

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Modelado matemático y análisis dinámico de los procesos involucrados en la
cristalización de bioscorodita para la remoción de arsénico**

Tesis que presenta

Edgar Noé Tec Caamal

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directores de la Tesis: **Dra. Refugio Rodríguez Vázquez, Dr. Ricardo Aguilar
López**

Ciudad de México

Febrero, 2021

Dedicatoria

Al que es antes de todas las cosas y por Él subsisto.

A mi padre y madre, para quienes la renuncia a mi nunca fue una alternativa.

A mis hermanos y hermanas por embellecer cada día.

A ellos dedico esta tesis.

Agradecimientos

A la Dra. Refugio Rodríguez Vázquez por el esfuerzo mostrado en la culminación de este proyecto.

Al Dr. Ricardo Aguilar López por su asesoría constante en el análisis de sistemas de biorreacción.

A los doctores Luis B. Flores, Jaime Ortega, Frédéric Thalasso, Luis Torres y Sergio Medina por sus importantes aportaciones a este trabajo.

Al Cinvestav-IPN por ser mi casa de estudios.

Al CONACyT por la beca otorgada (no. 639043) para mis estudios de doctorado.

Índice general

1. Introducción	1
1.1 Química del arsénico	1
1.2 Contaminación por arsénico y su impacto en la salud	3
1.3 Arsénico en aguas residuales de la industria metalúrgica	6
1.4 Procedimientos de inmovilización de arsénico en la industria metalúrgica	7
1.5 Precipitación de escorodita	9
1.6 Biorreactores para la cristalización de escorodita	12
1.6.1 Factores que controlan la formación de bioscorodita	16
1.7 Modelos generales para reactores biológicos	17
2. Justificación	20
3. Objetivos	21
3.1 Objetivo general	21
3.2 Objetivos particulares	21
4. Materiales y métodos	22
4.1 Modelo cinético para la oxidación de Fe(II) por un consorcio de Sulfolobales en un CSTR bajo condiciones extremas	22
4.2 Modelo cinético para la biooxidación simultánea de Fe(II)/As(III), precipitación de As(V) y cristalización de escorodita	25
4.3 Modelo cinético para el proceso industrial THIOTEQ™ Scorodite	30
4.4 Determinación del índice de saturación (IS)	32
4.5 Estrategia de ajuste de parámetros	33
4.6 Análisis de sensibilidad paramétrica global	34
4.7 Análisis en estado estacionario	35
4.8 Análisis de estabilidad por el segundo criterio de Lyapunov	35
4.9 Análisis estadístico	36
4.9 Software	36
4.10 Colecta de datos experimentales para la validación de los modelos	37
5. Resultados y discusión	41
5.1 Análisis de la oxidación de hierro usando un consorcio de Sulfolobus en condiciones de alta temperatura y pH ácido	41
5.1.1 Comparación de modelos cinéticos no estructurados para la tasa específica de crecimiento microbiano	42
5.1.2 Análisis paramétrico	44

5.1.3 Validación del modelo	47
5.1.4 Análisis del reactor en estado estacionario	50
5.2 Modelado de la cristalización de bioscorodita en condiciones extremas: Aspectos cinéticos de la biooxidación in-situ de Fe(II)/As(III), y precipitación de As(V)	53
5.2.1 Ajuste paramétrico, estadística y análisis de sensibilidad	53
5.2.2 Evaluación del modelo: Cinética de biooxidación, precipitación y cristalización	58
5.2.3 Factores de control en la cinética: Inóculo, y concentraciones iniciales de Fe(II) y As(III)	64
5.3 Análisis de la oxidación de Fe(II), precipitación de As(V) y cristalización de bioscorodita en un reactor con agitación neumática	68
5.3.1 Análisis paramétrico	68
5.3.2 Evaluación del modelo	72
5.3.3. Análisis de parámetros operacionales basado en modelos: Reactores en régimen batch y continuo	76
6. Conclusiones y recomendaciones	82
6.1 Conclusiones	82
6.2 Recomendaciones	83
Bibliografía	84
Lista de publicaciones	91
Anexos	92

Índice de tablas

Tabla 1. Niveles de contaminación por arsénico en distintos países (Modificado de Shaji et al. 2020).	5
Tabla 2. Bacterias capaces de oxidar hierro (Fuente: Ilbert & Bonnefoy, 2013).	12
Tabla 3. Características de procesos biológicos utilizados para la formación de bioscorodita.	13
Tabla 4. Comparación de modelos de limitación e inhibición por sustrato para la tasa específica de crecimiento microbiano.	44
Tabla 5. Parámetros cinéticos del modelo de oxidación en un sistema continuo.	46
Tabla 6. Valores de los parámetros del modelo de oxidación de Fe(II) y As(III), y precipitación de As(V) en régimen batch.	54
Tabla 7. Parámetros cinéticos utilizados para realizar simulaciones en regímenes batch y continuo.	69
Tabla 8. Parámetros operacionales empleados para la simulación.	70

Índice figuras

Figura 1. Diagrama potencial redox (Eh)-pH para especies de arsénico en medio acuoso a 25°C y 1 bar de presión (Fuente: Henke and Hutchinson, 2009)	2
Figura 2. Representación general de los procesos involucrados en la cristalización de escorodita para la remoción de arsénico.	14
Figura 3. Diagrama representativo de un biorreactor airlift. L_R , altura del reactor, L_{TC} longitud del tubo concéntrico, D_{TC} diámetro del tubo concéntrico, D_R diámetro del reactor.	15
Figura 4. Representación esquemática de los fenómenos involucrados en el proceso de formación de bioscorodita, empleando un cultivo de <i>Acidianus brierleyi</i> en condiciones extremófilas.	26
Figura 5. Esquema general del proceso de precipitación de As(V) como bioscorodita (modificado de PAQUES Technology, Holanda).	30
Figura 6. Modelado del crecimiento microbiano en un reactor en lote: A) Datos experimentales y simulados de la tasa específica de crecimiento en función de la concentración de Fe(II), usando varios modelos cinéticos no estructurados. B) Gráfico de residuales indicando la bondad de ajuste para el modelo de Andrews.	43
Figura 7. Análisis de sensibilidad para el modelo de oxidación de Fe(II) en sistema continuo.	45
Figura 8. Comparación de datos experimentales y simulados para la oxidación continua de Fe(II). A) Concentración de Fe(II), productividad y tasa de dilución. B) concentración de oxígeno disuelto y concentración de biomasa.	49
Figura 9. Diagramas de contorno obtenidos del análisis de bifurcación, considerando la tasa de dilución (D) y la concentración de Fe(II) en la alimentación al reactor ($Fe(II)_{in}$) como parámetros de bifurcación.	51
Figura 10. Oscilaciones en la variable O_2 evaluando $D=0.365\text{ d}^{-1}$ y $Fe(II)_{in}=0.45\text{ g L}^{-1}$.	52
Figura 11. Análisis de sensibilidad. A) Gráfico de dispersión de las evaluaciones del modelo para las variables Fe(II), As(III) y As(V). B) Índices de sensibilidad.	57
Figure 12. Datos experimentales y simulados del Sistema 1. Biooxidación de Fe(II) y As(III), precipitación de As(V), oxígeno disuelto, índice de saturación de escorodita y tamaño de cristal. Fuente de datos experimentales: Okibe et al. (2014).	59
Figura 13. Datos experimentales y simulados del Sistema 2. Biooxidación de Fe(II) y As(III), precipitación de As(V), oxígeno disuelto, índice de saturación de escorodita y tamaño de cristal. Fuente de datos experimentales: Okibe et al. (2014).	60

Figure 14. Datos experimentales y simulados del Sistema 3. Biooxidación de Fe(II) y As(III), precipitación de As(V), oxígeno disuelto, índice de saturación de escorodita y tamaño de cristal. Fuente de datos experimentales: Tanaka et al. (2017).	62
Figura 15. Experimento simulado con las condiciones reportadas por Okibe et al. (2014) con una concentración de inóculo de 1×10^8 células por mL^{-1} .	62
Figura 16. Tasas de transferencia de oxígeno para los tres sistemas.	63
Figura 17. Precipitación de As(V) y concentración de O_2 en función de la concentración inicial de Fe(II) y As(III). Inóculo: 1×10^6 (A1,B1), 1×10^7 (A2,B2), 1×10^8 (A3,B3) células mL^{-1} . Fe(II) ₀ /As(III) ₀ (mM): 9/6.5 (azul), 13.6/9.8 (naranja), 18/13.97 (amarillo), 22.4/16.2 (morado) y 26.9/19.4 (verde).	66
Figura 18. Regresiones lineales para las variables Fe(II) y As(V).	69
Figura 19. Gráfico de residuales para las variables Fe(II) y As(V).	73
Figura 20. Datos experimentales y simulados para Fe(II) (A) y precipitación de As(V) (B). Predicciones del modelo para las variables Fe(III) y O_2 (C) e índice de saturación (D).	74
Figura 21. Frecuencias de distribución de tamaño de cristales de bioscorodita producidos en el reactor a diferentes tiempos. Frecuencias día 30 (verde), 41 (azul) y 72 (rojo).	75
Figura 22. Efecto de la concentración de inóculo en: A) la oxidación de Fe(II), B) precipitación de As(V), C) generación de Fe(III) y velocidades máximas de oxidación de Fe(II) y precipitación de As(V).	77
Figura 23. Efecto de la relación molar Fe/As en la precipitación (%) de As(V) y la cristalización de escorodita (mm).	79
Figura 24. Análisis de bifurcación para el sistema de precipitación continua de As(V). Análisis en estado estacionario de: A) Fe(II), B) Precipitación de As(V), C) Concentración de oxígeno y D) Concentración de Fe(III).	80

Resumen

El proceso de formación de la bioscorodita es considerado como uno de los métodos más seguros para la inmovilización del arsénico y su disposición. La formación de este mineral ha sido ampliamente estudiada, buscando mejorar e innovar el proceso para obtener mejores rendimientos a menores costos de operación. El análisis de este proceso continúa siendo un área de interés, dado que es un proceso aplicable y escalable a nivel industrial para la remoción de arsénico de aguas residuales. Esta tesis tiene como objetivo analizar los fenómenos involucrados en la formación de la bioscorodita, que incluyen la oxidación de hierro y/o arsénico, la precipitación de arsénico en su estado de oxidación As(V) y la cristalización de bioscorodita. El primer capítulo proporciona los antecedentes de este trabajo, el segundo capítulo muestra la justificación de este trabajo, el tercer capítulo detalla los objetivos establecidos, y el capítulo cuarto muestra los métodos empleados para analizar cada sistema. De manera general se incluyen la construcción de modelos matemáticos para cada caso: i) biooxidación de hierro en condiciones de alta temperatura y pH ácido; ii) biooxidación de hierro y arsénico por *Acidianus brierleyi* en condiciones extremas para la formación de bioscorodita; y iii) biooxidación de hierro, precipitación de arsénico y cristalización de bioscorodita en un reactor neumático. El capítulo cinco muestra los resultados con su respectiva discusión. Se realizaron análisis de sensibilidad para los parámetros cinéticos de cada modelo para determinar los parámetros que ejercen mayor influencia en las salidas del modelo. Los análisis realizados por simulación, incluyendo los análisis de bifurcación y estabilidad permitieron proveer un panorama de la dinámica de cada sistema en regímenes batch y continuo, determinando regiones factibles de operación de los reactores para lograr mejores rendimientos. Finalmente, el capítulo seis muestra las conclusiones del trabajo y las recomendaciones para la realización de trabajos en el futuro.

