



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

***“ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DE IONES PRESENTES EN MINERALES  
FOSFATADOS, SOBRE LA ACTIVIDAD OXIDATIVA DE AZUFRE DE  
SULFOBACILLUS THERMOSULFIDOOXIDANS”***

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA E INGENIERA  
CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

SANDY EUGENIA CONTRERAS LLANO

PROFESORA GUÍA:

BLANCA ESCOBAR MIGUEL

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

TOMÁS VARGAS VALERO

FRANCISCO GRACIA CAROCA

SANTIAGO DE CHILE

2014

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE: INGENIERA CIVIL QUÍMICA E  
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA  
POR: SANDY CONTRERAS LLANO  
FECHA: 22/07/2014

**“ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DE IONES PRESENTES EN MINERALES FOSFATADOS,  
SOBRE LA ACTIVIDAD OXIDATIVA DE AZUFRE DE *SULFOBACILLUS  
THERMOSULFIDOOXIDANS*”**

Este trabajo se enmarca en el contexto de la creciente industria de los fertilizantes fosfatados y su principal materia prima el ácido fosfórico, este ácido se obtiene en su mayor parte del ataque vía húmeda de la roca fosfórica con ácido sulfúrico. El presente trabajo contribuye al estudio de viabilidad y factibilidad de biolixiviación de fosfatos requerido por la empresa minera VALE S.A. El objetivo principal es estudiar la toxicidad que puedan presentar algunos de los distintos iones presentes en la solución obtenida de la lixiviación química de una muestra de mineral fosfatado, sobre la cepa *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.

Se realizó un primer estudio de la toxicidad de los iones presentes en la solución obtenida de la lixiviación química, ajustada a 3 diferentes pH que se encuentran dentro del rango de operación del pH en pilas de lixiviación: 1,4; 1,8 y 2,03 . A estos cultivos se les monitoreó el pH, concentración de ion sulfato, concentración de ácido sulfúrico y se hizo recuento de células con el marcador fluorescente DAPI. De este estudio se concluyó que el crecimiento y actividad bacteriana fueron completamente inhibidos. Además se identificaron como posibles inhibidores el ion sulfato y el ion fosfato, iones que se encuentran en altas concentraciones.

Un segundo estudio de biooxidación de azufre se realizó en presencia de concentraciones de ion sulfato crecientes, como sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) con pH inicial 2,3. El objetivo fue determinar las concentraciones críticas de este ion a las que la actividad bacteriana se reduce al 50% y a la que es completamente inhibida. De este estudio se concluye que con una concentración de 70 mM de sulfato de potasio, la conversión de azufre elemental a ácido sulfúrico por parte de las bacterias se ve reducido al 50% de la conversión en un medio basal en ausencia de la sal. Y a los 200 mM de sulfato de potasio, la conversión se ve inhibida completamente.

Finalmente, se realizó un estudio preliminar de la actividad bacteriana en presencia de una concentración de 12  $[g/L]$  de ion fosfato y pH 2,3. Al cual se le monitorea solo la evolución del pH. Este estudio permite inferir que esta concentración resultaría tóxica para las bacterias, resultado que necesita ser confirmado mediante un estudio más exhaustivo.

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, por la educación y crianza que me dieron. Gracias por todo lo enseñado y por el amor y cariño brindado durante todos estos años.

Gracias a todos esos grandes amigos que hice a lo largo de todos estos años de universidad, todos han sido parte fundamental de mi vida universitaria y de lo que soy hoy en día. Agradezco a mis amigos de plan común, por el apoyo y la paciencia para explicarme y ayudarme con los ramos que me costaron. Por convertir la frustración de esos primeros años en anécdotas que no olvidaré jamás. También quiero agradecer a mis compañeros del departamento de química y biotecnología por hacer del departamento un ambiente tan familiar y acogedor. En especial a mis amigas Natalia Vicencio y Pilar Fernández. A mis compañeros del laboratorio por hacer más ameno el trabajo día a día.

Quiero agradecer también a la señora Emma por siempre tener una palabra de apoyo en los momentos de crisis, por poner las cuotas de calma y orden necesarias para la sana convivencia en el laboratorio. También quiero agradecer a mis profesores por la confianza y los desafíos que pusieron en mi camino.

Por último, quiero agradecerle a Gonzalo, por ser mi compañero en los buenos y malos momentos, por ser mi gran apoyo en cada aspecto de mi vida y en especial en esta etapa. Gracias por escucharme y soportarme en los momentos de nerviosismo e impotencia, por tus palabras de aliento y ánimo en los momentos difíciles. Gracias por recordarme de lo que soy capaz.

Finalmente, quiero agradecer a la empresa VALE S.A. por financiar y hacerme parte de este proyecto de investigación.

# Tabla de Contenido

Agradecimientos.....	ii
Tabla de Contenido .....	iii
Índice de Figuras .....	vi
Índice de Tablas .....	viii
1 Introducción .....	1
1.1 Antecedentes Generales.....	1
1.2 Biolixiviación y biooxidación de azufre.....	2
1.2.1 Mecanismos de Biolixiviación .....	2
1.3 Minerales fosfatados y producción de fertilizantes .....	5
1.4 Biolixiviación de fosfatos .....	6
1.5 Microorganismos involucrados en la biolixiviación .....	7
1.5.1 <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> .....	7
1.6 Cinética enzimática y actividad bacteriana .....	8
1.6.1 Mecanismos de inhibición enzimática .....	10
1.7 Curva de crecimiento microbiano .....	12
1.8 Factores que afectan el crecimiento y actividad oxidativa de <b>Fe + 2</b> y/o <b>S0</b> de bacterias biolixiviantes .....	14
1.8.1 Efecto de la presencia de iones metálicos y no metálicos sobre la actividad oxidativa de bacterias biolixiviantes .....	14
1.8.2 Efecto del pH sobre la actividad oxidativa de bacterias biolixiviantes .....	16
1.8.3 Efecto de algunas sales y fuerza iónica sobre la actividad oxidativa de bacterias biolixiviantes .....	17
2 Motivación y Justificación del proyecto.....	18
3 Objetivos .....	19
3.1 Objetivo general.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4 Metodología Experimental.....	20
4.1 Diseño Experimental .....	20
4.1.1 Lixiviación química.....	20
4.1.2 Inoculación y colonización de perlas de azufre elemental con <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> . .....	21

4.1.3	Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en soluciones de lixiviación química ajustada a diferentes pH.....	22
4.1.4	Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en medios de cultivo basales con variadas concentraciones de $K_2SO_4$ .....	23
4.1.5	Estudio preliminar de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en medios basales con 12 g/L de ion $PO_4 - 3$ .....	25
4.2	Análisis Químicos y Biológicos.....	26
4.2.1	Medición de pH.....	26
4.2.2	Determinación de la concentración de ion sulfato $SO_4 - 2$ en solución por turbidimetría .....	26
4.2.3	Medición de la concentración de ácido sulfúrico ( $H^+$ ) por titulación.....	28
4.2.4	Recuento del número de células en suspensión con marcador fluorescente DAPI	29
5	Resultados .....	31
5.1	Lixiviación química.....	31
5.2	Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en soluciones de lixiviación química ajustadas a diferentes pH.....	32
5.3	Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en medios de cultivo basal con múltiples concentraciones de $K_2SO_4$ .....	38
5.4	Estudio preliminar de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en medios basales con 12 g/L de ion $PO_4 - 3$ .....	43
6	Discusiones.....	44
6.1	Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en soluciones de lixiviación química ajustadas a diferentes pH.....	44
6.2	Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en medios de cultivo basal con múltiples concentraciones de $K_2SO_4$ .....	45
6.2.1	Evolución del pH en los cultivos.....	46
6.2.2	Evolución de la concentración del ion sulfato en solución .....	47
6.2.3	Concentración de ácido sulfúrico .....	47
6.2.4	Generación de ácido sulfúrico en el tiempo .....	48
6.2.5	Curvas de crecimiento bacteriano .....	48
6.2.6	Conversión .....	50
6.2.7	Ajuste del modelo de partícula decreciente modificado .....	50

6.2.8	Consideraciones al modelo modificado de partícula decreciente .....	51
6.3	Estudio preliminar de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en medios basales con 12 <i>gL</i> de ion $PO_4 - 3$ .....	52
7	Conclusiones.....	53
8	Bibliografía .....	55
9	Anexos.....	58
9.1	Tabla de simbología .....	58
9.2	Metodología de preparación de perlas de azufre esféricas .....	59
9.3	Resultados Adicionales.....	60
9.3.1	Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en soluciones de lixiviación química ajustada a diferentes pH.....	60
9.3.2	Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en medios de cultivo basales con variadas concentraciones de $K_2SO_4$ .....	62
9.4	Ejemplo de cálculo de generación de ácido y conversión .....	73

## Índice de Figuras

Figura 1: Mecanismos de Biolixiviación propuestos por Tributsch H. (Tributsch 2001)...	3
Figura 2: Vías de disolución de los minerales sulfurados. (I) Vía del tiosulfato, (D) Vía del polisulfuro; (Sand et al. 2001) .....	4
Figura 3: Diagrama de flujo proceso de producción de ácido fosfórico, vía húmeda (Aesseal 2002). .....	5
Figura 4: Reacción enzimática (Voet 2006) .....	8
Figura 5: Gráfico de Michaelis-Menten (Doran 1995) .....	9
Figura 6: Modelo general de Inhibición Competitiva (Voet 2006).....	10
Figura 7: Modelo general de Inhibición No competitiva (Voet 2006).....	11
Figura 8: Modelo general de Inhibición Mixta (Voet 2006) .....	11
Figura 9: Curva de crecimiento microbiano en cultivo Batch (Doran 1995) .....	12
Figura 10: Evolución del pH en el tiempo de cultivos microbianos en soluciones de lixiviación ajustadas a tres pH diferentes (1,4; 1,8 y 2,03) y control en medio basal a pH 2,3. Todos los experimentos fueron realizados en duplicado. ....	33
Figura 11: Concentración de ion sulfato en el tiempo, de los tres cultivos en soluciones de lixiviación a diferentes pH y del control en medio basal y pH 2,3. Todos los experimentos fueron realizados en duplicado. ....	34
Figura 12: Concentración de ácido sulfúrico en el tiempo, de cultivos en soluciones de lixiviación a tres pH diferentes y el cultivo control en medio basal a pH 2,3. Todos los experimentos fueron realizados en duplicado. ....	35
Figura 13: Curva de masa de ácido sulfúrico generado en el transcurso del tiempo. ....	36
Figura 14: Curvas de crecimiento bacteriano de los cultivos en la solución de lixiviación ajustada a diferentes pH .....	36
Figura 15: Curva de conversión molar de azufre elemental en ácido sulfúrico .....	38
Figura 16: Gráfico de barras de la conversión final alcanzada en cada uno de los medios experimentales, comparados con la conversión alcanzada en el medio basal.....	39
Figura 17: Curva de crecimiento bacteriano en suspensión, de los medios con distintas concentraciones de sulfato de potasio. ....	40
Figura 18: Ajuste del modelo de partícula decreciente con la reacción química como etapa controlante modificado (incorpora la concentración de bacterias adheridas como un reactante más), a la conversión obtenida en el cultivo en medio basal, en función del tiempo.....	42
Figura 19: Ajuste del modelo modificado de partícula decreciente con la reacción química como etapa controlante a partir de las 120 horas (izquierda) y a partir de las 200 horas (derecha).....	42
Figura 20: Evolución del pH en el tiempo de un cultivo control en medio basal y de un cultivo en medio basal con 0,852 [ml] de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (ácido fosfórico). Este se añadió para lograr una concentración de 12 g/L de ion fosfato PO <sub>4</sub> – 3.....	43

Figura 21: Evolución del pH en el tiempo, de cultivos en medios de cultivo basal con altas concentraciones de sulfato de potasio $K_2SO_4$ y el control sin agregar $K_2SO_4$ . .....	62
Figura 22: Evolución del pH en el tiempo, de cultivos en medios de cultivo basal con bajas concentraciones de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) y el control sin agregar $K_2SO_4$ . .....	63
Figura 23: Concentración de ion sulfato en el tiempo, de cultivos de medio basal con altas concentraciones de ion sulfato y el control sin agregar $K_2SO_4$ .....	64
Figura 24: Concentración de ion sulfato en el tiempo, de cultivos de medio basal con altas concentraciones de ion sulfato y el control sin agregar $K_2SO_4$ .....	65
Figura 25: Concentración de ácido sulfúrico en el tiempo, de cultivos en medios basales con altas concentraciones de sulfato de potasio y el control sin agregar $K_2SO_4$ .....	66
Figura 26: Concentración de ácido sulfúrico en el tiempo, de cultivos en medios basales con bajas concentraciones de sulfato de potasio y el control sin agregar $K_2SO_4$ . .....	67
Figura 27: Curva de la masa de ácido sulfúrico producido en cada uno de los medios de cultivo con altas concentraciones de sulfato de potasio .....	68
Figura 28: Curva de la masa de ácido sulfúrico producido en cada uno de los medios de cultivo con bajas concentraciones de sulfato de potasio .....	69
Figura 29: Curva de crecimiento bacteriano de cultivos en medios basales con altas concentraciones de sulfato de potasio y control sin agregar sulfato de potasio $K_2SO_4$ . ..	70
Figura 30: Imágenes del recuento de células con el marcador fluorescente DAPI, de los cultivos con medio basal (0,8 [g/L] $SO_4$ ), con 7 [g/L] $SO_4$ y con 20 [g/L] (columnas) en los tiempos 0, 120 y 360 horas (filas). .....	72

## Índice de Tablas

Tabla 1: Modelos de crecimiento microbiano (Alzate Fontalvo et al. 2009) .....	13
Tabla 2: Tabla de resistencias a altas concentraciones de metales de diversos microorganismos (Dopson et al. 2003). .....	15
Tabla 3: Contenido de iones del lixiviado .....	31
Tabla 4: Composición de los medios experimentales antes y después de la precipitación. Para los diferentes pH se obtuvieron precipitados de diferente composición.....	32
Tabla 5: Tabla de simbología .....	58
Tabla 6: Tabla de mediciones de pH en el tiempo, estudio de actividad biooxidativa de azufre en soluciones de lixiviación química ajustada a diferentes pH iniciales y control en medio de cultivo basal a pH inicial 2,3 .....	60
Tabla 7: Tabla de mediciones de la concentración de ion sulfato en solución, en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en soluciones de lixiviación química ajustada a diferentes pH iniciales y control en medio de cultivo basal a pH inicial 2,3.....	60
Tabla 8: Concentración de ácido sulfúrico en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en soluciones de lixiviación química ajustada a diferentes pH iniciales y control en medio de cultivo basal a pH inicial 2,3.....	60
Tabla 9: Curva de crecimiento bacteriano en cultivo Batch, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en soluciones de lixiviación química ajustada a diferentes pH iniciales y control en medio de cultivo basal a pH inicial 2,3.....	61
Tabla 10: Tabla de mediciones de pH en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con altas concentraciones de ion sulfato en solución .....	62
Tabla 11: Tabla de mediciones de pH en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con bajas concentraciones de ion sulfato en solución. ....	63
Tabla 12: Tabla de mediciones de la concentración de ion sulfato en solución en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con altas concentraciones de ion sulfato en solución. ....	64
Tabla 13: Tabla de mediciones de la concentración de ion sulfato en solución en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con bajas concentraciones de ion sulfato en solución. ....	65
Tabla 14: Mediciones de la concentración de ácido sulfúrico en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con altas concentraciones de ion sulfato en solución. ....	66
Tabla 15: Mediciones de la concentración de ácido sulfúrico en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con altas concentraciones de ion sulfato en solución. ....	67
Tabla 16: Masa de ácido sulfúrico producido y existente en los distintos medios de cultivo con altas concentraciones de sulfato de potasio .....	68

Tabla 17: Masa de ácido sulfúrico producido y existente en los distintos medios de cultivo con bajas concentraciones de sulfato de potasio .....	69
Tabla 18: Curva de crecimiento bacteriano en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con altas concentraciones de ion sulfato en solución.....	70
Tabla 19: Curva de crecimiento bacteriano en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con bajas concentraciones de ion sulfato en solución.....	71

# 1 Introducción

## 1.1 Antecedentes Generales

La biolixiviación es una tecnología efectiva que sirve para la extracción de minerales de baja ley que no pueden ser procesados por los métodos tradicionales debido a razones económicas. La recuperación del mineral se realiza desde minerales sulfurados, donde el azufre sirve como fuente de energía para las bacterias quimiolitótrofas.

Cabe mencionar que este bioproceso resulta ser mucho más amigable con el medio ambiente que otros procesos, como la pirometalurgia, utilizados en la industria minera hoy en día.

Esta técnica biotecnológica está establecida en la minería hace ya varias décadas, y ha sido ampliamente utilizada para la extracción de metales valiosos como el cobre, cobalto, níquel, zinc y uranio. Estos metales son extraídos desde sulfuros insolubles o incluso en el caso del uranio desde óxidos, mediante su solubilización con ácido o ion férrico como agente lixivante. Para la minería de otros metales como el oro o la plata, esta técnica es aplicada solo para la eliminación de metales sulfurados que interfieren con la pureza y ley del mineral (Vera et al. 2003).

Las rocas fosfáticas o fosfóricas, rocas con alto contenido de fósforo, corresponden a la principal fuente natural de fosfatos en la naturaleza. Actualmente el 90% de la producción de fosfatos es utilizado para la producción de fertilizantes fosfatados. Este proceso requiere grandes cantidades de ácido sulfúrico, que al reaccionar con el mineral fosfatado, forma como producto el ácido fosfórico.

Es debido a la creciente demanda de fertilizantes, que se estima crecerá un 1.9 por ciento anual desde 2012 hasta 2016, producto de la creciente escasez de alimentos y a la necesidad de acelerar el crecimiento y desarrollo de los diferentes cultivos, que surge la necesidad de crear o utilizar nuevas metodologías de extracción de fosfatos a partir de rocas fosfáticas de baja ley, que sean económicamente más rentables.

Esta problemática, lleva a que empresas mineras como VALE S.A., segunda compañía minera más grande a nivel mundial (BBC 2006), evalúen la posibilidad de aplicar la biolixiviación en el proceso de extracción de fosfatos. Esto hace necesaria la realización de una serie de estudios de factibilidad técnica y económica, que generen alternativas para el proceso de extracción de fosfatos en que se pueda utilizar el ácido sulfúrico generado por los microorganismos biolixivantes en la reacción química de formación de ácido fosfórico.

## 1.2 Biolixiviación y biooxidación de azufre

La biolixiviación o lixiviación bacteriana surgió como una alternativa a los procesos convencionales de metalurgia extractiva como el de pirometalurgia. Ésta técnica fue antecedida por otros procesos que requerían un alto consumo de reactivos lixiviantes y/o un alto requerimiento energético.

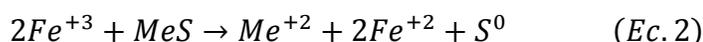
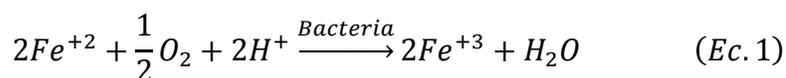
Enmarcada dentro de la hidrometalurgia, la biolixiviación consiste en la oxidación directa mediante un ataque enzimático de compuestos sulfurados, o indirecta mediante la regeneración también enzimática del agente lixiviante  $Fe^{+3}$ . En algunos casos, producto de estas reacciones se produce la disolución de metales de interés económico, mediante el ataque del ácido sulfúrico generado por las bacterias (Rodríguez et al. 2001). Este bioproceso, al igual que la lixiviación química, está ligado a procesos de extracción por solvente y/o electroobtención para la recuperación del metal de interés.

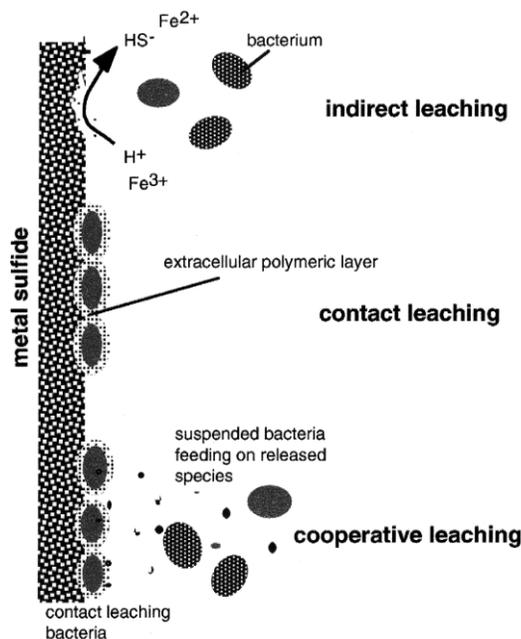
Por otro lado, dentro de las ventajas de la biolixiviación se mencionan la nula emisión de  $SO_2$ , pues a diferencia de los procesos pirometalúrgicos, los compuestos utilizados no son ajenos al ciclo biogeoquímico del azufre, por lo que son compuestos más amigables medioambientalmente. Otras ventajas son los bajos costos económicos y energéticos, entre otros. Sin embargo la lixiviación bacteriana también presenta desventajas como la baja velocidad de las reacciones y la obtención de soluciones demasiado diluidas (Rodríguez et al. 2001).

### 1.2.1 Mecanismos de Biolixiviación

En el 2001, Tributsch propone tres mecanismos de biolixiviación, la indirecta, directa o por contacto, y la cooperativa (Figura 1).

La biolixiviación indirecta requiere de la generación de un intermediario por parte de las bacterias, el ion férrico ( $Fe^{+3}$ ), el cual posee una gran capacidad oxidativa, solubilizando metales que formaban parte del mineral sulfurado. Este mecanismo se resume en las ecuaciones 1 y 2.





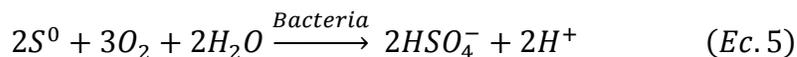
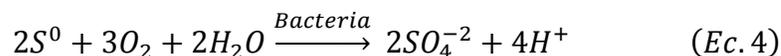
**Figura 1: Mecanismos de Biolixiviación propuestos por Tributsch H.** (Tributsch 2001)

En su mayor parte este tipo de mecanismo ocurre con microorganismos hierrooxidantes, como la *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Mecanismo del que se obtiene como producto final el metal de interés, que se encontraba formando parte del mineral sulfurado, solubilizado en un medio acuoso ácido.

Por otro lado, en el mecanismo directo o de contacto, el microorganismo se adhiere al mineral sulfurado, solubilizando el metal. Los microorganismos se adhieren al mineral mediante interacciones hidrofóbicas o creando capas de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), estas últimas serán distintas si las bacterias crecen en azufre elemental o en minerales sulfurados. Es en las EPS de células crecidas sobre mineral sulfurado, donde se produce una disolución de los minerales mediada por los iones férricos ( $Fe^{+3}$ ), induciendo la producción del ion tiosulfato y luego de sulfato.



En cambio, en las EPS de las células crecidas sobre azufre elemental las reacciones de oxidación de azufre son las siguientes:



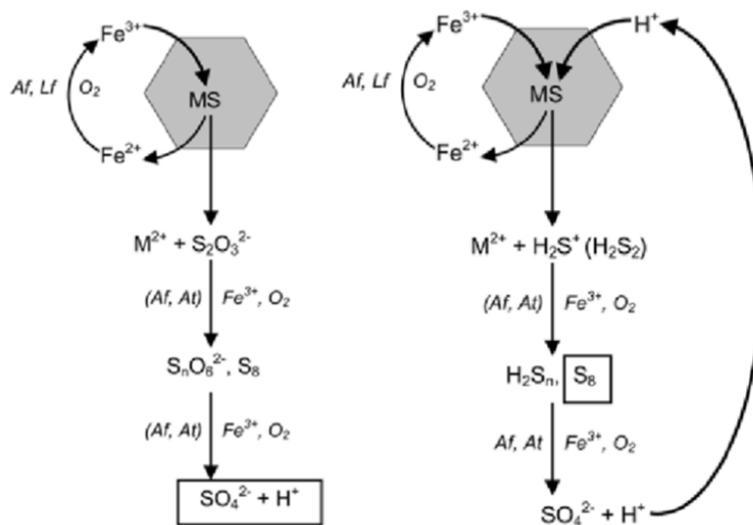
También existen algunos microorganismos que en vez de formar estas EPS, poseen una cisteína portadora de azufre el cual permite formar polisulfuros y a veces se puede utilizar como fuente de energía temporal.

El tercer mecanismo, corresponde a la biolixiviación cooperativa, en el cual las bacterias planctónicas (o en suspensión) cooperan con las bacterias adheridas al mineral.

Sin embargo, en el 2003, se redefinen los mecanismos indirecto por contacto y directo por contacto (Crundwell 2003). Queda definido como mecanismo directo por contacto aquel en que las bacterias adheridas al mineral no requieren de la presencia de iones férrico ni ferroso para la disolución del mineral. Por otro lado, el mecanismo indirecto por contacto se define como aquel mecanismo en que las bacterias adheridas al mineral implican la presencia de éstos iones en la EPS (Sustancia Polimérica Extracelular).

Finalmente, dependiendo de la solubilidad de los metales en ácido es posible definir dos tipos de minerales sulfurados (Sand et al. 2001), los que siguen la vía del tiosulfato y la del polisulfuro. La primera vía la siguen los minerales que solo podrían ser disueltos por  $Fe^{+3}$  y cuyo intermediario más importante sería el tiosulfato. En la segunda vía, de los polisulfuros, los minerales sulfurados son disueltos por el ion férrico y por el ataque de iones  $H^+$ . En este caso, el intermediario corresponde a un polisulfuro (Figura 2).

