuación 50 (64).

Para 70°C (cercana a la temperatura del biorreactor en estudio), la solubilidad de oxígeno se observa en 120 [$\mu\text{mol O}_2/\text{L}$] aproximadamente, lo cual equivale a 3,8 [$\text{mg O}_2/\text{L}$]. Esto indica que el valor utilizado en la presente tesis fue inferior, comparado a la estimada de Boogerd *et al.* Sin embargo, el considerar la influencia que pueden ejercer los microorganismos, el azufre y sus compuestos intermediarios, además de las sales nutritivas que entrega el medio Norris, entregaría un valor de solubilidad de oxígeno menor a 3,8 [$\text{mg O}_2/\text{L}$], por lo que el valor de 3,2 [$\text{mg O}_2/\text{L}$] se considera válido en esta experiencia.

Por su parte, Boogerd *et al* encontraron valores de $k_L a_i$ para 4 diferentes temperaturas y 3 condiciones distintas de aireación/agitación. En particular, para 70°C se referenciaron valores aproximados de 2,59 [min^{-1}] para una alta agitación, 0,385 [min^{-1}] para una alta aireación y 0,153 [min^{-1}] para una agitación y aireación medias. Según los parámetros utilizados en el presente estudio, el biorreactor puede considerarse con características de operación entre el segundo y tercer caso. Sin embargo, sólo alcanzó un coeficiente promedio de 0,108 [min^{-1}] (son los 0,0018 [s^{-1}] indicados previamente). En este sentido, la publicación previa presenta otro tipo de agitador (2 turbinas de 4 paletas concéntricas), por lo cual no pueden compararse de manera concluyente ambos $k_L a_i$. Sólo se puede rescatar el hecho de que se obtienen valores dentro de un orden de magnitud similar.

Un factor en la determinación del coeficiente de transferencia es la concentración de oxígeno que se va midiendo en el tiempo según el Método Dinámico. El medidor de oxígeno disuelto utilizado fue una nueva adquisición en el laboratorio de investigación, lo cual significó que fue operado con un conocimiento básico. A pesar de esto, la correlación obtenida para los valores utilizados en cada regresión (presentada en el Anexo C) da cuenta de una medición confiable.

Gracias a la aceptable comparación realizada anteriormente, los datos obtenidos en el biorreactor resultan confiables para proseguir el estudio de aireación. La evaluación continuó con la estimación del oxígeno remanente en el medio líquido (es decir en el seno del fluido) en cada estado estacionario. De esta forma, puede observarse si la reacción fue limitada por la cantidad de O_2 o no.

Estimar el oxígeno en el seno del fluido se realizó utilizando el consumo de oxígeno en cada estado estacionario, por una parte (Tabla 13), y la determinada en base a los rendimientos de producción que se obtienen una vez modelado el balance de producción, por otra (Tabla 14). En este último caso, se supuso una tasa de crecimiento del modelo que fuese acorde a las referencias previas (obtenido como 0,022 [h^{-1}] en el caso η_T de 0,125) para generar un requerimiento de O_2 por célula, y luego un consumo en el tiempo. Con esta información, basta despejar el valor C_L de la Ecuación 28 para evaluar la concentración remanente en el seno del fluido (ver Anexo C).

En general, las mediciones realizadas presentaron valores de C_L mayores a cero, y menores a la solubilidad de O_2 en el medio. En el caso del flujo 1,8 [mL/min], se obtuvieron valores negativos de concentración que representan el error acumulado cuando se comparan diferentes mediciones realizadas a escala de laboratorio: titulación ácido base y turbidimetría, por un lado, crecimiento celular y el modelo, por otro. A pesar de esto, no se considera un error determinante en el sistema en estudio, y no resulta mayormente relevante para la discusión posterior.

Para el común de las mediciones, esta concentración remanente indicaría que el gradiente de concentración de O_2 en solución puede ser aumentado, resultando en una mayor cantidad de

oxígeno disponible para la reacción, y así mejoraría la producción de ácido sulfúrico bajo las mismas condiciones de operación del biorreactor actual.

El caso límite del gradiente resulta cuando C_L es igual a cero, lo que indicaría que todo el oxígeno transferido se utiliza en la reacción de manera instantánea. En estas condiciones, se utilizó la Ecuación 47 para obtener un valor máximo de azufre para cargar el biorreactor de 126 [g], lo cual permite decir que podría duplicarse la cantidad de azufre inicial (que originalmente era de 60 [g]), bajo las condiciones actuales de agitación, aireación y razón de arqueas adheridas por superficie de perla de azufre.

Lo anterior trae como consecuencia directa que la producción de ácido sulfúrico alcance un valor máximo de 0,0014 [g/min], independiente del flujo de operación total del biorreactor. En otras palabras, flujos pequeños de operación entregarán concentraciones elevadas de ácido, mientras que altos flujos operarán con cantidades diluidas de producto, manteniendo siempre los 0,0014 [g ácido/min] mencionados previamente. En este sentido, se observó en modo batch que las concentraciones que puede alcanzar el recipiente superan los 10 [g ácido/L] sin presentar una inhibición en el crecimiento de las arqueas, por lo que un incremento de concentración no impediría la proliferación de microorganismos productores de ácido.

Un parámetro central que define la transferencia de oxígeno al sistema es el coeficiente de transferencia combinado. De este depende que pueda tratarse el azufre en perlas y que los microorganismos proliferen. Derivado de la Ecuación 47, la cantidad de azufre que puede ser tratado en el reactor también es dependiente del $k_L a_i$. Por ejemplo, un aumento al doble de este factor puede duplicar teóricamente el azufre que puede manejarse y, a su vez, la cantidad de arqueas adheridas también irán en aumento.

Los métodos para aumentar el $k_L a_i$ son principalmente: modificar la distribución de aire, aumentar el nivel de agitación del sistema, cambiar el tipo de agitador o diseñar conjuntamente estas características. En ese sentido, el modelo de biorreactor utilizado desconoce si el tamaño de burbujas, flujo de aire y nivel de agitación (o tipo de paleta) son los adecuados para el sistema.

No obstante, los valores de agitación y de flujo de aire usados son similares a los reportados en trabajos previos (34) (60), aunque en ellos no se habla mayormente sobre ellos pues no son los objetivos de cada estudio.

En la literatura se presentan relaciones entre $k_L a_i$ y los parámetros físicos de operación (14), en donde se aprecian distintas correlaciones empíricas dependiendo del tipo de reactor. Un estudio al respecto puede ser de ayuda para optimizar los gastos energéticos que proyectaría la operación del biorreactor en escalas más grandes de producción. Lo anterior, no obstante, debe ser equilibrado con el crecimiento celular, específicamente en asegurar condiciones para que las arqueas preserven su integridad celular.

En esta proyección de estudio se debe considerar que las cantidades de O_2 utilizadas efectivamente en la reacción de biooxidación presentan órdenes de magnitud muy inferiores a la cantidad inicial entregada por el aireador de pecera (de 0,28 [g O_2 /min]), por lo que puede ser un objetivo de interés optimizar la energía usada en aquella inyección de oxígeno.

Si bien el estudio de aireación se pensó para considerar al oxígeno como gas limitante en el proceso, también resultaría de interés conocer el escenario que presenta la restricción de CO₂ en el sistema de reacción. En este sentido, Boogerd *et al* (64) mostraron que el dióxido de carbono también es un compuesto clave para ser estudiado, y lo definen como más limitante aún que el propio oxígeno. Para fines del estudio en curso, sin embargo, no fue considerado.