Abstract

Bioscorodite process formation is considered as one of the safest methods for the immobilization of arsenic for its disposal. The formation of this mineral has been widely studied, seeking to improve and innovate the process to obtain better yields at lower operating costs. The analysis of this process continues to be an area of interest, since it is an applicable and scalable process at an industrial level for the removal of arsenic from wastewater. This thesis aims to analyze the phenomena involved in bioscorodite formation, which include the oxidation of iron and/or arsenic, the precipitation of arsenic in its oxidation state As(V) and the crystallization of bioscorodite. The first chapter provides the background, the second chapter shows the justification, the third chapter details the objectives pursued, and the fourth chapter shows the methods used to analyze each system. In a general way, the construction of mathematical models for each case are included: i) iron biooxidation under high temperature and acid pH conditions; ii) iron and arsenic biooxidation by *Acidianus brierleyi* under extreme conditions for bioscorodite formation; and iii) iron biooxidation, arsenic precipitation and scorodite crystallization in a pneumatic reactor. Chapter fifth shows the results with their respective discussion. Sensitivity analyses were performed for the kinetic parameters of each model to determine the parameters that have the greatest influence on the model outputs. The analyses performed by simulation, including the bifurcation and stability analyses, allowed to provide an overview of the dynamics of each system in batch and continuous regimes, determining feasible regions of operation of the reactors to achieve better yields. Finally, chapter sixth shows the conclusions of the work and recommendations for future work.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Química del arsénico

El arsénico es un elemento que pertenece al grupo VA de la tabla periódica que es clasificado químicamente como un metaloide (semimetal), el cual es un material metálico de color gris, frágil e insoluble en agua y ocupa el vigésimo lugar entre los elementos en abundancia en la corteza terrestre (National Research Council, 1977). En la naturaleza, el arsénico es encontrado principalmente en su forma de sulfuro en minerales complejos que contienen plata, plomo, cobre, níquel, antimonio, cobalto y hierro (WHO, 2001). El arsénico puede encontrarse en formas orgánicas e inorgánicas con estados de oxidación de As^{3-} (arsina), As^0 (arsénico), As^{3+} (arsenito), As^{5+} (arsenato), aunque en el medio ambiente predominan las formas As^{5+} y As^{3+} . El arsénico es raramente encontrado en su forma elemental en la naturaleza (ATSDR, 2007). El arsénico es uno de los principales constituyentes de más de 200 especies minerales, los cuales pueden ser clasificados en arsénico elemental, arsenitos (e.g. arsenolita, claudetita), arsenatos (e.g. mimetita, escorodita, mansfieldita), sulfuros de arsénico (e.g. arsenopirita, orpimento, realgar,), arseniuros (e.g. safflorita, sperrylita) y sulfosales de arsénico (e.g. enargita, proustita) (National Research Council, 1977; O'Day, 2006).

Las especies de arsénico y su movilidad son dependientes del pH y el potencial redox (Eh), y su toxicidad depende fuertemente de su unión con elementos o ligandos (Henke and Hutchinson, 2009). En aguas superficiales o subterráneas oxidantes (ambientes oxigenados), el arsénico es encontrado principalmente como As^{5+} . A valores de pH debajo de 2, el arsénico se presenta como H_3AsO_4 , sin embargo, en el rango de pH 2 a 11, el H_3AsO_4 puede disociarse como H_2AsO_4^- y HAsO_4^{2-} . En aguas subterráneas o hidrotermales con condiciones de baja concentración de oxígeno (condiciones reductoras/bajos valores de Eh), el arsénico puede presentarse principalmente en su estado de oxidación As^{3+} como H_3AsO_3 (WHO, 2001). Sin embargo, en condiciones de pH mayor a 9, puede presentarse como H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-} y AsO_3^{2-} (Henke and Hutchinson, 2009).

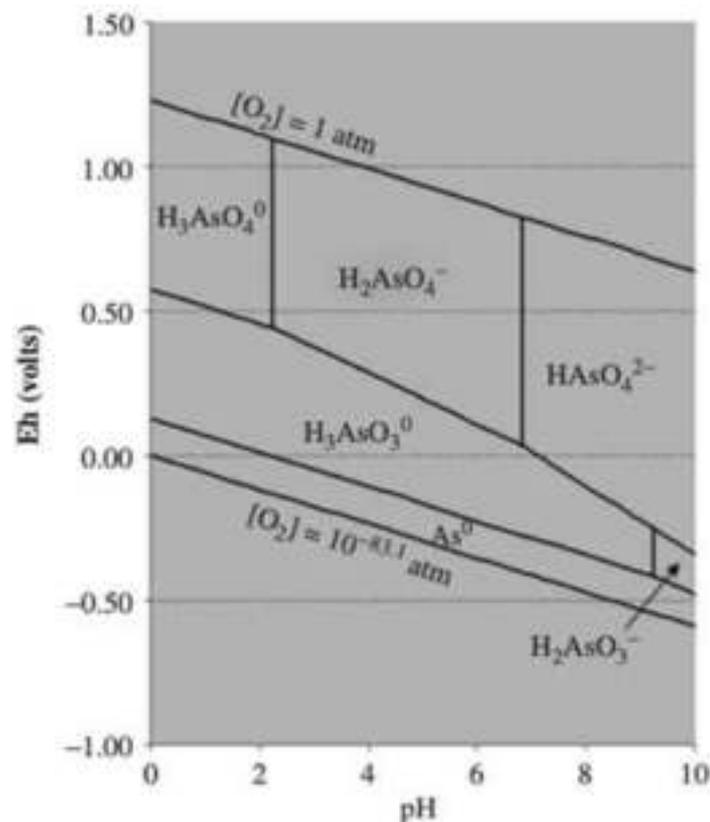


Figura 1. Diagrama potencial redox (Eh)-pH para especies de arsénico en medio acuoso a 25°C y 1 bar de presión (Fuente: Henke and Hutchinson, 2009).

1.2. Contaminación por arsénico y su impacto en la salud

El arsénico se encuentra en la atmósfera, en rocas, suelo, agua, sedimentos, aire y en organismos. Estos compuestos pueden ser liberados al ambiente debido a causas naturales como las actividades volcánicas y geotérmicas, la erosión de rocas y depósitos minerales, y los incendios forestales; así como antropogénicas, entre las cuales destacan la fundición de metales, actividades de minería, aplicación de plaguicidas, combustión de madera, carbón y petróleo, disposición e incineración de desechos municipales (IARC, 2012; Cope, 2017; WHO, 2019). Aunque el consumo de alimentos y medicamentos son fuentes de exposición al arsénico (Roy and Saha, 2002; WHO, 2019), el principal riesgo para la salud pública se origina en la contaminación de agua para consumo humano (WHO, 2011). En aguas subterráneas, las cuales son fuente primaria de agua potable, las concentraciones de As pueden ser elevadas debido a depósitos sedimentarios y minerales provenientes de rocas volcánicas (IARC, 2012; WHO, 2017). La calidad de estos recursos hídricos depende de la mineralogía y lixiviación de elementos tóxicos provenientes de formaciones geológicas en los acuíferos, las condiciones ambientales, así como el impacto de las actividades humanas (Schwarzenbach et al. 2010). De esta forma, el arsénico ha sido clasificado como uno de los 10 productos químicos con mayor y creciente importancia debido al riesgo que representa para la salud humana (WHO, 2017).

En 1993, la Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés) ha recomendado una concentración máxima de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de As en agua para consumo humano. Este valor fue fijado debido a su relación con el riesgo de la salud humana y las dificultades prácticas de su remoción, particularmente en cantidades pequeñas (WHO, 2017). La contaminación en aguas subterráneas en algunas zonas de diversos países puede alcanzar concentraciones elevadas de arsénico ($>10 \mu\text{g L}^{-1}$), debido a la composición natural del sedimento del acuífero (Shaji et al. 2020). La presencia de As en agua para consumo humano ha causado uno de los mayores problemas para la salud pública (Schwarzenbach et al. 2010).

Se estima que 1000 millones de personas están expuestas al As en los alimentos y más de 200 millones de personas ingieren arsénico en agua potable con concentraciones que exceden el límite recomendado por la Organización Mundial de la Salud (Naujokas et al. 2013) (**Tabla 1**). Los compuestos de As inorgánico se pueden absorber mediante inhalación, o ingestión y pueden ser distribuidos hacia todos los órganos. Estos compuestos pueden causar cáncer a través de la exposición a largo plazo (Hartwing and MAK Commission, 2016). Aunque los compuestos pentavalentes y trivalentes son absorbidos rápidamente por el tracto gastrointestinal, los compuestos de As^{3+} como: el trióxido de arsénico, As_2O_3 , trifluoruro de arsénico, AsF_3 , tricloruro de arsénico, $AsCl_3$ y arsina, AsH_3 , son más tóxicos debido a su alta solubilidad comparada con el As^{5+} (Grund et al. 2008). La arsina es considerada la forma más tóxica de arsénico, seguida por los arsenitos, arseniatos y los compuestos orgánicos de arsénico (WHO, 2017).

La ingesta de arsénico conlleva a la acumulación del elemento en cabello, piel y uñas (Roy and Saha, 2002; Naujokas et al. 2013; Hartwing and MAK Commission, 2016), lo cual puede causar hiperqueratosis, hipertensión, leucodermia, melanosis, disfunciones neurológicas, enfermedades cardiovasculares, bronquitis crónica, diabetes mellitus, entre otros efectos (Grund et al. 2008; Schwarzenbach et al. 2010) (**Figura 1**). Adicionalmente, los compuestos de arsénico pueden aumentar el riesgo de cáncer de piel, pulmón, vejiga, hígado, próstata, etc. (Naujokas et al. 2013; Young-Seoub et al. 2014, WHO, 2019). Debido a esta problemática, surge la necesidad de desarrollar y aplicar tecnologías capaces de remover As y mejorar la calidad del agua para consumo humano.

Tabla 1. Niveles de contaminación por arsénico en distintos países (Modificado de Shaji et al. 2020).

País	Concentración máxima (µg/L)	Población expuesta
<i>Africa</i>		
Burkina Faso	1,630	560,000
Camerún	2,000	4000
Ghana	4,500	ND
Nigeria	750	ND
<i>Asia</i>		
Bangladesh	4,730	85 millones
Burma	630	3.4 millones
Camboya	1,610	2.4 millones
China	2,000	19.6
India	3,880	50 millones
Japan	25,700	ND
Nepal	2,620	13 millones
Pakistán	2,580	13 millones
Rusia	360,000	ND
<i>Australia y oceanía</i>		
Vietnam	3,050	10 millones
Australia	300,000	1976
Guam	1,200	ND
Nueva Zelanda	8,500	1939
<i>Europa</i>		
Francia	263	17,000
Alemania	550	ND
Italia	1,300	ND
España	613	50,000
UK	355	ND
<i>Norte América</i>		
Canadá	100,000	ND
México	2,400	2 millones
USA	24,300	ND
<i>América del Sur</i>		
Argentina	14,969	2 millones
Brazil	100,000	ND
Chile	27,000	500,000

ND: No disponible.