Para el estudio del trabajo de tesis, los mecanismos que generan ácido sulfúrico son los de mayor interés, es decir en los que la biooxidación de azufre se realiza a partir de azufre elemental.



**Figura 2: Vías de disolución de los minerales sulfurados. (I) Vía del tiosulfato, (D) Vía del polisulfuro;**  
(Sand et al. 2001)

### 1.3 Minerales fosfatados y producción de fertilizantes

Las rocas fosfóricas son rocas con alto contenido de fósforo. El principal mineral fosfatado encontrado en ellas es la apatita, mineral formado por diversas combinaciones de sales de fosfato de calcio con otros elementos ( $Ca_5(PO_4)_3(OH, F, Cl)$ ) (Bhatti & Yawar 2010).

La roca fosfórica corresponde a la principal fuente natural de fósforo o fosfatos en la naturaleza. Los yacimientos más importantes de fosfatos o roca fosfórica se encuentran en Marruecos, el Sahara Occidental y Perú. El mercado de los fosfatos está en su mayor parte controlado por Marruecos, pues este país mantiene un control de facto en el Sahara Occidental, posicionándose como el tercer productor y primer exportador más grande de fosfatos a nivel mundial y como el primer exportador de ácido fosfórico, con una participación del 50% de mercado internacional (ICEX 2010).

Uno de los principales productos químicos obtenidos de las rocas fosfóricas es el ácido fosfórico, el que se obtiene al tratar la roca fosfórica vía húmeda. Esta reacción consiste en el ataque de la roca con ácido sulfúrico, llevándose a cabo la siguiente reacción (Aesseal 2002):



De esta reacción se obtiene también como subproducto sulfato de calcio (cristales de yeso).

En la Figura 3 se muestra un diagrama de flujo simplificado del proceso de producción de ácido fosfórico (Aesseal 2002).

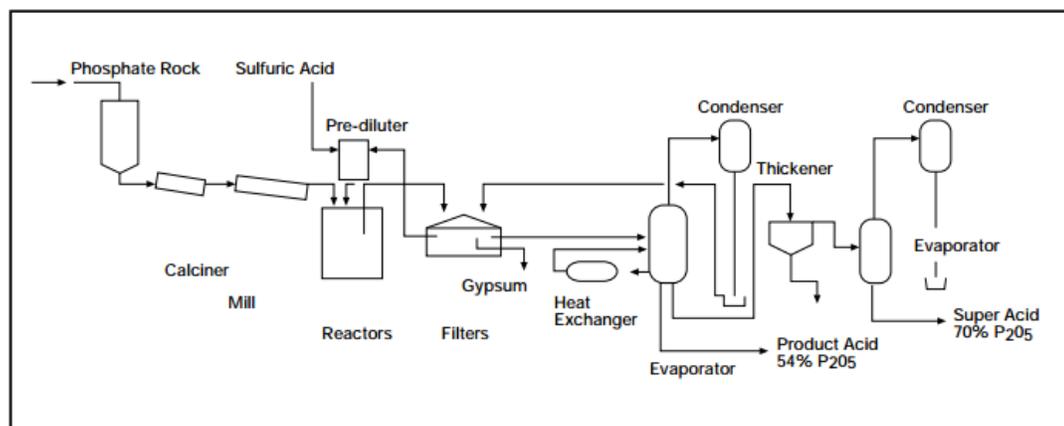


Figura 3: Diagrama de flujo proceso de producción de ácido fosfórico, vía húmeda (Aesseal 2002).

El 90% de la producción mundial de ácido fosfórico, es utilizado en la fabricación de fertilizantes fosfatados (Quiminet 2006) debido a su gran importancia en el crecimiento

y desarrollo de plantas y vegetales y su consecuente importancia alimenticia para los animales, entre ellos el hombre, para la formación de dientes y huesos (FIPR 2010).

Particularmente, se espera que la demanda de fertilizantes fosfatados alcance los 45.0 millones de toneladas en el 2016, con una tasa de crecimiento anual del 2.0 por ciento (Berrueto 2012).

Dadas las grandes magnitudes de fosfatos que son utilizadas para la producción de fertilizantes y dada la creciente industria de fertilizantes debido a la creciente escasez de alimentos, nace la necesidad de acelerar el crecimiento y desarrollo de las plantaciones. Con lo que surge la necesidad de nuevas metodologías de extracción de fosfatos a partir de rocas fosfóricas de baja ley, que sean más rentables económicamente y más amigables con el medio ambiente.

#### **1.4 Biolixiviación de fosfatos**

La biolixiviación de rocas fosfáticas está siendo estudiada cada vez más debido a que podría ser una alternativa para la costosa industria de fertilizantes (Bhatti & Yawar 2010). Es debido a su reciente importancia económica que existen muy pocos estudios respecto a dicho proceso. Se han encontrado sólo dos estudios de biolixiviación de fosfatos:

El primer estudio tiene como objetivo principal la caracterización del mecanismo de la solubilización de fósforo por parte de bacterias acidófilas (*At. thiooxidans* y *At. ferrooxidans*), desde roca fosfática, utilizando como fuente de energía externa un lodo de azufre. A partir de este estudio se concluye que la tasa de fósforo disuelto se encuentra en directa relación con la tasa de producción de ácido sulfúrico producido por las bacterias. Este fenómeno vuelve atractiva la idea del tratamiento de suelos con rocas fosfáticas y la combinación de bacterias azufre y hierro oxidantes (Bhatti & Yawar 2010).

Sin embargo, un segundo estudio se acerca más a la temática de este trabajo de tesis. Dicho trabajo es realizado con *At. ferrooxidans* como agente biooxidante de pirita, generando ácido sulfúrico y sulfato ferroso, como producto de las reacciones químicas involucradas en la oxidación de pirita. El sulfato ferroso actúa como una fuente de energía para las bacterias y el ácido sulfúrico generado se usa para disolver la roca fosfática. De este estudio se concluye que el fósforo se obtiene en forma de compuestos solubles de fósforo, producto de la disolución de la roca fosfática por el ácido sulfúrico generado (Chi et al. 2006).

Estos estudios hacen que la idea de utilizar la biolixiviación para la producción de ácido fosfórico, resulte cada vez más interesante, pues al igual que en los procesos tradicionales, se obtiene directamente la materia prima para la producción de fertilizantes, sin necesidad de realizar ningún proceso de recuperación del mineral adicional.

Sin embargo, no se han encontrado estudios de biolixiviación de mineral fosfatado, con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.

## 1.5 Microorganismos involucrados en la biolixiviación

La lixiviación bacteriana en general ocurre en ambientes ácidos, con un pH entre 1,5 y 3, por ésta razón los microorganismos involucrados son en general, acidófilos. Los microorganismos acidófilos se definen como microorganismos que crecen óptimamente a  $\text{pH} < 3$  (Plumb et al. 2008). Los microorganismos acidófilos, tal como cualquier otro microorganismo tienen un pH intracelular cercano al neutro. Es por esto que los microorganismos acidófilos deben ser capaces de tolerar gradientes de pH de varios órdenes de magnitud mayores que los microorganismos neutrófilos (Baker-Austin & Dopson 2007). Precisamente este gradiente y el flujo de entrada de protones  $H^+$  a través de una enzima, es lo que permite la generación de energía.

Por otro lado, los microorganismos acidófilos, a su vez, pueden ser mesófilos, es decir que tienen una temperatura óptima de crecimiento entre los 25-35°C, como el género de los *Leptospirillum* y *Acidithiobacillus*; termófilos moderados, cuya temperatura óptima es cercana a los 50°C, entre los que se encuentran los microorganismos del género *Sulfobacillus*; o termófilos, cuya temperatura óptima se encuentra sobre los 60°C, como el género de los *Sulfolobus*. Todas, especies hierrooxidantes y/o sulfooxidantes (Bosecker 1997).

### 1.5.1 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*

Este microorganismo, pertenece al dominio de las bacterias y como tal es un microorganismo procarionte.

*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, una de las 4 especies del género *Sulfobacillus*, es un microorganismo quimiolitótrofo, es decir, utiliza como fuente de energía compuestos inorgánicos, siendo capaz de utilizar hierro y/o azufre elemental como fuente de energía. Es una bacteria Gram-Positiva y aeróbica facultativa, por lo que también podría desarrollarse en ausencia de oxígeno. *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* es un microorganismo termófilo moderado, cuya temperatura óptima se encuentra entre los 40 y 55°C. El pH óptimo para su desarrollo se encuentra entre 1,9 y 2,4 y es formadora de endosporas. Las endosporas son formas especializadas de la bacteria en estado de latencia, estas no exhiben actividad metabólica detectable experimentalmente y muestran mayor resistencia frente a agentes patógenos (Bogdanova et al. 2002; Karavajko et al. 1990). Finalmente, esta bacteria se clasifica dentro de los bacilos (*Bacillus*) por su forma ovalada y alargada.

Además, es necesario mencionar que este tipo de bacteria requiere de materia orgánica como fuente de carbono. Es debido a esto que la especie *S. thermosulfidooxidans* es un microorganismo quimioheterótrofo y no crece en ausencia de extracto de levadura (Bosecker 1997).

## 1.6 Cinética enzimática y actividad bacteriana

El modelo de cinética enzimática de Michaelis-Menten, propone que la reacción global de la reacción enzimática, consta de dos reacciones separadas: en la primera, se forma el complejo enzima-sustrato, para luego descomponerse en enzima y producto, como se ve en la Figura 4, donde E, S, ES y P simbolizan la enzima, el sustrato, complejo enzima-sustrato y producto, respectivamente

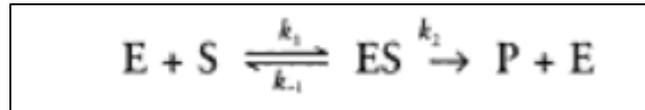


Figura 4: Reacción enzimática (Voet 2006)

Según este modelo, cuando el sustrato se encuentra en altas concentraciones, la segunda reacción se convierte en la limitante de la velocidad de reacción. De esta forma la velocidad de la reacción global se independiza de la concentración de sustrato, quedando la expresión de la velocidad global, como sigue:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (\text{Ec. 7})$$

Siendo por su parte la velocidad total de producción del complejo [ES]:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (\text{Ec. 8})$$

Luego, suponiendo estado estacionario:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (\text{Ec. 9})$$

y considerando que:  $[E]_T = [ES] + [E]$ , se puede reescribir la ecuación 8, de la siguiente manera:

$$k_1([E]_T - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (\text{Ec. 10})$$

Ecuación que reordenando términos queda:

$$[ES](k_{-1} + k_2 + k_1[S]) = k_1 [E]_T[S] \quad (\text{Ec. 11})$$

Finalmente, dividiendo ambos términos por  $k_1$  y despejando [ES] queda:

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M + S} \quad (\text{Ec. 12})$$

Donde  $K_M$  es la constante de Michaelis-Menten y se define como:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{Ec. 13})$$

Luego de todo el trabajo algebraico, es posible expresar la velocidad inicial de la reacción, en términos de las cantidades  $[E]_T$  y  $[S]$ , que son medibles experimentalmente:

$$v_0 = \left( \frac{d[P]}{dt} \right)_{t=0} = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_M + S} \quad (\text{Ec. 14})$$

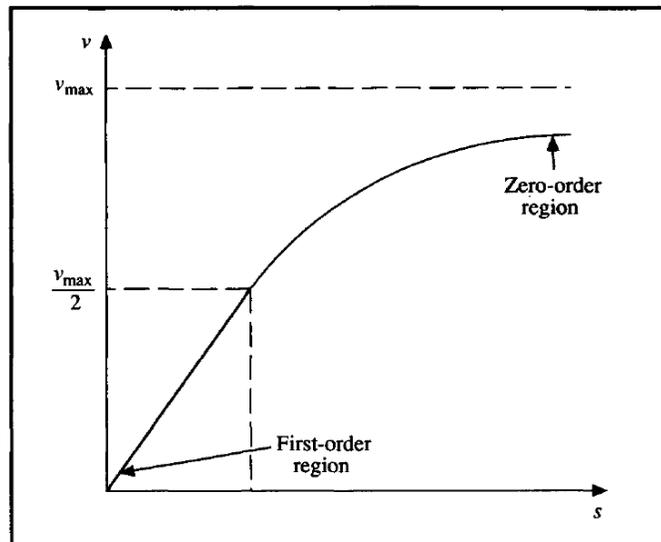
Por otro lado, la velocidad máxima de la reacción se alcanza con concentraciones elevadas de sustrato y la enzima se satura, es decir cuando la enzima se encuentra en su totalidad como complejo enzima-sustrato ( $[ES]$ ):

$$v_{max} = k_2[E]_T \quad (\text{Ec. 15})$$

Y reemplazando en la ecuación 14 la ecuación para la velocidad inicial de una reacción enzimática es.

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_M + S} \quad (\text{Ec. 16})$$

La ecuación 16, corresponde entonces a la ecuación de cinética enzimática básica, de Michaelis-Menten, cuya curva corresponde a una hipérbola rectangular (Figura 5).



**Figura 5: Gráfico de Michaelis-Menten** (Doran 1995)

### 1.6.1 Mecanismos de inhibición enzimática

La inhibición enzimática puede producirse mediante diferentes mecanismos, dependiendo del tipo de inhibidor. Un inhibidor se define como una sustancia que altera la actividad de una enzima, ya sea interfiriendo en la unión del sustrato con la enzima, en la formación o rompimiento del complejo enzima-sustrato, o en la formación del producto final (Voet 2006). Estos diversos mecanismos se detallan a continuación.

Las ecuaciones que rigen estos mecanismos, no se presentan en este apartado, pues en este trabajo no se realizan experimentos de cinética enzimática, cabe mencionar sin embargo, que se deben calcular nuevas constantes cinéticas  $K_M$  y  $v_{max}$  cuando esté presente algún tipo de inhibición.

#### 1.6.1.1 Inhibición Competitiva

La inhibición competitiva ocurre cuando el inhibidor compite directamente con el sustrato por unirse con la enzima. Estos inhibidores muchas veces tienen una estructura química bastante semejante a la del sustrato, tanto que forma una unión específica con la enzima reversible, no reactiva, como lo muestra la Figura 6.

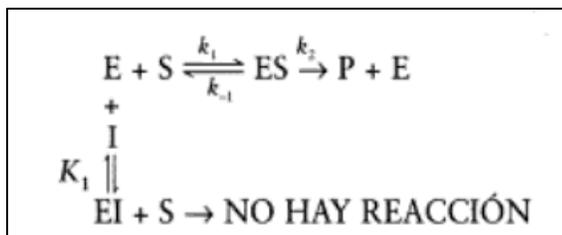


Figura 6: Modelo general de Inhibición Competitiva (Voet 2006)

Con esto, el inhibidor competitivo, actúa reduciendo la cantidad de enzima libre disponible para unirse al sustrato. Esta reacción, de pertenecer al metabolismo energético de un microorganismo, podría reducir la actividad metabólica llegando a reducir también la velocidad del crecimiento microbiano (Voet 2006).

#### 1.6.1.2 Inhibición No Competitiva

En la inhibición no competitiva, el inhibidor se une directamente al complejo enzima-sustrato (Figura 7). En este caso el inhibidor no necesariamente posee semejanzas estructurales con el sustrato, y al unirse al complejo enzima-sustrato, se piensa que produce algún cambio estructural en el sitio activo, dejando a la enzima inactiva.

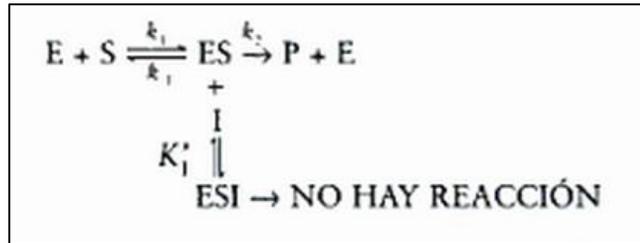


Figura 7: Modelo general de Inhibición No competitiva (Voet 2006)

En este tipo de inhibición entonces, el inhibidor tiene que ser capaz de afectar la capacidad catalítica de la enzima y no su fijación al sustrato. Lo que en enzimas con sustrato único, difícilmente ocurre, excepto que se trate de pequeños inhibidores, como protones ( $H^+$ ) o iones metálicos (Voet 2006).

### 1.6.1.3 Inhibición Mixta

Este tipo de inhibición ocurre cuando el inhibidor puede unirse tanto a la enzima como al complejo enzima-sustrato, como se ve en la Figura 8.

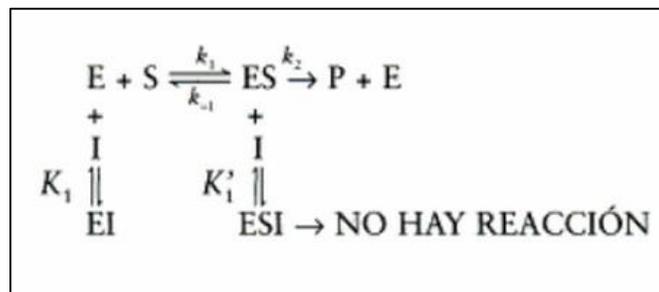


Figura 8: Modelo general de Inhibición Mixta (Voet 2006)

En este tipo de inhibición se piensa que el inhibidor se une a los sitios de la enzima que participan de la unión con el sustrato y de catálisis. Este fenómeno también se conoce como inhibición no competitiva. Este tipo de inhibidores son efectivos a bajas y altas concentraciones de sustrato (Voet 2006).

## 1.7 Curva de crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano en cultivos batch, consta típicamente de seis fases: Al principio una fase de retraso (o lag), en la cual los microorganismos no crecen ni se reproducen, solo se adaptan al medio en el que estén inmersos. La segunda fase es la fase de aceleración, que corresponde a la etapa en la cual comienza a aumentar la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ). En la fase exponencial, se alcanza la máxima velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) para la concentración de sustrato y condiciones del cultivo en estudio. En esta etapa los microorganismos se reproducen a una tasa más alta que la tasa de muerte de los mismos. La siguiente etapa es la etapa de declinación, en la cual comienza a disminuir  $\mu$  debido a limitaciones de espacio y/o nutrientes, además de la acumulación de desechos. La fase estacionaria corresponde a la etapa en que  $\mu=0$ , lo que se traduce en un estancamiento del aumento del número de microorganismos debido al aumento de la tasa de muerte celular. Finalmente se llega a la fase de muerte celular, en la que  $\mu < 0$  y el número de microorganismos comienza a disminuir sustancialmente. (Doran 1995). En la Figura 9 se muestra una típica curva de crecimiento microbiano en un cultivo batch.

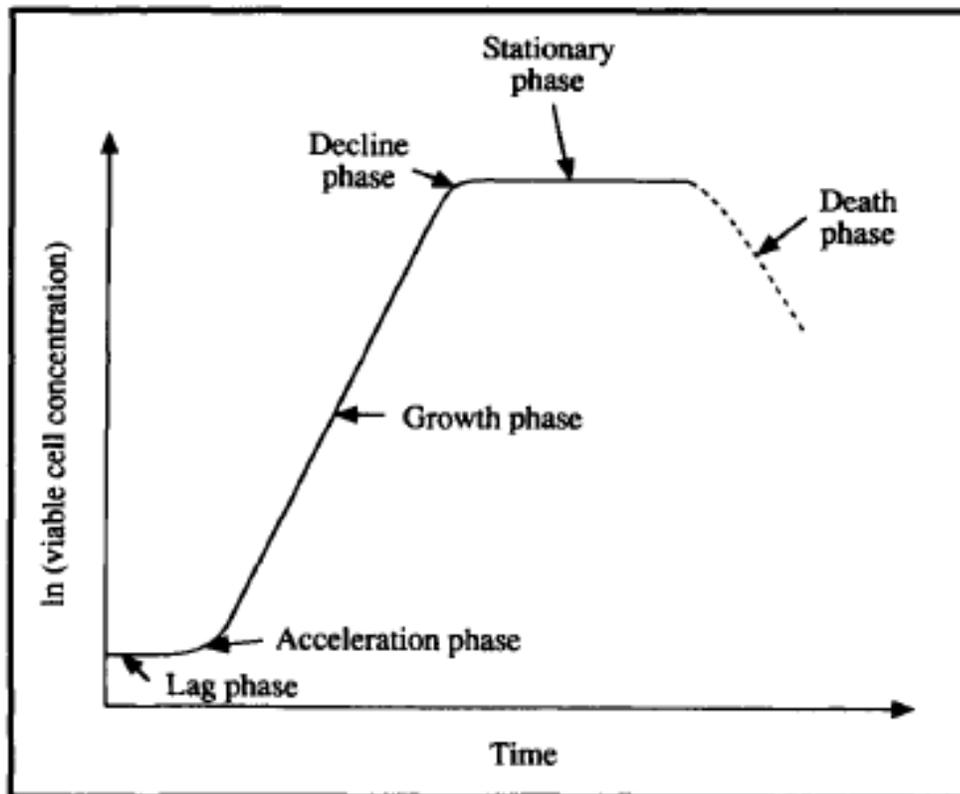


Figura 9: Curva de crecimiento microbiano en cultivo Batch (Doran 1995)

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) corresponde a la variación del número de microorganismos en el tiempo:

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \quad (\text{Ec. 17})$$

Y se encuentra bien representada por el modelo y ecuación de Monod, el cual define la velocidad específica de crecimiento, en función de la concentración de sustrato, como se muestra en la ecuación 18:

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Ec. 18})$$

La ecuación de Monod es homóloga a la ecuación de cinética enzimática de Michaelis-Menten, bajo el concepto que toda reacción biológica es realizada a través de una enzima y por lo tanto, controlada por una única velocidad enzimática (Alzate Fontalvo et al. 2009).

Sin embargo, la aplicabilidad de la ecuación de Monod, para el crecimiento bacteriano se ve limitada en muchos casos. La ecuación de Monod no es aplicable por ejemplo cuando el sustrato en cuestión, no es limitante del crecimiento microbiano, o cuando existe más de un sustrato que limita el crecimiento microbiano.

Otra situación en la que la ecuación de Monod no es aplicable para describir el crecimiento de microorganismos, ocurre cuando el crecimiento es inhibido por altas concentraciones de sustrato o de productos. En estos y otros casos se deben agregar otros términos a la ecuación de crecimiento, cuyas curvas se adaptan mejor a resultados experimentales (Doran 1995). Algunas de estas ecuaciones, se muestran en la Tabla 1 (Alzate Fontalvo et al. 2009).

**Tabla 1: Modelos de crecimiento microbiano** (Alzate Fontalvo et al. 2009)

Modelo	Relación
Monod	$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_m + S}$
Teissier	$\mu = \mu_{max} \left( 1 - \exp\left(\frac{-S}{K_m}\right) \right)$
Moser	$\mu = \mu_{max} \frac{S^n}{K_m + S^n}$
Haldane	$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_m + S + K_1 S^2}$
Hinshelwood	$\mu = \mu_{max} \left( \frac{S}{K_m + S} \right) (1 - K_p P)$

## **1.8 Factores que afectan el crecimiento y actividad oxidativa de $Fe^{+2}$ y/o $S^0$ de bacterias biolixiviantes**

### **1.8.1 Efecto de la presencia de iones metálicos y no metálicos sobre la actividad oxidativa de bacterias biolixiviantes**

Debido a las condiciones extremas en que se desarrollan la mayor parte de los microorganismos involucrados en los procesos de biolixiviación, generalmente acidófilos, ha resultado interesante conocer cuáles son los mecanismos de resistencia que éstos poseen a metales pesados o sus iones. Como es sabido, las soluciones ácidas de lixiviación se caracterizan por la alta concentración de metales pesados que son tóxicos para la mayoría de las formas de vida. Sin embargo, también se sabe que las soluciones de drenaje ácido de las minas (AMD), representan condiciones no solo tolerables, si no que propicias para la vida de los microorganismos acidófilos (Dopson et al. 2003).

El mayor conocimiento que se pueda generar respecto a la toxicidad de metales y otros iones típicos de estas soluciones ácidas de lixiviación y de cómo estos microorganismos sobreviven en dichas soluciones es importante para la generación de nuevas tecnologías y optimizaciones de los procesos de biolixiviación.

En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos del grado de resistencia a iones metálicos que presentan algunos microorganismos acidófilos (Dopson et al. 2003).

Se han encontrado estudios del efecto que tienen altas concentraciones de ciertos metales, como el ion férrico ( $Fe^{+3}$ ) sobre la actividad bioquímica oxidativa de ion ferroso ( $Fe^{+2}$ ) a férrico ( $Fe^{+3}$ ) de *At. ferrooxidans*, los cuales muestran que la actividad oxidativa de dicho microorganismo decrece con un incremento de la concentración del ion férrico. Inhibición cuyas curvas de Lineweber-Burk revelan que corresponde a la cinética de inhibición competitiva del sistema enzimático de la oxidación de hierro. Siendo también la inhibición por ion cuproso ( $Cu^{+}$ ) y  $Zn^{+2}$  sobre la oxidación de ion ferroso ( $Fe^{+2}$ ) a férrico ( $Fe^{+3}$ ) de *At. ferrooxidans*, de tipo competitiva (Kawabe et al. 2003; Suzuki et al. 1999).

La oxidación de azufre por parte de *At. thiooxidans* es también inhibida por altas concentraciones de iones metálicos, pero el mecanismo de inhibición parece ser más complejo. Esto debido a que este proceso involucra el contacto de la célula con el mineral sulfurado, además de la oxidación del mineral sulfurado *MS* (Sulfuro) o el azufre elemental ( $S^0$ ) a  $SO_3^{-2}$  (Sulfito) y de sulfito a  $SO_4^{-2}$  (Sulfato), reacciones que se encuentran influenciadas también por el pH (Suzuki et al. 1999). Esto hace pensar que la cepa utilizada en este trabajo (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*) podría presentar un mecanismo de inhibición también muy complejo.