5.6 Discusión general

Dentro de las metodologías realizadas para el presente trabajo de tesis, se encuentran la preparación de perlas, cultivo de inóculos, mediciones de pH, titulación, medición de sulfato y conteo celular. Cada una de ellas entrega una información valiosa para desarrollar una modelación clásica de biorreactor. Sin embargo, algunas requieren una mayor preparación para los estudios venideros, en particular preparar perlas con diámetros inferiores, que entreguen una mayor área superficial para el desarrollo de arqueas adheridas, y el seguimiento al sulfato en solución, donde la metodología que se presenta en este informe mejora los resultados de publicaciones previas (18), aunque debe seguir en constante revisión. Por lo demás, las metodologías presentan un manejo sencillo nivel de laboratorio, lo cual facilita el estudio propuesto.

Los resultados entregados también evidenciaron que el sistema funcionó correctamente según lo que predicen las publicaciones previas, en particular el descenso de pH y los tiempos de producción de ácido sulfúrico (18). Por ende, en este caso el concepto de escalamiento empleado resultó exitoso, basado en el establecimiento de las condiciones del sistema utilizando una regla de proporción simple, según el material disponible en el laboratorio. Lo anterior es validado a pesar de no cumplir la razón entre superficie de azufre y volumen de reactor estimada desde los matraces de Pacheco (18).

Otros puntos a favor del sistema de reacción empleado fueron que no existió inhibición celular, el volumen de reacción permaneció sin contaminación externa y se logró evidenciar la reducción de tamaño y el ataque celular a las perlas, lo cual finalmente permite observar un proceso de biooxidación en el reactor agitado montado en el laboratorio.

Con respecto a futuras mediciones, existen dos datos no revisados en este informe, pero que pueden presentar información interesante de la operación: medir el azufre remanente en el biorreactor y contabilizar las arqueas adheridas a las perlas. Realizar estos procedimientos significaba en este estudio detener constantemente el biorreactor, y por ende no fueron considerados, lo cual entrega una oportunidad de mejora en resultados. Asimismo, realizar un seguimiento de la concentración de CO₂ en el medio de reacción podría especializar aún más el conocimiento acerca del sistema de aireación, permitiendo establecer, por ejemplo, si el aire atmosférico es suficiente para alimentar el biorreactor, o se requiere aire enriquecido con algún compuesto esencial.

Relacionado con el conteo de arqueas, un dato desconocido por falta de tiempo, pero que puede ser útil en términos de una modelación futura, es la masa de células que se producen (por ejemplo gramos de arqueas). En la bibliografía consultada se desconoce esta información, la cual podría

ser deducida gracias a filtración de muestras, y conteo celular en cámara Neubauer. Además del aporte de esta información para futuras publicaciones, podría estudiarse la información sobre la masa de arqueas adheridas y planctónicas, y así discutir sus posibles diferencias en el sistema de reacción.

Sin embargo, a pesar de que se cumplió el objetivo de la presente tesis, que se traduce en observar la biooxidación de azufre en un reactor a 67°C utilizando *Sulfolobus metallicus*, se requiere un mayor nivel de ingeniería para mejorar el sistema. En este trabajo, debido a la disponibilidad de herramientas y equipos, primero se pensó en un montaje de reactor, luego en su operación, y al final determinar una ecuación de diseño que explique el comportamiento monitoreado. Lo anterior implicó que varios puntos en la ingeniería de reactores quedasen sin resolver apropiadamente, tal como el tipo de agitación, diseño acabado de una paleta y del aireador, o la implementación de baffles.

En este sentido, también deben destacarse problemas que deben mejorarse para las futuras investigaciones. Tal como es positivo trabajar con arqueas termófilas extremas, pues gracias a su temperatura de crecimiento aprovechan el calor emanado por la reacción exotérmica de oxidación, además de autorregular cualquier tipo de contaminación externa, en las mangueras que transportaban los fluidos se observaron algunos problemas de bloqueo o de posible contaminación no confirmada. El trabajo presentado es una positiva primera aproximación sobre la biooxidación que se desea trabajar, pero requiere una observación y mejora de estos detalles antes de continuar con una próxima etapa de escalamiento. Por ejemplo, se puede pensar en filtros para las mangueras, que por tiempos del trabajo de tesis no se lograron implementar en este estudio, o integrar un pH-metro permanente en el sistema.

Un rediseño más acabado del sistema también podría generar más adelante una mejora sustantiva cuando se piense acoplar este reactor al que efectuará la biolixiviación de fosfatos, tal como Godoy lo ha pronosticado anteriormente en su modelo (7). En este trabajo de rediseño se debe tener presente que los resultados obtenidos podrían variar con respecto al actual. Por ejemplo, implementar un filtro de sólidos cambiaría cada estado estacionario conseguido, pues estos se alcanzaron con salida de azufre.

Durante la recopilación bibliográfica no se encontraron mayores datos sobre concentraciones de ácido sulfúrico en procesos industriales de biooxidación modernos. Por ende, no fue posible determinar si las concentraciones obtenidas en el presente estudio son comparables o aplicables a escala industrial.

A su vez, un supuesto fundamental para el trabajo presentado es el crecimiento exclusivo de células adheridas al azufre, lo cual hablaría de un mecanismo directo de formación de ácido sulfúrico. Por otra parte, Pacheco (18), Shrihari *et al* (45) y Gautier (46) han mostrado la posibilidad de crecimiento mixto entre estas y las que se encuentran suspendidas en el medio, proponiendo un ataque de carácter cooperativo. Al respecto, no se registran mayores referencias que entreguen una conclusión concreta sobre el tipo predominante de crecimiento y, según los resultados obtenidos en este trabajo, se obtuvo una producción interesante sólo considerando las arqueas adheridas a las perlas, lo cual resalta la importancia de estas células en el sistema.

En otro tema, se destaca en trabajos previos valores de tiempo para los cuales el 100% de las perlas de azufre se consumen bajo la acción biológica de microorganismos, es decir, el tiempo

que toma alcanzar una conversión completa (18) (19). Esta predicción fue llevada a cabo en dichos trabajos utilizando la Teoría de Núcleo Sin Reaccionar, extrapolando el tiempo en que la conversión del sistema es 1.

En la presente investigación se utilizó un enfoque diferente, considerando los rendimientos obtenidos en el sistema en modo batch de operación (véase Tabla 15). Con esto, utilizando la tasa máxima de crecimiento descrito para las arqueas desde el modelo ($0,022 \text{ [h}^{-1}\text{]}$), el total de arqueas potencialmente adheridas al azufre ($2,54 \cdot 10^{11} \text{ [células]}$) y el rendimiento de sustrato estimado para el biorreactor batch, se logró estimar una tasa de consumo de azufre (ver Anexo E). Para lo anterior se describió un rendimiento de sustrato en batch pues es el mejor escenario que identifica la reducción de azufre en el tiempo, mientras que los valores en estado estacionario representan la obtención constante de producto.

El resultado de la estimación anterior es de 6897 [h], es decir, un tiempo aproximado de 287 [días]. Si se compara con lo reportado por Pacheco en su investigación (76 días) (18), es un mayor tiempo para que las perlas sean consumidas, principalmente asociado al mayor tamaño de estas en el presente reporte. Otra información valiosa que puede ser derivada de este cálculo es estimar un tiempo en el cual se pueda renovar el azufre del sistema y dar una continuidad a la operación, aunque debe ser evaluado en conjunto a la reingeniería del sistema de reacción.