1.3 Arsénico en aguas residuales de la industria metalúrgica

Las actividades de minería extractiva (pirometalurgia e hidrometalurgia), procesamiento de minerales o el drenaje de ácidos procedentes de minas pueden liberar gran cantidad de arsénico al ambiente. Algunos países donde se ha observado contaminación en suelos debido a procesos de minería son: Ghana, Zimbabue, Sudáfrica, México, Canadá y los Estados Unidos de América (Bissen and Frimmel, 2003). Los procesos de hidrometalurgia generan subproductos de arsénico. Por ejemplo, en el proceso de lixiviación y biolixiviación de enargita se obtienen compuestos de arsénico en estados de oxidación As(III) y As(V), los cuales deben ser recuperados para su disposición final. De los procesos de pirometalurgia se obtienen metales de interés como Cu, Ni, Pb, Zn y Ca, aunque también se pueden obtener materiales tóxicos, como Sb, Hg y As, presentándose este último en forma de As_2O_3 o As_2S_3 , los cuales presentan un alta toxicidad y solubilidad en agua (Filippou and Demopoulos, 1997) en comparación con los compuestos de As(V).

Las técnicas desarrolladas para la inmovilización de arsénico son dependientes de las especies de arsénico. Es por esto que en la mayoría de estos procedimientos, primero se considera el cambio de estado de oxidación de As(III) a su estado pentavalente, debido a que As(V) presenta un mayor grado de remoción (con mayor estabilidad) y es menos tóxico (Liévremont et al. 2009).

La oxidación de As(III) a As(V) con oxígeno es una reacción que ocurre en el ambiente. En condiciones de laboratorio, se ha observado que la reacción ocurre a muy bajas velocidades (Bissen and Frimmel, 2003). Otros agentes oxidantes fuertes como peróxido de hidrógeno, ozono, hipoclorito, ferrato (Fe(VI)), permanganato, carbón activado, o mezcla de gases han sido evaluados en la oxidación de arsénico a su estado pentavalente. Algunos de estos agentes oxidantes son utilizados en procesos industriales para la oxidación de As(III) a As(V). También, algunos de estos agentes oxidantes han sido evaluados empleando luz ultravioleta,

observándose resultados prometedores. Una de las principales desventajas en estos procesos son los costos altos de los materiales (Nazari et al. 2016).

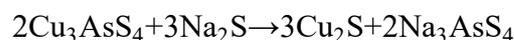
Una alternativa biológica a los procesos de oxidación química antes mencionados, es la biooxidación, en la cual se emplean microorganismos para cambiar el estado de oxidación del compuesto tóxico. Por ejemplo, en procesos de precipitación de arsénico se ha estudiado la oxidación de Fe(II) a Fe(III), el cual en presencia de As(V) puede precipitar en forma de bioscorodita (González-Contreras et al. 2009). Para estos procesos se ha empleado una amplia gama de bacterias y arqueas, entre ellas *Leptospirillum*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *L. ferriphilum*, *Thiobacillus prosperous*, *Sulfolobales*, entre otros (Johnson et al. 2012). En este sentido, Okibe et al. (2014) ha evaluado la capacidad de *Acidianus brierleyi* para la oxidación simultánea de Fe(II) y As(III) en un mismo reactor para la precipitación de As(V) como bioscorodita, la cual es considerada como uno de los materiales más seguros para disposición de arsénico.

1.4 Procedimientos de inmovilización de arsénico en la industria metalúrgica

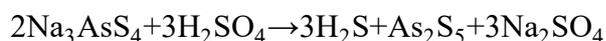
Las técnicas convencionales para la inmovilización de arsénico incluyen un conjunto de procesos fisicoquímicos, entre los cuales se encuentran, los procesos de oxidación/reducción, en la cual se alteran los estados de oxidación, pero no se remueve el arsénico de la solución. Generalmente, estos procedimientos se usan como etapas previas de otros procesos. La adsorción e intercambio iónico son técnicas que emplean materiales sólidos como flocs de hidróxido de aluminio o hierro para la remoción de arsénico disuelto. En los procesos de precipitación se forman minerales a partir de arsénico disuelto, los cuales pueden ser removidos con mayor facilidad a través de sedimentación o filtración. Se llama coprecipitación al proceso donde se adiciona algún agente coagulante (Duarte et al. 2009).

La precipitación es uno de los métodos económicos utilizados para la remoción de altas concentraciones de arsénico en agua. La neutralización con cal (CaO) es una técnica empleada para precipitar arsénico, donde Ante et al. (2005) describe un proceso de neutralización con cal para disminuir los volúmenes de residuos y los costos operativos. Nazari et al. (2016) presentan un esquema del proceso: en el primer paso se añade la cal a una temperatura de 50-80 °C. Paso seguido, se aumenta el pH de tal forma que precipite yeso puro (CaSO₄·2H₂O) a pH ácido (pH<1). Tercer paso, se incrementa el pH para precipitar yeso, arsenito de calcio e hidróxidos de metales pesados. Cuarto paso, el arsenito residual se precipita como arsenito férrico a pH neutro, empleando una relación molar Fe/As mayor a 3:1. Una desventaja de este proceso es la baja estabilidad del precipitado a tiempos prolongados.

Otro método de inmovilización de arsénico es la precipitación de sulfuro. En este proceso se alimenta el material a lixiviar (e.g. enargita, Cu₃AsS₄), el cual se somete a una temperatura de 80-105 °C en presencia de NaOH y Na₂S, de acuerdo con la siguiente expresión:



Posteriormente se lleva a cabo una separación sólido-líquido, donde el cobre es recuperado y se envía a fundición. Los procesos de evaporación, enfriamiento (30-40 °C) y filtración permiten la recuperación de Na₃AsS₄ en forma de cristales, los cuales son tratados con ácido sulfúrico para formar As₂S₅, de acuerdo con la siguiente expresión



En el tratamiento de efluentes de la industria metalúrgica que contienen altas concentraciones de arsénico, la coprecipitación con ferrihidrita ha sido señalada como la tecnología disponible mejor demostrada (U.S. EPA) (Nazari et al. 2016). Este proceso suele llevarse a cabo con una neutralización con cal en presencia de exceso de hierro (Fe(II)/As(V)>3). Cabe resaltar que el arsenato (As(V)) es removido con mayor eficiencia que el arsenito (As(III)) debido a su mayor afinidad a la ferrihidrita, por lo tanto, es preciso aplicar

como primer paso la oxidación de arsenito soluble, el cual es la especie de arsénico comúnmente encontrado en las operaciones metalúrgicas. Las formas solubles de arsénico son incorporadas en la fase metálica de hidróxido y coprecipitadas. Posteriormente, los sólidos pueden ser separados por sedimentación o filtración. Se ha reportado que la existencia de co-iones, como el níquel, aluminio o calcio pueden mejorar la estabilidad del arsénico (De Klerk et al. 2015; Nicomel et al. 2016).

1.5 Precipitación de escorodita

El arseniato férrico cristalino es un mineral secundario supergénico de arsénico conocido como escorodita ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), el cual puede encontrarse en la naturaleza en combinación con azufre como la arsenopirita (FeAsS), enargita (Cu_3AsS_4) o tennantita ($\text{Cu}_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$) (Okibe et al. 2014). La escorodita es el arseniato (As^{5+}) natural más común, seguido de otros arseniatos como la annabergita, $\text{Ni}_3(\text{AsO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O})$ y eritrita, $\text{Co}_3(\text{AsO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O})$. La presencia de escorodita en el ambiente sugiere que su solubilidad puede controlar la concentración de arseniato en aguas superficiales y cercanas a la superficie (Dove and Rimstidt, 1985), así como la movilidad en el drenaje ácido de minas y aguas termales (Henke et al. 2009). Por otra parte, los influentes industriales que contienen altas concentraciones de arsénico representan una problemática que debe resolverse.

Una de las formas de remoción de arsénico es mediante la precipitación del arseniato férrico amorfo, sin embargo, este método puede requerir altas cantidades de hierro para su obtención (relación molar Fe/As al menos de 4). Además, los cristales obtenidos pueden presentar un bajo contenido de arsénico (Jia et al. 2003). Una opción para la precipitación de As(V) es la cristalización de escorodita, la cual posee una mayor estabilidad termodinámica, una alta capacidad de remoción de arsénico y requiere bajas cantidades de hierro, lo que puede conducir a la obtención de volúmenes bajos de material de desecho. Este mineral es aceptado

ampliamente como la forma más estable para la disposición de arsénico (Riveros et al. 2001; Jia et al. 2003; Paktunc et al. 2008). Por un lado, la formación de la scorodita se ha llevado a cabo mediante el uso de condiciones de autoclave. En el tratamiento hidrotermal suele utilizarse condiciones de oxidación ácida bajo presión, es decir, temperaturas arriba de los 170 °C y presión de oxígeno de hasta 2000 kPa. Paktunc et al. (2008) reportó la cristalización de scorodita utilizando con soluciones de sulfato y altas temperaturas (mayores a 125 °C) para lograr una cristalinidad adecuada. Estos factores pueden incrementar los costos de operación del proceso (Nazari et al. 2017). Por lo que ha surgido un amplio interés en el estudio de la precipitación de arsénico de efluentes industriales bajo condiciones de menor presión y temperatura, así como las cantidades de hierro (relación molar) necesarias para su formación. Por otro lado, diversos trabajos han reportado la cristalización de scorodita bajo condiciones de presión atmosférica y temperaturas por debajo de los 100 °C. Por ejemplo, Demopoulos et al (1995) reportó la formación de scorodita a presión ambiental a temperaturas de 80 – 95 °C. Por otro lado, Fujita et al. (2008) reportó la cristalización de scorodita a partir de soluciones de sulfato, en un rango de temperaturas de 50, 70, y 95 °C, encontrando una precipitación de arsénico del 34% a la temperatura de 50 °C y 98 % a las temperaturas de 70 y 95 °C. Sin embargo, la formación de scorodita puede ser llevada a cabo mediante el uso de sistemas biológicos, utilizando ambientes controlados para la formación del mineral, los cuales pueden presentar diversas ventajas respecto a los métodos químicos. El mineral de origen biológico obtenido recibe el nombre de bioscorodita.