**Tabla 2: Tabla de resistencias a altas concentraciones de metales de diversos microorganismos**  
(Dopson et al. 2003).

Micro-organism	Metal concentration whereby metabolic activity occurs (mM)*				
	As(III)	Cu(II)	Zn(II)	Cd(II)	Ni(II)
<b>Neutrophilic bacterium</b>					
<i>Escherichia coli</i>	4 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	0.5 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
<b>Acidophilic bacteria</b>					
<i>Acidiphilium cryptum</i>	ND	15 <sup>c</sup>	125 <sup>c</sup>	700 <sup>c</sup>	20 <sup>c</sup>
<i>Acidiphilium multivorum</i>	30 <sup>d</sup>	10 <sup>c</sup>	40 <sup>c</sup>	20 <sup>c</sup>	350 <sup>c</sup>
' <i>Acidiphilium symbioticum</i> ' KM2	ND	20 <sup>c</sup>	150 <sup>c</sup>	700 <sup>c</sup>	20 <sup>c</sup>
' <i>Acidiphilium symbioticum</i> ' H8	ND	15 <sup>c</sup>	150 <sup>c</sup>	700 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup>
<i>Acidiphilium angustum</i>	ND	5 <sup>c</sup>	8 <sup>c</sup>	<0.2 <sup>c</sup>	10 <sup>c</sup>
<i>Acidiphilium</i> strain GS18h	ND	15 <sup>c</sup>	60 <sup>c</sup>	10 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup>
<i>Acidocella aminolytica</i>	ND	30 <sup>e</sup>	500 <sup>e</sup>	200 <sup>e</sup>	150 <sup>e</sup>
<i>Acidocella facilis</i>	ND	<1 <sup>e</sup>	100 <sup>e</sup>	<1 <sup>e</sup>	1 <sup>e</sup>
<i>Acidocella</i> strain GS19h	ND	15 <sup>e</sup>	900 <sup>e</sup>	700 <sup>e</sup>	150 <sup>e</sup>
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	84 <sup>f</sup>	800 <sup>f</sup>	1071 <sup>g</sup>	500 <sup>h</sup>	1000 <sup>i</sup>
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	ND	6 <sup>j</sup>	43 <sup>j</sup>	ND	5 <sup>j</sup>
<b>Acidophilic archaea</b>					
' <i>Ferroplasma acidarmanus</i> '	13 <sup>k</sup>	16 <sup>l</sup>	ND	9 <sup>l</sup>	ND
<i>Metallosphaera sedula</i>	1 <sup>m</sup>	16 <sup>m</sup>	150 <sup>m</sup>	1 <sup>m</sup>	ND
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	ND	1 <sup>n</sup>	10 <sup>n</sup>	10 <sup>n</sup>	1 <sup>n</sup>
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	ND	1 <sup>n</sup>	10 <sup>n</sup>	10 <sup>n</sup>	0.1 <sup>n</sup>

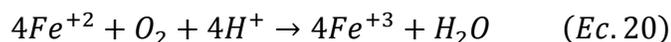
Los datos de esta tabla fueron recogidos de diferentes publicaciones: **a**, Carlin et al., (1995); **b**, Nies (1999); **c**, Mahapatra & Banerjee (1996); **d**, Suzuki et al. (1997); **e**, Ghosh et al. (1997); **f**, Harvey & Crundwell (1996); **g**, Kondratyeva et al. (1995); **h**, Baillet et al. (1997); **i**, Dew et al. (1999); **j**, Vartanyan et al. (1990); **k**, Gihring et al. (2003); **l**, unpublished results; **m**, Huber et al. (1989); **n**, Miller et al. (1992).

En la actualidad, existen pocos estudios que se refieran al efecto que pueda tener el ion sulfato sobre la actividad biooxidativa de hierro y menos aún sobre la actividad biooxidativa de azufre de las bacterias, esto a pesar de que la mayoría de las plantas de biolixiviación operan con altas concentraciones de sales de sulfato. Estas sales de sulfato pueden ser provenientes del propio mineral a lixiviar, de la adición (y/o generación por parte de bacterias azufre-oxidantes) de ácido sulfúrico, o también de la muy frecuentemente utilizada recirculación de las soluciones de lixiviación, situaciones que provocan la concentración de estas sales y por ende del ion sulfato. Se ha encontrado que el ion sulfato posee un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las bacterias oxidativas de hierro como como la *Leptospirillum ferrooxidans* y *At. ferrooxidans*, a partir de los 70 [g/L] y los 130 [g/L] de este ion, respectivamente. Estudio en el cual, el crecimiento bacteriano es monitoreado mediante la medición de la actividad oxidativa de fierro (Romero et al. 2003).

## 1.8.2 Efecto del pH sobre la actividad oxidativa de bacterias biolixiviantes

Uno de los mecanismos de regulación homeostática del pH en organismos acidófilos, corresponde al que postula que el flujo de protones hacia el medio intracelular se inhibe gracias a un gradiente quimioosmótico creado por la diferencia de potencial eléctrico entre el medio intracelular y el extracelular, separados por la membrana plasmática, que actúa como una membrana de intercambio iónico. Este mecanismo postula que en el medio intracelular los organismos acidófilos tienen un potencial eléctrico positivo, el cual se cree que es logrado gracias a un alto flujo de entrada de ion potasio y un potencial eléctrico negativo en el medio extracelular. Esta diferencia de potencial eléctrico reduciría el flujo de entrada de protones a las células (bacterias), actuando como una barrera quimioosmótica en contra del gradiente de concentración de protones ( $H^+$ ) (Baker-Austin & Dopson 2007).

La mayoría de las pilas de lixiviación operan con un pH entre 1,5 y 2,5. Este pH, es consecuencia del balance entre las reacciones de generación o consumo de ácido, las que se llevan a cabo dependiendo de la composición del mineral que se esté lixivando. Las reacciones de generación de ácido, son aquellas en que se oxida  $S^0$ , mientras que las reacciones de consumo de ácido son aquellas en que se oxida  $Fe^{+2}$  (ecuaciones 19 y 20 respectivamente) (Plumb et al. 2008).



Sin embargo, pese a la importancia y el conocimiento general que se tiene sobre la importancia del pH en las soluciones de biolixiviación, no existen muchos estudios que describan el efecto del pH sobre las tasas de oxidación de  $S^0$  y  $Fe^{+2}$  por microorganismos biolixiviantes.

Un estudio muestra que algunas cepas azufre oxidantes tienen diferentes rangos de pH óptimos para el crecimiento, por ejemplo, la *A. thiooxidans* (pH 1 – 3,5), la *A. caldus* (pH 1,5 – 2), y la *Acidianaunus brierleyi* (alrededor de pH 1). Es más, en este mismo estudio se obtiene, que no necesariamente un pH óptimo para la oxidación de azufre es necesariamente el óptimo del crecimiento del mismo microorganismo, aunque sí son cercanos (Plumb et al. 2008).

Por otro lado, el mismo estudio sugiere también que algunos microorganismos acidófilos y hierro oxidantes también poseen diferentes rangos de pH óptimo para la actividad hierrooxidativa: *L. ferriphilum* (pH 2,0) y *S. thermosulfidooxidans* (pH 1,5); sin embargo, en este estudio solo se realizan mediciones de la actividad microbiana y no del crecimiento microbiano, por lo que no se concluye respecto al crecimiento bacteriano, sino sólo

respecto a la actividad bacteriana, por esta razón tampoco es posible comparar con estudios previos de crecimiento bacteriano (Plumb et al. 2008).

### **1.8.3 Efecto de algunas sales y fuerza iónica sobre la actividad oxidativa de bacterias biolixiviantes**

Es en base al postulado de que la regulación del pH se realiza mediante un gradiente quimioosmótico que impide la entrada del flujo de protones, que cualquier adición de sales (adición de iones), podría afectar la actividad bacteriana de los organismos acidófilos. Esto debido a que cualquier modificación del potencial eléctrico del medio extracelular podría modificar esta barrera quimioosmótica haciendo que se vea perjudicado el gradiente de pH entre el medio intracelular de la bacteria y el medio extracelular.

Es en este ámbito, que se han encontrado algunos estudios que muestran el efecto de algunas sales sobre la actividad oxidativa de azufre de algunos microorganismos como es el caso del *A. thiooxidans* a pH 2,3, cuya actividad oxidativa de azufre se ve incrementada con concentraciones entre 10 y 50 mM de sales como el sulfato de sodio y sulfato de potasio e inhibida a concentraciones mayores. Sin embargo la actividad oxidativa de esta bacteria es afectada de manera distinta si se trata de sales fosfatadas: el fosfato de potasio por ejemplo a pH 2,3 incrementa la actividad oxidativa de azufre a concentraciones también entre 10 y 50 mM, pero el fosfato de sodio a las mismas concentraciones produce una actividad bacteriana siempre menor (Suzuki et al. 1999).

Así mismo, hay sales como el cloruro de potasio que a pH 2,3 incrementa la tasa de oxidación de azufre a concentraciones entre 10 y 50 mM, y otras como el cloruro de sodio que resulta inhibidora a concentraciones tan bajas como 10 mM y activante de la tasa de oxidación de azufre a concentraciones de 50 o 100 mM. Siendo el cloruro de litio la sal más inhibidora, pues inhibe la actividad oxidativa de azufre a partir de una concentración de 10 mM. (Suzuki et al. 1999).

Sin embargo, no se han encontrado estudios de inhibición bacteriana con sales en *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.

## **2 Motivación y Justificación del proyecto**

Dada la creciente demanda de fertilizantes cuyo principal insumo corresponde al ácido fosfórico y cuya obtención, mediante vía húmeda, requiere grandes cantidades de ácido sulfúrico, ácido bien conocido por los altos costos de producción que involucra, surge la biolixiviación como una alternativa para su utilización en la minería de los fosfatos.

Es en este contexto en que se enmarca el presente trabajo, solicitado por la empresa minera brasilera VALE S.A. Este trabajo pretende contribuir al estudio de factibilidad técnica de la aplicación de la biolixiviación de minerales fosfatados.

Este estudio tiene la finalidad de generar herramientas para el diseño del proceso de biolixiviación de fosfatos. Específicamente, se busca aportar en la determinación, a mediano plazo, respecto a realizar o no, la oxidación de azufre y producción de ácido por las bacterias, en un mismo reactor y en forma simultánea que la lixiviación del mineral fosfatado.

Particularmente, en este trabajo se busca determinar los efectos inhibitorios que puedan presentar algunos de los iones más abundantes en una solución de lixiviación química de una muestra de mineral fosfatado, sobre el crecimiento y actividad de la cepa *Sulfo bacillus thermosulfidooxidans*. La solución de lixiviación se obtiene como producto de la solubilización con ácido de los compuestos y sales que forman parte del mineral fosfatado.

Este trabajo será también de gran importancia en el caso que, en una futura biolixiviación fosfatos se recircularan las soluciones de lixiviación (circuito cerrado). De esta forma se produciría un aumento cada vez mayor de la concentración de iones, hasta llegar al punto de saturación. Punto en que sería de gran utilidad conocer el grado de toxicidad que representan las diferentes concentraciones alcanzadas, de los diversos iones.

## **3 Objetivos**

### **3.1 Objetivo general**

Identificar iones u otros compuestos tóxicos contenidos en la solución obtenida de la lixiviación química de una muestra de mineral fosfatado. Y determinar la concentración crítica a la que alguno de ellos afecte la actividad oxidativa de azufre de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* y su velocidad de crecimiento.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Definir la metodología experimental para estudiar el efecto inhibitorio de algunos de los iones presentes en la solución lixivante de alguna de las muestras de mineral fosfatado.
- Identificar iones que puedan ser tóxicos para la actividad y/o crecimiento de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.
- Determinar concentración crítica de ion sulfato que afecta la actividad y crecimiento de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.
- Cuantificar la disminución de la actividad bacteriana con las distintas concentraciones de ion sulfato.
- Determinar la velocidad de máximo crecimiento microbiano en los medios con distintas concentraciones de ion sulfato.

Todo lo anterior con el objeto mayor, de aportar en la selección de la metodología para la biolixiviación de minerales fosfatados.

## 4 Metodología Experimental

Para realizar este estudio se realizan experimentos de biooxidación de azufre con cultivos de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, cepa bacteriana que es proporcionada por el laboratorio de biohidrometalurgia de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

Se hacen previamente cultivos bacterianos iniciales y se monitorea su crecimiento, para generar una población inicial de bacterias con la cual inocular todos los ensayos posteriores, siempre en condiciones de esterilidad adecuadas.

Es necesario, para los cultivos iniciales y en menor medida para los experimentos de actividad bacteriana, preparar en forma periódica el medio de cultivo basal ( $0,4 \text{ [g/L]} (NH_4)_2SO_4$ ;  $0,4 \text{ [g/L]} MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ;  $0,056 \text{ [g/L]} K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ) ajustado a pH 2,3 con ácido sulfúrico, solución de extracto de levadura (1%) y las perlas de azufre elemental de 1,4 mm de diámetro, cuyo procedimiento se adjunta en el anexo 9.2 dado que no se llevó a cabo personalmente. Además fue necesaria la recurrente esterilización de agua destilada y del medio de cultivo basal.

### 4.1 Diseño Experimental

Con el fin de estudiar el efecto de los diversos iones presentes en una muestra de mineral fosfatado se realizan 3 experimentos con diferentes medios de cultivo.

En el primer experimento, se utiliza como medio de cultivo una solución lixivante preparada previamente, a partir de la lixiviación química de una muestra de mineral fosfatado, ajustada a 3 pH distintos.

El segundo experimento se realiza utilizando medio de cultivo basal con altas concentraciones de ion sulfato adicionado en forma de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ), con el fin de dilucidar si es esta alta concentración, encontrada en la solución lixivante del primer experimento, la responsable de la inhibición bacteriana.

Finalmente, se realiza un tercer experimento con el fin de encontrar la concentración crítica de este ion, a la cual comienza a ser afectada la actividad bacteriana.

#### 4.1.1 Lixiviación química

La lixiviación química consiste en someter el mineral fosfatado al contacto directo con una solución de ácido sulfúrico, produciéndose la disolución de un conjunto de iones.

## Materiales y equipos

- 100 g muestra mineral fosfatado (Muestra N° 19, proporcionada por VALE S.A.)
- 1 L de solución de  $H_2SO_4$  (ácido sulfúrico) Merck al 5%
- Agitador mecánico
- Equipo de filtración Embudo Busner Kitazato, papel filtro y bomba de vacío.

## Procedimiento

- Se contacta el mineral con la solución de ácido sulfúrico al 5% durante 3 horas en un vaso precipitado con agitación.
- Al terminar las 3 horas se procede a filtrar la solución espesa (barro) obtenida, con filtro papel, que no retiene sulfatos.

Una vez finalizada la lixiviación química se solicita un análisis del contenido y concentración de iones de la solución obtenida de esta lixiviación química, en adelante también llamado lixiviado.

### **4.1.2 Inoculación y colonización de perlas de azufre elemental con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.**

Se preparan numerosos cultivos, con el fin de utilizarlos cuando la superficie de las perlas se encuentre colonizada con las bacterias y así estudiar el efecto de los iones disueltos en la solución lixivante sobre la actividad oxidativa de las bacterias adheridas a dichas perlas.

## Materiales y equipos

- Matraces Erlenmeyer de 120 [ml]
- 44 [ml] Medio de cultivo basal con pH 2,3, para cada matraz.
- 1,5 [g] Perlas de azufre elemental de 1,4 [mm] de diámetro, para cada matraz.
- 1 [ml] Extracto de levadura al 1%, para cada matraz.
- 5 [ml] de un inóculo de un cultivo antiguo, para cada matraz
- Agitador rotatorio/incubadora de matraces (Shaker) Thermo Scientific Equilab, Max 4000

## Procedimiento

- Como primer paso, las perlas de azufre son esterilizadas por calor ( $T^\circ = 100^\circ C$ ) y sin presión durante 30 [min] en medio de cultivo basal no estéril y luego de 24 horas se repite el mismo procedimiento, con el fin de eliminar posibles esporas existentes en las perlas.
- Luego, se agregan 44 [ml] de medio de cultivo basal y 1 [ml] de extracto de levadura a todos los matraces.
- A continuación se inoculan todos los matraces, incorporando 5 [ml] del cultivo viejo (con pH entre 1,7 y 1,3) a cada uno de ellos.

- Finalmente, se incuban a 45 [°C] con agitación a 200 rpm.
- Se realiza un seguimiento del pH en el tiempo y cuando éste llega a 1,3 aproximadamente (dada la producción de ácido sulfúrico por parte de las bacterias) se realiza un cambio de medio, para evitar la inhibición de la actividad oxidativa de azufre por efecto del pH muy bajo.
- El paso anterior se repite unas 2 o 3 veces, con el fin de asegurarse que las perlas se encuentren lo suficientemente colonizadas por las bacterias.

#### **4.1.3 Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en soluciones de lixiviación química ajustada a diferentes pH**

En este primer experimento se utilizan, 8 matraces con perlas colonizadas por la cepa *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, se utilizan 2 controles con medio de cultivo basal y los demás utilizan como medio de cultivo el lixiviado obtenido previamente, obtenida con anterioridad ajustada a 3 diferentes pH.

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

- 8 matraces Erlenmeyer de 120 [ml] con perlas colonizadas por las bacterias
- Solución obtenida de la lixiviación química (o lixiviado)
- *KOH* Merck en perlas y en solución al 57%
- Medio de cultivo basal y extracto de levadura al 1%
- Nutrientes del medio de cultivo basal
- Agitador rotatorio/incubadora de matraces (Shaker) Thermo Scientific Equilab, Max 4000

##### **Procedimiento**

- Se preparan los medios de cultivo experimentales utilizando el lixiviado obtenido con anterioridad, adicionándoles los nutrientes del medio de cultivo basal y el extracto de levadura y ajustando el pH a 1,4; 1,8 y 2,03, agregando hidróxido de potasio (*KOH*).
- Como consecuencia de esta disminución del pH, se obtiene un precipitado en todos los medios experimentales, el cual se descarta. Se utiliza el sobrenadante como medio de cultivo experimental.
- Se realiza un análisis químico del contenido de los iones más abundantes en el lixiviado antes y después de la precipitación (de cada uno de los medios experimentales: a pH 2,03; 1,8 y 1,4).
- Se elimina el medio de cultivo basal antiguo de los 8 matraces y se cambia por:  
Control1: Medio de cultivo basal a pH 2,3  
Control 2: Medio de cultivo basal a pH 2,3  
A1: Medio de cultivo experimental a pH 2,03  
A2: Medio de cultivo experimental a pH 2,03

- B1: Medio de cultivo experimental a pH 1,8  
 B2: Medio de cultivo experimental a pH 1,8  
 C1: Medio de cultivo experimental a pH 1,4  
 C2: Medio de cultivo experimental a pH 1,4
- Luego, se incuban a 45 [°C] , con agitación a 200 rpm.
  - Periódicamente se toman 4 [ml] de muestra de cada uno de los matraces, para el monitoreo de la actividad bacteriana; de los que se utilizan 2 [ml] para la medición de pH, que luego son usados para la medición de la concentración de ácido sulfúrico (1 [ml]) y la determinación de la concentración de ion sulfato (1 [ml] control y 0,100 [ml] experimentos A, B y C). Los restantes 2 [ml] se usan para el recuento de células en suspensión con el marcador fluorescente DAPI.

#### **4.1.4 Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en medios de cultivo basales con variadas concentraciones de $K_2SO_4$**

Con este estudio se desea obtener la concentración crítica de ion sulfato que comienza a tener un efecto inhibitorio en la actividad oxidativa de azufre de las bacterias. Primero se realiza un estudio con concentraciones altas de esta sal ( $K_2SO_4$ ), cercanas a la concentración existente en la solución lixivante. Y finalmente se hace el mismo estudio a concentraciones bajas de la misma sal, cercanas a la concentración de este ion en el medio de cultivo basal.

##### **4.1.4.1 Altas Concentraciones: Cercanas a la concentración de ion sulfato en la solución obtenida de la lixiviación química**

Materiales y equipos

- 9 matraces Erlenmeyer de 120 [ml] con perlas colonizadas por las bacterias
- Medio de cultivo basal a pH 2,3 estéril y extracto de levadura al 1 %
- $K_2SO_4$  Merck
- Agitador rotatorio/incubadora de matraces (Shaker) Thermo Scientific Equilab, Max 4000

Procedimiento

- Se prepara un concentrado de 70 [ $g/L$ ] de  $K_2SO_4$  en medio de cultivo basal a pH 2,3: Agregando 36,67 [g] de  $K_2SO_4$  a 286 [ml] de medio de cultivo basal.
- Se prepara una solución de 50 [ $g/L$ ] de  $K_2SO_4$  en medio de cultivo basal: Agregando 35,7 [ml] del concentrado de 70 [ $g/L$ ] de  $K_2SO_4$  y 13,3 [ml] de medio de cultivo basal a pH 2,3.

- Se prepara una solución de 30 [g/L] de  $K_2SO_4$  en medio de cultivo basal: Agregando 21,4 [ml] del concentrado de 70 [g/L] de  $K_2SO_4$  y 27,6 [ml] de medio de cultivo basal a pH 2,3.
- Se prepara una solución de 20 [g/L] de  $K_2SO_4$  en medio de cultivo basal: Agregando 14,3 [ml] del concentrado de 70 [g/L] de  $K_2SO_4$  y 34,7 [ml] de medio de cultivo basal a pH 2,3.
- Todos los cultivos experimentales se preparan en duplicado y se les agrega igual que al control (que contiene solo medio de cultivo basal), 1 [ml] de extracto de levadura.
- Luego, todos los matraces en duplicado se incuban a 45 [°C], con agitación a 200 rpm.
- Periódicamente se toman 5 [ml] de muestra de cada uno de los matraces, para el monitoreo de la actividad bacteriana; de los que se utilizan 3 [ml] para la medición de pH y luego para la medición de ácido sulfúrico (2 [ml]) y determinación de ion sulfato (1 [ml] control y 0,100 [ml] medios experimentales). Los restantes 2 [ml] se utilizan para el recuento de células en suspensión con el marcador fluorescente DAPI.

#### **4.1.4.2 Bajas Concentraciones: Cercanas a la concentración de ion sulfato en el medio basal**

##### Materiales y equipos

- 16 matraces Erlenmeyer de 120 [ml] con perlas colonizadas por las bacterias
- Medio de cultivo basal y extracto de levadura al 1%
- $K_2SO_4$  Merck
- $H_2SO_4$  Merck
- Agitador rotatorio/incubadora de matraces (Shaker) Thermo Scientific Equilab, Max 4000

##### Procedimiento

- Se prepara cada medio de cultivo experimental con distinta concentración de sulfato de potasio por separado, agregando al medio de cultivo basal :  
 Control: 150 [ml] Medio de cultivo basal  
 2 [g/L]: 150 [ml] Medio de cultivo basal + 0,55 [g] de  $K_2SO_4$   
 5 [g/L]: 150 [ml] Medio de cultivo basal + 1,38 [g] de  $K_2SO_4$   
 7 [g/L]: 150 [ml] Medio de cultivo basal + 1,93 [g] de  $K_2SO_4$   
 10 [g/L]: 150 [ml] Medio de cultivo basal + 2,75 [g] de  $K_2SO_4$   
 12 [g/L]: 150 [ml] Medio de cultivo basal + 3,30 [g] de  $K_2SO_4$   
 15 [g/L]: 150 [ml] Medio de cultivo basal + 4,13 [g] de  $K_2SO_4$

- 20 [g/L]: 150 [ml] Medio de cultivo basal + 5,50 [g] de  $K_2SO_4$
- Se Ajusta el pH de cada una de las soluciones con gotas de ácido sulfúrico a 2,3
  - Luego, todas las soluciones se esterilizan por calor y presión.
  - A continuación, los medios de cultivos preparados con distintas concentraciones de sulfato de potasio, se distribuyen en los matraces en duplicado (49 [ml] en cada matraz) y se les agrega 1 [ml] de extracto de levadura a todos los matraces, incluidos los controles.
  - Finalmente, se incuban todos los matraces a 45 [°C] , con agitación a 200 rpm,
  - Periódicamente se toman 7 o 5 [ml] de muestra de cada uno de los matraces, para el monitoreo de la actividad bacteriana; de los que se utilizan 5 o 3 [ml] para la medición de pH y luego para la medición de ácido sulfúrico (4 o 2 [ml]) y determinación de ion sulfato (1 [ml] control y 0,100 [ml] medios experimentales). Los restantes 2 [ml] se utilizan para el recuento de células en suspensión con tinción DAPI.

#### 4.1.5 Estudio preliminar de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en medios basales con 12 [g/L] de ion $PO_4^{-3}$

Dada la alta concentración de ion fosfato que se obtiene del análisis químico de la solución lixivante, se realiza un estudio en medio basal con la misma concentración de este ion (12 [g/L]). Esta experiencia tiene como objetivo saber si en la solución lixiviantes la concentración de ion fosfato es o no inhibitoria para los microorganismos (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*).

##### Materiales y equipos

- 1 matraz Erlenmeyer con perlas colonizadas por las bacterias
- Medio de cultivo basal y extracto de levadura al 1%
- $H_3PO_4$  Merck
- Agitador rotatorio/incubadora de matraces (Shaker) Thermo Scientific Equilab, Max 4000

##### Procedimiento

- Se prepara el medio experimental agregando a 100 [ml] de medio de cultivo basal, sin ajuste de pH, 0,852 [ml] de  $H_3PO_4$  cuya densidad es 1,710 [g/L].
- Luego se realiza el ajuste de pH a 2,3 con  $KOH$  en perlas.
- Finalmente se incuba a 45 [°C], con agitación a 200 rpm.
- Periódicamente se toman 2 ml de muestra, para monitorear el pH.