Finalmente, desde el trabajo de modelación presentado se propone un método de resolución general de los balances de biomasa y producción, para así determinar por completo el biorreactor en estudio (Anexo F). Esto sería útil, por ejemplo, si se desea estimar una concentración necesaria de ácido sulfúrico a producir, tal como se presenta en dicho Anexo. Esta propuesta considera 4 variables desconocidas (masa total de azufre, células planctónicas, adheridas y flujo de operación) que pueden ser encontradas resolviendo simultáneamente 4 ecuaciones, tres de las cuales se han presentado en este informe, y una cuarta que podría generarse desde una correlación numérica entre flujo de operación y concentración de células en suspensión, en base a una posible regularidad encontrada en el conteo celular para los estados estacionarios evaluados (ver Gráfico 10). Este sistema no fue resuelto en la presente tesis, quedando propuesto para una investigación de mayor nivel de ingeniería.

6 Conclusiones

Se ha presentado un estudio de un reactor a escala banco para la biooxidación de azufre, siguiendo una línea de escalamiento que comenzó desde matraces, con un cultivo de *Sulfolobus metallicus* a 67°C, sobre perlas de azufre. Posteriormente, fue montado un biorreactor tipo batch en el cual se estudiaron variables que dieran cuenta de un exitoso cambio en la escala del sistema. Luego, el biorreactor fue operado en modo continuo, donde se alcanzaron estados estacionarios en la producción de ácido sulfúrico. Lo anterior permitió generar un modelo matemático, similar a los utilizados en el diseño de fermentadores clásicos, que describiera el comportamiento observado. Finalmente, se evaluó el sistema de aireación que poseía el biorreactor.

El cultivo en matraces permitió generar biomasa, además de entregar el porcentaje de sólidos (3%) y la velocidad de agitación (200 RPM) a usar como parámetros de operación en el biorreactor, y resultó útil para conocer el manejo de las metodologías usadas en el laboratorio.

El montaje y operación del biorreactor batch entregó mediciones que evidenciaron la influencia de *Sulfolobus metallicus* como agente biooxidante de las perlas de azufre, lo cual se indica como un éxito en el escalamiento. Además, la relación del pH y acidez en modo batch permite concluir que la titulación es un método confiable para monitorear la formación de producto, además de confirmar que no existen especies intermediarias ácidas entre los productos de interés.

La conversión estimada por acidez en batch entregó un valor del 15% al tiempo final de medición (456 horas), el que podría mejorarse utilizando perlas de diámetro medio más pequeño, aumentando así la razón entre superficie disponible para adhesión celular y el volumen del biorreactor. Además, se logró obtener una tasa específica de crecimiento de *Sulfolobus metallicus* en batch (0,056 [h⁻¹]), la cual se utilizó sólo para estimar rangos de flujo para operar el biorreactor en modo continuo.

Se observó también que el crecimiento celular y la producción ácida parecen no presentar la misma tendencia en el tiempo, por lo que la producción de ácido sulfúrico no se encontraría ligada directamente al crecimiento, sino sólo a la condición de adhesión celular al azufre.

El biorreactor continuo, estudiado con 4 flujos distintos de operación, presentó tiempos transientes con diferentes respuestas de carácter irregular, debido a las fallas técnicas en la operación del biorreactor. No obstante, se logró estimar un tiempo transiente regular entre las 24 y 40 [horas].

Los estados estacionarios presentaron una relación inversa entre el aumento de flujo, y la concentración de las especies monitoreadas. En este sentido, los flujos de operación utilizados definieron un rango bajo de producción de ácido y de sulfato, entre 0,5 - 1,2 y 1,08 - 1,8 [g/L], respectivamente. También se constató que la variación celular no se relaciona directamente al cambio en los parámetros químicos.

Con respecto a la modelación del sistema en modo continuo, se implementó un modelo basado en el diseño clásico de un fermentador, que resultó simple de entender, de bajo costo informático y que relacionó de manera intuitiva diversos parámetros del sistema. Puede entregar soluciones

numéricas diferentes si se considera o no el crecimiento en el biorreactor de arqueas en suspensión, mientras que suponer una tasa específica de crecimiento constante, para todos los flujos estacionarios, puede forzar la solución del sistema.

Para fines del estudio realizado, no obstante, se estableció como un supuesto aceptable el desestimar las arqueas planctónicas de los balances de biomasa y producción, mientras que considerar una tasa μ constante fue validado para representar la condición de altos flujos que fueron operados, comparándola al caso variable por flujo de operación.

El factor de efectividad resultó la variable clave para la estimación de μ . Para η_T igual a 0,125, se encontraron tasas de crecimiento comparables a trabajos previos utilizando *Sulfolobus metallicus*, lo cual sitúa a dicho valor como el mejor representante del sistema, y habla sobre el gran efecto que tendría la transferencia de masa entre el medio y las arqueas en el proceso de biooxidación.

Los rendimientos de producción obtenidos (Y_p^{XA}) se asemejaron en ambos casos de modelación (μ constante versus μ variable), alcanzando valores en torno a 10^{-10} [g producto/arquea]. No obstante, el segundo caso entregó coeficientes de correlación más altos, por lo que se consideró un mejor método para resolver el balance de producción. Por su parte, no se observaron mayores diferencias entre usar ácido sulfúrico o sulfato en los modelos, por lo que ambos compuestos pueden ser útiles para evaluar el proceso descrito.

El sistema de aireación fue evaluado positivamente, con un coeficiente de transferencia combinado ($k_L a_i$) de 0,0018 [s^{-1}], lo cual permitió que el proceso de biooxidación se desarrolle con disponibilidad constante de O_2 . Además, fue proyectada una cantidad máxima de 126 [g] de azufre que podrían ser cargados inicialmente al biorreactor, bajo las condiciones de operación descritas en el presente informe, lo cual duplica la masa utilizada en el estudio (60 [g]) y permitiría una producción máxima de ácido sulfúrico de 0,0014 [g/min].

Se pronosticó además un tiempo total de consumo de azufre, en las condiciones actuales del sistema, de 6897 [horas] (287 [días]). Esta es una primera estimación que permitiría evaluar un tiempo adecuado para agregar al sistema mayor cantidad de azufre, y mantener al sistema en constante actividad.

Un sistema general para resolver los balances del biorreactor fue propuesto en función de un flujo deseado de producción de ácido sulfúrico. Su resolución dependerá del grado de conocimiento adquirido sobre el proceso.

Por último, mejoras en la ingeniería del biorreactor, tales como utilizar perlas de azufre de tamaño reducido, o rediseñar la aireación y agitación, entre otras, podrían conducir a una operación mejor controlada, y que pueda acoplarse óptimamente a la lixiviación química de fosfatos.

7 Recomendaciones

Se entregan a continuación una serie de recomendaciones con respecto al diseño, montaje y operación del reactor de biooxidación de azufre, con el objetivo de mejorar la producción de ácido sulfúrico compatible con una posterior lixiviación química de fosfatos.