La cristalización de la scorodita puede ser llevada a cabo mediante el uso de sistemas biológicos controlados que permiten llevar a cabo la oxidación de elementos metálicos como el arsénico, hierro, cromo, entre otros. La oxidación simultánea del As(III) y Fe(II) por medio de microorganismos puede favorecer la cristalización de la bioscorodita (González-Contreras et al. 2010; Bahar et al. 2013). En procariotas, existe una amplia gama de microorganismos con

diferentes metabolismos para la oxidación del hierro, entre ellos se encuentran los fotótrofos o quimiótrofos, autótrofos o heterótrofos aerobios o anaerobios, acidófilos o neutrófilos, psicrófilos, mesófilos o termófilos (Ilbert and Bonnefoy, 2013; **Tabla 2**). La cadena de transferencia de electrones entre Fe (II) y O₂ de *Acidithiobacillus (At.) ferrooxidans* es uno de los sistemas más estudiados. La cual consiste en una proteína (Citocromo C *Cyc2*) localizada en la membrana externa, donde ocurre la oxidación del Fe (II), la proteína de cobre periplásmica (rusticianina), la proteína Citocromo C *Cyc1* unida a la membrana, y la proteína Citocromo oxidasa *aa3* localizada en la membrana interna, la cual cataliza la reducción del oxígeno (Ilbert and Bonnefoy, 2013). En bacterias heterotróficas (que utilizan fuente de carbono orgánica) el proceso de oxidación se describe como un mecanismo de desintoxicación, que convierte el As (III) a una forma menos tóxica, As (V). Por otra parte, las bacterias autótrofas (obtienen la fuente de carbono de sustancias inorgánicas como el CO₂) son capaces de utilizar el As (II) como un donador de electrones, el oxígeno como aceptor de electrones. Se ha reportado que la oxidación de As (III) está ligada a la actividad catalítica de la arsenito-oxidasa (designada como *aio*), la cual es una enzima localizada entre la membrana y el espacio periplásmico (Bahar et al. 2013).

La remoción de metales en sistemas acuosos por medio del uso de hongos (aislados de diferentes ambientes) es un proceso ampliamente estudiado, donde se ha caracterizado que éstos son capaces de llevar a cabo procesos de bioacumulación, biosorción, biovolatilización, entre otros. Sin embargo, poco es estudiado el proceso de oxidación metales por medio hongos, los cuales posiblemente pueden utilizar mecanismos diferentes a las bacterias, como el uso de enzimas extracelulares o la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂ agente oxidante producido en la biodegradación de celulosa), para favorecer la oxidación de compuestos de arsénico (Hofmann et al. 2001). La oxidación de arsénico y hierro de sus estados de oxidación As (III) a As (V) y Fe (II) a Fe (III) puede favorecer la cristalización de la bioscorodita en el

sistema, la cual es controlada por la supersaturación. A su vez, la supersaturación es el factor principal que controla el proceso de nucleación-crecimiento (González-Contreras et al. 2010; Riveros et al. 2001). Los sistemas biológicos más comúnmente usados son las procariotas (bacterias y arqueas), las cuales pueden soportar altas temperaturas (>70 °C) y condiciones de pH bajos (<2) (González-Contreras et al. 2010).

Tabla 2. Bacterias capaces de oxidar hierro (Fuente: Ilbert y Bonnefoy, 2013).

Dominio	Microorganismo	Temperatura
Eubacteria	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Mesófilo
	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	Psicrotolerante
	<i>Sulfobacillus sibiricus</i>	Termófilo moderado
	<i>Thiobacillus prosperus</i>	Mesófilo
	<i>Mariprofundus ferrooxydans</i>	Mesófilo
	<i>Sideroxydans lithotrophicus</i>	Mesófilo
	<i>Dechloromonas agitata</i>	Mesófilo
Archea	<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	Termófilo moderado
	<i>Metallosphaera sedula</i>	Termófilo moderado
	<i>Sulfolobus metallicus</i>	Termófilo
	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	Termófilo
	<i>Metallosphaera yellowstonensis</i>	Termófilo

1.6 Biorreactores para la cristalización de escorodita

La cristalización de bioscorodita ha sido estudiada en biorreactores con diferentes configuraciones, tales como botes serológicos, matraz agitado, reactor tanque agitado y reactor de agitación neumática, en regímenes de operación batch (por lotes) y continuos, empleando diferentes condiciones de operativas (ver **Tabla 3**).

Tabla 3. Características de procesos biológicos utilizados para la formación de bioscorodita.

Autor	Sistema/Operación	Microorganismo	Metal oxidado	pH / Temperatura	Fe/As	Material semilla
Gonzalez-Contreras et al., (2009)	Bote serológico/batch	<i>Acidianus Sulfidivorans</i>	Fe(II)	0.8/80 °C	1-5.5	Yeso
González-Contreras, et al., (2010)	Bote serológico /batch	<i>Acidianus Sulfidivorans</i>	Fe(II)	0.8/80 °C	1.1	–
González-Contreras et al., (2012a)	Tanque agitado/continuo	<i>Sulfolobales</i>	Fe(II)	1.2/72 °C	1	–
Okibe et al., (2013)	Matraz agitado/batch	<i>Acidianus brierleyi</i>	As(III)/Fe(II)	1.5/70 °C	1.3/5.4	Jarosita
Okibe et al., (2014)	Matraz agitado/batch	<i>Acidianus brierleyi</i>	As(III)/Fe(II)	1.5/70 °C	1.4-5.5	–
Tanaka et al., (2017)	Matraz agitado/batch	<i>Acidianus brierleyi</i>	As(III)/Fe(II)	1.5/70 °C	1.4-3	Escorodita
Tanaka and Okibe, (2018)	Matraz agitado/batch	<i>Acidianus brierleyi</i>	As(III)/Fe(II)	1.2-1.3/70 °C	0.8-6	Escorodita
Vega-Hernández et al., (2019)	Bote serológico/batch	<i>Sulfobacillus and Sulfolobales</i>	As(III)/Fe(II)	1.3/70 °C	1.34	–

Uno de los procesos comercializados a escala industrial para la remoción de arsénico mediante la formación de escorodita biogénica es descrito por González-Contreras et al. (2012). Un diagrama de los fenómenos involucrados en el proceso se muestra en la **Figura 2**. El proceso se lleva a cabo a temperatura entre 70-80 °C, bajo pH (~1.2) y bajas relaciones molares Fe/As ($1 < \text{Fe/As} < 1.3$). Las bacterias o arqueas extremófilas pueden crecer en los efluentes de los procesos metalúrgicos y oxidar los iones metálicos que inducen la formación biomineral en un solo paso *in situ* (González-Contreras et al., 2012). Una vez en solución los iones Fe(III) y As(V), estos reaccionan para formar la escorodita. El reactor empleado es de agitación neumática (airlift), debido a importantes ventajas que aporta al proceso.

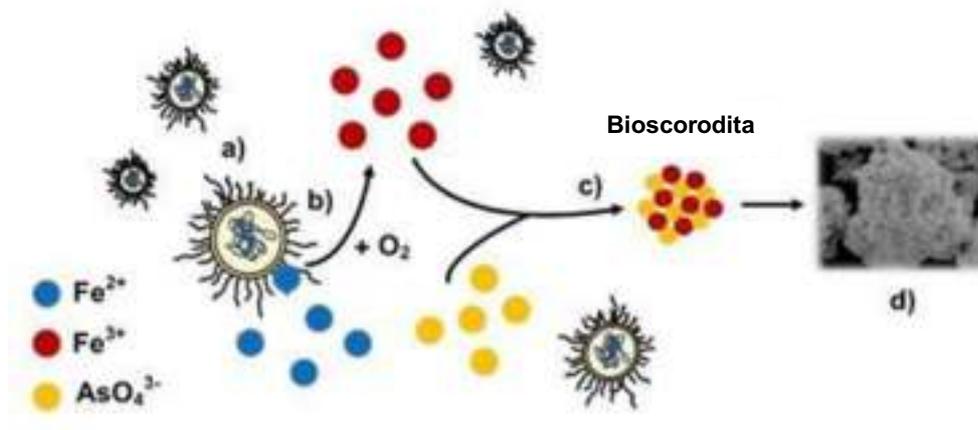


Figura 2. Representación general de los procesos involucrados en la cristalización de escorodita para la remoción de arsénico.

Los reactores airlift (RAL) son sistemas agitados neumáticamente, que constan de dos secciones características conocidas como: riser (zona de ascenso del fluido), donde generalmente se lleva a cabo la introducción de una fase gaseosa, y downcomer (zona de descenso), lo cual les proporciona un patrón de flujo bien definido. La **Figura 3** muestran un esquema representativo de un RAL. La diferencia de densidades entre ambas secciones y, por ende, de la fracción de retención de la fase gas (εg, hold-up) proporciona la fuerza impulsora para la recirculación dentro del sistema. Los reactores airlift han sido ampliamente usados en aplicaciones biotecnológicas como el tratamiento de aguas residuales, producción de químicos de interés o la biodegradación de compuestos recalcitrantes (Guieysse et al. 2011; Tec-Caamal et al. 2018). Estos sistemas pueden presentar diversas ventajas sobre los más comúnmente utilizados como los tanques agitados que pueden presentar un mayor estrés de corte, lo cual puede causar modificaciones fisiológicas de las células. Por otro lado, se conoce que los RALs consumen menos energía debido a la ausencia de una fuerza mecánica para el mezclado, ya que esto se lleva a cabo mediante la inyección de aire al sistema (Chisti, 1989). Se ha observado

que los bioprocesos en RALs dependen fuertemente del comportamiento hidrodinámico y de la transferencia de masa (Luo et al. 2011). A su vez, estos procesos dependen de variables como el diseño del aireador (tamaño de burbuja), configuración geométrica del RAL, velocidad superficial de la fase gaseosa (U_g) y de las propiedades fisicoquímicas del medio de cultivo (Chisti, 1989). Debido a que muchos de los procesos biológicos se llevan a cabo en condiciones aerobias, los RALs resultan un sistema adecuado debido a que estos presentan alta transferencia de masa (Guiéysse et al. 2011).