## 4.2 Análisis Químicos y Biológicos

La actividad bacteriana se monitorea realizando tres análisis químicos distintos, Medición de pH, determinación de la concentración de ion sulfato y medición de la concentración de ácido sulfúrico. Por otro lado, el seguimiento del crecimiento bacteriano se realiza por recuento de células en suspensión mediante el marcador fluorescente DAPI.

### 4.2.1 Medición de pH

Materiales y Equipos:

- Medidor de pH Jenco Electronics, modelo 1671
- Electrodo de Ag/ AgCl
- Tubo de plástico (10 [ml])

Procedimiento:

- Se saca una muestra de 2 [ml] y se coloca en un tubo de plástico de 10 [ml]
- Se mide el pH, colocando el electrodo dentro del tubo durante unos 15 segundos.
- El electrodo se lava con agua destilada antes y después de medir pH.
- Finalmente, el electrodo se coloca en una solución de mantención de *KCl* 3M

### 4.2.2 Determinación de la concentración de ion sulfato ( $SO_4^{-2}$ ) en solución por turbidimetría

Materiales y equipos:

- $BaCl_2 \times 2H_2O$  Merck
- Solución de Cloruro de sodio (*NaCl*) 240 [g/L] y *HCl* al 0,3% con agua desionizada
- Glicerina 1: 1 con agua desionizada.
- Agua desionizada.
- Espectrofotómetro UV-visible. Weisser analítica Agilent 8453.

Procedimiento:

a) *Para altas concentraciones de ion sulfato:*

- En un matraz aforado de 100 [ml] agregar 0,100 [ml] de la muestra.
- Agregar 10 [ml] de glicerina 1:1. Agitar
- Agregar 5 [ml] de *NaCl* 240 [g/L]. Agitar
- Aforar a 100 [ml] con agua desionizada. Agitar
- Agregar 0,3 [g] de  $BaCl_2$

b) *Para bajas concentraciones de ion sulfato:*

- En un matraz aforado de 25 [ml] agregar 1 [ml] de la muestra.

- Agregar 2,5 [ml] de glicerina 1:1. Agitar
- Agregar 1,25 [ml] de  $NaCl$  240 [g/L]. Agitar
- Aforar a 25 [ml] con agua desionizada. Agitar
- Agregar 0,075 [g] de  $BaCl_2 \times H_2O_2$

Luego, agitar durante un minuto y medir concentración en espectrofotómetro UV-visible a 500 [nm] contra blanco. Esta medición se realiza unas cuatro veces y se calcula el promedio, esto debido a la poca precisión y gran variabilidad de las mediciones, sobre todo a altas concentraciones.

Debido a la problemática anteriormente mencionada y al tiempo que requiere este método, se utiliza otra metodología para las mediciones de ion sulfato en el estudio a bajas concentraciones. Esta nueva metodología posee una curva de calibración de fábrica entre los 0 y 50 [ $mg/L$ ] de ion sulfato, por lo que se debe estimar una concentración de ion sulfato para las distintas muestras y utilizar un factor de dilución adecuado, para que la concentración obtenida se encuentre dentro del rango de medición.

#### Materiales y Equipos

- Espectrofotómetro HACH, modelo DR2000
- 2 Celdas de 25 ml
- Reactivo en polvo SulfaVer 4

#### Procedimiento

- Para comenzar las mediciones se debe introducir el número del procedimiento preprogramado para ion sulfato: 680.
- Se gira la perilla del costado derecho para elegir la longitud de onda para medir, que en este caso es de 450 [nm].
- Se llena una celda con 25 [ml] de la muestra ya diluida y agregar el contenido de un sobre de reactivo SulfaVer 4 a la celda de muestra y luego se presiona en el equipo el botón *Shift Timer*.
- Comenzará a correr el tiempo de un temporizador programado con 5 minutos, tiempo necesario para que la reacción y la formación del complejo de bario y sulfato se lleve a cabo.
- Cuando el tiempo se acabe, se llena la otra celda con 25 [ml] de la muestra, esta celda servirá como blanco.
- A continuación se coloca la celda con el blanco en el portacelda del equipo y se cierra la tapa contra luz, luego presionar el botón *Zero*.
- Rápidamente cambiar la celda del blanco por la celda con la muestra y el reactivo SulfaVer 4. Luego presionar el botón *Read/Enter*. El resultado de la medición aparecerá en la pantalla en [ $mg/L$ ] o lo que es lo mismo [ppm].

El principio teórico que rige este método, es exactamente el mismo que se utiliza en el primer procedimiento, pues los iones sulfato reaccionan con los iones de bario, formando un precipitado de sulfato de bario, cuya turbidez es proporcional a la concentración de sulfato.

#### **4.2.3 Medición de la concentración de ácido sulfúrico ( $H^+$ ) por titulación**

Materiales y Equipos:

- Bureta
- Hidróxido de sodio ( $NaOH$ ) 0,1 N o 0,01 N Merck
- Agua destilada
- Colorante anaranjado de metilo
- Vasos precipitados de 100 [ml] (o 200 [ml])
- Soporte para bureta
- Agitador magnético y magnetos

Procedimiento:

a) *Para muestras con pH bajo 2:*

- En el vaso precipitado, agregar 49,5 [ml] (o 99 [ml]) de agua destilada.
- Agregar 0,5 [ml] (o 1 [ml]) de muestra.
- Agregar 3 gotas del colorante anaranjado de metilo, colocar un magneto y agitar la muestra.
- Llenar la bureta hasta el punto 0 (cero), con hidróxido de sodio 0,1 N y colocarla en el soporte.
- Agregar una gota de hidróxido de sodio a la vez, al vaso, hasta apreciar un cambio de color (de rosado a amarillo).

b) *Para muestras con pH sobre 2:*

- En el vaso precipitado, agregar 49 [ml] de agua destilada.
- Agregar 1 [ml] de muestra.
- Agregar 3 gotas del colorante fenolftaleina, colocar un magneto y agitar la muestra.
- Llenar la bureta hasta el punto 0 (cero), con hidróxido de sodio 0,01 N y colocarla en el soporte.
- Agregar una gota de hidróxido de sodio a la vez, al vaso, hasta apreciar un cambio de color (de incoloro a violeta).

Anotar el volumen de hidróxido de sodio en la bureta correspondiente a ese punto.

Agregar una gota más de hidróxido de sodio, si no cambia el color, el valor anterior corresponde al volumen de titulación, de lo contrario anotar el nuevo valor. Se repite este procedimiento hasta que no se observe cambio de color en la mezcla.

Finalmente, se calcula la concentración de ácido sulfúrico y la concentración de protones en solución como sigue:

$$Molaridad_{H_2SO_4} = \frac{Molaridad_{NaOH} \cdot Volumen_{NaOH}}{Volumen_{H_2SO_4}} \quad (Ec. 21)$$

$$Concentración \left[ \frac{g}{L} \right]_{H_2SO_4} = Molaridad_{H_2SO_4} \cdot Peso \text{ Molecular}_{H_2SO_4} \quad (Ec. 22)$$

#### 4.2.4 Recuento del número de células en suspensión con marcador fluorescente DAPI

Materiales y equipos

- Filtro de membrana de policarbonato blanco Milipore, tipo GTTP de poro 0,2  $\mu m$ , y de 47mm de diámetro
- Equipo de filtración
- Formaldehído al 37%  $v/v$
- Tinción DAPI
- Reactivo Mountant
- Microscopio de epifluorescencia Zeiss Modelo AxioLab A1

Procedimiento

- **Preparación de la muestra:** luego de sacar las muestras de los matraces (2 [ml]), se coloca en un vaso precipitado de 20 ml y se agrega la cantidad suficiente de formaldehído para lograr una concentración final del 4%. Esto con el objetivo de fijar las células. A continuación, se congelan durante un mínimo de 2 horas. Luego se descongelan a temperatura ambiente y se filtran al vacío con un filtro de membrana de policarbonato blanco. El filtro debe guardarse en una placa Petri envuelta en alusa foil, en el congelador.
- **Recuento de células:** Se descongelan las placas Petri con los filtros a temperatura ambiente, se cortan pequeños cuadrados de la parte central del filtro, con una longitud por lado de no más de 0,6 [cm]. Estos cuadrados se colocan en una segunda placa; mientras que la primera se guarda con los restos del filtro y envuelta en alusa foil. A cada uno de los pequeños cuadrados se les agrega 20 [ $\mu l$ ] del marcador fluorescente DAPI, luego se colocan sobre un portaobjeto y se les agrega una gota del reactivo Mountant. Se tapan con el cubreobjeto y finalmente se aplica una gota de aceite de cedro sobre el cubreobjeto, pues se utiliza un lente de inmersión.
- Se observa al microscopio de fluorescencia con un lente objetivo de 100x, y se procede a contar las células utilizando la celdilla ubicada en el lente ocular, la cual

está dividida en 100 cuadrados de  $1 [mm^2]$ . Las bacterias fluorescen debido a que el marcador DAPI se adhiere al DNA circular de las bacterias fijadas.

- **Cálculo del número de células por ml:** El número de bacterias por cuadrado se cuenta en al menos 4 cuadrillos diferentes y en distintas regiones del cuadrado del filtro, con éstas se hace un promedio y se calcula proporcionalmente el número de bacterias que habrían en el área total de la celdilla del microscopio y luego en el área total del filtro.

$$N^{\circ} \text{ cel. prom. celdilla} = N^{\circ} \text{ cel. prom} \cdot 100 [mm^2] \quad (\text{Ec. 23})$$

$$N^{\circ} \text{ cel prom. filtro} = \frac{N^{\circ} \text{ cel. prom. celdilla} \cdot \text{Área del filtro}}{100 [mm^2]} \quad (\text{Ec. 24})$$

Finalmente, se calcula el número de bacterias por ml, a partir del volumen de la muestra que se filtró, cuyo número de bacterias corresponde al número de bacterias que habrían en el filtro.

$$N^{\circ} \text{ cel. prom. final} = \frac{N^{\circ} \text{ cel prom. filtro}}{2 [ml]} \quad (\text{Ec. 25})$$

## 5 Resultados

### 5.1 Lixiviación química

Luego de la lixiviación química de la muestra de mineral (Muestra N° 19), perteneciente a la empresa minera VALE S.A., se procede a filtrar el barro obtenido y se obtiene la solución de lixiviación, también llamado lixiviado en la extensión de este trabajo. Además se realiza un análisis químico para conocer la concentración en que se encuentran algunos de los iones más comunes en las soluciones de lixiviación. Este análisis fue realizado por la empresa Cesmec S.A. cuyo resultado se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3: Contenido de iones del lixiviado**

Iones	Concentración [ppm]
<b>Aluminio (<math>Al^{+3}</math>)</b>	<b>594</b>
Arsénico ( $As^{+3}$ )	0,028
<b>Calcio (<math>Ca^{+2}</math>)</b>	<b>786</b>
Cloruro ( $Cl^{-}$ )	32,5
Cobalto ( $Co^{+3}$ )	0,21
Cobre ( $Cu^{+2}$ )	1
Fluoruro ( $F^{-}$ )	0,93
<b>Fosfato (<math>PO_4^{-3}</math>)</b>	<b>13,9 [g/L]</b>
Fósforo ( $P^{-3}$ )	51,1
<b>Hierro (<math>Fe^{+3}</math>)</b>	<b>318</b>
Magnesio ( $Mg^{+2}$ )	10,9
Manganeso ( $Mn^{+2}$ )	20,5
Níquel ( $Ni^{+3}$ )	0,40
Potasio ( $K^{+}$ )	14,3
Sodio ( $Na^{+}$ )	15,2
Sulfato ( $SO_4^{-2}$ )	70,9
Zinc ( $Zn^{+2}$ )	1,3

Es destacable de este resultado, que el consumo de ácido no es lo suficientemente alto al cabo de las tres horas como para elevar el pH a una concentración mínima detectable por el sensor de pH. Esto podría explicarse por la formación de ácido fosfórico, a partir de la reacción entre el mineral fosfatado ( $Ca_5(PO_4)_3$ ) y el ácido sulfúrico.

## 5.2 Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en soluciones de lixiviación química ajustadas a diferentes pH.

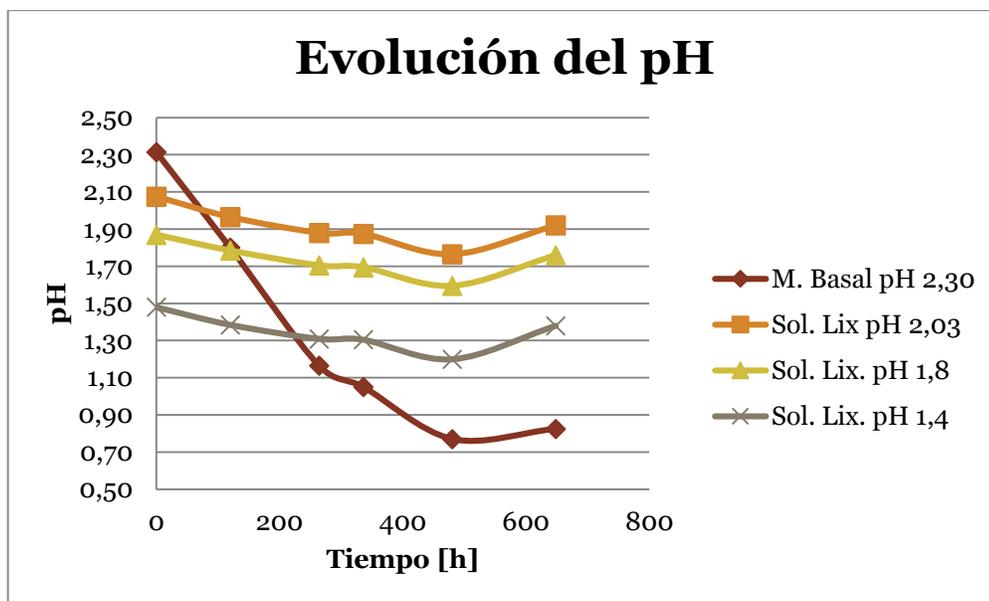
La solución obtenida luego de la lixiviación química (lixiviado), por su naturaleza en extremo ácida, no es adecuada para utilizarla directamente como medio basal para el estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias. Por otro lado, considerando que la mayor parte de las pilas de biolixiviación trabajan en un rango de pH entre 1,4 y 2,5, es que se decide como primer experimento ajustar el pH de esta solución, a 3 diferentes pH dentro de éste rango: 1,4; 1,8 y 2,03. Sin embargo, producto del ajuste de pH realizado en los diferentes medios se forma un precipitado, el cual es descartado. Esto se realizó teniendo en cuenta que a los diferentes pH a los que podría trabajar una pila de biolixiviación, sería naturalmente distinta la concentración de iones disueltos, y estaría representada por la concentración que se alcance en el sobrenadante de las soluciones que se utilizan en este trabajo.

En la Tabla 4 se muestra el contenido de los iones más abundantes en el lixiviado de la muestra de mineral fosfatado con la que se trabajó en este estudio, antes y después del ajuste de pH, acción que produjo la formación del precipitado.

**Tabla 4: Composición de los medios experimentales antes y después de la precipitación. Para los diferentes pH se obtuvieron precipitados de diferente composición.**

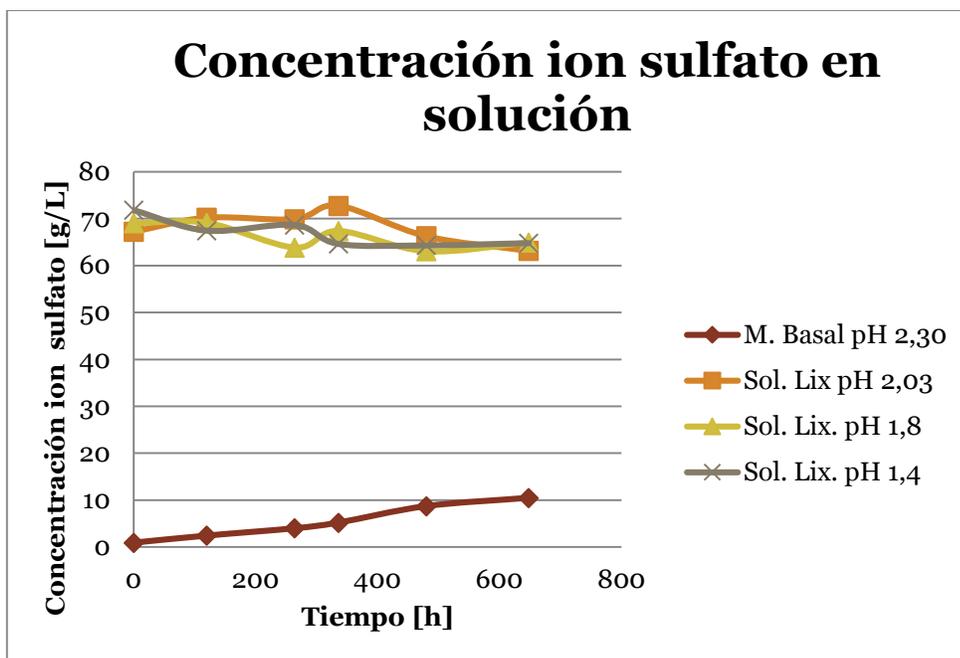
	Muestra	$Al^{+3}$ [ppm]	$Fe^{+3}$ [ppm]	$Ca^{+2}$ [ppm]	$PO_4^{-3}$ [g/L]
<b>Inicial</b>	-	486	241	728	13,90
	pH 1,4	454	175	190	13,13
<b>Final</b>	pH 1,8	436	52	205	12,18
	pH 2,03	432	34	250	12,62

Los resultados de la actividad bacteriana en las tres soluciones, obtenidas de la lixiviación química y ajustadas a tres pH distintos se muestran en cuatro gráficos: primero, un gráfico que muestra la evolución del pH en el tiempo, cuyo decrecimiento es uno de los indicadores más generales y usados de la existencia de actividad oxidativa de azufre por parte de las bacterias, producto de la generación de ácido sulfúrico (Figura 10). Luego, se muestran tres gráficos que cuantifican la actividad biooxidativa de azufre, el primero, de la concentración de ion sulfato en el tiempo (Figura 11), el segundo de la concentración de ácido sulfúrico en el tiempo (Figura 12) y finalmente un gráfico que muestra la generación de ácido en el tiempo (Figura 13). Finalmente, se presenta un gráfico del crecimiento bacteriano monitoreado por recuento de células con el marcador fluorescente DAPI (Figura 14).



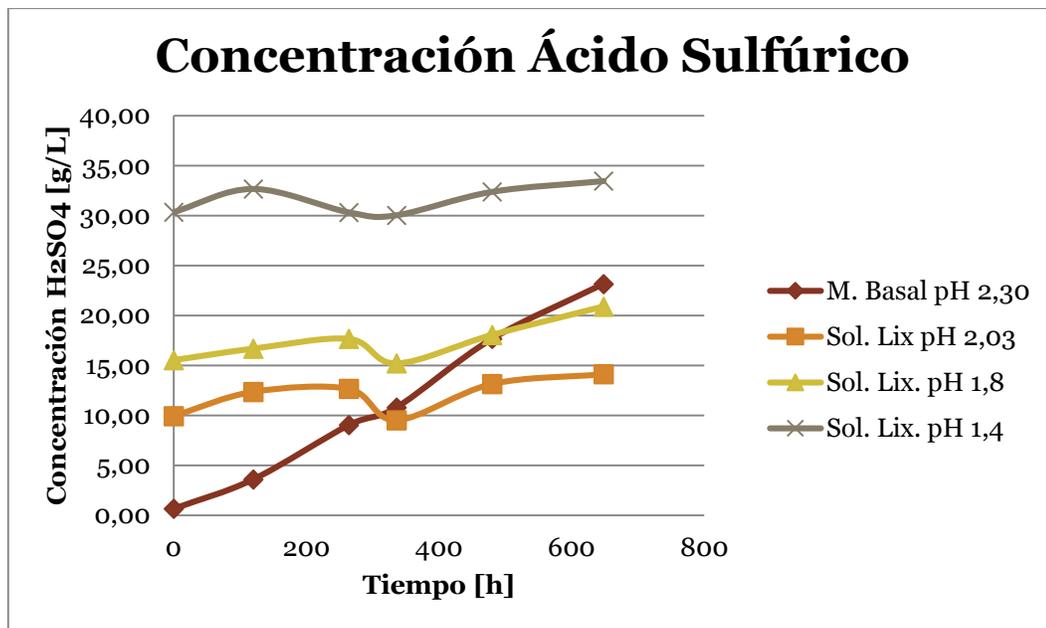
**Figura 10: Evolución del pH en el tiempo de cultivos microbianos en soluciones de lixiviación ajustadas a tres pH diferentes (1,4; 1,8 y 2,03) y control en medio basal a pH 2,3. Todos los experimentos fueron realizados en duplicado.**

Como se puede ver en la Figura 10, ninguno de los cultivos en las soluciones de lixiviación, presenta una tendencia a la disminución del pH tan pronunciada, como es el caso del experimento control, cultivado en medio basal a pH 2,30. Aunque los cultivos en medios experimentales, a partir de la solución de lixiviación, presentan una leve tendencia a disminuir, es difícil interpretarla como producto de la generación de ácido por parte de las bacterias. Cabe mencionar que todos los cultivos presentan un alza en el pH a las 648 horas, la que podría interpretarse como un efecto inhibitorio del crecimiento y actividad de las bacterias producto de la acumulación de metabolitos o de incluso una alta concentración del ácido (principal producto de la oxidación de azufre). Pero dado que se presenta en todos los cultivos, incluso en los cultivos en que el pH a esa altura del experimento solo llegó a un mínimo de 1,92; cabe la posibilidad de que haya sido efecto de la descalibración del sensor de pH.



**Figura 11: Concentración de ion sulfato en el tiempo, de los tres cultivos en soluciones de lixiviación a diferentes pH y del control en medio basal y pH 2,3. Todos los experimentos fueron realizados en duplicado.**

La Figura 11, muestra la concentración de ion sulfato en el tiempo, donde se observa que el control (cultivo en medio basal a pH 2,3) alrededor de las 500 horas alcanza una concentración de aproximadamente  $10 \text{ [g/L]}$ . Mientras que los cultivos en el lixiviado del mineral fosfatado tienen una concentración de ion sulfato muy alta y relativamente constante, de aproximadamente  $70 \text{ [g/L]}$ . Este resultado sugiere que el crecimiento y también la actividad bacteriana podrían estar inhibidos por efecto de la alta concentración de este ion.



**Figura 12: Concentración de ácido sulfúrico en el tiempo, de cultivos en soluciones de lixiviación a tres pH diferentes y el cultivo control en medio basal a pH 2,3. Todos los experimentos fueron realizados en duplicado.**

Consecuentemente con el gráfico de concentración de ion sulfato, el gráfico de la Figura 12 de la concentración de ácido sulfúrico en el tiempo, muestra que en los cultivos en medio basal existen claras señales de la generación de este ácido por parte de las bacterias. Sin embargo, este gráfico muestra una curva de concentración de ácido sulfúrico bastante diferente para las bacterias cultivadas en los medios realizados a base de la solución de lixiviación. Los medios a base del lixiviado del mineral fosfatado con menor pH inicial (pH 1,4) muestran que la concentración tiene una concentración inicial mayor de ácido sulfúrico que las demás, pues se le agrega menos hidróxido de potasio para elevar el pH a 1,4, que al resto de los medios experimentales. Esto se debe a que el hidróxido de potasio neutraliza el ácido sulfúrico existente en el lixiviado, cuya concentración hay que recordar, era de 5 %  $[V/V]$  o 50  $[g/L]$  antes de la lixiviación. De la misma forma, los medios experimentales con pH inicial 1,8, muestran una mayor concentración de ácido sulfúrico inicial que las soluciones con pH inicial 2,03 y que el control. Por otro lado, todos los cultivos en medios realizados a partir del lixiviado, presentan una leve tendencia a subir.

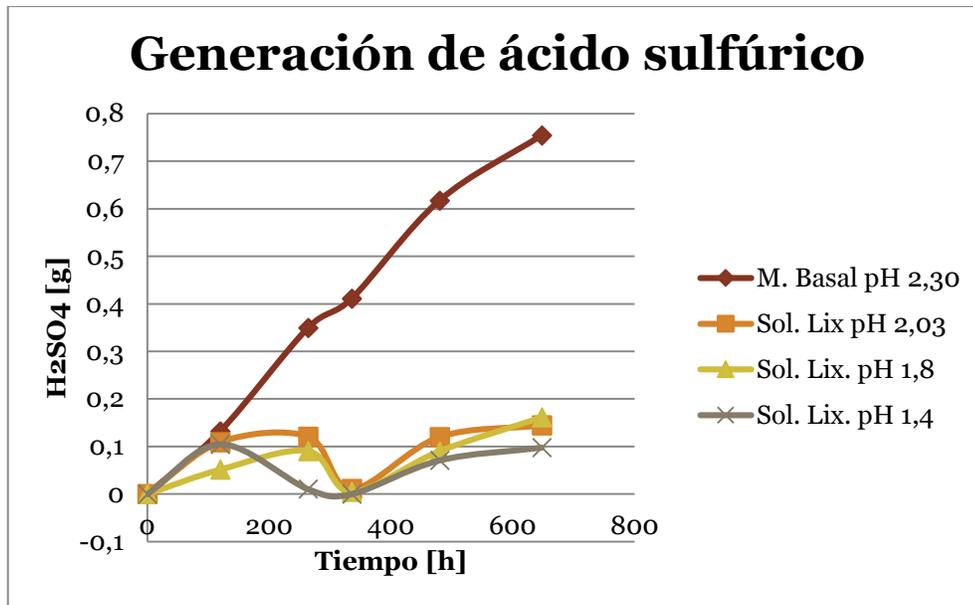


Figura 13: Curva de masa de ácido sulfúrico generado en el transcurso del tiempo.