- Utilizar un tamaño menor de perlas de azufre elemental, tal como lo propuso Pacheco (18). En este sentido, es conveniente revisar la metodología de preparación señalada en la sección 3.1.1 y modificarla para lograr una síntesis de perlas del diámetro requerido.
- Realizar un modelo previo sobre la dinámica del biorreactor, es decir, predecir idealmente la respuesta del sistema al cambiar el flujo de operación. Esto entregaría valores estimativos del tiempo que demora el estado transiente, reduciéndose los tiempos de experimentación y de evaluación del sistema.
- Diseñar teóricamente cada componente del sistema de reacción, como la agitación y distribución del aire, utilizando criterios formales de escalamiento. El presente informe entregó una primera concepción de reactor montando elementos disponibles en el laboratorio. Diseñar previamente el sistema mejoraría notablemente las mediciones y estimaciones derivadas del sistema y su modelación. Se aconseja planificar la agitación, paletas, aireador, baffles, etcétera, para obtener un montaje con especificaciones claras de cada componente.
- Revisar las instalaciones de mangueras de conexión al biorreactor. Se recomienda instalar filtros en ellas (entrada, salida, aireación), además de monitorear cualquier tipo de contaminación no deseada en dichos conductos (sólo el volumen del reactor está libre de microorganismos por la alta temperatura a la que opera).
- Instalar un pH-metro especializado dentro del biorreactor, de manera de obtener constantemente mediciones de pH, por ser la medición más directa de seguir.
- Es recomendable continuar el desarrollo de un método más preciso y estandarizado para el seguimiento de la concentración de sulfato en solución. Además, se aconseja evaluar la opción de monitorear la cantidad de azufre remanente en el reactor, para lo cual deben reducirse al mínimo las pérdidas de este elemento en el sistema.
- Se recomienda realizar un conteo de arqueas adheridas tal como lo plantea Konishi *et al* (60) (61), donde se utiliza el reactivo CS₂ para romper las perlas de azufre y liberar las arqueas adheridas a una solución acuosa, para su posterior contabilización. Lo anterior resulta un método alternativo a la tinción con reactivo DAPI usado en publicaciones previas (18) (19), el cual se piensa no resulta ser específico para cada especie celular, por lo que no fue utilizado en el presente trabajo de tesis.
- Finalmente, se recomienda monitorear la aireación considerando, en conjunto, la transferencia de O₂ y CO₂ al sistema de reacción (ambos con baja solubilidad).

8 Bibliografía

1. HERRERA, J. La Protección Medioambiental en Minería y el Desarrollo Minero Sostenible. Madrid, Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas, 2008, 63p.
2. CHANG, R. Química. 7° ed. México, D.F. McGraw-Hill, 2002. 1004p.
3. CHILDS, P. University of Limerick. The discovery and production of phosphorus [En línea] <http://www3.ul.ie/~childsp/CinA/Issue60/TOC55_Urine.htm> [consulta: 12 enero 2014].
4. SUSTAINABLE Use of Phosphorus por J.J. Schröder, D. Cordell, A.L. Smit y A. Rosemarin. Plant Research International Wageningenur [En línea] <http://ec.europa.eu/environment/natres/pdf/sustainable_use_phosphorus.pdf> [consulta: 12 enero 2014].
5. CASTRO, L., MELGAR, R. Universidad de San Martín. Rocas Fosfáticas [En línea] <http://www.unsam.edu.ar/institutos/centro_ceps/investigaciones/fertilizantes/capitulo3.pdf> [consulta: 12 enero 2014].
6. VALE. Business. Mining. Fertilizers. [En línea] <<http://www.vale.com/EN/business/mining/fertilizers/Pages/Fertilizers.aspx>> [consulta: 12 enero 2014].
7. GODOY León, María Fernanda. Integración y Optimización del Proceso Químico y Bacteriológico para la Recuperación de Fósforo a partir de Residuos Minerales. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 2013. 157p.
8. ETACUDE SCIENCE PARK. Sulfur: History and Production. [En línea] <<http://www.elements.etacude.com/S.php>> [consulta: 12 enero 2014].
9. ANTIÑOLO, A. Universidad de Castilla - La Mancha, Profesorado, Química Inorgánica. Tema 7: Oxígeno y Azufre. [En línea] <http://www.uclm.es/profesorado/afantinolo/docencia/inorganica/Tema7/Trans_T7IQ.pdf> [consulta: 12 enero 2014].
10. PASCUAL, J. A. Apuntes de Química. Tema 11.6: el Azufre y sus propiedades. [En línea] <<http://www.100ciaquimica.net/temas/tema11/punto6.htm>> [consulta: 12 enero 2014].
11. NEW ZEALAND INSTITUTE OF CHEMISTRY. The Manufacture of Sulfuric Acid and Superphosphate. [En línea] <<http://nzic.org.nz/ChemProcesses/production/1B.pdf>> [consulta: 12 enero 2014].
12. MATERIALS and methods for the biological production of sulfuric acid por T. Young "et al". US Pat. Appl. US 2004/0086450A1. 06 mayo 2004.

13. McCABE, W., SMITH, J., HARRIOTT, P. Operaciones Unitarias en Ingeniería Química. Madrid, McGraw-Hill, 1991. 1121p.
14. ACEVEDO, F. The use of reactors in biomining processes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3: 184 - 194, 2000.
15. EFFECT of ore solid concentration on the bioleaching of phosphorus from high-phosphorus iron ores using indigenous sulfur-oxidizing bacteria from municipal wastewater por Jincao Wang "et al". *Process Biochemistry*, 45: 1624 - 1631, 2010.
16. BALLESTER, Antonio. Mecanismo de la biolixiviación. En: ACEVEDO, F., GENTINA, J.C. (Eds.). *Perspectivas de las Tecnologías Biomineras*. Chile, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Ediciones Universitarias de Valparaíso, 2005. pp. 7 - 22.
17. BHATTI, T. YAWAR, W. Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud. *Hydrometallurgy*, 103: 54 - 59, 2010.
18. PACHECO Arias, Rachel Elizabeth. Estudio de Oxidación de Azufre Elemental con *Sulfobolus metallicus* a 67°C. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 2013. 67p.
19. LIRA Ampuero, Rhida Elena. Estudio de la Biooxidación de Azufre Elemental por *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 45°C. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 2013. 101p.
20. OLSON, G., BRIERLEY, J. A. BRIERLEY, C. L. Bioleaching review part B. Progress in Bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63: 249 - 257, 2003.
21. RAWLINGS, D.E., JOHNSON, B.D. *Biomining*. Berlín, Springer-Verlag, 2007. 324p.
22. ACEVEDO, F., GENTINA, J.C. *Fundamentos y Perspectivas de las Tecnologías Biomineras*. Chile, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Ediciones Universitarias de Valparaíso, 2005.
23. HYDROMETALLURGY: A sustainable technology in evolution por Marios Tsezos "et al". Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium (Part I), IBS 2003. National Technical University of Athens. 766p.
24. LA BIOLIXIVIACIÓN al comienzo del siglo XXI por Y. Rodriguez "et al". *Revista de Metalurgia*, 37: 616 - 627, 2001.
25. ESPEJO R., ROMERO P. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on elemental sulfur. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1907 - 1912, 1987.

26. ANALYSIS of the elemental sulfur bio-oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* with sulfur K-edge XANES por Huan He "et al". World J. Microbiol. Biotechnol., 27: 1927 - 1931, 2011.
27. ASSESSMENT of recoverable forms of sulfur particles used in bioleaching of contaminated sediments por Shen-Yi Chen "et al". Water Research, 37: 450 - 458, 2003.
28. CRUNDWELL, F. How do bacteria interact with minerals? Hydrometallurgy, 71: 75 - 81, 2003.
29. BOSECKER, Klaus. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. FEMS Microbiology Reviews, 20: 591 - 604, 1997.
30. SAND, W., GEHRKE, T., JOZSA, P., SCHIPPERS, A. (Bio) chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching. Hydrometallurgy, 59: 159 - 175, 2001.
31. LLORENTE, Emilio. Minería Química. Madrid, Instituto Tecnológico Geominero, 1991. 652p.
32. JAQUE Liberona, Indira Adriana. Estudio de la Biolixiviación de Pirita por un Cultivo de *Sulfobacillus acidophilus* a 45 °C. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 2012. 92p.
33. HUBER, G., STETTER, K. *Sulfolobus metallicus*, sp. nov., a Novel Strictly Chemolithoautotrophic Thermophilic Archaeal Species of Metal-Mobilizers. Systematic and Applied Microbiology, 14: 372 - 378, 1991.
34. NEMATI, M., LOWENADLER, J., HARRISON, S. T. L. Particle size effects in bioleaching of pyrite by acidophilic thermophile *Sulfolobus metallicus* (BC). Appl. Microbiol. Biotechnol., 53: 173 - 179, 2000.
35. BAILEY, J., OLLIS, D. Biochemical Engineering Fundamentals. Nueva York, McGraw-Hill, 1986. 984p.
36. GRANADOS, R., VILLAVERDE, M. C. Microbiología: Tomo I. Madrid, International Ediciones Paraninfo, 1997. 352p.
37. COCHILCO. Dirección de Estudios y Políticas Públicas. Biolixiviación: desarrollo actual y sus expectativas [En línea]
<http://www.cochilco.cl/descargas/estudios/tematico/innovacion/estudio_biolixiviacion.pdf>
[consulta: 12 enero 2014].
38. NORRIS, P. Acidophile Diversity in Mineral Sulfide Oxidation. En: RAWLINGS, D. E., JOHNSON, D. B. (Eds.). Biomining. Berlín, Springer - Verlag, 2006. pp. 199 - 216.
39. COLMER, A. R., HINKLER, M. A. The role of microorganisms in acid mine drainage: A preliminary report. Science, 106: 253-256, 1947.