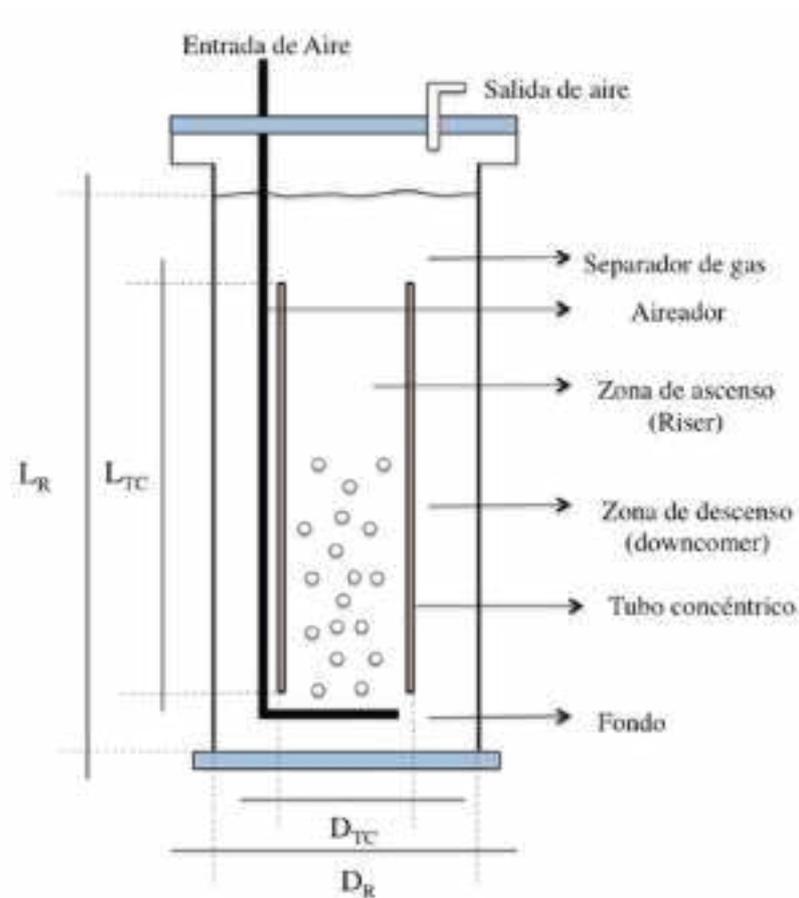


Figura 3. Diagrama representativo de un biorreactor airlift. L_R , altura del reactor, L_{TC} longitud del tubo concéntrico, D_{TC} diámetro del tubo concéntrico, D_R diámetro del reactor.

1.6.1 Factores que controlan la formación de bioscorodita

Entre los principales factores que controlan la formación de bioscorodita en sistemas donde ocurre la oxidación de Fe(II) y/o As(III), se encuentran los relacionados al crecimiento del microorganismo, como la concentración de Fe(II)/As(III), el pH, la adición de material semilla, la concentración de inóculo, la composición del medio (contenido de extracto de levadura), la relación molar Fe/As y los parámetros relacionados al oxígeno (González-Contreras et al. 2010; González-Contreras et al. 2012a; Okibe et al. 2014; Okibe et al. 2017). En estos sistemas se ha observado que la relación molar Fe/As entre 1 y 1.4 es un rango óptimo para la remoción casi completa de arsénico (Okibe et al. 2013). Cabe resaltar que este rango observado es el más cercano a la relación estequiométrica teórica (Fe/As=1), lo cual indica que el proceso requiere bajas cantidades de Fe(II) para la remoción de arsénico. Sin embargo, es importante resaltar que aunque la relación molar Fe/As puede ser mantenida, el empleo de altas concentraciones de Fe(II) o As(III) puede generar inhibición de la biomasa o influenciar en la formación de otros minerales. Con respecto al pH, el rango óptimo observado es reducido, entre 1.2 y 1.5. El valor de pH del medio de cultivo es determinante en el proceso, debido a que promueve el crecimiento de la biomasa y la formación de bioscorodita. Con relación al medio de cultivo, la adición de extracto de levadura ha mostrado un efecto positivo en la capacidad de oxidación de As(III) (Okibe et al. 2014) y Fe(II) (González-Contreras et al. 2012b), a través de la producción de exopolisacáridos y la formación de biopelículas las cuales pueden estar relacionadas al mejoramiento de la oxidación. La evaluación de la concentración de inóculo ha mostrado que aumenta la velocidad de oxidación de hierro y arsénico (Okibe et al. 2014). Dado que la supersaturación de bioscorodita es controlada por la oxidación de Fe(II), este factor puede ser clave en el mejoramiento del proceso. Por otro lado, se ha observado que en procesos de oxidación de Fe(II) continuos, la transferencia de oxígeno a la fase acuosa puede ser una etapa limitante.

Por lo tanto, se necesitan cubrir ciertos requerimientos de transporte de masa en el sistema, como el empleo de valores del coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($K_L a$) de aproximadamente 30 h^{-1} .

1.7 Modelos generales para reactores biológicos

El modelado matemático de reactores bioquímicos ha sido ampliamente reconocido como una herramienta de gran importancia en el estudio de la dinámica y control de bioprocesos, lo cual requiere de un modelo cinético robusto que pueda predecir con la mejor definición posible la dinámica del proceso en cuestión. Estos modelos se basan principalmente en las leyes de conservación de materia y energía. De manera general, las funciones del modelo consideran en su estructura los componentes dinámicos y los parámetros (constantes) ajustados para cada condición de operación. Entre los enfoques de modelado, los modelos fenomenológicos son de relevancia en el análisis de bioprocesos debido a que encuentran un punto intermedio entre la complejidad y practicidad (Velázquez-Sánchez et al., 2014), ya que estas estructuras matemáticas expresan los resultados de los fenómenos observados de manera coherente con la teoría fundamental, pero sin prestar atención detallada a su significado fundamental (Thewlis, 1973). Una vez propuesto el esquema de reacción, pueden construirse modelos cinéticos para realizar simulaciones bajo diferentes escenarios. El desarrollo de modelos matemáticos validados experimentalmente permite la generación de un panorama más completo de la dinámica del proceso, la propuesta de estrategias de operación del reactor y la elaboración de enfoques de escalamiento, diseño, optimización y control del proceso.

De forma general, el modelo de los bioprocesos es desarrollado con base en balances de masa, como se observa en la **Ec. (1)**, donde V es el volumen del cultivo (L^3), $C_{1,i}$ es la concentración de entrada (M L^{-3}), $C_{2,i}$ es la concentración de salida (M L^{-3}), $r_{g,i}$ es la velocidad de generación ($\text{M L}^{-3} \text{ T}^{-1}$) y $r_{c,i}$ es la velocidad de generación ($\text{M L}^{-3} \text{ T}^{-1}$).

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = F_1 C_{1,i} - F_2 C_{2,i} + Vr_{g,i} - Vr_{c,i} \quad (1)$$

A partir de esta expresión, dependiendo de la variación de los flujos F_1 y F_2 se simulan los reactores en régimen por lote, semicontinuo y continuo. Suponiendo que el reactor opera en régimen continuo, i.e., $F_1=F_2$, entonces el volumen es constante, lo cual conduce a la obtención de la **Ec. (2)**.

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = F(C_{1,i} - C_{2,i}) + V(r_{g,i} - r_{c,i}) \quad (2)$$

Ahora, considerando el crecimiento microbiano en el reactor, asumiendo que no hay entrada de biomasa y considerando $V=cte$ (dividiendo entre V ambos lados de la **Ec. 2**), se obtiene la **Ec. (3)**. Después, considerando F/V como D (tasa de dilución, T^{-1}) y $r_{g,i}$ como $\mu_B(B)$, donde μ_B es la tasa específica de crecimiento microbiano, la cual puede ser expresada por diferentes modelos cinéticos de limitación e inhibición por sustrato, se obtiene la **Ec. (4)**.

$$\frac{d(B)}{dt} = -\frac{F}{V}B + r_{g,i} \quad (3)$$

$$\frac{d(B)}{dt} = -D(B) + \mu_B(B) \quad (4)$$

Para la dinámica de la concentración de sustrato, se considera la concentración de entrada como constante, existe salida de sustrato debido a que no todo es consumido. No hay formación del sustrato solo consumo. Bajo la consideración de volumen constante y $D=F/V$, la expresión para esta variable está dada por la **Ec. (5)**, donde S_{in} es la concentración de sustrato a la entrada ($M L^{-3}$) y $Y_{B/S}$ es el rendimiento biomasa-sustrato ($M M^{-1}$).

$$\frac{d(S)}{dt} = -D(S_{in} - S) - \frac{\mu_B(B)}{Y_{B/S}} \quad (5)$$

Para la generación del producto, se considera volumen constante, no hay entrada de producto al reactor, hay salida y existe formación, quedando el balance de masa por la **Ec. (6)**.

$$\frac{d(P)}{dt} = -D(P) + \frac{\mu_B(B)}{Y_{S/P}} \quad (6)$$

En sistemas aerobios, el balance de masa de oxígeno es importante, donde se considera la tasa de transferencia de oxígeno desde la fase gas (burbuja) hasta la fase acuosa. Bajo las consideraciones anteriores, el balance de oxígeno queda expresado por la **Ec. (7)**, donde $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (T^{-1}), C_L^* es la concentración de saturación de oxígeno en la fase líquida ($M L^{-3}$) y Y_{X/O_2} es el rendimiento biomasa-oxígeno ($M M^{-1}$).

$$\frac{d(C_L)}{dt} = K_L a (C_L^* - C_L) - \frac{\mu_B(B)}{Y_{S/O_2}} \quad (7)$$

El modelo para el proceso continuo, se considera el modelo descrito con anterioridad, asumiendo que el volumen no es cero, sino que tiene un valor constante, de manera que se añade una expresión para el cambio de volumen, i.e.

$$\frac{d(S)}{dt} = Cte. \quad (8)$$

El modelo para un reactor en batch es el expresado por las **Ecs. (4-7)**, considerando $D=0$.

Capítulo 2

Justificación

La presencia de compuestos tóxicos de arsénico en efluentes de la industria metalúrgica ha llevado al desarrollo e implementación de procedimientos capaces de remover arsénico. Una de las principales técnicas utilizadas es la precipitación. Dentro de estas técnicas, la formación de scorodita por medios biológicos representa una solución prometedora para el tratamiento de efluentes que contienen altas concentraciones de arsénico, siendo este mineral uno de los materiales más seguros para la inmovilización de arsénico debido a sus características termodinámicas. La cristalización de bioscorodita ha sido ampliamente estudiada en reactores operando en regímenes batch y continuo. Sin embargo, todavía no se han realizado estudios con herramientas numéricas que permitan: i) proveer un panorama de la dinámica de estos procesos bajo escenarios diferentes, lo cual resulta de gran utilidad al disminuir costos de experimentación, ii) analizar regiones de operación más amplias, iii) determinar condiciones operativas que permitan un desempeño mejor del proceso, iv) proponer estrategias de operación de los reactores en sus diferentes configuraciones, v) realizar estudios de factores que controlan la biocinética, vi) así como estudios energéticos de los procesos, además de vii) la generación de esquemas de optimización, escalamiento y control del proceso. Debido a esto, resulta crucial la realización de esta clase de estudios mediante la generación de modelos matemáticos experimentalmente validados, que consideren los fenómenos involucrados en la cristalización de scorodita, y que puedan ser utilizados como plataformas robustas en la realización de dichos estudios.

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivo general

- Analizar la dinámica de los procesos involucrados en la cristalización de bioscorodita para la remoción de arsénico en condiciones de alta temperatura y pH ácido mediante herramientas de modelado matemático y simulación.

3.2 Objetivos particulares

- Desarrollar modelos matemáticos para los procesos simultáneos de Fe(II) y As(III) por *Acidianus brierleyi* y un consorcio de *Sulfolobales*, la precipitación de As(V), la dinámica de oxígeno, y la cristalización de bioscorodita.
- Analizar mediante simulación el comportamiento de los sistemas en regímenes de operación batch y continuo.
- Estudiar los factores que controlan la biocinética para la determinación de regiones factibles de operación del proceso.