Por otro lado, la Figura 13 muestra la generación en masa de ácido sulfúrico. En esta figura se puede apreciar que las curvas de generación de ácido para los medios con solución de lixiviación, no generan ni una cuarta parte del ácido que genera el cultivo en medio basal.

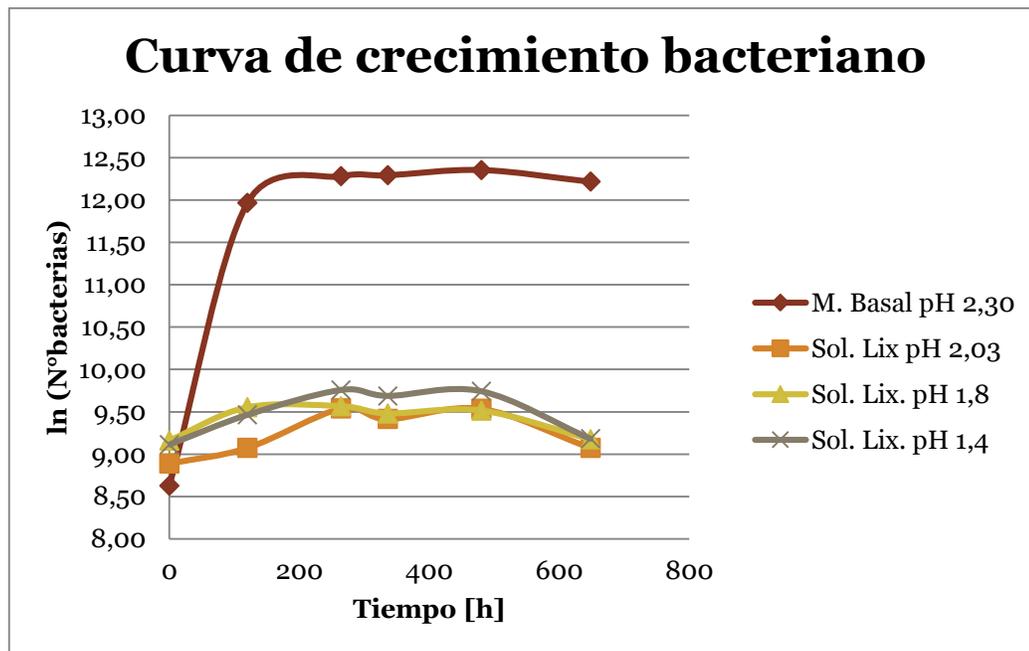


Figura 14: Curvas de crecimiento bacteriano de los cultivos en la solución de lixiviación ajustada a diferentes pH

En la Figura 14, se puede apreciar la velocidad de crecimiento bacteriano de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. La curva de crecimiento microbiano típica de un cultivo Batch se puede apreciar solo en el caso del cultivo en medio basal a pH inicial 2,3. Sin embargo, no es posible aplicar una linealización a la parte que correspondería a la etapa de crecimiento exponencial, para estimar la velocidad específica de crecimiento microbiano. Esto debido a que se tienen muy pocos puntos que correspondan a esta sección, por lo que no se puede asegurar que al aplicar la función logaritmo, esta sección sea lineal.

Las curvas de crecimiento de los cultivos en los medios experimentales, hechas a base del lixiviado, no muestran crecimiento en el número de bacterias, por lo que se intuye que la actividad y crecimiento de las bacterias estarían siendo inhibidos debido a la gran concentración de iones presentes en el medio de cultivo. Sin embargo, de este estudio no es posible concluir cual ion es más influyente en este efecto inhibitorio, no obstante, llama la atención la enorme concentración de ion sulfato que se obtiene en todos los medios experimentales.

### 5.3 Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en medios de cultivo basal con múltiples concentraciones de $K_2SO_4$

Los resultados de este experimento se muestran de una manera diferente, pues el objetivo final de realizar este experimento a altas y bajas concentraciones es encontrar las concentraciones críticas de ion sulfato a las que la actividad de las bacterias es inhibida parcial y completamente. Es por esto que en esta sección se muestra, para cada una de las concentraciones de la sal  $K_2SO_4$  (sulfato de potasio), una curva que da cuenta de la conversión de azufre a ácido sulfúrico en el transcurso del experimento (Figura 15).

Cabe mencionar que debido a que se modificó la metodología experimental con bajas concentraciones de sulfato de potasio, considerándose ésta más correcta que la empleada en la experiencia a altas concentraciones de la misma sal, solo se presentan en esta sección los resultados a bajas concentraciones.

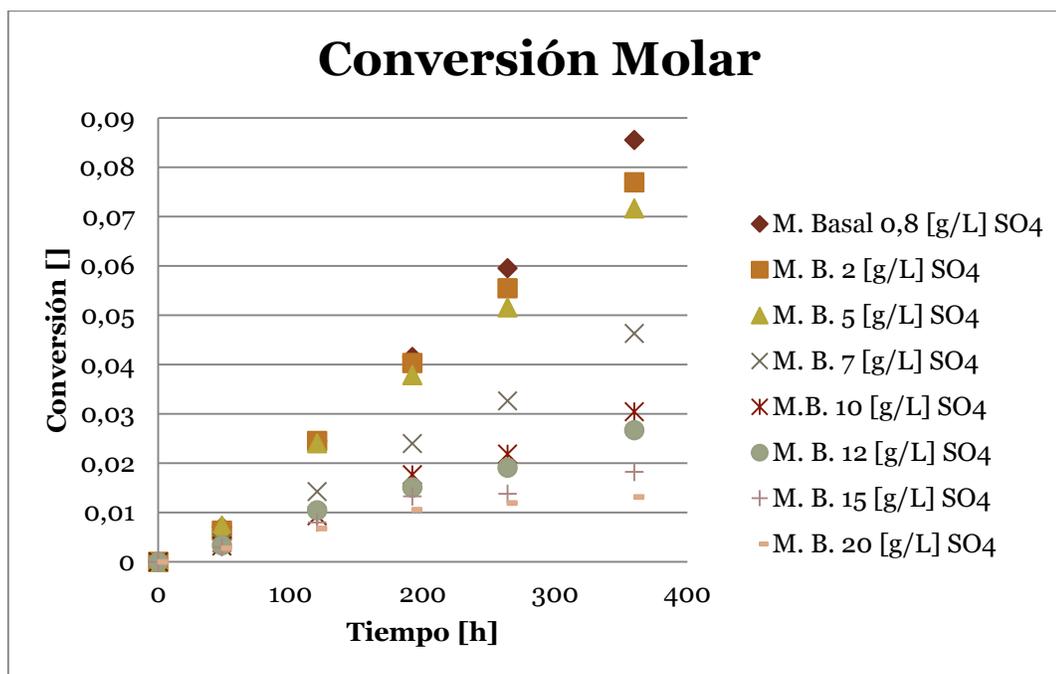
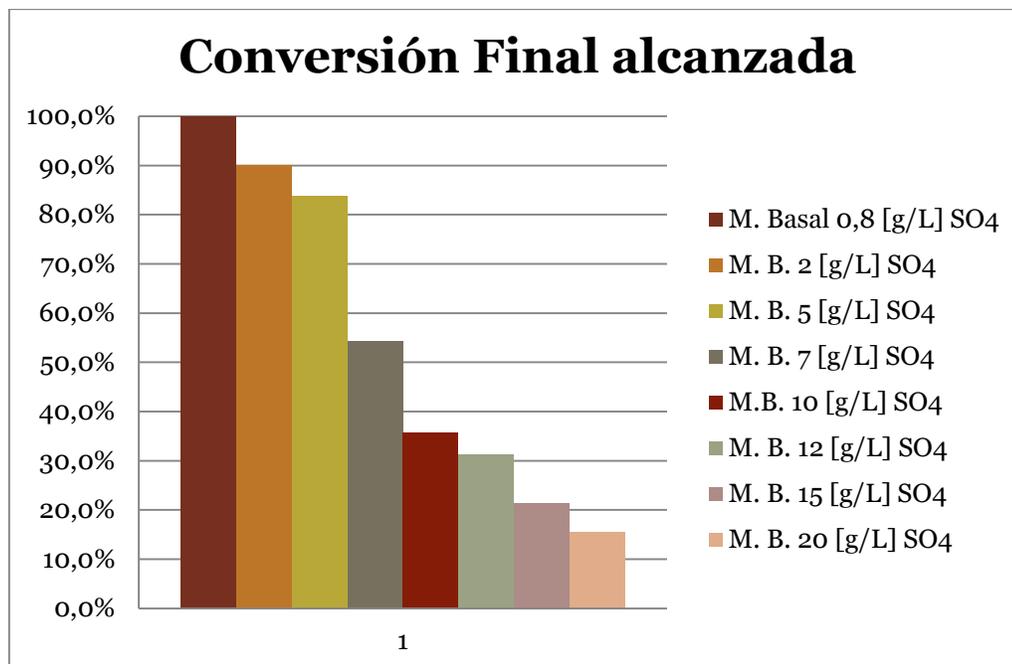


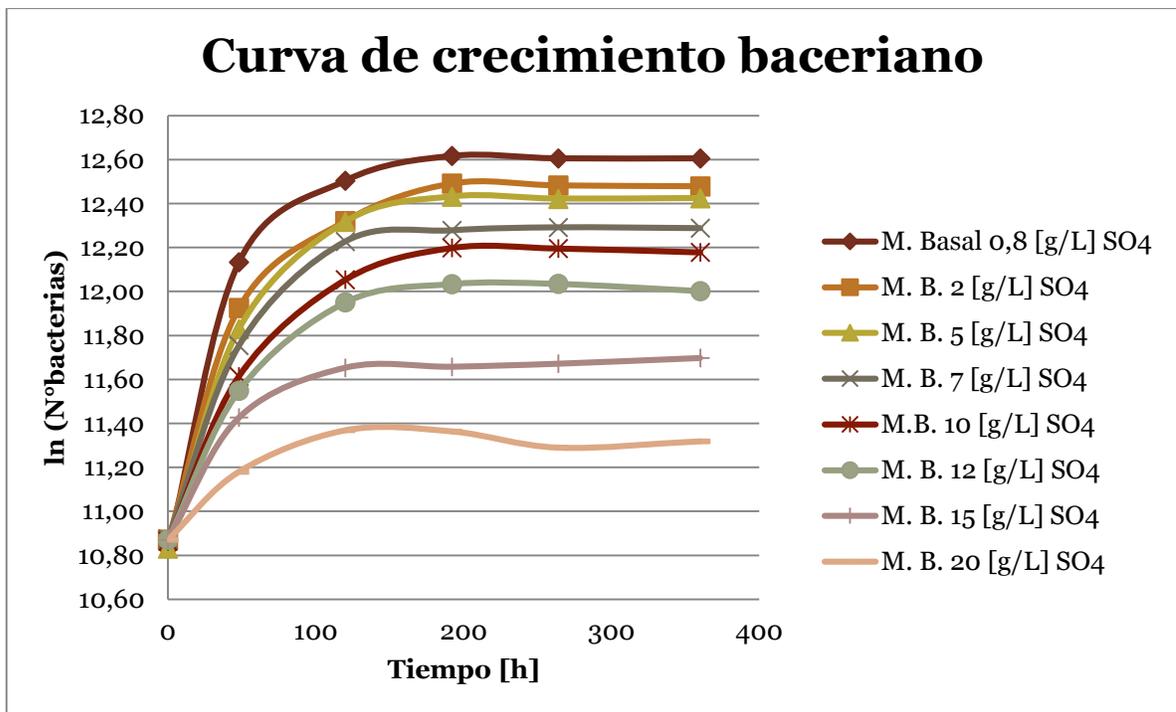
Figura 15: Curva de conversión molar de azufre elemental en ácido sulfúrico

Este gráfico se confeccionó calculando la masa total de ácido producido a partir de la concentración de ácido medida y corregida por el volumen de medio restante en los matraces y agregando la masa de ácido retirada en cada toma de muestra. Esto debido a que la conversión se refiere a la masa total de ácido producida.

Como se puede ver en la Figura 15, la conversión molar de azufre en ácido es siempre y cada vez menor con el aumento en la concentración de sulfato de potasio y por ende de ion sulfato. La conversión se ve drásticamente disminuida a partir de los 7 [g/L] de ion sulfato, llegando a ser al término del experimento en este medio, levemente superior al 50% de la conversión alcanzada en el medio basal (Figura 15). Por otro lado, la conversión alcanzada en el medio con 20 [g/L] de ion sulfato en la Figura 15, alcanza a ser ligeramente superior al 10% de la alcanzada por el cultivo en medio basal. Esto se puede apreciar claramente en la Figura 16.



**Figura 16: Gráfico de barras de la conversión final alcanzada en cada uno de los medios experimentales, comparados con la conversión alcanzada en el medio basal.**



**Figura 17: Curva de crecimiento bacteriano en suspensión, de los medios con distintas concentraciones de sulfato de potasio.**

La Figura 17 muestra las curvas de crecimiento bacteriano para todos los medios con distintas concentraciones de sulfato de potasio. Como es lógico pensar, dado que la actividad de las bacterias azufre-oxidantes está en directa relación con la generación de energía de las mismas, el número de las bacterias en suspensión también se ve afectado a mayor concentración de la sal de sulfato.

Sin embargo, dado que no se cuenta con la cantidad de puntos suficientes en la sección de máximo crecimiento y dado que al aplicar la función logaritmo, esta sección no corresponde a una línea recta, no es correcto estimar la velocidad específica de crecimiento para ninguno de los cultivos antes mencionados.

Como un resultado adicional, se utiliza el modelo de partícula decreciente para reacciones heterogéneas, con la reacción química como etapa controlante que fue modificado por Rhida Lira. Este modelo se aplica solo al cultivo en medio basal, pues es el único cultivo que podría tener tal comportamiento. Los demás cultivos deberían considerar algún término de inhibición.

La modificación al modelo de partícula decreciente realizada por Rhida, incorpora la concentración de bacterias adheridas como un reactante más en la reacción heterogénea (Lira 2013):

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

Donde supone la concentración de las bacterias como una función lineal del tiempo:

$$C_{Bact} = \frac{N^\circ \text{Bacterias en el Azufre}}{\text{Área total del azufre}} = \frac{10^{10} * t}{A_{total}} \quad (Ec. 27)$$

Para luego del desarrollo matemático, obtener la siguiente expresión para el tiempo:

$$t = \sqrt{K_1 * (R_0 - R)} \quad (Ec. 28)$$

con:

$$K_1 = \frac{2 * \rho_B * A_{total}}{b * k_s * 10^{10} * C_{Ag}} \quad (Ec. 29)$$

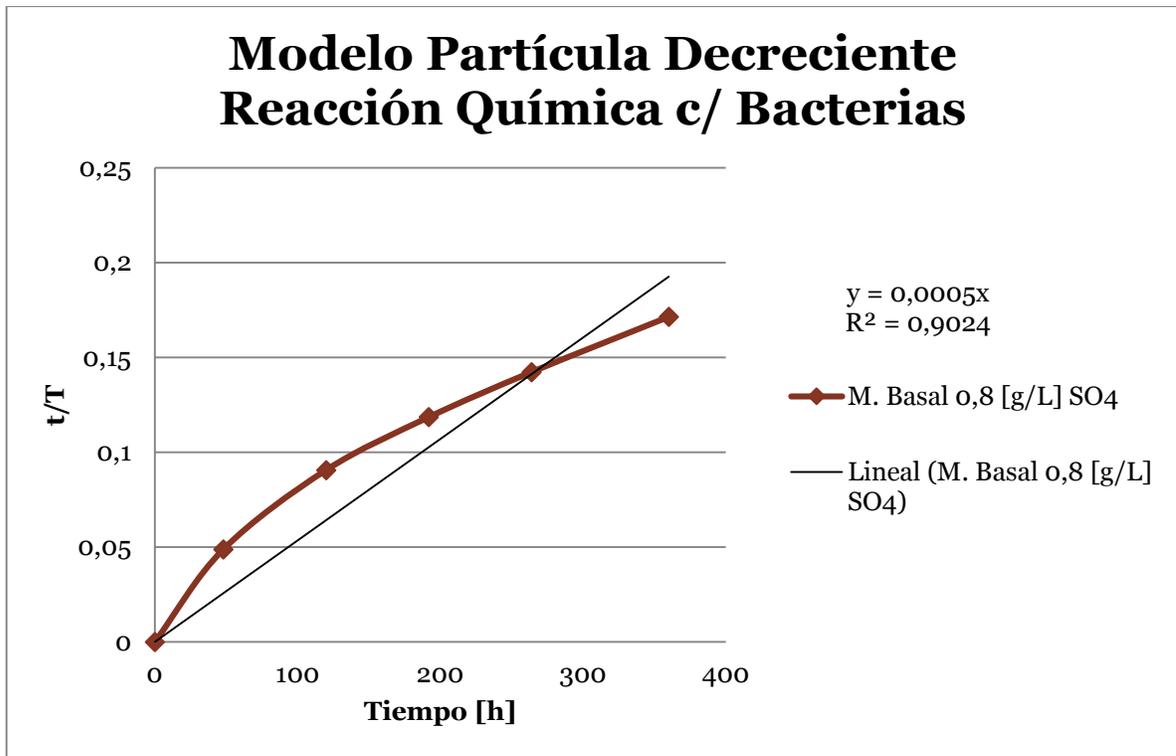
Siendo el tiempo de conversión completa  $\tau$ :

$$\tau = \sqrt{K_1 * R} \quad (Ec. 30)$$

Con lo que finalmente  $\frac{t}{\tau}$  se expresa como sigue:

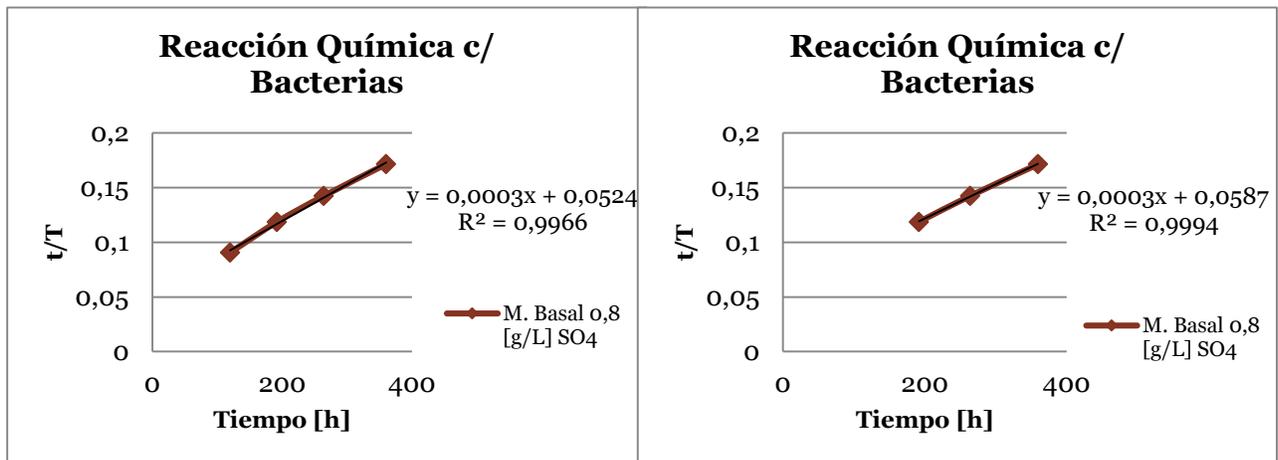
$$\frac{t}{\tau} = \sqrt{1 - \frac{R}{R_0}} = \sqrt{1 - (1 - X_B)^{1/3}} \quad (Ec. 31)$$

La Figura 18 muestra que el ajuste de este modelo a la conversión obtenida en el cultivo en medio basal ( $0,8 \text{ [g/L] } SO_4^{-2}$ ), no es satisfactorio. Lo que se presume puede ser debido a la suposición preliminar de que la concentración de las bacterias adheridas aumente de forma lineal con el tiempo.



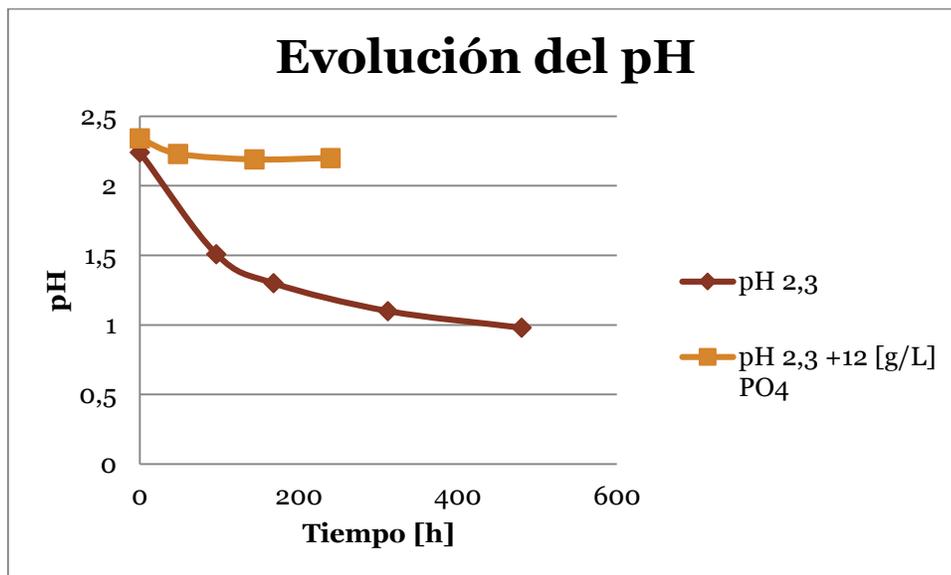
**Figura 18:** Ajuste del modelo de partícula decreciente con la reacción química como etapa controlante modificado (incorpora la concentración de bacterias adheridas como un reactante más), a la conversión obtenida en el cultivo en medio basal, en función del tiempo.

Sin embargo, este modelo se ajusta mucho mejor al comportamiento de la conversión a partir de las 120 horas, e incluso mejor a partir de las 200 horas (Figura 19).



**Figura 19:** Ajuste del modelo modificado de partícula decreciente con la reacción química como etapa controlante a partir de las 120 horas (izquierda) y a partir de las 200 horas (derecha).

## 5.4 Estudio preliminar de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en medios basales con $12 \text{ [g/L]}$ de ion $\text{PO}_4^{-3}$



**Figura 20:** Evolución del pH en el tiempo de un cultivo control en medio basal y de un cultivo en medio basal con 0,852 [ml] de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (ácido fosfórico). Este se añadió para lograr una concentración de  $12 \text{ [g/L]}$  de ion fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ).

Este experimento corresponde a un estudio preliminar del efecto del ion fosfato sobre la actividad biooxidativa de azufre de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Es necesario hacer, de la misma forma en que se hizo con el ion sulfato, un barrido de concentraciones para encontrar la concentración crítica de este ion que afecte sustancialmente la actividad de las bacterias.

En este estudio por falta de tiempo y cultivos con perlas colonizadas, solo se realizó un seguimiento de la evolución del pH, el cual da claros indicios de que la actividad oxidativa de azufre de las bacterias se ve inhibida a la concentración de ion fosfato en estudio ( $12 \text{ [g/L]}$ ).

## 6 Discusiones

### 6.1 Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en soluciones de lixiviación química ajustadas a diferentes pH.

En el primer estudio, realizado en medios de cultivo preparados a partir de la solución de lixiviación del mineral fosfatado (o lixiviado), tanto el crecimiento de la biomasa como la actividad biooxidativa de azufre de las bacterias *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* resultaron ser inhibidas casi en un 90%. Lo anterior se concluye a partir de la despreciable acidificación del medio en el tiempo (Figura 10), además de la poca generación de ácido sulfúrico por parte de las bacterias en los medios de cultivo, que apenas alcanzaron entre un 12 y un 21% de la masa de ácido sulfúrico producido por el cultivo en medio basal, al término del experimento (Figura 13). Por otro lado, también la curva de crecimiento bacteriano, refleja una inhibición en el crecimiento de biomasa, en la Figura 14.

En este mismo estudio, también se destaca la diferencia entre la concentración de ácido sulfúrico y la concentración de ion sulfato, siendo la concentración de este ion bastante mayor que la de ácido. De esta diferencia se deduce, que en la lixiviación química pueden haberse solubilizado sales de sulfato, lo que habría hecho aumentar la concentración de este ion en aproximadamente 20 [g/L].

Otra situación interesante ocurre cuando luego de la precipitación se vuelven a medir las concentraciones de  $Al^{+3}$ ,  $Fe^{+3}$  y  $Ca^{+2}$ , donde es posible apreciar que a mayor pH la concentración de ion férrico disminuye considerablemente desde 241 [ppm] en la solución de lixiviación (pH fuera del rango de medición del sensor de pH) hasta 34 [ppm] en la misma solución de lixiviación a pH 2,03. Esta disminución drástica de la concentración de ion férrico se explica por la disminución de la solubilidad del compuesto hidróxido de hierro, el cual comienza a precipitar a pH cercanos a 2. Una situación similar ocurre con el ion  $Al^{+3}$ , pero la disminución es menos drástica: desde 486 [ppm] a 432 [ppm]. Por otro lado, el ion calcio  $Ca^{+2}$  en solución disminuyó considerablemente en todas las soluciones de lixiviación ajustadas a pH 2,03; 1,8 y 1,4. Esta disminución fue mayor en la solución con pH 1,4, seguida de la solución con pH 1,8 y finalmente por la solución ajustada a pH 2,03. Esto podría deberse a una mayor precipitación de sulfato de calcio, mientras más bajo sea el pH.