40. BRIERLEY, C.F. How will biomining be applied in future? Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 18: 1302 - 1310, 2008.
41. ACEVEDO, F. GENTINA, J.C. Bioreactor design fundamentals and their application to gold mining. En: DONATI, E. R., SAND, W. (Eds.). Microbial Processing of Metal Sulfides. Holanda, Springer – Verlag, 2007. pp. 151 - 168.
42. DEVELOPMENT of a mathematical model for continuous tank bioleaching por L. Bircumshaw "et al". The Journal of The South African Institute of Mining and Metallurgy, 106: 277-282, 2006.
43. ROSSI, G. The design of bioreactors. Hydrometallurgy, 59: 217 – 231, 2001.
44. DORAN, P. Bioprocess Engineering Principles. Londres, London Academic Press, 1995. Versión en español por Editorial Acribia S.A., Zaragoza, 1998. 468p.
45. DISSOLUTION of Sulphur Particles by *Thiobacillus ferrooxidans*: Substrate for Unattached Cells por S. Shrihari "et al". Biotechnol. Bioeng. 41: 612 - 616, 1993.
46. GAUTIER Hill, Verónica Lucía. Estudio de las Interacciones Microorganismo-Mineral en la Biolixiviación de la Calcopirita con *Sulfolobus Metallicus*. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Ingeniería mención Química. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 2009. 146p.
47. UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA. Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química. Ingeniería Bioquímica I y II: Mantenimiento Celular. [En línea] <<http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/ingenieriabioquimicaIyII/mantenimientocelular.doc>> [consulta: 12 enero 2014].
48. HADDADIN, J., DAGOT, C., FICK, M. Models of bacterial leaching. Enzyme and Microbial Technology, 17: 290 - 305, 1995.
49. BLANCARTE-ZURITA, M. A., BRANION, R. M. R. Particle size effects in the microbiological leaching of sulfide concentrates by *T. ferrooxidans*. Biotechnol. Bioeng., 28: 751 - 755, 1985.
50. KONISHI, S. A. Y., KATOH, H. Bacterial dissolution of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. Bioproc. Eng., 5: 231 - 237, 1990.
51. HANSON, J. S. Kinetic model of the bacterial leaching of chalcopyrite concentrates. En: SCHEINER, B., DOYLE, F., KAWATRA, S. (eds.). Biotechnology in Minerals and Metal Processing. Littleton, Colorado, Society of Mining Engineers, 1989. pp. 25 - 31.
52. MYERSON, A. S., KLINE, P. C. Continuous bacterial coal desulfurization employing *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnol. Bioeng., 26: 92 - 99, 1984.
53. WICHLACZ, P. L., UNZ, R. F. Growth kinetics of attached iron-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 50: 460 - 467, 1985.

54. CRUNDWELL, F. K. Progress in the mathematical modelling of leaching reactors. *Hydrometallurgy*, 39: 321-335, 1995.
55. KONISHI, Y., KOGASAKI, K., ASAI, S. Bioleaching of pyrite by *Acidianus brierleyi* in a continuous-flow stirred-tank reactor. *Chemical Engineering Science*, 52(24): 4525 - 4532, 1997.
56. COPPER recovery from chalcopyrite concentrate by acidophilic thermophile *Acidianus brierleyi* in batch and continuous-flow stirred tank reactors por Yasuhiro Konishi "et al". *Hydrometallurgy*, 59: 271 - 282, 2001.
57. A REVIEW of the structure, and fundamental mechanisms and kinetics of the leaching of chalcopyrite por Y. Li "et al". *Advances in Colloid and Interface Science*, 197-198: 1 - 32, 2013.
58. BREED, A. W., HANSFORD, D. S. Modeling Continuous Bioleach Reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 64(6): 671 - 677, 1999.
59. CRUNDWELL, F. K. Modeling, Simulation, and Optimization of Bacterial Leaching Reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 71(4): 255 - 265, 2000.
60. KONISHI, Y., TAKASAKA, Y., ASAI, S. Kinetics of Growth and Elemental Sulfur Oxidation in Batch Culture of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 667 - 673, 1994.
61. KONISHI, Y., ASAI, S., YOSHIDA, N. Growth Kinetics of *Thiobacillus thiooxidans* on the Surface of Elemental Sulfur. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10): 3617 - 3622, 1995.
62. GOURDON, R., FUNTOWICZ, N. Kinetic model of elemental sulfur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans* in batch slurry reactors. *Bioprocess Engineering* 18: 241-249, 1998.
63. ESCOBAR Antoine, Claudio Manuel. Estudio de la Reducción de Azufre Elemental y Producción de Sulfuro de Hidrógeno en Biorreactores Anaeróbicos. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Ingeniería mención Química. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 2009. 141p.
64. OXYGEN and Carbon Dioxide Mass Transfer and the Aerobic, Autotrophic Cultivation of Moderate and Extreme Thermophiles: A Case Study Related to the Microbial Desulfurization of Coal por F.C. Boogerd "et al". *Biotechnol. Bioeng.* 35: 1111 - 1119, 1990.

9 Anexos

A. Estimación del valor de células adheridas en el sistema

i) Caso actual de estudio

Estimar la adhesión celular requiere conocer la superficie disponible de azufre y la cantidad de células que se adhieren por unidad de área. Como en el biorreactor se tienen 60 [g] de azufre elemental en perlas esféricas de diámetro medio establecido (2,79 [mm]), la superficie total de azufre se puede estimar como sigue:

$$S_{perla} = 4 \cdot \pi \cdot \left(\frac{D}{2}\right)^2 = 24,6 [mm^2] \quad \text{Ecuación 51}$$

$$V_{perla} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{D}{2}\right)^3 = 11,4 [mm^3] \quad \text{Ecuación 52}$$

$$M_{perla} = V_{perla} \cdot \rho_{azufre} = 0,024 [g] \quad \text{Ecuación 53}$$

$$Total_{perlas} = \frac{60}{M_{perla}} = 2524 [perlas] \quad \text{Ecuación 54}$$

$$S_{total} = Total_{perlas} \cdot S_{perla} = 6,21 \cdot 10^{10} [\mu m^2] \quad \text{Ecuación 55}$$

Se utiliza en lo anterior

D : Diámetro medio de perla (mm).

S_{perla} : Superficie de una perla (mm^2).

V_{perla} : Volumen de una perla (mm^3).

ρ_{azufre} : Densidad del azufre ($2,1 \cdot 10^{-3} [g/mm^3]$)

M_{perla} : Masa estimada de una perla (g).

$Total_{perlas}$: Número total de perlas estimadas en el sistema.