Capítulo 4

Materiales y métodos

4.1 Modelo cinético para la oxidación de Fe(II) por un consorcio de *Sulfolobales* en un CSTR bajo condiciones extremas

El modelo que describe la dinámica del crecimiento microbiano de un consorcio de *Sulfolobales*, la oxidación de Fe(II), la generación de Fe(III) y el oxígeno disuelto en el medio líquido está compuesto por un conjunto de ecuaciones diferenciales que consideran términos de entrada, salida, generación y transporte de masa (oxígeno). El modelo fue construido bajo las siguientes hipótesis: i) los principales factores que controlan el crecimiento microbiano es la fuente de energía (Fe(II)) y el oxígeno, siendo este último utilizado como aceptor de electrones; ii) el consorcio está compuesto por microorganismos autotróficos, los cuales usan dióxido de carbono (CO₂) como fuente de carbono. En un estudio previo realizado por González-Contreras et al. (2012b) se observó que el proceso de oxidación de Fe(II) no está limitado por CO₂ y se consideró en exceso para los requerimientos de crecimiento. Por lo tanto, los términos de CO₂ no fueron considerados en las ecuaciones del modelo; iii) Los autores antes mencionados, observaron que la oxidación de Fe(II) se da principalmente por vía microbiana, de manera que la oxidación por oxígeno disuelto no ocurre, por lo tanto, estos últimos términos no se consideraron en la estructura del modelo; iv) el pH del sistema es considerado constante debido a ligeros cambios observados experimentalmente (~0.2 unidades de pH). v) el reactor es

operado a temperatura constante (72 °C) y con condiciones de mezclado ideal. Bajo estas consideraciones, el modelo se presenta a continuación.

La tasa específica de crecimiento microbiano (μ_x) puede ser definida como una función de la tasa específica máxima de crecimiento (μ_{max}) y los factores que limitan el crecimiento (Murwanashyaka et al., 2020), como se observa en la **Ec. (9)**.

$$\mu_x = \mu_{max} \times \prod_{i=1}^n f(S_i) \quad (9)$$

donde, n es el número de factores limitantes y $f(S_i)$ es una función de múltiples recursos limitantes. En la literatura, es común encontrar el empleo de modelos no estructurados que consideran limitación e inhibición por sustrato (Pina et al. 2010; Melton et al. 2014). Las **Ecs. (10-14)** muestran ejemplos de modelos no estructurados para la tasa específica de crecimiento.

Modelo de Monod.

$$\mu_x = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad (10)$$

Modelo de Luong

$$\mu_x = \mu_{max} \frac{S^n}{K_S + S^n} \quad (11)$$

Modelo de Andrews

$$\mu_x = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (12)$$

Modelo de Webb

$$\mu_x = \mu_{max} \frac{S \left(1 + \frac{\phi S}{K_I}\right)}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (13)$$

Modelo de Tessier

$$\mu_x = \mu_{max} \left(\exp\left(-\frac{S}{K_I}\right) - \exp\left(-\frac{S}{K_S}\right) \right) \quad (14)$$

La **Ec. (15)** representa la tasa específica de crecimiento dada por una doble limitación de sustrato (Fe(II) y O₂), donde μ_{\max} es la tasa específica máxima de crecimiento (d⁻¹), $K_{S_{Fe(II)}}$ es la constante de afinidad de Fe(II) (g L⁻¹), $K_{i_{Fe(II)}}$ es la constante de inhibición de Fe(II) (g L⁻¹) y $K_{S_{O_2}}$ es la constante de afinidad de oxígeno (g L⁻¹).

$$\mu_x = \mu_{\max} \left(\frac{Fe(II)}{K_{S_{Fe(II)}} + Fe(II) + \frac{Fe(II)^2}{K_{i_{Fe(II)}}}} \right) \left(\frac{O_2}{K_{S_{O_2}} + O_2} \right) \quad (15)$$

Considerando la operación en régimen continuo, la ecuación que describe la producción de biomasa en el reactor está dado por la **Ec. (16)**, donde D es la tasa de dilución definida como el cociente del flujo de entrada y el volumen del reactor, el cual se considera constante ($D=F/V$, d⁻¹) y X es la concentración de biomasa (g L⁻¹).

$$\frac{dX}{dt} = -D[X] + \mu_x [X] \quad (16)$$

Después, el balance de masa para Fe(II) está dado por la **Ec. (17)**, donde $r_{Fe(II)}$ es la tasa de oxidación de Fe(II) (g L⁻¹ d⁻¹), $Fe(II)_{in}$ es la concentración de Fe(II) a la entrada del reactor y $Y_{X/Fe(II)}$ es el rendimiento biomasa-Fe(II). En este sentido, la generación de Fe(III) está dada por la **Ec. (18)**.

$$\frac{dFe(II)}{dt} = D[Fe(II)_{in}] - D[Fe(II)] - \frac{\mu_x}{Y_{X/Fe(II)}} [X] \quad (17)$$

$$\frac{dFe(III)}{dt} = -D[Fe(III)] + \frac{\mu_x}{Y_{X/Fe(II)}} [X] \quad (18)$$

El balance de masa para el oxígeno en la fase líquida está dado por las **Ecs. (19,20)**, donde $O_{2,in}$ es la concentración de oxígeno de entrada, TTO es la tasa de transferencia de oxígeno (g L⁻¹ d⁻¹), $q_{O_2,x}$ es la tasa específica de consumo de oxígeno (g g⁻¹ d⁻¹), $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa, C^* es la concentración de saturación de oxígeno en el medio líquido y Y_{X/O_2} es el rendimiento biomasa-oxígeno (g g⁻¹).

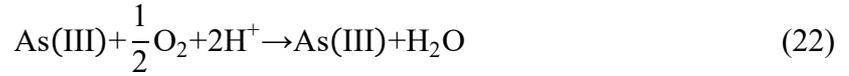
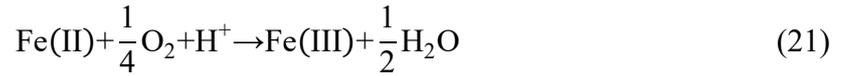
$$\frac{dO_2}{dt} = D[O_{2,in}] - D[O_2] + OTR - q_{O_2,X}(X) \quad (19)$$

$$\begin{cases} TTO = k_L a (C^* - O_2) \\ q_{O_2,X} = \frac{\mu_X}{Y_{X/O_2}} \end{cases} \quad (20)$$

4.2 Modelo cinético para la biooxidación simultánea de Fe(II)/As(III), precipitación de As(V) y cristalización de escorodita

En esta sección se describe la construcción de un modelo cinético que describe la oxidación simultánea de Fe(II) a Fe(III) y As(III) a As(V) en un biorreactor, así como la precipitación de As(V) y la cristalización de bioscorodita. La **Figura 4** muestra un diagrama general de los fenómenos del sistema. Este proceso fue diseñado para la inmovilización de altas concentraciones de arsénico (~1000 ppm) de efluentes de la industria metalúrgica. Por lo tanto, el modelo fue construido bajo las siguientes consideraciones: i) la oxidación de Fe(II) y As(III) es llevada a cabo principalmente por vía microbiana (*Acidianus brierleyi*), ii) la oxidación por oxígeno disuelto no ocurre de acuerdo a observaciones experimentales en sistemas similares en condiciones de alta temperatura y pH ácido, iii) el oxígeno (aceptor de electrones) es suministrado por la agitación constante del biorreactor (matraz agitado), iv) *Acidianus brierleyi* es la única cepa microbiana, la cual obtiene su fuente de carbono del CO₂ disuelto en el medio líquido. Sin embargo, como se mencionó en la sección anterior (Sec. 4.1), este sustrato no se considera un limitante en el proceso, por lo tanto, se consideró en exceso y no se consideró en la estructura del modelo, v) los principales factores que limitan el proceso es la concentración de Fe(II) y el oxígeno, vi) el pH del sistema se considera constante (1.2) debido a que experimentalmente se ha observado que su valor sufre ligeros cambios en el tiempo (Okibe et al. 2017), y vii) el reactor es operado a temperatura constante (70 °C) y con condiciones de mezclado ideal. El desarrollo del modelo se presenta a continuación.

La oxidación de Fe(II) y As(III) por vía microbiana esta dada por las expresiones:



De aquí, Pesic et al. (1989) y Kirby et al. (1999) propusieron una fórmula para la tasa de oxidación biológica de Fe(II), que considera la concentración de biomasa, Fe(II), O₂ y protones, donde $r_{\text{Fe(II)}}$ es la tasa de oxidación de Fe(II), k es la constante de velocidad (L³ mg⁻¹ mol⁻² h⁻¹), C_{bio} es la concentración de biomasa (mg L⁻¹, peso seco), O₂ es la concentración de oxígeno (mol L⁻¹), y Fe(II) y H⁺ están dadas en mol L⁻¹.

$$r_{\text{Fe(II)}} = \frac{d\text{Fe(II)}}{dt} = -k(C_{\text{bio}})[\text{O}_2][\text{Fe(II)}][\text{H}^+] \quad (23)$$

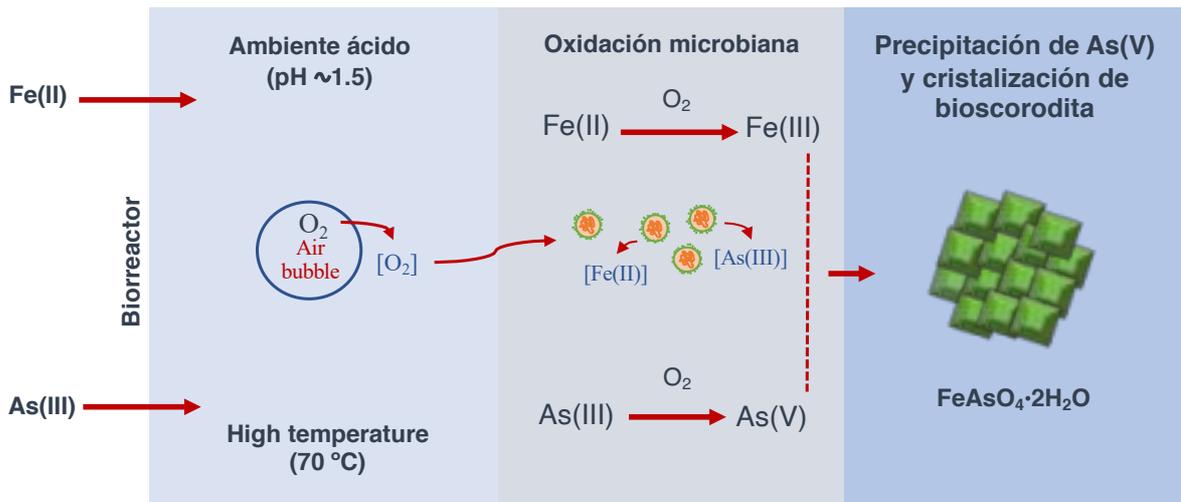


Figura 4. Representación esquemática de los fenómenos involucrados en el proceso de formación de bioscorodita, empleando un cultivo de *Acidianus brierleyi* en condiciones extremófilas.