De esto se puede decir que el precipitado obtenido al incrementar el pH fue principalmente ion calcio, en menor medida ion férrico y en cantidades mínimas ion aluminio. El precipitado es por lo tanto más rico en ion férrico a pH 2,03 y más rico en ion calcio a pH 1,40.

De este primer estudio no es posible deducir que iones de los más abundantes en el lixiviado ( $Ca$ ,  $Fe$ ,  $Al$ ,  $PO_4^{-3}$  o  $SO_4^{-2}$ ) son los más tóxicos para esta bacteria, o si es la concentración en la que se encuentran lo que hace que estos iones presenten ese nivel de

toxicidad. Sin embargo, se tienen conocimientos previos del nivel de toxicidad de algunos de estos iones sobre otras cepas azufre-oxidantes y hierro-oxidantes. Por ejemplo, se sabe que para la cepa *At. Ferrooxidans* el ion Aluminio es tóxico desde las 4800 ppm y que el ion sulfato sobre los 70 [g/L]. Teniendo en cuenta lo anterior y la elevada concentración en que se encuentra el ion sulfato (Figura 11), es posible pensar que los iones *Ca*, *Fe* y *Al* no presenten un nivel de toxicidad importante y que el ion sulfato sea uno de los principales responsables de la inhibición bacteriana. Esto es lo que motiva la realización de un segundo estudio, esta vez de toxicidad del ion sulfato sobre la actividad biooxidativa de azufre por *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.

## **6.2 Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en medios de cultivo basal con múltiples concentraciones de $K_2SO_4$**

El estudio de toxicidad del ion sulfato se dividió en dos experimentos, el primero se realizó agregando altas concentraciones de la sal  $K_2SO_4$  (sulfato de potasio), y el segundo con bajas concentraciones de la misma sal, con la finalidad de hacer un barrido de concentraciones y encontrar la concentración crítica de ion sulfato que comienza a afectar la actividad biooxidativa de azufre, o en otras palabras, que comience a afectar la generación de ácido sulfúrico. Específicamente se quiere encontrar la concentración a la cual la actividad biooxidativa de azufre se ve reducida a la mitad de la alcanzada en el medio de cultivo basal.

Es importante mencionar que con el objetivo de estudiar el efecto del ion sulfato se utiliza una sal de sulfato, el sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ), pues no es posible añadir sólo el ion sulfato por separado. Esta adición no deseada de ion potasio, contenido en la sal, complica las deducciones sobre la toxicidad del ion sulfato pues no hay forma de demostrar que es este ion y no el potasio el responsable de la disminución de la actividad bacteriana. Basado en conocimientos y experiencia previa se tiene la noción de que este ion no presenta efectos tóxicos importantes sobre las bacterias, pero dadas las concentraciones en que se encuentra en este estudio, entre 0,9 y 31,4 [g/L], no es posible asegurarlo. Es por el motivo recién expuesto, que de aquí en adelante, se deduce y concluye siempre a partir de la toxicidad de la sal de sulfato.

Una opción para evaluar la toxicidad para las bacterias del ion potasio, en las concentraciones alcanzadas en los distintos medios, habría sido utilizar en forma paralela otra sal de sulfato como el sulfato de sodio ( $Na_2SO_4$ ) y comparar la inhibición de la actividad y crecimiento bacteriano, como en el trabajo realizado por Carolina Salhe (Salhe 1999). Este experimento queda propuesto para la continuidad del estudio de toxicidad de iones sobre *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.

### 6.2.1 Evolución del pH en los cultivos

La disminución del pH en los cultivos con altas concentraciones de ion sulfato ( $20$  a  $70$   $[\text{g}/\text{L}]$ ), fue muy leve, mientras que el descenso del pH del cultivo en medio basal (control) del mismo estudio fue bastante más pronunciado, llegando a  $0,98$  al cabo de las  $480$  horas (ver Figura 21, sección anexos 9.3.2.1). Esta diferencia en la disminución del pH sería un primer indicador de que la actividad biooxidativa de azufre de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* estaría siendo inhibida desde los  $200$   $mM$  de la sal sulfato de potasio aproximadamente ( $20$   $[\text{g}/\text{L}]$  de ion sulfato). Cabe mencionar que el pH inicial de los medios de cultivo con  $K_2SO_4$ , es más alto que el de los controles, debido a que la adición de la sal de sulfato a la solución madre, es decir, a lo que sería el concentrado de sulfato de potasio ( $70$   $[\text{g}/\text{L}]$ ), se realiza luego de ajustar pH al medio basal ( $2,3$ ). Por lo que, al mezclar distintos volúmenes de este concentrado con distintos volúmenes de medio basal para lograr las concentraciones de los medios experimentales, el pH inicial de los mismos fue diferente. Se piensa que estas variaciones del pH son producto de modificaciones del equilibrio ácido-base al agregar un ion común (ion sulfato) con la disociación del ácido sulfúrico. Es por el motivo recién mencionado, que estos resultados no se consideran confiables, pues al tener distintos pH iniciales se agrega una nueva variable al experimento.

Por otro lado, la evolución del pH para el estudio a bajas concentraciones de ion sulfato, entre  $2$  a  $20$   $[\text{g}/\text{L}]$ , es decir, de los  $20$  a los  $200$   $mM$  de sulfato de potasio, fue diferente. En este estudio existe una disminución muy notoria del pH en los cultivos hasta los  $12$   $[\text{g}/\text{L}]$  de ion sulfato (Ver Figura 22 Sección Anexos 9.3.2.1). Respecto a este estudio cabe mencionar que los medios de cultivo se prepararon de una forma diferente, para eliminar la variable del efecto del pH inicial al estudio de inhibición, como fue el caso del estudio a altas concentraciones de ion sulfato. Con este fin, las diferentes masas de sulfato de potasio fueron agregadas a los medios de cultivo antes de ajustar el pH. De esta forma, es posible ajustar el pH inicial de todos los medios de cultivos a  $2,3$  luego de la adición de la sal. Esto tiene un mínimo efecto en la concentración inicial de ácido sulfúrico en cada uno de los cultivos con diferente concentración de  $K_2SO_4$ , como se puede apreciar en la Tabla 15 y más notoriamente en la Figura 26 (Sección Anexos 9.3.2.3).

Es importante mencionar, que aunque se haya definido como incorrecta la metodología utilizada en el estudio de biooxidación de azufre a altas concentraciones de sulfato de potasio, al agregar la variable del pH inicial, se cree que aunque se realizara este experimento nuevamente y corrigiendo la metodología, tampoco se observaría actividad bacteriana. Esto, debido a que la actividad bacteriana fue inhibida casi en un  $90\%$  a partir de los  $200$   $mM$  de  $K_2SO_4$  en el experimento a bajas concentraciones de la sal y el

experimento a altas concentraciones de la sal considera un rango entre los 200 *mM* y los 700 *mM* aproximadamente.

### **6.2.2 Evolución de la concentración del ion sulfato en solución**

La evolución de la concentración del ion sulfato también fue analizada en todo el rango de concentraciones. En el caso de los experimentos con altas concentraciones, estos resultados son poco concluyentes. La metodología utilizada para su medición posee baja sensibilidad para concentraciones sobre los 10 [ $g/L$ ] y arroja mucha variación en mediciones repetitivas de una misma muestra. Por lo tanto, no se puede concluir que las variaciones percibidas desde los 20 [ $g/L$ ] sean debido a la oxidación de azufre elemental. A pesar de que las variaciones en la concentración de este ion no sean perceptibles por este método, si se pueden corroborar aproximadamente las distintas concentraciones iniciales con las que partió cada cultivo (Figura 23, Anexo 9.3.2.2).

Sin embargo, en el gráfico de concentración de ion sulfato en los cultivos con bajas concentraciones de este ion, es decir, de los 20 a los 200 *mM* de sulfato de potasio, si se puede ver un aumento de la concentración de este ion en el tiempo (Figura 24, Sección anexos 9.3.2.2). En los cultivos en medio basal con 20, 50, 70 y 100 *mM* de sulfato de potasio (2, 5, 7 y 10 [ $g/L$ ] de ion sulfato), el ion sulfato presenta una clara tendencia a aumentar. En cambio en los cultivos con 150 y 200 *mM* no es tan claro el aumento en la concentración de este ion, debido a la presencia de oscilaciones en las mediciones. Debido a esto no es posible asegurar que desde los 12 [ $g/L$ ] de ion sulfato la actividad bacteriana y/o producción de ácido se encuentren inhibidas, pues existe la posibilidad sea debido a la mala sensibilidad del método de medición pues estos cultivos se inician con concentraciones sobre los 10 [ $g/L$ ]. No obstante, a los gráficos de concentración y generación de ácido sulfúrico ayudan a dilucidar si la actividad biooxidativa de azufre es o no inhibida desde los 12 [ $g/L$ ] de ion sulfato.

### **6.2.3 Concentración de ácido sulfúrico**

El gráfico de concentración de ácido sulfúrico para los cultivos con altas concentraciones iniciales de ion sulfato (sulfato de potasio), muestran claramente que la concentración del ácido no aumenta en el transcurso del tiempo, para ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 25).

En el caso del experimento que utiliza concentraciones más bajas de sulfato de potasio (Figura 26, Anexo 9.3.2.3) se puede ver la concentración del ácido tiene una tendencia a aumentar cada vez mayor para el cultivo en medio basal y en menor medida para los cultivos con 2, 5 y 7 [ $g/L$ ] de ion sulfato. Este resultado resulta ser contraintuitivo, pues a medida que el medio se acidifica se sabe que las bacterias comienzan a disminuir su actividad. Sin embargo, este comportamiento se explica por la disminución del volumen

en el tiempo debido a la toma de muestra. Esto implica que aunque las bacterias estén produciendo ácido con una velocidad relativamente constante, o incluso menor, la concentración aumenta considerablemente más rápido, debido a que el ácido producido se disuelve en un menor volumen cada vez (Figura 26).

#### **6.2.4 Generación de ácido sulfúrico en el tiempo**

El gráfico de generación de ácido sulfúrico en el tiempo para altas concentraciones de ion sulfato (Figura 27, Anexo 9.3.2.4), muestra la nula generación del ácido en todos los cultivos con altas concentraciones del mismo ion, mientras que el control del mismo estudio (en medio de cultivo basal sin sulfato de potasio adicional) alcanza una producción total final de ácido sulfúrico cercana a los 0,70 [g] al cabo de las 500 horas. Este resultado indicaría que la actividad oxidativa de azufre es inhibida por todas las concentraciones de sulfato de potasio en estudio (200 – 700 [mM]). No obstante, como en este experimento se sumó la variable del pH inicial, no es posible concluir fehacientemente respecto a este experimento.

En el caso del estudio a bajas concentraciones de ion sulfato, los resultados obtenidos son bastante diferentes pues sí hay generación de ácido, es decir, la actividad bacteriana no se ve inhibida por completo con todas las concentraciones de sulfato de potasio probadas en este estudio. En la Figura 28 se puede ver la curva de generación de ácido sulfúrico (en masa). Esta curva tiene un comportamiento diferente a la curva de concentración de ácido, pues la masa total producida de ácido aumenta más lento que la concentración.

#### **6.2.5 Curvas de crecimiento bacteriano**

Teóricamente, en un cultivo *batch* la fase de crecimiento exponencial se enlentece debido al agotamiento de nutrientes y/o a la acumulación de desechos. Sin embargo, en este tipo de cultivos los nutrientes que podrían limitar el crecimiento de las bacterias son el azufre y el oxígeno, pero ambos se encuentran en exceso: el azufre se encuentra en exceso en las perlas y la concentración de oxígeno se mantiene relativamente constante mediante la agitación. Debido a lo anterior, es que la fase estacionaria del crecimiento debe iniciarse por otras razones. Una opción es la inhibición por la acumulación de algún producto, como el ácido sulfúrico (ion sulfato y protones), lo que a su vez acidifica el ambiente; o la sobrepoblación de bacterias del biofilm en la superficie de las perlas de azufre. La sobrepoblación de bacterias provocaría inhibición en cualquiera de las siguientes formas: La primera, en que las bacterias que queden más lejanas a la superficie de las perlas de azufre se les haga más difícil el acceso al nutriente. La segunda, en que las bacterias que se encuentran en contacto más directo con el azufre, reciban menos oxígeno debido a problemas difusionales del oxígeno a través del biofilm. Sin embargo, menos probablemente, también es posible pensar que sea el agotamiento del extracto de levadura el causante de la aparición del estado estacionario.

Por otro lado, también es importante considerar que en este estudio se realiza un seguimiento de las bacterias en suspensión o planctónicas, y no de las bacterias adheridas. Esto debido a que no se cuenta con los medios adecuados para el seguimiento de las bacterias adheridas. Sin embargo, se toma el supuesto de que realizar el recuento de células en suspensión entrega un reflejo del crecimiento en número de las bacterias totales, a partir de las bacterias adheridas a la superficie de las perlas, como inóculo.

En el experimento en medios con altas concentraciones de ion sulfato, se puede apreciar una curva de crecimiento bacteriano de las bacterias planctónicas, un tanto menor que la del cultivo en medio basal. Este gráfico (Figura 29, Anexo 9.3.2.5) muestra un aumento en el número de bacterias, aún con estas altas concentraciones de ion sulfato, aunque su actividad se vea inhibida casi por completo desde una concentración de  $20 \text{ [g/L]}$  del ion sulfato. Este aumento en el número de bacterias planctónicas podría tener variadas explicaciones. En primer lugar, podría interpretarse como un desprendimiento de las bacterias adheridas al azufre elemental con el objetivo de encontrar algún ambiente más favorable para su crecimiento, propiciado por las condiciones adversas en que se encuentran, y dado que a partir de ese punto el número de bacterias en suspensión se mantiene relativamente constante, esta explicación parece ser bastante razonable. Además, esta opción resulta ser bastante atractiva, ya que no es lógico que haya un aumento de biomasa si las bacterias no generan el producto de la reacción de obtención de energía. Otra alternativa es que las bacterias tuvieran la opción de utilizar otra molécula como fuente de energía, proveniente por ejemplo, del extracto de levadura, como ocurre en el caso de especies como la *A. brierleyi* y *A. caldus* (Plumb et al. 2008), provocando el aumento de la biomasa, pero no de la concentración de ácido sulfúrico.

En el caso del estudio con bajas concentraciones de sulfato de potasio, las curvas de crecimiento bacteriano son consistentes con el registro de actividad que se obtuvo a partir de la generación de ácido sulfúrico, pues las curvas de crecimiento son menores mientras mayor es la concentración de sulfato (Figura 17). En la sección de Anexos 9.3.2.6 se muestran imágenes de las bacterias marcadas con el reactivo fluorescente DAPI, con el cual se realiza el recuento de células.

Finalmente, cabe mencionar que este procedimiento, el recuento de células en suspensión, no reporta información relevante a parte del hecho de encontrar y asegurar la presencia de bacterias. Como se explicó en un principio, el número de bacterias en suspensión podría variar por diferentes razones: desde un desprendimiento de las bacterias desde las perlas, en busca de mejores condiciones ambientales; o efectivamente una duplicación en número de las bacterias adheridas, en cuyo caso una sobrepoblación sobre las perlas no deje otra opción, que la liberación del exceso del número de bacterias a la suspensión. Resulta entonces lógico, que en varios de los estudios consultados solo se utilice como parámetro controlable y confiable la medición del producto del metabolismo energético. En estos estudios la medición de este producto da cuenta a su vez del crecimiento

bacteriano. Cuyo comportamiento, sabemos resulta ser más complejo, cuando el sustrato en estudio no corresponde a un limitante del propio crecimiento.

### 6.2.6 Conversión

En la Figura 15, la conversión del azufre elemental a ácido sulfúrico, se ve disminuida con el aumento de la concentración de la sal sulfato de potasio. En este gráfico se puede ver que la conversión comienza a ser afectada a partir de la concentración mínima de ion sulfato ( $2 \text{ [g/L]}$ ). Es decir, que en cada instante de tiempo la conversión resulta ser cada vez más baja mientras mayor sea la concentración de sulfato de potasio en el medio. A los  $100 \text{ mM}$  de  $K_2SO_4$  ( $7 \text{ [g/L]} SO_4^{-2}$ ) la actividad enzimática final corresponde aproximadamente al 50% de la del experimento control (final).

Se observa que el aumento de la conversión en los cultivos en medio basal y con  $2$  y  $5 \text{ [g/L]}$  de ion sulfato, es más lento durante las primeras 48 horas, lo que sería consecuente con una etapa de adaptación de las bacterias a un medio nuevo. Luego de las 48 horas el aumento en la conversión para los cultivos con las concentraciones más bajas comienza a aumentar de forma más pronunciada y lineal. En cambio, la conversión de azufre a ácido para los cultivos a partir de los  $15 \text{ [g/L]}$  de  $SO_4^{-2}$  aumenta mucho menos, tendiendo a estancarse en algún punto. Lo mismo debiera ocurrir con las demás concentraciones, pero sería necesario alargar el tiempo del experimento, para encontrar el tiempo en que ocurriese.

### 6.2.7 Ajuste del modelo de partícula decreciente modificado

Como se explica en la sección de resultados 5.3, se realizó adicionalmente, un ajuste de las conversiones obtenidas en el experimento a bajas concentraciones, con el modelo de partícula decreciente para reacciones heterogéneas, modificado por Rhida Lira. Este modelo se utilizó con la reacción química como etapa controlante debido a que en una reacción enzimática es la reacción de formación de productos la etapa que generalmente limita la velocidad de este tipo de reacciones. La modificación realizada por la autora antes mencionada, incorpora el crecimiento bacteriano como una función lineal del tiempo.

En base al mal ajuste de este modelo y al bajo coeficiente de correlación (0,90) visible en la Figura 18, se concluye que este modelo no representa de buena forma el comportamiento de la conversión obtenida. Sin embargo, cabe mencionar que el modelo modificado por Rhida, si tiene un buen ajuste con la conversión desde las 120 horas y mejor aún desde las 200 horas (Figura 18).

Es posible que este modelo se ajuste mejor a partir de las 120 horas, debido a que ese instante coincida con el inicio de la etapa estacionaria del crecimiento microbiano, lo cual

tenga como resultado un aumento lineal de la conversión, lo que implicaría también un aumento de la generación de ácido en forma constante.

Este modelo modificado, sí se ajusta al comportamiento de las conversiones obtenidas en el trabajo realizado por Rhida Lira. La diferencia entre éste y el trabajo aquí presentado radica en el cálculo de la conversión. Se muestra un ejemplo de cálculo de este en el Anexo 9.4.

El presente estudio se realiza en matraces con 50 [ml] de medio de cultivo inicialmente, y se requiere tomar muestra cada cierto tiempo para el monitoreo de la actividad bacteriana; razón por la cual el volumen se reduce significativamente en el transcurso del experimento. Esta reducción del volumen tiene como consecuencia que el volumen restante en los matraces sea cada vez más concentrado respecto a la generación de ion sulfato y ácido sulfúrico, independientemente si la generación del mismo sea más rápida o no. Por lo que, aunque la generación se mantenga constante, el volumen de medio disminuye. Es por esta razón que en este trabajo, al cálculo de la generación de ácido se le aplica una corrección por la variación del volumen en el tiempo. Esta corrección considera la masa de ácido contenida en el volumen restante de cada matraz en el tiempo y las masas de ácido retiradas en el tiempo.

### **6.2.8 Consideraciones al modelo modificado de partícula decreciente**

Es posible que el modelo de reacciones heterogéneas modificado, aquí utilizado se ajustara mejor al comportamiento de la conversión obtenido en este estudio, si se profundizara más en la incorporación de la concentración de bacterias en la superficie de las perlas de azufre. Una opción, que se sugiere para un próximo estudio es que la concentración de bacterias adheridas obedezca a alguna ecuación cinética de crecimiento microbiano que considere inhibición por producto, problemas de difusión de Oxígeno, o la inexistencia del contacto entre las bacterias y el azufre, estas dos últimas problemáticas debidas a una sobrepoblación de bacterias adheridas. Sin embargo, en el caso de incorporar algún término de inhibición sería necesario realizar experimentos de cinética de crecimiento para encontrar los parámetros de esta ecuación: que corresponderían a una nueva velocidad específica de crecimiento microbiano ( $\mu_{max}$ ) y las correspondientes constantes de inhibición (Tabla 1). Experimentos que no resultan triviales experimentalmente.

Por otro lado, para el comportamiento de las conversiones de los cultivos a múltiples concentraciones de sulfato de potasio, es necesario además incorporar la cinética de inhibición que provoca el ion sulfato. Para lo cual sería necesario primero determinar el mecanismo de inhibición del ion. Esto no se pudo determinar en este trabajo y para lo que probablemente resultaría necesario realizar experimentos de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

### **6.3 Estudio preliminar de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en medios basales con 12 $\left[\frac{g}{L}\right]$ de ion $PO_4^{-3}$**

El ion fosfato es otro ion que se encuentra en una alta concentración, aproximadamente 12  $\left[\frac{g}{L}\right]$  en la solución de lixiviación química, lo que es lógico dado que el lixiviado proviene de una muestra de mineral fosfatado. Es por esto que se realiza un estudio preliminar de toxicidad de este ion. Este estudio se realiza agregando el volumen suficiente de ácido fosfórico para lograr la concentración deseada. En este aspecto es necesario mencionar que en el rango de pH en se desarrolla la biooxidación de azufre, solo existe el ácido fosfórico como las especies molecular ( $H_3SO_4$ ) y como los iones  $H^+$  y  $H_2SO_4^-$ . Pues solo la primera constante de disociación del ácido fosfórico ( $pk_{a1} = 2,15$ ) se encuentra dentro del rango de pH utilizado. Las demás constante de disociación se encuentran en pH más elevados,  $pk_{a2} = 7,21$  y  $pk_{a3} = 12,34$  (Jenck S. A. 2005)

Al tratarse de un estudio preliminar se realiza solo un monitoreo del pH el cual indicaría, de forma general, que la actividad biooxidativa de azufre resulta ser inhibida por esta concentración de ion fosfato (Figura 20). Sin embargo, es necesario realizar un estudio más exhaustivo para hallar la concentración a la cual este ion comienza a afectar la conversión de azufre y a la cual se inhibe completamente.

Cabe mencionar la importancia de que este resultado sea confirmado, pues de ser así, se complicaría en extremo la posibilidad de realizar, a escala industrial, la biooxidación de azufre y la biolixiviación de fosfatos a la vez para la producción de ácido fosfórico. Esto debido a que se espera que las concentraciones del ácido fosfórico, y por ende del ion fosfato, sean lo suficientemente altas para hacer rentable este bioproceso.

## 7 Conclusiones

El primer experimento realizado, el estudio de biooxidación de azufre en soluciones de lixiviación química, permite concluir que tanto el crecimiento de las bacterias *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* como la actividad oxidativa de azufre son casi completamente inhibidas en ambientes tan semejantes a los de una lixiviación química. Por otro lado, de este mismo estudio no se puede concluir sobre que ion es el que presenta mayor toxicidad sobre la actividad de las bacterias. Sin embargo, en este estudio se identifican dos iones que se encuentran en altas concentraciones los cuales podrían presentar un efecto tóxico sobre la actividad de las bacterias: ion sulfato y fosfato. El ion sulfato es el que se encuentra en mayor concentración, lo que da algunos indicios de que pueda ser este ion uno de los principales responsables de la inhibición bacteriana.

El segundo experimento de biooxidación de azufre, se realizó en presencia de múltiples concentraciones de ion sulfato. De este se concluye en primer lugar, que la metodología más óptima y confiable para lograr un estudio de la inhibición bacteriana para el ion sulfato es que se realice primero la adición del sal de sulfato y luego se realice el ajuste del pH, con lo cual se consigue no añadir la variable del pH inicial al estudio de actividad. En segundo lugar se concluye, que la actividad bacteriana se ve reducida por efecto de concentraciones del sulfato de potasio desde los 20 mM, llegando a ser reducida al 50% con una concentración de 70 mM de la misma sal, para ser prácticamente nula desde los 200 mM.

Por otro lado, el estudio preliminar de la actividad bacteriana de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* en presencia de una concentración de 12 [g/L] de ion fosfato, permite inferir que esta concentración resultaría tóxica para las bacterias. Este último resultado, requiere ser confirmado mediante un estudio más exhaustivo, pues en éste solo se monitoreó la evolución del pH. Este requerimiento resulta ser de vital importancia, dado que este resultado, de ser confirmado, sería muy desfavorable para la realización de la biolixiviación de fosfatos simultánea, debido a que este proceso involucraría altas concentraciones de ion fosfato en solución. En cuyo caso, cobraría mucha importancia la posibilidad de realizar la biooxidación de azufre y la lixiviación ácida por separado.

Por otro lado, respecto a la velocidad de máximo crecimiento bacteriano, ésta no se pudo calcular. Para reportar una aproximación de la velocidad máxima de crecimiento bacteriano hubiese sido necesario realizar más mediciones en las primeras horas del experimento. Sin embargo, también se concluyó que la ecuación de crecimiento bacteriano de Monod, no es aplicable a este experimento, pues el crecimiento se ve afectado por otros factores que no son considerados por dicho modelo. Como lo son la inhibición por producto, la inhibición por pH, o la inhibición debida a la interferencia del propio biofilm en la difusión de nutrientes para el caso de las bacterias adheridas.

Finalmente, se realizó un ajuste de la conversión obtenida en el cultivo en medio basal, con el modelo para reacciones heterogéneas de partícula decreciente, con la reacción química como etapa controlante, modificado por Rhida Lira. Este ajuste resultó no ser bueno, como es el caso del trabajo realizado por la autora mencionada anteriormente. Sin embargo, este modelo sí se ajusta bien al comportamiento de la conversión del cultivo en medio basal, sólo en la parte final del experimento. Esta diferencia probablemente se deba a que en el presente trabajo se realizó una corrección en el cálculo de la generación de ácido, y por ende de la conversión, referente al volumen decreciente en el tiempo.