S_{total} : Superficie total de azufre (μm^2).

Conocido lo anterior, resta estimar el valor de adherencia por unidad de superficie. Para ello, se propone utilizar un valor de “arqueas/ μm^2 ” de publicaciones previas. En particular, del trabajo de Pacheco (18) se puede obtener un valor de 4 [arqueas/ μm^2], cantidad que es resultado de considerar la adherencia máxima alcanzada en sus experimentos en matraces ($4,9 \cdot 10^{10}$ [arqueas]). Este valor indicaría una superficie de azufre (igual a $1,2 \cdot 10^{10} [\mu m^2]$) completamente poblada por microorganismos, similar a una adherencia tipo Langmuir (60).

Por último, multiplicando el valor de adherencia por la superficie total disponible, y dividiendo por el volumen de reacción (2 L) se obtiene una concentración de células adheridas igual a $1,27 \cdot 10^{11} [\text{arqueas}/L]$.

ii) Generalización: células adheridas como función de la masa de azufre

Gracias al trabajo del punto anterior, se pueden generalizar las estimaciones realizadas previamente, considerando ahora una masa total de azufre cualquiera (M_t), tal que cada perla sea del mismo diámetro que el estudiado en el punto previo⁶:

$$Total_{perlas} = \frac{M_t}{M_{perla}} = \frac{M_t}{0,024} \quad \text{Ecuación 56}$$

$$S_{total} = Total_{perlas} \cdot S_{perla} = \frac{M_t}{0,024} \cdot 24,6 \cdot 10^6 [\mu m^2]$$

$$S_{total}(M_t) = 1,03 \cdot 10^9 \cdot M_t [\mu m^2] \quad \text{Ecuación 57}$$

Lo anterior sirve para estimar una nueva función entre las arqueas adheridas del sistema y la masa inicial de azufre que se utiliza:

$$x_A(M_t) = \frac{adherencia_{inicial} \cdot S_{total}(M_t)}{V}$$

$$x_A(M_t) = \frac{4 \left[\frac{\text{arqueas}}{\mu m^2} \right] \cdot 1,03 \cdot 10^9 \cdot M_t [\mu m^2]}{2[L]}$$

$$x_A(M_t) = 2,06 \cdot 10^9 \cdot M_t \left[\frac{\text{arqueas}}{L} \right] \quad \text{Ecuación 58}$$

⁶ También pueden manipularse las relaciones numéricas presentadas para generar una expresión de x_A en función del diámetro de perla, si esa información fuese requerida.

B. Modelación: tasas específicas de crecimiento variable

A continuación se muestran los diferentes resultados numéricos para las tasas de crecimiento de *Sulfolobus metallicus* obtenidas a partir del balance de biomasa y con la tasa μ variando en cada flujo estacionario.

En primer lugar se presenta la Tabla 17, donde se indican los resultados de las diferentes velocidades específicas de crecimiento según flujo de operación y factor de efectividad, para el caso de crecimiento de arqueas planctónicas en el sistema.

Tabla 17: Valores de la tasa específica μ en el caso variable de modelación, considerando el crecimiento de arqueas planctónicas, para cada flujo de operación y factor de efectividad descritos en la investigación.

		Factor η_T			
		1	0,5	0,25	0,125
Flujo [mL/min]	0,9	0,0018	0,0033	0,006	0,010
	1,8	0,0026	0,0049	0,009	0,016
	2,7	0,0027	0,0053	0,010	0,018
	3,6	0,0024	0,0047	0,009	0,017

Además, en la Tabla 18 se observa el detalle de las tasas específicas de crecimiento μ , para cada flujo y factor de efectividad en el sistema, de acuerdo a la modelación sin considerar el crecimiento de arqueas planctónicas.

Tabla 18: Valores de la tasa específica μ en el caso variable de modelación, sin considerar el crecimiento de arqueas planctónicas, para cada flujo de operación y factor de efectividad descritos en la investigación.

		Factor η_T			
		1	0,5	0,25	0,125
Flujo [mL/min]	0,9	0,0019	0,0037	0,007	0,015
	1,8	0,0027	0,0054	0,011	0,022
	2,7	0,0028	0,0056	0,011	0,022
	3,6	0,0025	0,0049	0,010	0,020

Se observa de lo anterior que los mayores valores de la tasa μ fueron obtenidos con el valor de η_T más bajo (0,125), vale decir considerando una gran resistencia a la transferencia de masa. En la Tabla 19 se presenta la diferencia porcentual de μ para cada combinación de η_T y flujo:

Tabla 19: Diferencia (en porcentaje) de la tasa específica μ para el caso variable de modelación, entre los casos de simplificar o no el crecimiento de arqueas planctónicas, para cada flujo de operación y factor de efectividad.

		Factor			
		1	0,5	0,25	0,125
η_T					
Flujo [mL/min]					
0,9		6,49	12,18	21,72	35,69
1,8		4,80	9,17	16,79	28,76
2,7		3,35	6,49	12,18	21,72
3,6		2,24	4,37	8,38	15,46

C. Evaluación de la aireación en el sistema

i) Medida experimental del oxígeno disuelto: Método Dinámico

De acuerdo a lo expuesto en la sección Antecedentes con respecto al Método Dinámico de evaluación del coeficiente de transferencia de oxígeno en un biorreactor, se procedieron a realizar dos mediciones que permitiesen encontrar el parámetro buscado, en base a la medición de oxígeno disuelto, mediante un electrodo especializado.

El manejo de la información recopilada de las mediciones se presenta en Tabla 20 y Tabla 21, donde cada columna representa una expresión de utilidad para la evaluación de la fórmula que se pretende utilizar (Ecuación 32). En la notación empleada se tienen valores de concentración inicial de oxígeno (C_i), el cambio de esta en el tiempo (C), la concentración estacionaria final (C_{est}) y los tiempos de medición (T_i y T).

Luego de esto, se procede a graficar los resultados en Gráfico 24 y Gráfico 25, en los cuales se proyectan regresiones lineales que permiten obtener los valores del coeficiente $k_L a_i$ buscados.

Tabla 20: Primera medición de la concentración de oxígeno solubilizado en el tiempo. Se muestran además los valores generados a partir del monitoreo, y que son útiles para aplicar la Ecuación 32.

Tiempo (s)	Concentración O_2 (mg/L)	$(C_{est}-C_i)/$ $(C_{est}-C)$	$\ln((C_{est}-C_i)/$ $(C_{est}-C))$	$T_2 - T_i$ (s)
0	0,7	1,0000	0,00000	0
10	0,8	1,0455	0,04445	10
20	0,8	1,0455	0,04445	20
30	0,9	1,0952	0,09097	30
40	0,9	1,0952	0,09097	40
50	1	1,1500	0,13976	50
60	1,1	1,2105	0,19106	60
120	1,3	1,3529	0,30228	120
180	1,5	1,5333	0,42744	180
240	1,6	1,6429	0,49644	240
360	1,8	1,9167	0,65059	360
480	2	2,3000	0,83291	480
600	2,2	2,8750	1,05605	600
900	2,4	3,8333	1,34373	900
1200	2,7	7,6667	2,03688	1200
1920	2,9	23,0000	3,13549	1920
2400	3	-	-	-