Sin embargo, debido a que experimentalmente se ha observado que el crecimiento microbiano (bajo las condiciones evaluadas en simulación) es bajo, considerándose que la

concentración de células permanece esencialmente constante, llevando a un cambio en la estructura de la **Ec. (23)**, como:

$$r_{\text{Fe(II)}} = \frac{d\text{Fe(II)}}{dt} = -k_{\text{bio}} [\text{O}_2] [\text{Fe(II)}] [\text{H}^+] \quad (24)$$

donde, k_{bio} es la constante de velocidad agrupada ($\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$). En este mismo sentido, Sheng et al. (2017) propone un cambio de la **Ec. (24)** utilizando una cinética de Monod y evaluar la concentración de Fe(II) y de protones, como:

$$r_{\text{Fe(II)}} = \frac{d\text{Fe(II)}}{dt} = -k_{\text{bio}} \left(\frac{\text{Fe(II)}}{K_{\text{SFe(II)}} + \text{Fe(II)}} \right) \left(\frac{\text{H}^+}{K_{\text{SH}^+} + \text{H}^+} \right) \quad (25)$$

donde, $K_{\text{SFe(II)}}$ es la constante de saturación de Fe(II) disuelto (mol L^{-1}) y K_{SH^+} es la concentración de protones (mol L^{-1}). Sin embargo, debido a que los experimentos utilizados para el ajuste paramétrico emplearon pH constante, los términos de protones no se consideraron en la estructura. Además, este factor puede ser evaluado por separado (García-Ríos et al. 2020). Un enfoque similar fue utilizado para nuestro caso de estudio, quedando expresada la tasa de oxidación de hierro en el reactor batch por la **Ec. (26)**.

$$r_{\text{Fe(II)}} = \frac{d\text{Fe(II)}}{dt} = -k_{\text{bio}} (C_{\text{bio}}) \left(\frac{\text{Fe(II)}}{K_{\text{SFe(II)}} + \text{Fe(II)}} \right) \left(\frac{\text{O}_2}{K_{\text{SO}_2} + \text{O}_2} \right) \quad (26)$$

En este mismo sentido, la tasa de oxidación de As(III) a As(V), está expresada por

$$r_{\text{As(III)}} = \frac{d\text{As(III)}}{dt} = -k_{\text{bio}} (C_{\text{bio}}) \left(\frac{\text{As(III)}}{K_{\text{SAs(III)}} + \text{As(III)}} \right) \left(\frac{\text{O}_2}{K_{\text{SO}_2} + \text{O}_2} \right) \quad (27)$$

donde, $K_{\text{SAs(III)}}$ es la constante de afinidad con respecto al As(III) disuelto (mol L^{-1}). Después, una vez que el Fe(II) y As(III) han sido oxidados, estos pueden reaccionar y precipitar, de acuerdo a la siguiente expresión que considera generación y precipitación de As(V):

$$\frac{d\text{As(V)}}{dt} = r_{\text{As(III)}} - k_{\text{As(V)}} [\text{Fe(III)}] [\text{As(V)}] \quad (28)$$

donde, $k_{\text{As(V)}}$ es la constante de precipitación de As(V) ($\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$). Después, el balance de masa para Fe(III) en el biorreactor está dado por la siguiente expresión:

$$\frac{d\text{Fe(III)}}{dt} = r_{\text{Fe(II)}} - k_{\text{As(V)}} [\text{Fe(III)}] [\text{As(V)}] \quad (29)$$

El balance de masa para el oxígeno en el biorreactor está dado por el término de transferencia de oxígeno debido a la agitación continua (TTO), y el término de consumo (TCO):

$$\frac{d\text{O}_2}{dt} = \text{TTO} - \text{TCO} \quad (30)$$

donde,

$$\begin{cases} \text{TTO} = k_L a (C^* - \text{O}_2) \\ \text{TCO} = \frac{1}{4} r_{\text{Fe(II)}} + \frac{1}{2} r_{\text{As(III)}} \end{cases} \quad (31)$$

Para la dinámica de la cristalización de bioscorodita en el reactor, se consideró que la deposición de masa es llevada a cabo primeramente por un proceso de difusión, donde las moléculas de soluto son transportadas del seno líquido a la fase sólida (Mullin, 2001). Después, ocurre una reacción de primer orden, donde las moléculas de soluto se disponen en una red cristalina. Estas dos etapas pueden ser asociadas en un coeficiente global de crecimiento de cristal, K_G (**Ec. 32**).

$$\frac{1}{K_G} = \frac{1}{k_d} + \frac{1}{k_r} \quad (32)$$

Entonces, la tasa de deposición de masa (R_G , $\text{kg m}^{-2} \text{d}^{-1}$) queda dada por:

$$R_G = \frac{1}{A} \cdot \frac{dm}{dt} = K_G (c - c^*) \quad (33)$$

Después, la relación entre R_G y la tasa de crecimiento lineal (G , m d^{-1}) está dada por la expresión:

$$R_G = \frac{1}{A} \cdot \frac{dm}{dt} = \frac{3\alpha}{\beta} \cdot \rho_{\text{Sco}} G = \frac{3\alpha}{\beta} \cdot \rho_{\text{Sco}} \frac{dL}{dt} \quad (34)$$

donde, ρ_{Sco} es la densidad de la escorodita (3280 kg m^{-3}), α y β son factores de volumen y forma. Para octaedros, $6\alpha/\beta=0.816$ (Mullin, 2001). De la **Ec. (34)** se obtiene que:

$$G = \frac{dL}{dt} = \frac{\beta}{3\alpha \cdot A \cdot \rho_{\text{Sco}}} \cdot \frac{dm_{\text{Sco}}}{dt} \quad (35)$$

donde, dm_{Sco}/dt es la tasa de cambio de la masa de escorodita, la cual está relacionada a la precipitación de As(V) en la solución. Además, debido a que se detectaron bajas concentraciones a la salida del reactor, se asume que el arsénico es acumulado en el reactor como un precipitado, por lo tanto, se obtiene la siguiente expresión para la formación de bioscorodita:

$$\frac{dm_{\text{Sco}}}{dt} = M_{\text{Sco}} \cdot V \cdot \left(-\frac{d\text{As(V)}}{dt} \right) = M_{\text{Sco}} \cdot V \cdot (k_{\text{As(V)}} [\text{Fe(III)}] [\text{As(V)}]) \quad (36)$$

donde, V es el volumen constante de reacción (L), M_{Sco} es el peso molecular de la escorodita ($0.230 \text{ kg mol}^{-1}$). Después, de las ecuaciones de masa total y área superficial (**Ecs. 37,38**) se obtiene la **Ec. (39)**.

$$W = n \cdot \rho_{\text{Sco}} \cdot \alpha \cdot L_c^3 \quad (37)$$

$$A = n \cdot \beta \cdot L_c^2 \quad (38)$$

$$\frac{\beta}{\alpha \cdot A} = \frac{L_c \cdot \rho_{\text{Sco}}}{W} \quad (39)$$

donde, L_c es el tamaño de cristal característico (m), n es el número de cristales (adimensional), W es la masa de los cristales (kg) y A es el área de la partícula (m^2). Después, reemplazando la **Ec.(39)** en **(35)** y usando **(36)**, obtenemos la **Ec. (40)**, la cual siendo integrada describe el tamaño del cristal (m) en el tiempo.

$$G = \frac{dL}{dt} = \frac{L_c \cdot M_{\text{Sco}} \cdot V}{3 \cdot W} (k_{\text{As(V)}} [\text{Fe(III)}] [\text{As(V)}]) \quad (40)$$

La tasa de crecimiento lineal está dada por la **Ec. (41)**.

$$R_G = 0.408 \cdot \rho_{\text{Sco}} \cdot \frac{dL}{dt} \quad (41)$$

4.3 Modelo cinético para el proceso industrial THIOTEQ™ Scorodite (PAQUES Technology, Holanda)

El proceso THIOTEQ™ Scorodite es un proceso patentado por PAQUES Technology (Holanda), para la remoción de arsénico de aguas residuales. De forma general consta de los siguientes procesos que ocurren simultáneamente en un mismo biorreactor: oxidación de Fe(II) vía microbiana, generación de Fe(III), precipitación de As(V), consumo/transporte de oxígeno y la cristalización de bioscorodita en la fase líquida. Todos estos fenómenos están descritos por un conjunto de ecuaciones diferenciales compuestas por términos de entrada, salida, generación/consumo, y transporte de masa (oxígeno). La **Figura 5** muestra un diagrama general del proceso THIOTEQ™ Scorodite.

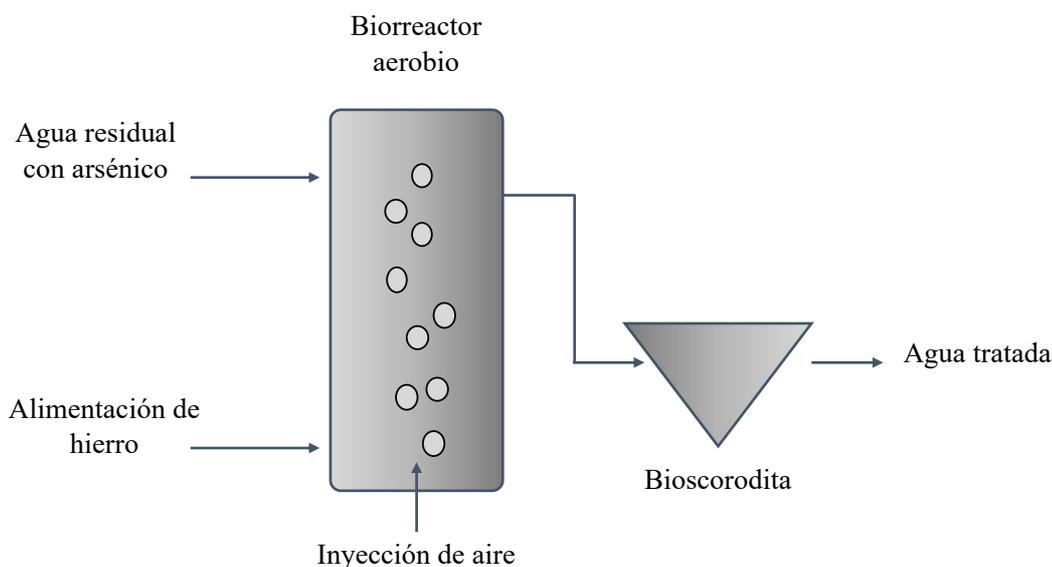


Figura 5. Esquema general del proceso de precipitación de As(V) como bioscorodita (modificado de PAQUES Technology, Holanda).

Se puede observar que una solución que contiene Fe(II) y otra conteniendo As(V) son alimentadas al biorreactor airlift. El empleo de este tipo de reactor es justificado principalmente por la agitación neumática (que induce el mezclado), bajo estrés cortante y bajo costo de

inversión y operación, comparado los reactores tradicionales agitados mecánicamente. Por otro lado, se observa la recuperación de los cristales de escorodita por sedimentación para su disposición final. En este trabajo nos enfocaremos específicamente en los fenómenos que ocurren en el biorreactor. El desarrollo del modelo se muestra a continuación.