Este modelo podría mejorarse y probablemente se ajustaría mejor al comportamiento de la conversión corregida, si considerara alguna ecuación cinética de crecimiento microbiano que considere por ejemplo, la inhibición por producto.

## 8 Bibliografía

- Aesseal. 2002. "A Guide to Sealing PHOSPHORIC ACID PLANTS." Retrieved ([http://www.arthomson.com/Literature/brochures/MechSeals/AESSEAL/IndustrySealingGuides/L\\_UK\\_PHOS.pdf](http://www.arthomson.com/Literature/brochures/MechSeals/AESSEAL/IndustrySealingGuides/L_UK_PHOS.pdf)).
- Alzate Fontalvo, Manuel Víctor, Ángel Miguel Garcia Gómez, and Víctor Manuel Trejos. 2009. "Mathematical Description and Stability Analysis of Fermentative Processes."
- Baker-Austin, Craig, and Mark Dopson. 2007. "Life in Acid: pH Homeostasis in Acidophiles." *Trends in microbiology* 15(4):165–71. Retrieved January 24, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17331729>).
- BBC. 2006. "BBC News." *Brazilian miner buys Canada rival*. Retrieved (<http://news.bbc.co.uk/2/hi/business/6081390.stm>).
- Berrueto, Elisa I. Félix. 2012. *Tendencias Actuales de Los Fertilizantes Y Perspectivas Para El 2016*.
- Bhatti, Tariq M., and Wasim Yawar. 2010. "Bacterial Solubilization of Phosphorus from Phosphate Rock Containing Sulfur-Mud." *Hydrometallurgy* 103(1-4):54–59. Retrieved July 29, 2013 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304386X10000575>).
- Bogdanova, T. I., a L. Muliukin, I. a Tsaplina, G. I. El'-Registan, and G. I. Karavaiko. 2002. "[Effect of the Medium Composition and Cultivation Conditions on Sporulation in Chemolithotrophic Bacteria]." *Mikrobiologiya* 71(2):187–93. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12024817>).
- Bosecker, K. 1997. "Bioleaching: Metal Solubilization by Microorganisms." *FEMS Microbiology Reviews* 20(3-4):591–604. Retrieved (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00340.x/full>).
- Chi, R., C. Xiao, and H. Gao. 2006. "Bioleaching of Phosphorus from Rock Phosphate Containing Pyrites by Acidithiobacillus Ferrooxidans." *Minerals Engineering* 19(9):979–81. Retrieved February 17, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0892687505003729>).
- Crundwell, F. K. 2003. "How Do Bacteria Interact with Minerals?" *Hydrometallurgy* 71(1-2):75–81. Retrieved July 29, 2013 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304386X03001750>).

- Dopson, M., Craig Baker-Austin, P. Ram Koppineedi, and Philip L. Bond. 2003. "Growth in Sulfidic Mineral Environments: Metal Resistance Mechanisms in Acidophilic Micro-Organisms." *Microbiology* 149(8):1959–70. Retrieved June 5, 2013 (<http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.26296-0>).
- Doran, Pauline M. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. Harcourt Brace & Company.
- FIPR. 2010. "Chemical Processing of Phosphate." Retrieved (<http://www1.fipr.state.fl.us/PhosphatePrimer/0/01E19457A7CE3FE385256F800074411E>).
- ICEX. 2010. "Instituto Español de Comercio Exterior." Retrieved (<http://www.icex.es/icex/cma/contentTypes/common/records/mostrarDocumento/?doc=4408653>).
- Jenck S. A. 2005. "Constantes de Ionización Ácidos Inorgánicos." Retrieved March 15, 2014 (<http://www.jenck.com/utilidades/acidez/>).
- Karavajko, GI, ES Bulygina, and IA Tsaplina. 1990. "Sulfobacillus Thermosulfidooxidans: A New Lineage of Bacterial Evolution?" *FEBS letters* 261(1):8–10. Retrieved July 29, 2013 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001457939080623Q>).
- Kawabe, Yoshishige, Chihiro Inoue, Koichi Suto, and Tadashi Chida. 2003. "Inhibitory Effect of High Concentrations of Ferric Ions on the Activity of Acidithiobacillus Ferrooxidans." *Journal of bioscience and bioengineering* 96(4):375–79. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233540>).
- Lira, Rhida. 2013. "Estudio de La Biooxidación de Azufre Elemental Por Sulfobacillus Thermosulfidooxidans a 45°C." Universidad de Chile.
- Plumb, J. J., R. Muddle, and P. D. Franzmann. 2008. "Effect of pH on Rates of Iron and Sulfur Oxidation by Bioleaching Organisms." *Minerals Engineering* 21(1):76–82. Retrieved January 24, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0892687507002476>).
- Quiminet. 2006. "Uso de La Roca Fosfórica Para Fertilizantes." Retrieved (<http://www.quiminet.com/articulos/el-uso-de-la-roca-fosforica-para-fertilizantes-10357.htm>).
- Rodríguez, Y., M. L. Blázquez, A. Ballester, F. González, and J. A. Muñoz. 2001. "La Biolixiviación Al Comienzo Del Siglo XXI." *Revista de metalurgia* LIX(c):121–29. Retrieved July 29, 2013 (<http://revistademetalurgia.revistas.csic.es/index.php/revistademetalurgia/article/viewArticle/528>).

- Romero, Jaime, Carolina Yañez, Mónica Vásquez, Edward R. B. Moore, and Romilio T. Espejo. 2003. "Characterization and Identification of an Iron-Oxidizing, *Leptospirillum*-like Bacterium, Present in the High Sulfate Leaching Solution of a Commercial Bioleaching Plant." *Research in microbiology* 154(5):353–59. Retrieved February 18, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12837511>).
- Salhe, Carolina. 1999. "Evaluación de La Inhibición Bacteriana En Soluciones de Lixiviación Industrial Usando Métodos Bioelectroquímicos." Universidad de Chile.
- Sand, Wolfgang, Tilman Gehrke, PG Jozsa, and Axel Schippers. 2001. "(Bio) Chemistry of Bacterial Leaching—direct vs. Indirect Bioleaching." *Hydrometallurgy* 59(2-3):159–75. Retrieved July 29, 2013 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304386X00001808>).
- Suzuki, I., D. Lee, B. Mackay, L. Harahuc, and J. K. Oh. 1999. "Effect of Various Ions, pH, and Osmotic Pressure on Oxidation of Elemental Sulfur by *Thiobacillus Thiooxidans*." *Applied and environmental microbiology* 65(11):5163–68. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=91697&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Tributsch, Helmut. 2001. "Direct versus Indirect Bioleaching." *Hydrometallurgy* 59(2-3):177–85. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304386X0000181X>).
- Vera, Mario, Axel Schippers, and Wolfgang Sand. 2003. "Bioleaching Review Part A: Progress in Bioleaching: Fundamentals and Mechanisms of Bacterial Metal Sulfide Oxidation." *Applied microbiology and biotechnology* 63(3):239–48. Retrieved July 29, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720034>).
- Voet. 2006. *Biochemistry*. 3th Editio. John Wiley & Sons. Retrieved ([http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=r5bedH\\_aST0C&oi=fnd&pg=PR1&dq=Biochemistry+Voet.+John+Wiley+&+Sons.&ots=RlmLkPzbO2&sig=KijdvdOYi6qsBm95NWSwBtpSLu8#v=onepage&q&f=false](http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=r5bedH_aST0C&oi=fnd&pg=PR1&dq=Biochemistry+Voet.+John+Wiley+&+Sons.&ots=RlmLkPzbO2&sig=KijdvdOYi6qsBm95NWSwBtpSLu8#v=onepage&q&f=false)).

## 9 Anexos

### 9.1 Tabla de simbología

Tabla 5: Tabla de simbología

Símbolo	Significado
$v = \frac{d[P]}{dt}$	Velocidad de una reacción enzimática
$[P]$	Concentración del producto
$[ES]$	Concentración del complejo enzima sustrato
$[E]$	Concentración de la enzima
$[S]$	Concentración del sustrato
$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$	Constante de Michaelis-Menten
$k_1$	Constante cinética de la reacción de formación del complejo enzima-sustrato
$k_{-1}$	Constante cinética de la reacción inversa a la formación del complejo enzima-sustrato
$k_2$	Constante cinética de la reacción de formación de producto
$v_{max}$	Velocidad máxima de una reacción enzimática
$v_0$	Velocidad inicial de una reacción enzimática
$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt}$	Velocidad específica de crecimiento microbiano
$x$	Número de microorganismos
$\mu_{max}$	Velocidad específica de crecimiento máximo microbiano
$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$	Ecuación de Monod para el crecimiento bacteriano en un cultivo <i>batch</i>
$N_A$	Moles del reactante gaseoso A
$N_B$	Moles del reactante sólido B
$k_s$	Coefficiente de primer orden para la reacción en la superficie del sólido
$a$	Coefficiente estequiométrico de A
$b$	Coefficiente estequiométrico de B
$C_{Ag}$	Concentración del reactante A en el seno del fluido
$C_{Bact}$	Concentración de bacterias en la superficie
$X_B$	Conversión molar de B
$\tau$	Tiempo de conversión completa
$R_0$	Radio inicial de la partícula
$R$	Radio de la partícula

## 9.2 Metodología de preparación de perlas de azufre esféricas

### Materiales y equipos

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

### Obtención de perlas de azufre

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

## 9.3 Resultados Adicionales

### 9.3.1 Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en soluciones de lixiviación química ajustada a diferentes pH

Tabla 6: Tabla de mediciones de pH en el tiempo, estudio de actividad biooxidativa de azufre en soluciones de lixiviación química ajustada a diferentes pH iniciales y control en medio de cultivo basal a pH inicial 2,3

t [h]	pH					
	0	120	264	336	480	648
<b>M. Basal pH 2,30</b>	2,32	1,80	1,17	1,05	0,77	0,83
<b>Sol. Lix pH 2,03</b>	2,08	1,97	1,88	1,88	1,77	1,92
<b>Sol. Lix. pH 1,8</b>	1,87	1,79	1,71	1,70	1,60	1,76
<b>Sol. Lix. pH 1,4</b>	1,48	1,39	1,31	1,31	1,20	1,38

Tabla 7: Tabla de mediciones de la concentración de ion sulfato en solución, en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en soluciones de lixiviación química ajustada a diferentes pH iniciales y control en medio de cultivo basal a pH inicial 2,3

t [h]	SO <sub>4</sub> [g/L]					
	0	120	264	336	480	648
<b>M. Basal pH 2,30</b>	0,93	2,43	3,99	5,21	8,71	10,48
<b>Sol. Lix pH 2,03</b>	67,24	70,21	69,91	72,77	66,28	63,16
<b>Sol. Lix. pH 1,8</b>	69,06	69,15	63,88	67,42	63,12	64,92
<b>Sol. Lix. pH 1,4</b>	71,83	67,47	68,69	64,64	64,33	64,81

Tabla 8: Concentración de ácido sulfúrico en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en soluciones de lixiviación química ajustada a diferentes pH iniciales y control en medio de cultivo basal a pH inicial 2,3

t [h]	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [g/L]					
	0	120	264	336	480	648
<b>M. Basal pH 2,30</b>	0,65	3,60	9,02	10,79	17,65	23,15
<b>Sol. Lix pH 2,03</b>	9,93	12,36	12,65	9,51	13,14	14,12
<b>Sol. Lix. pH 1,8</b>	15,53	16,67	17,65	15,20	18,05	20,89
<b>Sol. Lix. pH 1,4</b>	30,33	32,66	30,31	30,01	32,37	33,45

**Tabla 9: Curva de crecimiento bacteriano en cultivo Batch, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en soluciones de lixiviación química ajustada a diferentes pH iniciales y control en medio de cultivo basal a pH inicial 2,3**

<b>t [h]</b>	<b>Ln (N° Bacterias/ml)</b>					
	<b>0</b>	<b>120</b>	<b>264</b>	<b>336</b>	<b>480</b>	<b>648</b>
<b>M. Basal pH 2,30</b>	8,63	11,97	12,28	12,29	12,36	12,22
<b>Sol. Lix pH 2,03</b>	8,89	9,07	9,54	9,42	9,54	9,07
<b>Sol. Lix. pH 1,8</b>	9,16	9,55	9,57	9,48	9,51	9,18
<b>Sol. Lix. pH 1,4</b>	9,11	9,46	9,76	9,69	9,74	9,18

### 9.3.2 Estudio de la actividad oxidativa de azufre de las bacterias en medios de cultivo basales con variadas concentraciones de $K_2SO_4$

#### 9.3.2.1 Evolución del pH en el tiempo

Tabla 10: Tabla de mediciones de pH en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con altas concentraciones de ion sulfato en solución

t [h]	pH				
	0	96	168	312	480
M. Basal 0,8 [g/L] SO <sub>4</sub>	2,16	1,51	1,30	1,10	0,98
M. B. 20 [g/L] SO <sub>4</sub>	2,93	2,79	2,79	2,77	2,75
M. B. 30 [g/L] SO <sub>4</sub>	3,03	2,85	2,85	2,83	2,80
M. B. 50 [g/L] SO <sub>4</sub>	3,18	3,02	3,01	2,99	2,96
M. B. 70 [g/L] SO <sub>4</sub>	3,32	3,21	3,22	3,19	3,15

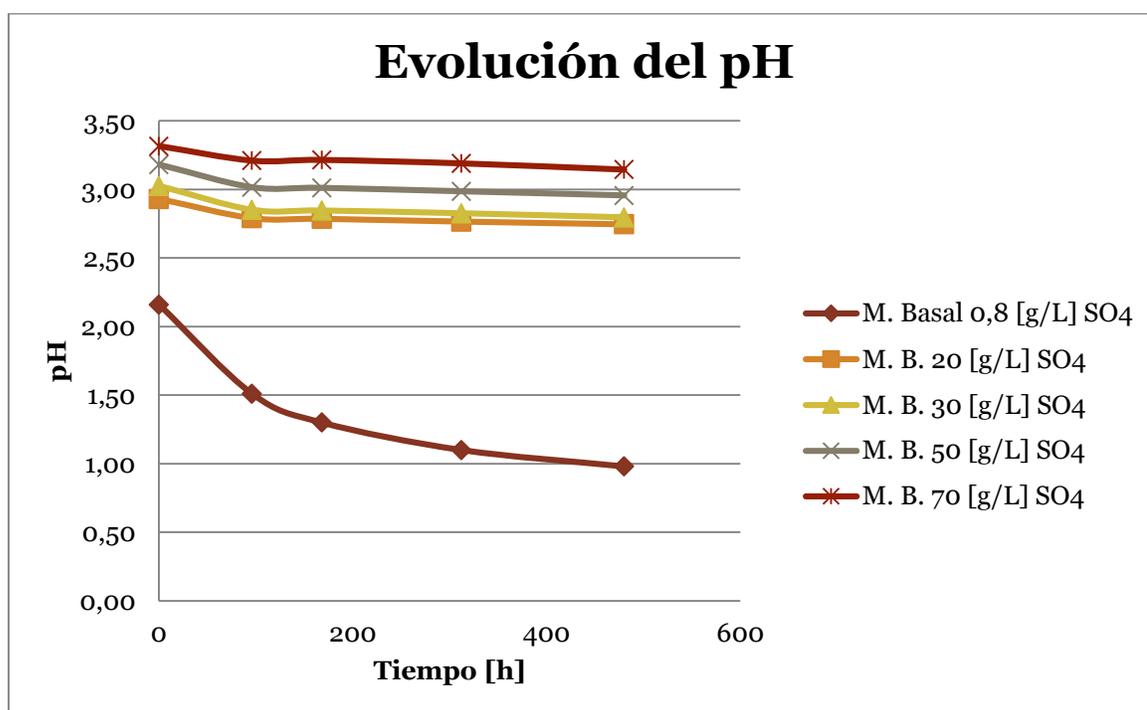
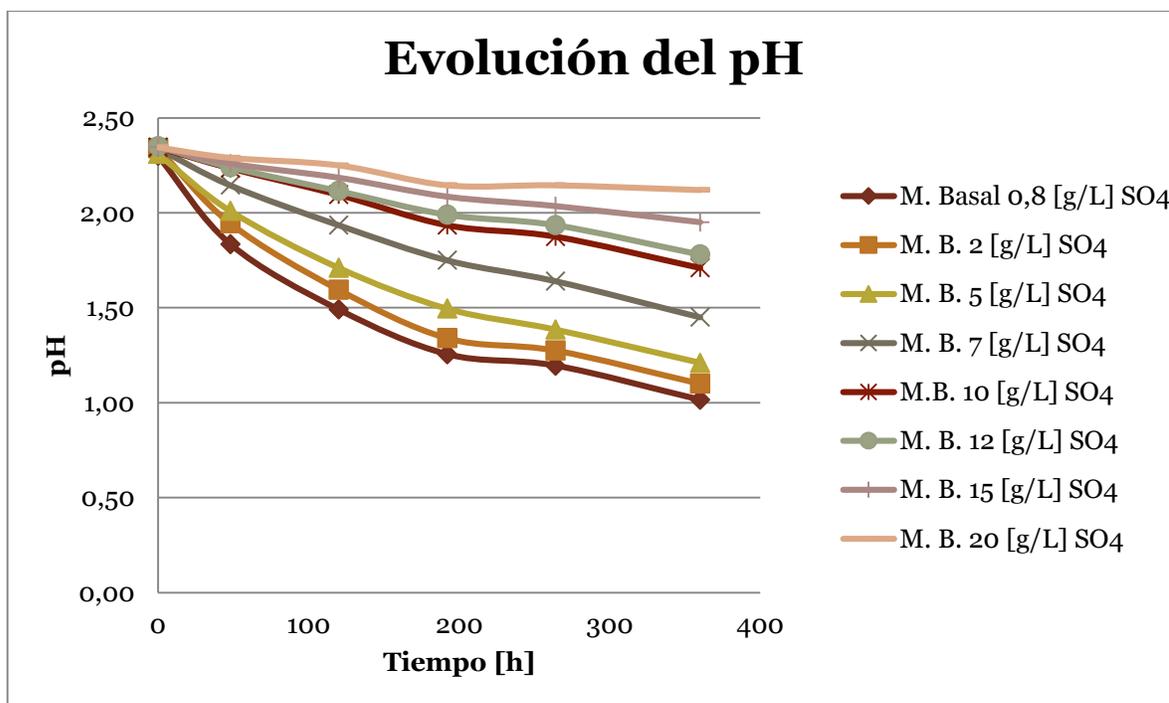


Figura 21: Evolución del pH en el tiempo, de cultivos en medios de cultivo basal con altas concentraciones de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) y el control sin agregar  $K_2SO_4$ .

**Tabla 11:** Tabla de mediciones de pH en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con bajas concentraciones de ion sulfato en solución.

t [h]	pH					
	0	48	120	192	264	360
<b>M. Basal 0,8 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	2,30	1,84	1,49	1,26	1,20	1,02
<b>M. B. 2 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	2,34	1,95	1,60	1,34	1,28	1,10
<b>M. B. 5 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	2,31	2,01	1,71	1,50	1,39	1,21
<b>M. B. 7 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	2,34	2,15	1,94	1,75	1,64	1,45
<b>M.B. 10 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	2,35	2,24	2,10	1,94	1,88	1,71
<b>M. B. 12 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	2,35	2,24	2,12	1,99	1,94	1,78
<b>M. B. 15 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	2,35	2,26	2,19	2,09	2,04	1,95
<b>M. B. 20 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	2,35	2,29	2,25	2,15	2,15	2,12



**Figura 22:** Evolución del pH en el tiempo, de cultivos en medios de cultivo basal con bajas concentraciones de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) y el control sin agregar  $K_2SO_4$ .

### 9.3.2.2 Concentración de ion sulfato en el tiempo

Tabla 12: Tabla de mediciones de la concentración de ion sulfato en solución en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con altas concentraciones de ion sulfato en solución.

t [h]	SO <sub>4</sub> [g/L]				
	0	96	168	312	480
M. Basal 0,8 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,67	2,39	3,60	6,21	10,05
M. B. 20 [g/L] SO <sub>4</sub>	16,36	18,42	14,32	16,17	18,35
M. B. 30 [g/L] SO <sub>4</sub>	23,20	27,35	22,12	24,60	26,15
M. B. 50 [g/L] SO <sub>4</sub>	46,92	49,28	46,22	48,18	50,26
M. B. 70 [g/L] SO <sub>4</sub>	72,34	69,85	62,57	68,12	62,88

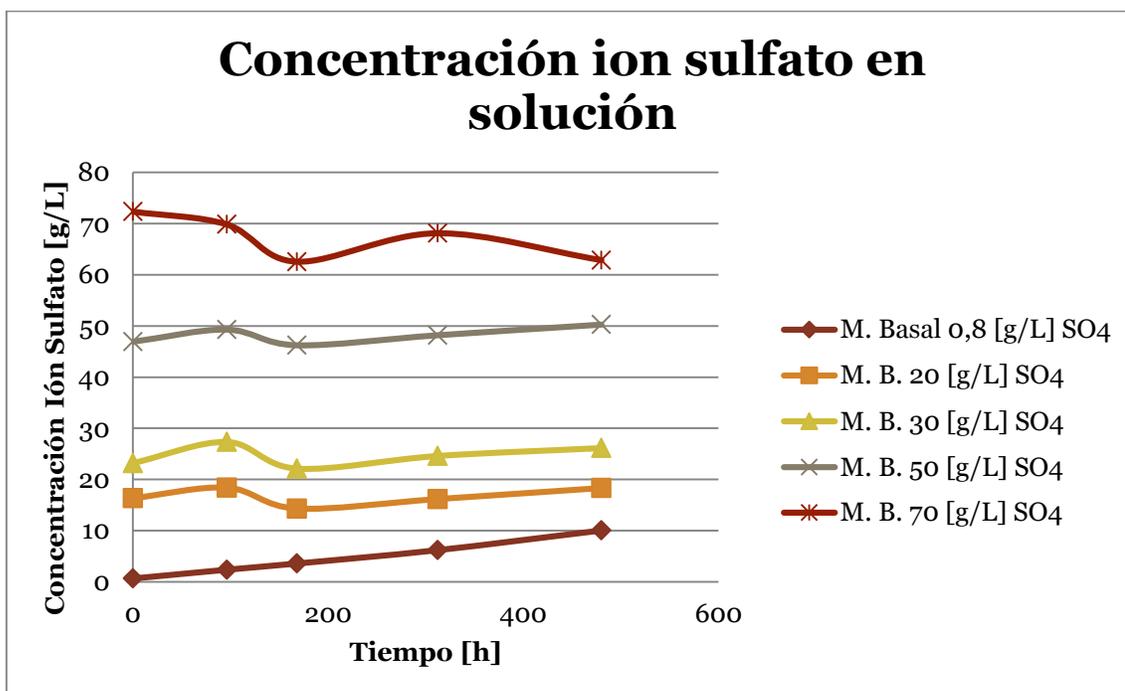
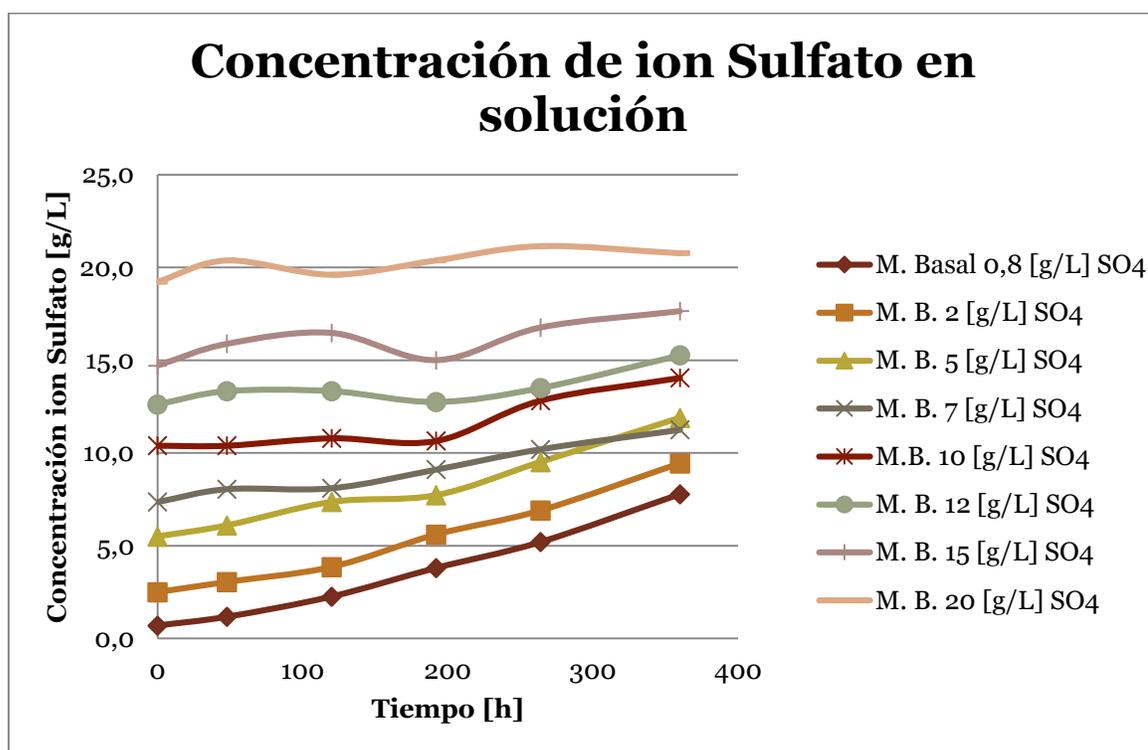


Figura 23: Concentración de ion sulfato en el tiempo, de cultivos de medio basal con altas concentraciones de ion sulfato y el control sin agregar  $K_2SO_4$ .