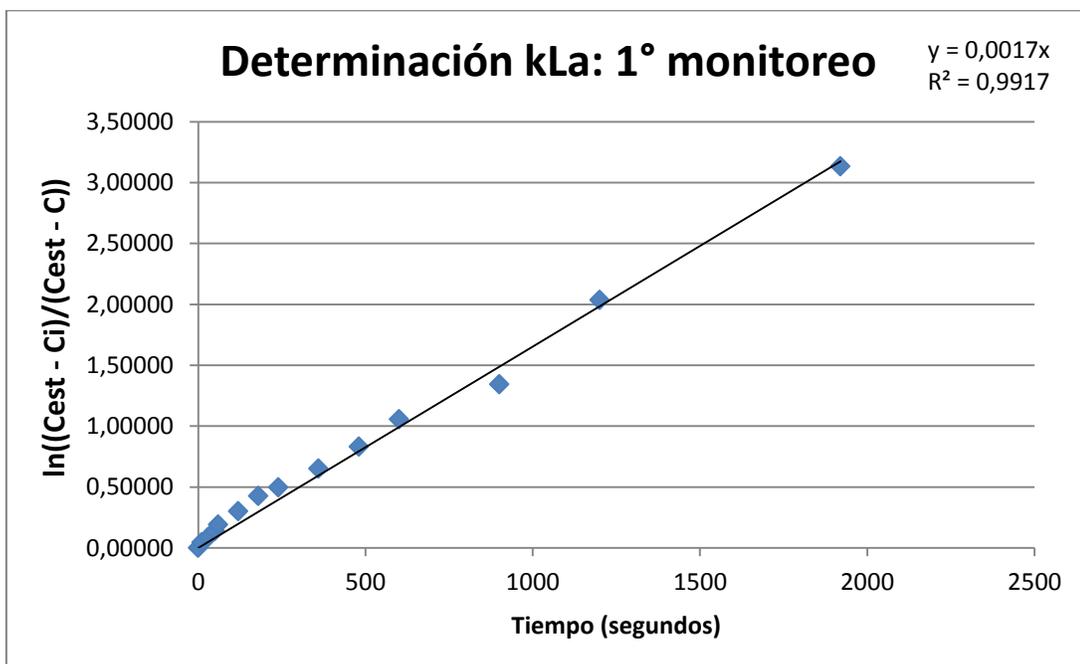


Gráfico 24: Primera curva del Método Directo, utilizada para encontrar el coeficiente de transferencia de oxígeno en el biorreactor.

Tabla 21: Segunda medición de la concentración de oxígeno solubilizado en el tiempo. Se muestran además los valores generados a partir del monitoreo, y que son útiles para aplicar la Ecuación 32.

Tiempo (s)	Concentración O ₂ (mg/L)	$(C_{est} - C_i)/(C_{est} - C)$	$\ln((C_{est} - C_i)/(C_{est} - C))$	T ₂ - T _i (s)
0	0,4	1,0000	0,00000	0
10	0,5	1,0370	0,03637	10
20	0,5	1,0370	0,03637	20
30	0,5	1,0370	0,03637	30
40	0,6	1,0769	0,07411	40
50	0,6	1,0769	0,07411	50
60	0,7	1,1200	0,11333	60
120	0,9	1,2174	0,19671	120
180	1,1	1,3333	0,28768	180
240	1,4	1,5556	0,44183	240
360	1,9	2,1538	0,76726	360
480	2,2	2,8000	1,02962	480
600	2,4	3,5000	1,25276	600
900	2,8	7,0000	1,94591	900
1200	3	14,0000	2,63906	1200
1920	3,1	28,0000	3,33220	1920
2400	3,2	-	-	-

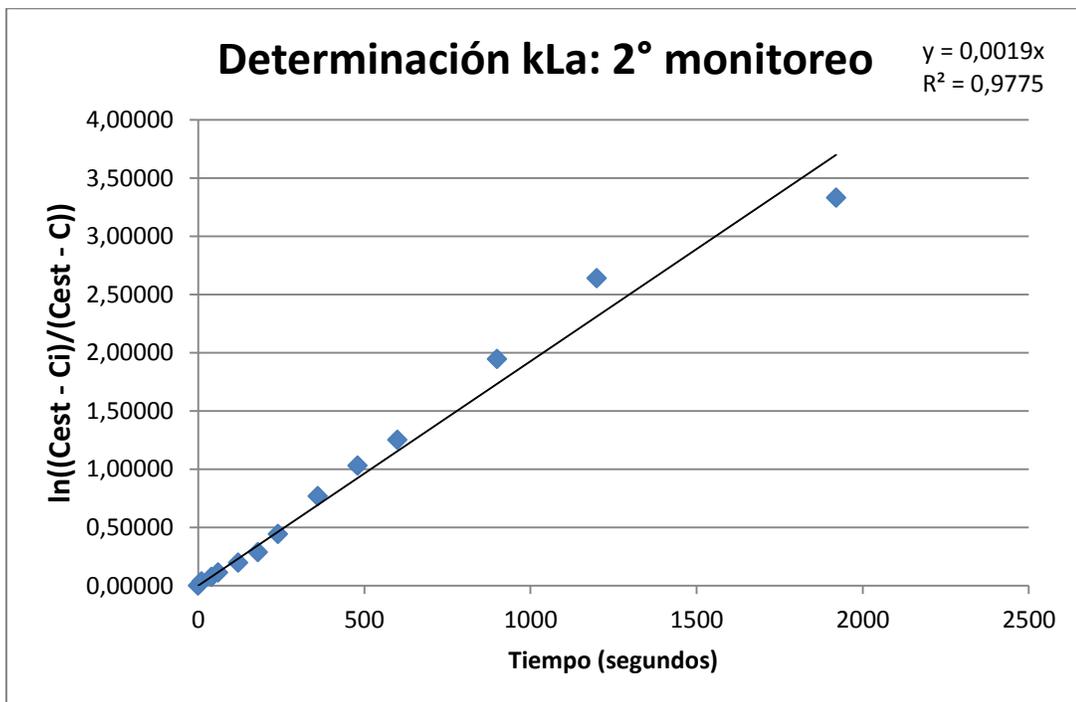


Gráfico 25: Segunda curva del Método Directo, utilizada para encontrar el coeficiente de transferencia de oxígeno en el biorreactor.

Cada regresión presentada entregó altos valores de correlación, lo cual implica una fuerte relación entre las variables medidas. Observando directamente las pendientes, se puede extraer un coeficiente de transferencia combinado ($k_L a_i$) promedio de $0,0018 \text{ [s}^{-1}\text{]}$.

Además, desde Tabla 20 y Tabla 21 puede obtenerse la concentración de saturación de O_2 en el líquido ácido del biorreactor en estudio a 67°C . Basta notar las concentraciones registradas a los 2400 [s] de medición (fin del monitoreo), donde se registró un valor límite de $3,2 \text{ [mg } O_2\text{/L]}$.

ii) Concentración de oxígeno en el seno del fluido

A partir de la Ecuación 28 puede estimarse la concentración de oxígeno remanente en el seno del fluido de reacción, para cada estado estacionario evaluado. El sentido físico de dicha concentración (C_L) guarda relación con la disponibilidad de oxígeno en el líquido una vez que el sistema alcanza el estado estacionario de producción. Un gradiente máximo de O_2 puede ser definido bajo la condición límite $C_L = 0$, por lo que concentraciones mayores de C_L significarían que el sistema opera bajo esta cota, la cual puede aumentarse para obtener el rendimiento óptimo del sistema.

Reordenando la Ecuación 28 se obtiene:

$$C_L = C^* - \frac{N_A}{k_L a_i \cdot V} \quad \text{Ecuación 59}$$

A partir de la Ecuación 59, se obtienen las diferentes concentraciones de O₂ en el seno del fluido, dependiendo del flujo y el tipo de producto de la cual se derivó el consumo de oxígeno. Esto se presenta en la Tabla 22:

Tabla 22: Flujo de oxígeno utilizado y concentración remanente en el seno del fluido para cada valor de estado estacionario y tipo de producto estudiado.

Flujos [mL/min]	O₂ utilizado (ácido) (g O₂/min)	Concentración en el seno C_L (g/L)
0,9	$4 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$
1,8	$7,2 \cdot 10^{-4}$	$-2 \cdot 10^{-4}$
2,7	$5,2 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$
3,6	$5,2 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$
Flujos [mL/min]	O₂ utilizado (sulfato) (g O₂/min)	Concentración en el seno C_L (g/L)
0,9	$4,3 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$
1,8	$7,1 \cdot 10^{-4}$	$-1 \cdot 10^{-4}$
2,7	$3,8 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-3}$
3,6	$3,9 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-3}$

Además, para los rendimientos de producción derivados del modelo también se estimó la concentración C_L, lo cual se registra en la Tabla 23:

Tabla 23: Flujo de oxígeno utilizado y concentración remanente en el seno del fluido para cada consumo obtenido desde el balance de producto, por cada supuesto y tipo de producto.

		O₂ utilizado [g O₂/min]	Concentración en el seno C_L (g/L)
Modelo con μ constante	Ácido sulfúrico	$3,4 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$
	Sulfato	$4,1 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$
Modelo con μ variable	Ácido sulfúrico	$5,7 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-4}$
	Sulfato	$5,8 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$

Puede observarse de las tablas previas que los resultados para la concentración C_L se encuentran en un rango válido de medición (entre 0 y 3,2 [mg/L]) con excepción del flujo 1,8 [mL/min]. No obstante, esa diferencia es de una magnitud baja comparada con el resto de mediciones, y se justifica como dentro del posible error en la toma de mediciones, tanto de producción como de flujo en el sistema de reacción.

D. Relación superficie de perlas/volumen reactor

Para comparar los resultados de Pacheco (18) a los del biorreactor batch, el cual presenta un sistema de mayor volumen, se analizó la razón superficie de perlas/volumen de reactor entre ambos trabajos con el fin de entregar un criterio de semejanza.

Para este fin se calcularon las medidas presentadas en la Tabla 24, utilizando como datos iniciales la densidad de azufre (0,00207 [g/mm³]), el diámetro medio de perlas y la masa inicial en ambos sistemas.

Tabla 24: Estimación de la relación superficie disponible de perlas/volumen de reacción para el caso de Pacheco (18) y del presente estudio. Cada fila de la tabla entrega un valor que es usado para finalmente encontrar la razón deseada.

Medida	Pacheco (18)	Presente trabajo
Diámetro medio (mm)⁷	0,6	2,79
Superficie perla (mm²)	1,12	24,6
Volumen perla (mm³)	0,11	11,48
Masa de 1 perla (g)	0,00023	0,02
Masa disponible (g)	1,5	60
Total perlas teóricas	6543	2524
Superficie total disponible (mm²)	7297	62130
Volumen operación (mL)	50	2000
Relación superficie/volumen reacción (mm²/mL)	145,94	31,07

⁷ Según el planteamiento teórico de mallas Tyler, el diámetro promedio se mide según una estimación de media tipo geométrica.

E. Rendimiento estimado de sustrato por acción celular

Para obtener un rendimiento estimado de sustrato, basta utilizar la estequiometría de la reacción (presentada en Reacción 8), y que entrega la siguiente ecuación:

$$Y_{S^0} = \frac{M_{S^0}}{M_{producto}} \cdot Y_P \quad \text{Ecuación 60}$$

En ella

Y_{S^0} : Rendimiento de sustrato consumido por arquea (g S^0 /arquea).

Y_P : Rendimiento de producto por arquea (g H_2SO_4 /arquea).

M_i : Masas molares de sustrato y producto (g/mol).

Importante es notar que, en lo anterior, se debe utilizar el rendimiento de producto por biomasa total encontrado en batch (se prefiere el de ácido sulfúrico presentado en la Tabla 15). La razón para esto radica en que este valor fue determinado en una progresión del consumo de azufre, mientras que en estado estacionario se obtuvieron rendimientos bajo un modelo de consumo estacionario y no es compatible con la conversión de azufre sostenida en el tiempo. Así, reemplazando valores se obtiene⁸:

$$Y_{S^0} = \frac{32}{98} \cdot \frac{1}{2,1 \cdot 10^{11}} = 1,55 \cdot 10^{-12} \left[\frac{g S^0}{arquea} \right]$$

Por ende, si se desea conocer una tasa de consumo de azufre, esta se puede definir en base a la tasa de crecimiento celular y al número de arqueas adheridas. En otras palabras:

$$F_{S^0} = \mu \cdot x_A \cdot V \cdot Y_{S^0} = 0,0087 \left[\frac{g S^0}{h} \right] \quad \text{Ecuación 61}^9$$

donde

F_{S^0} : Tasa de consumo de azufre en el tiempo (g S^0 /h).

Finalmente, dado que en el sistema se utilizan 60 [g] de azufre en perlas, el tiempo pronosticado para que se consuma completamente es medido entonces como:

$$t(\text{conversion } 100\%) = \frac{\text{masa inicial } S^0}{F_{S^0}} \quad \text{Ecuación 62}$$

⁸ El rendimiento por producto en batch puede ser encontrado en la Tabla 15 presentada en la sección Discusión.

⁹ Nótese que en la expresión no se considera al factor de efectividad (η_T) para la estimación, debido a que el contacto directo entre microorganismo y azufre se asume sin efectos de transferencia (se busca obtener un consumo máximo).

$$t(\text{conversion } 100\%) = \frac{60}{0,0087} = 6897 \text{ [h]}$$

F. Solución general para una producción deseada

En el siguiente ejemplo de cálculo se propone una resolución teórica de las ecuaciones que describen al biorreactor, para determinar un flujo requerido de ácido sulfúrico a utilizar en procesos río abajo, como la lixiviación química de fosfatos. Se asume una producción a satisfacer de “A” [g ácido/h].

Bajo este supuesto, Ecuación 10 y Ecuación 16 son las encargadas de ilustrar la operatividad del sistema de reacción. Antes que nada, se debe recordar que la cantidad de arqueas adheridas al azufre es directamente proporcional a la masa de azufre en el sistema, derivada de la geometría de la perla y de la cantidad de arqueas por superficie (ver Anexo A):

$$x_A = x_A(M_T) \quad \text{Ecuación 63}$$

Por su parte, la Ecuación 10 se puede reescribir como:

$$F = \mu V \left(1 + \eta_T \cdot \frac{x_A}{x_S} \right) \quad \text{Ecuación 64}$$

En la expresión anterior se presentan como incógnitas F , x_A y x_S . En particular, gracias a la observación realizada en la presente tesis, podría existir una correlación lineal entre las arqueas suspendidas y el flujo estacionario (ver Gráfico 10), es decir:

$$x_S = x_S(F) \quad \text{Ecuación 65}$$

Además, la Ecuación 16 puede reescribirse tal como se presenta a continuación:

$$F \cdot p_0 - F \cdot p + \mu \cdot (Y_P^{XS} x_S + Y_P^{XA} \eta_T x_A) \cdot V = 0$$

$$F \cdot p = A = F \cdot p_0 + \mu \cdot (Y_P^{XS} x_S + Y_P^{XA} \eta_T x_A) \cdot V = 0 \quad \text{Ecuación 66}$$

Finalmente, se obtiene un sistema de 4 ecuaciones (Ecuación 63, Ecuación 64, Ecuación 65 y Ecuación 66) y 4 incógnitas (M_T , x_A , x_S y F), desde el cual puede encontrarse una solución numérica sobre la cantidad de azufre a utilizar en el biorreactor, el flujo de operación y la concentración de células adheridas y planctónicas necesarias para alcanzar la producción deseada.