**Tabla 13:** Tabla de mediciones de la concentración de ion sulfato en solución en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con bajas concentraciones de ion sulfato en solución.

t [h]	SO <sub>4</sub> [g/L]					
	0	48	120	192	264	360
M. Basal 0,8 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,7	1,2	2,3	3,8	5,2	7,8
M. B. 2 [g/L] SO <sub>4</sub>	2,5	3,1	3,9	5,6	6,9	9,4
M. B. 5 [g/L] SO <sub>4</sub>	5,5	6,1	7,4	7,7	9,5	11,9
M. B. 7 [g/L] SO <sub>4</sub>	7,4	8,1	8,1	9,1	10,2	11,3
M.B. 10 [g/L] SO <sub>4</sub>	10,4	10,4	10,8	10,7	12,8	14,0
M. B. 12 [g/L] SO <sub>4</sub>	12,6	13,3	13,3	12,8	13,5	15,3
M. B. 15 [g/L] SO <sub>4</sub>	14,7	15,9	16,5	15,0	16,8	17,6
M. B. 20 [g/L] SO <sub>4</sub>	19,2	20,4	19,6	20,4	21,2	20,8



**Figura 24:** Concentración de ion sulfato en el tiempo, de cultivos de medio basal con altas concentraciones de ion sulfato y el control sin agregar  $K_2SO_4$ .

### 9.3.2.3 Concentración de ácido sulfúrico en el tiempo

Tabla 14: Mediciones de la concentración de ácido sulfúrico en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con altas concentraciones de ion sulfato en solución.

t [h]	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [g/L]				
	0	96	168	312	480
M. Basal 0,8 [g/L] SO <sub>4</sub>	1,33	4,88	7,77	12,08	22,30
M. B. 20 [g/L] SO <sub>4</sub>	1,32	1,35	1,67	1,45	1,68
M. B. 30 [g/L] SO <sub>4</sub>	1,38	1,45	2,05	1,57	1,70
M. B. 50 [g/L] SO <sub>4</sub>	1,28	1,58	1,95	1,53	1,74
M. B. 70 [g/L] SO <sub>4</sub>	1,30	2,08	1,77	1,37	1,52

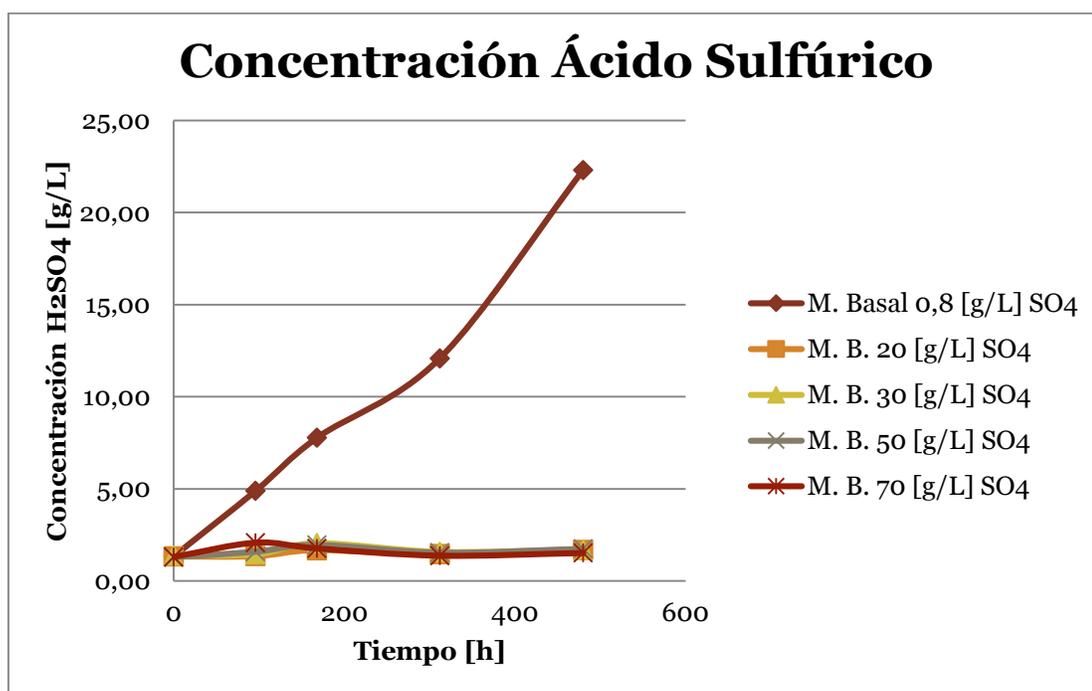


Figura 25: Concentración de ácido sulfúrico en el tiempo, de cultivos en medios basales con altas concentraciones de sulfato de potasio y el control sin agregar  $K_2SO_4$ .

Tabla 15: Mediciones de la concentración de ácido sulfúrico en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con altas concentraciones de ion sulfato en solución.

t [h]	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [g/L]					
	0	48	120	192	264	360
M. Basal 0,8 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,78	1,54	3,75	6,46	9,90	16,18
M. B. 2 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,83	1,51	3,83	6,33	9,23	14,42
M. B. 5 [g/L] SO <sub>4</sub>	1,01	1,79	3,92	6,11	8,74	13,58
M. B. 7 [g/L] SO <sub>4</sub>	1,23	1,64	2,97	4,50	6,15	9,46
M.B. 10 [g/L] SO <sub>4</sub>	1,35	1,69	2,48	3,79	4,59	6,67
M. B. 12 [g/L] SO <sub>4</sub>	1,39	1,74	2,65	3,39	4,15	5,98
M. B. 15 [g/L] SO <sub>4</sub>	1,54	1,86	2,50	3,34	3,43	4,51
M. B. 20 [g/L] SO <sub>4</sub>	1,72	2,01	2,53	3,12	3,39	3,68

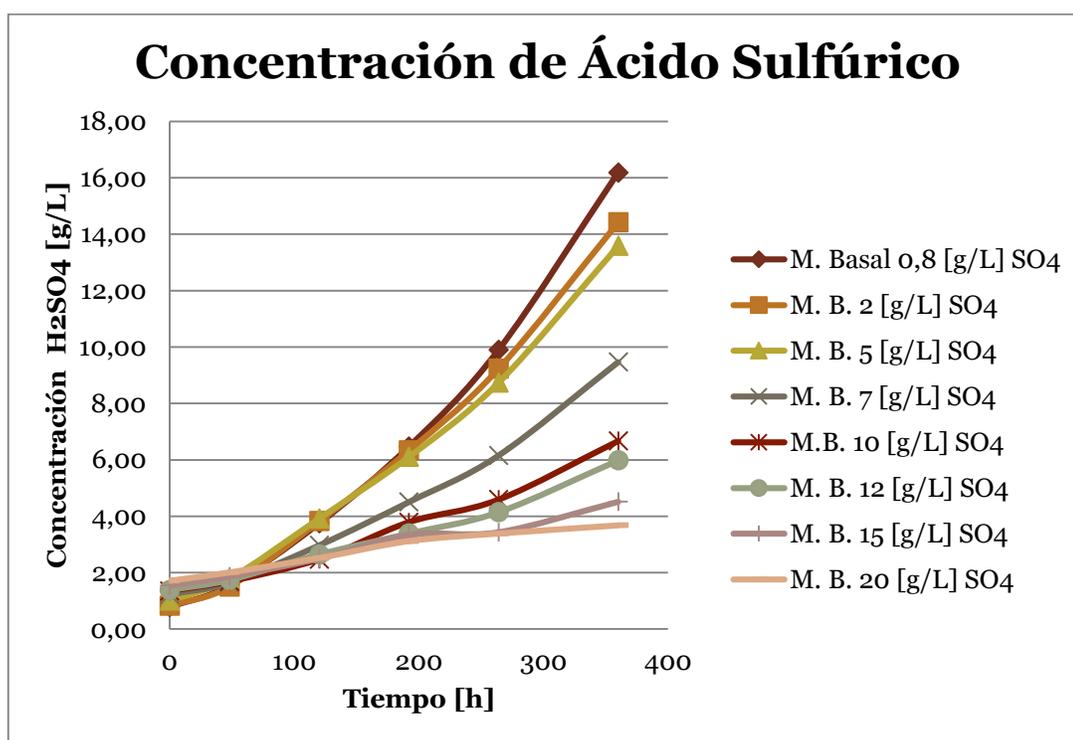


Figura 26: Concentración de ácido sulfúrico en el tiempo, de cultivos en medios basales con bajas concentraciones de sulfato de potasio y el control sin agregar K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 9.3.2.4 Generación de ácido sulfúrico en el tiempo

Tabla 16: Masa de ácido sulfúrico producido y existente en los distintos medios de cultivo con altas concentraciones de sulfato de potasio

Generación H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)					
t [h]	0	96	168	312	480
M. Basal 0,8 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,00	0,16	0,28	0,43	0,73
M. B. 20 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
M. B. 30 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,00	0,00	0,03	0,01	0,01
M. B. 50 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,00	0,01	0,03	0,01	0,02
M. B. 70 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,00	0,03	0,02	0,01	0,01

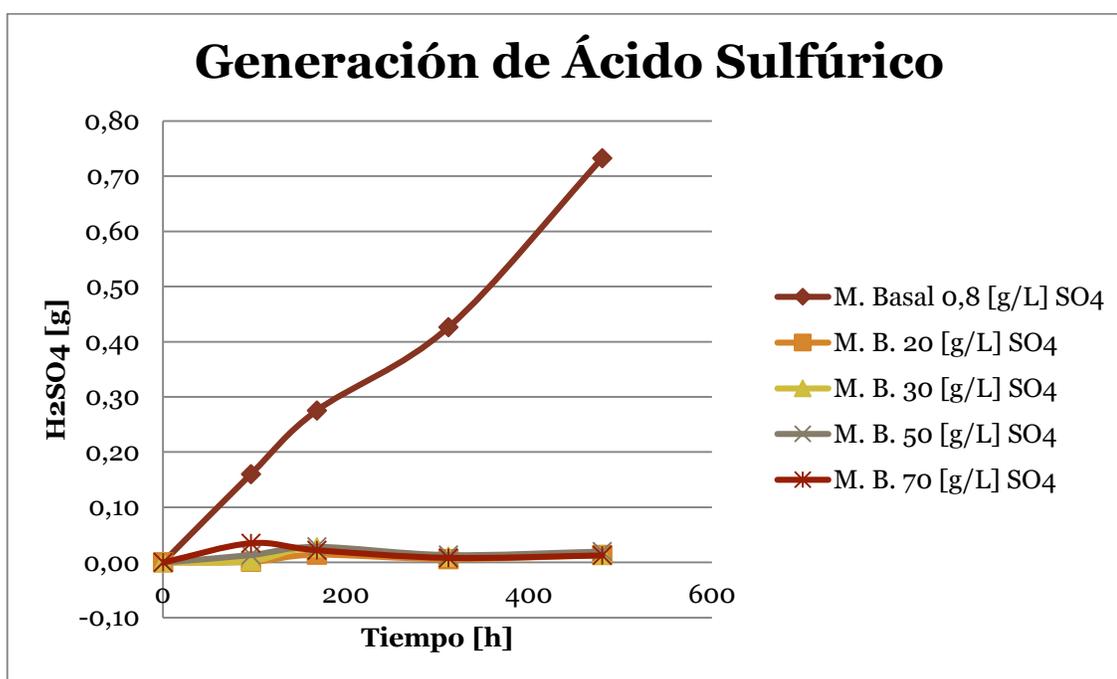


Figura 27: Curva de la masa de ácido sulfúrico producido en cada uno de los medios de cultivo con altas concentraciones de sulfato de potasio

Tabla 17: Masa de ácido sulfúrico producido y existente en los distintos medios de cultivo con bajas concentraciones de sulfato de potasio

Generación H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [g]						
t [h]	0	48	120	192	264	360
M. Basal 0,8 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,00	0,03	0,11	0,19	0,27	0,39
M. B. 2 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,00	0,03	0,11	0,19	0,25	0,35
M. B. 5 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,00	0,03	0,11	0,17	0,24	0,33
M. B. 7 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,00	0,02	0,07	0,11	0,15	0,21
M.B. 10 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,00	0,01	0,04	0,08	0,10	0,14
M. B. 12 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,00	0,02	0,05	0,07	0,09	0,12
M. B. 15 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,00	0,01	0,04	0,06	0,06	0,08
M. B. 20 [g/L] SO <sub>4</sub>	0,00	0,01	0,03	0,05	0,05	0,06

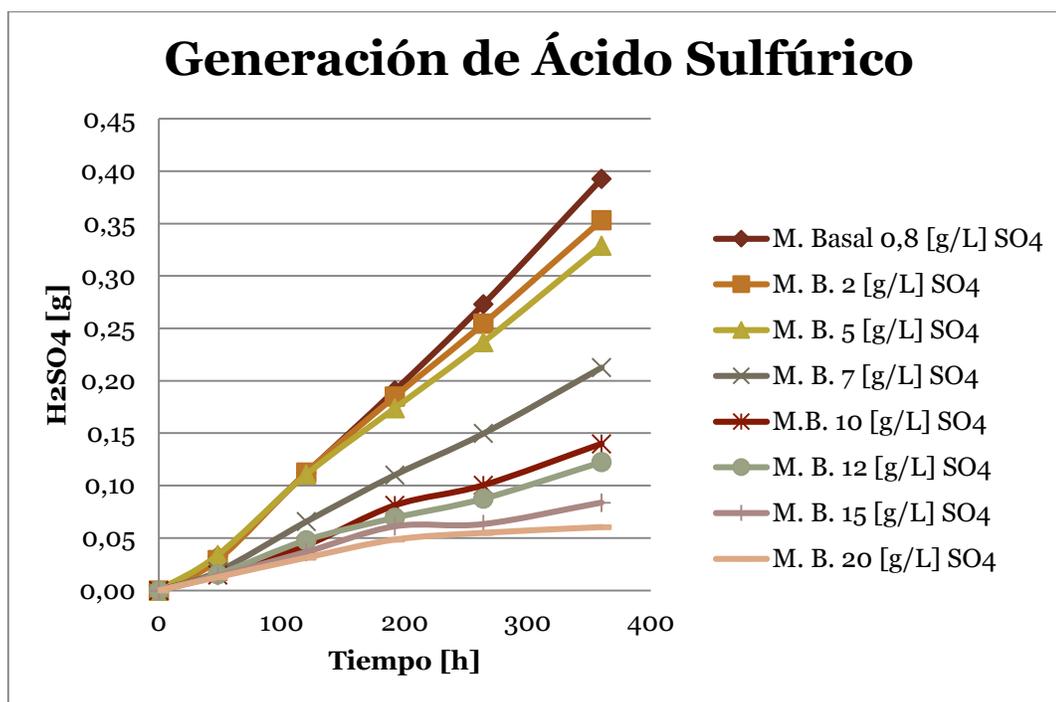


Figura 28: Curva de la masa de ácido sulfúrico producido en cada uno de los medios de cultivo con bajas concentraciones de sulfato de potasio

### 9.3.2.5 Curvas de crecimiento Bacteriano

Tabla 18: Curva de crecimiento bacteriano en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con altas concentraciones de ion sulfato en solución.

t [h]	Ln(Nº Bacterias/ml)				
	0	96	168	312	480
M. Basal 0,8 [g/L] SO <sub>4</sub>	9,90	12,08	12,25	12,31	12,41
M. B. 20 [g/L] SO <sub>4</sub>	9,86	11,26	11,35	11,59	11,51
M. B. 30 [g/L] SO <sub>4</sub>	9,86	11,35	11,52	11,52	11,54
M. B. 50 [g/L] SO <sub>4</sub>	9,89	11,35	11,45	11,57	11,58
M. B. 70 [g/L] SO <sub>4</sub>	9,93	11,35	11,46	11,57	11,58

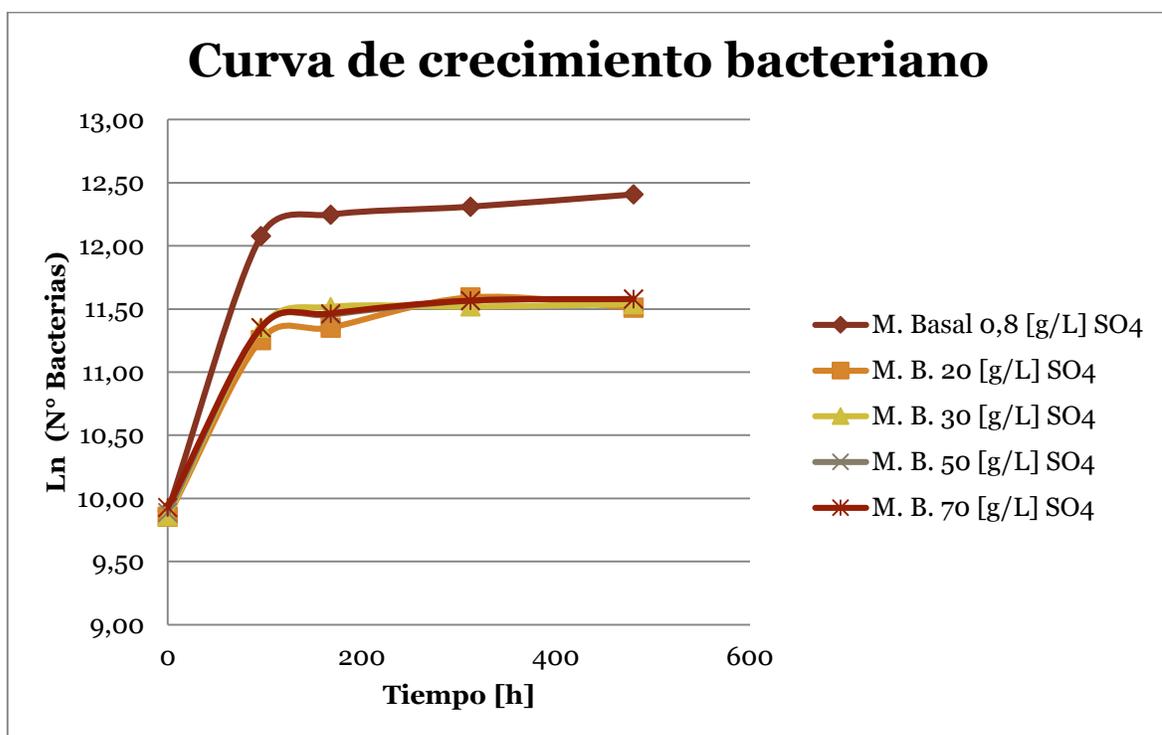
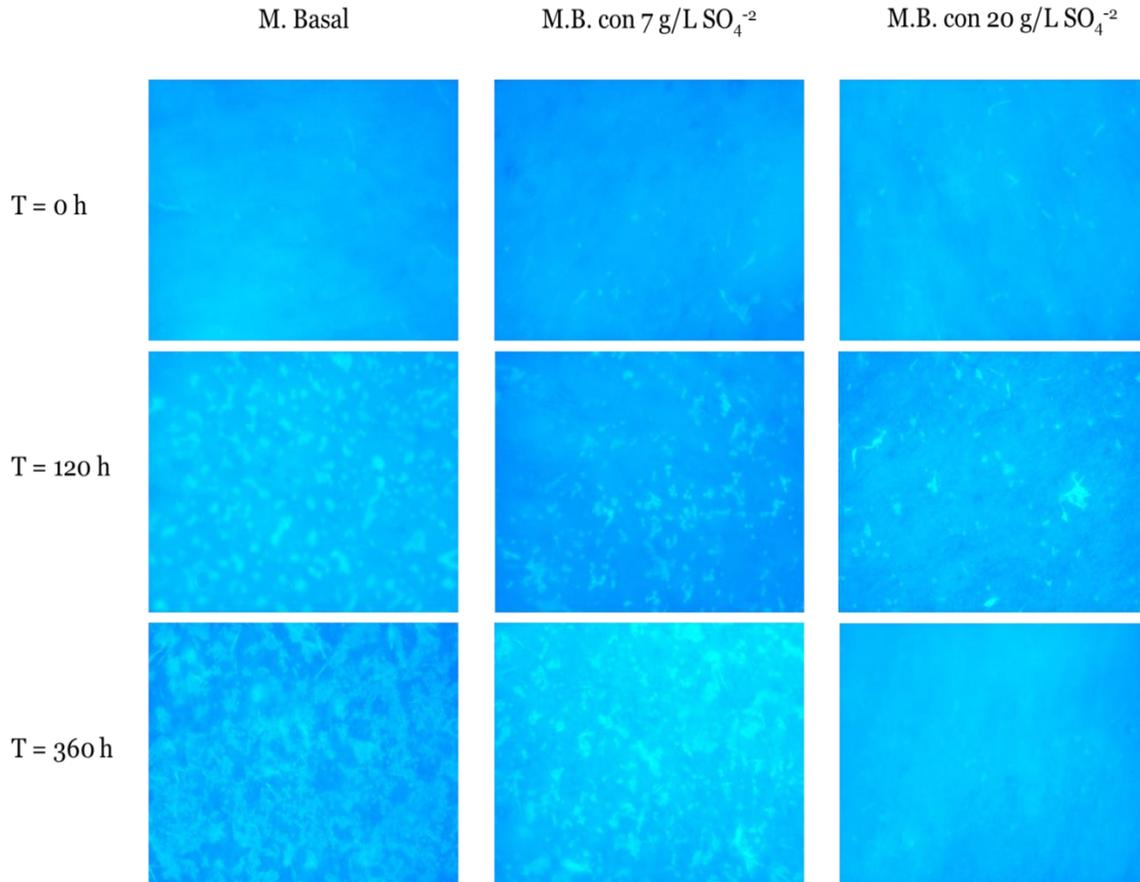


Figura 29: Curva de crecimiento bacteriano de cultivos en medios basales con altas concentraciones de sulfato de potasio y control sin agregar sulfato de potasio  $K_2SO_4$ .

**Tabla 19: Curva de crecimiento bacteriano en el tiempo, estudio de la actividad biooxidativa de azufre en medios de cultivo basales con bajas concentraciones de ion sulfato en solución.**

<b>t [h]</b>	<b>Ln (N° Bacterias/ml)</b>					
	<b>0</b>	<b>48</b>	<b>120</b>	<b>192</b>	<b>264</b>	<b>360</b>
<b>M. Basal 0,8 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	10,83	12,13	12,50	12,62	12,61	12,61
<b>M. B. 2 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	10,87	11,92	12,32	12,49	12,48	12,48
<b>M. B. 5 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	10,83	11,83	12,32	12,43	12,42	12,43
<b>M. B. 7 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	10,88	11,75	12,23	12,28	12,29	12,29
<b>M.B. 10 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	10,86	11,61	12,05	12,20	12,20	12,18
<b>M. B. 12 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	10,87	11,55	11,95	12,03	12,03	12,00
<b>M. B. 15 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	10,87	11,43	11,65	11,66	11,67	11,70
<b>M. B. 20 [g/L] SO<sub>4</sub></b>	10,87	11,18	11,37	11,36	11,29	11,32

**9.3.2.6 Imágenes recuento de células con marcador fluorescente DAPI. Estudio de la actividad oxidativa de azufre a diferentes concentraciones de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ).**



**Figura 30: Imágenes del recuento de células con el marcador fluorescente DAPI, de los cultivos con medio basal (0,8 [g/L]  $SO_4$ ), con 7 [g/L]  $SO_4$  y con 20 [g/L] (columnas) en los tiempos 0, 120 y 360 horas (filas).**

## 9.4 Ejemplo de cálculo de generación de ácido y conversión

La conversión para cada muestra recolectada en el transcurso de cada experimento se calculó de la siguiente forma:

Primero a partir de la titulación acido-base se obtuvo la concentración molar de ácido sulfúrico  $C[M]$ . (También se calcula la concentración en  $[g/L]$ ).

A partir de esta, se calculó en número de moles totales de ácido sulfúrico, multiplicando la concentración obtenida por el volumen de medio en el matraz antes de sacar la muestra, más el número de moles de ácido retirados en las muestras anteriores. También se obtienen los gramos de ácido, multiplicando por el peso molecular del ácido.

$$(moles_{H_2SO_4})_t = C[M]_t \cdot (V_{matraz}[L])_t + \sum_{i=1}^{t-1} (V_{muestra}[L])_i \cdot C[M]_i$$

Luego de obtener los moles de ácido totales en cada matraz y en cada tiempo se calculan los moles de ácido generados en el tiempo, restándole a los moles totales en cada tiempo, los moles existentes en el tiempo inicial, como sigue:

$$(moles_{H_2SO_4})_t \text{ generados} = (moles_{H_2SO_4})_t - (moles_{H_2SO_4})_{t=0}$$

Con estos moles de ácido (también se calculan los gramos), por estequiometria se calculan los moles de azufre que fueron oxidados. En este caso por cada mol de ácido producido se consume un mol de azufre.

$$(moles_S)_t \text{ oxidados} = (moles_{H_2SO_4})_t \text{ generados}$$

A continuación se calculan los moles de azufre iniciales con que parten los cultivos, a partir del peso molecular del azufre y de la masa de azufre que se utiliza para los mismos.

$$(moles_S)_{iniciales} = \frac{\text{masa de } S}{PM(S)} = \frac{1,5 [g]}{32,065 \left[ \frac{g}{mol} \right]} = 0,0468 [moles]$$

Finalmente, se calcula la conversión en el tiempo como los moles de azufre oxidados divididos entre los moles de azufre iniciales:

$$X(\text{molar})_t = \frac{(moles_S)_t \text{ oxidados}}{(moles_S)_{iniciales}}$$