Suponiendo un reactor operando en régimen continuo, la **Ec. (42)** muestra el balance de masa para Fe(II), donde D es la tasa de dilución la cual está en función del flujo de entrada ($L d^{-1}$) y el volumen del reactor, el cual se asume constante (L) ($D=F/V$, d^{-1}), $Fe(II)_{in}$ es la concentración de Fe(II) a la entrada del reactor ($g L^{-1}$), y $r_{Fe(II)}$ es la tasa de oxidación de Fe(II) ($g L^{-1} d^{-1}$) dada por la **Ec. (26)** (Sección 4.2).

$$\frac{dFe(II)}{dt} = D[Fe(II)_{in}] - D[Fe(II)] - r_{Fe(II)} \quad (42)$$

El balance de masa para O_2 es expresado por la **Ec. (43)**, donde $O_{2,in}$ es la concentración de O_2 a la entrada del reactor ($g L^{-1}$), TTO y TCO están dados por las **Ec. (31)**.

$$\frac{dO_2}{dt} = D[O_{2,in}] - D[O_2] + OTR - TCO \quad (43)$$

La concentración de As(V) en el biorreactor está dada por la **Ec. (44)**, donde $As(V)_{in}$ es la concentración de As(V) a la entrada del reactor ($g L^{-1}$).

$$\frac{dAs(V)}{dt} = D[As(V)_{in}] - D[As(V)] - k_{As(V)}[Fe(III)][As(V)] \quad (44)$$

El balance de masa para Fe(III) está dado por la **Ec. (45)**.

$$\frac{dFe(III)}{dt} = -D[Fe(III)] + r_{Fe(II)} - k_{As(V)}[Fe(III)][As(V)] \quad (45)$$

Las **Ecs. (36-41)** fueron utilizadas para la simulación de la cristalización de bioscorodita en el reactor. El proceso THIOTEQ™ Scorodite fue simulado en un reactor operando en batch por 35 días, cambiando régimen continuo durante 37 días más. Para esto en el diagrama de bloques en Simulink® se programó un switch para activar el flujo de entrada (F) al biorreactor. También se debe mencionar que para la simulación de los tamaños de cristal, se utilizaron

tamaños de cristal característicos diferentes para cada régimen de operación, $L_{c,b}$ para régimen batch y $L_{c,c}$ para régimen continuo. Para el análisis de este sistema en régimen batch, se consideró $D=0 \text{ d}^{-1}$.

4.4 Determinación del índice de saturación (IS)

El índice de saturación (IS) es un parámetro que indica si se ha formado una fase mineral, la cual es calculada de acuerdo a la **Ec. (46)** (Mbamba et al. 2015), donde $a_{\text{Fe(III)}}$ y $a_{\text{As(V)}}$ son las actividades del ión férrico y arsenato, respectivamente, y $K_{\text{sp,Sco}}$ es la constante del producto de solubilidad de escorodita (González-Contreras et al. (2010).

$$SI = \log_{10} \left(\frac{(a_{\text{Fe(III)}})(a_{\text{As(V)}})}{K_{\text{sp,Sco}}} \right) \quad (46)$$

Las actividades químicas pueden ser determinadas de las concentraciones de Fe(III), As(V) y protones, de acuerdo con las **Ecs. (47,48)**.

$$a_{\text{Fe(III)}} = \frac{\text{Fe(III)}}{1 + \frac{K_1}{a_{\text{H}^+}} + \frac{K_1 K_2}{(a_{\text{H}^+})^2} + \frac{K_1 K_2 K_3}{(a_{\text{H}^+})^3} + \frac{K_1 K_2 K_3 K_4}{(a_{\text{H}^+})^4}} \quad (47)$$

$$a_{\text{As(V)}} = \frac{\text{As(V)}}{1 + \frac{a_{\text{H}^+}}{K_3} + \frac{(a_{\text{H}^+})^2}{K_2 K_3} + \frac{(a_{\text{H}^+})^3}{K_1 K_2 K_3}} \quad (48)$$

Las constantes para la determinación de la actividad química de Fe(III) fueron: $K_1=10^{-2.18}$, $K_2=10^{-3.47}$, $K_3=10^{-6.31}$, $K_4=10^{-9.58}$, y para As(V) fueron: $K_1=10^{-2.26}$, $K_2=10^{-6.93}$, $K_3=10^{-11.51}$ (González-Contreras et al. 2012). Para una fase acuosa, se pueden presentar tres condiciones diferentes: i) $IS < 0$, la fase acuosa está sub-saturada y el mineral escorodita puede disolverse en el medio, ii) $IS = 0$, la fase acuosa está en equilibrio, y iii) $IS > 0$, la fase acuosa está supersaturada con respecto al mineral, y ocurre la precipitación (Mbamba et al. 2015).

4.5 Estrategia de ajuste de parámetros

El ajuste de los parámetros cinéticos se realizó mediante el desarrollo de un diagrama de bloques en Simulink® que consta de las ecuaciones diferenciales del modelo, el cual trabaja en la plataforma de Matlab® (R2016a). El programa simula los procesos de oxidación, precipitación y cristalización, y envía los resultados a Matlab® para análisis posteriores. Después, en la herramienta *Parameter estimation* de Simulink® se seleccionaron los parámetros a ajustar. Se añadió un nuevo experimento donde se especificaron las señales de salida del modelo y las señales de salida medidas. Se seleccionó la función de costo (suma del cuadrado del error), la cual es la diferencia entre la salida simulada y la medida. Se utilizó el método de optimización Nonlinear least squares (*lsqnonlin*) para minimizar la función de costo cambiando los valores de los parámetros hasta alcanzar el criterio de paro especificado para el problema de optimización (1×10^{-3}). La resolución del problema de minimización se realizó mediante los algoritmos *Trust Region* y el *Levenberg-Marquardt*, los cuales tienen sus bases en el algoritmo de Gauss-Newton. Este último algoritmo es uno de los métodos empleados para la resolución de problemas de mínimos cuadrados no lineales de la forma:

$$\min_x f(b) \equiv \min_x \frac{1}{2} \|r(b)\|_2^2 = \min_x \frac{1}{2} \sum_{i=1}^m r_i(b)^2 \quad (49)$$

donde, $x \in \mathbb{R}^n$, y

$$r(x) = \begin{pmatrix} r_1(x) \\ \vdots \\ r_m(x) \end{pmatrix} \in \mathbb{R}^m; r_i(x) = y_i - \phi(x, t_i); i=1, \dots, m$$

Este algoritmo consiste en una linealización del modelo empleando una expansión de series de Taylor en la vecindad de un conjunto de valores iniciales de los parámetros (b_0), donde se calculan solamente las derivadas parciales de primer orden (Constales, 2017),

$$f(\mathbf{b}_0 + \Delta \mathbf{b}) \approx f(\mathbf{b}_0) + \mathbf{J}_0 \cdot \Delta \mathbf{b}$$

donde, \mathbf{J}_0 es la matriz Jacobiana:

$$\mathbf{J}_0 = \begin{bmatrix} \frac{\partial f}{\partial \beta_1}(x_1, \mathbf{b}_0) & \cdots & \frac{\partial f}{\partial \beta_p}(x_1, \mathbf{b}_0) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial f}{\partial \beta_1}(x_n, \mathbf{b}_0) & \cdots & \frac{\partial f}{\partial \beta_p}(x_n, \mathbf{b}_0) \end{bmatrix}$$

Sin embargo, como los elementos de la matriz \mathbf{J}_0 depende de la posición de \mathbf{b} en el espacio de parámetros, las estimaciones óptimas de los parámetros se obtienen por aproximaciones sucesivas (iteraciones).

$$\Delta \mathbf{b}_{k+1} = (\mathbf{J}_k^T \mathbf{J}_k)^{-1} \mathbf{J}_k^T (\mathbf{y} - f(\mathbf{b}_k))$$

4.6 Análisis de sensibilidad paramétrica global

El análisis de sensibilidad es un grupo de herramientas que permiten la evaluación de la influencia de los parámetros en las variables de salida. Uno de los principales roles de este análisis es la reducción de un modelo dado. Es decir, del conjunto de parámetros del modelo matemático, existen parámetros con mayor influencia en las salidas, mientras que otros son esencialmente irrelevantes. De esta manera, el espacio de parámetros puede ser reducido, haciendo más simple el modelo para el sistema con la misma complejidad (Jarret et al. 2014).

El análisis de sensibilidad local (ASL) fue realizado empleando simulaciones de Monte Carlo. Este enfoque emplea un set global representativo de muestras para explorar el espacio de parámetros. Como primer paso, en la herramienta “Análisis de sensibilidad” de Simulink® se definió un espacio de parámetros generando valores de entrada aleatorios (100 valores por parámetro) que seguían una distribución normal $\left(\frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{x-\mu}{\sigma} \right)^2} \right)$. Después, se definió la función de costo, creando un requerimiento de diseño en la señal del modelo (Signal Matching

time-domain). La función de costo fue evaluada posteriormente en cada combinación de parámetros generados. Finalmente, los resultados se analizaron mediante análisis estadístico, empleando los coeficientes de regresión lineal estandarizada, calculado entre la función de costo y cada parámetro.

4.7 Análisis en estado estacionario

La caracterización del proceso continuo de la remoción de arsénico en estado estacionario fue llevada a cabo por medio de un análisis de bifurcación. Las bifurcaciones son inherentes a lo sistemas biológicos dado que estos sistemas son susceptibles perturbaciones ambientales. Un análisis de bifurcación provee un panorama del comportamiento en estado estacionario en respuesta a cambio de un parámetro (parámetro de bifurcación). Una bifurcación de un sistema dinámico de la forma:

$$\dot{x}=f(x, \omega), x \in \mathbb{R}^n, \omega \in \mathbb{R}^k$$

tiene lugar cuando uno o más de estos parámetros (ω) es modificado, lo que causa un cambio en la estructura cualitativa de las soluciones de las ecuaciones del modelo (Figueroa-Estrada et al. 2020; Tec-Caamal et al. (2019)). Los resultados de este análisis se resumen en diagramas de bifurcación. En este trabajo para el sistema continuo de oxidación de Fe(II) (CSTR) y para el reactor neumático para precipitación de As(V) se empleó la tasa de dilución y la concentración de Fe(II) como parámetros de entrada. Los rangos evaluados de los parámetros de bifurcación fueron establecidos de acuerdo con datos encontrados en la literatura.

4.8 Análisis de estabilidad por el segundo criterio de Lyapunov

La estabilidad de los puntos en estado estacionario fue analizada por medio del primer criterio de estabilidad de Lyapunov (Popovic et al. 2019). Para esto consideramos un sistema dinámico no lineal de la forma:

$$\dot{x}(t)=f(x(t)) \text{ y } x(0)=x_0$$

Después, suponemos que f tiene un punto de equilibrio (x_{eq}), de modo que $f(x_{eq})=0$. En la vecindad del punto de equilibrio (X_0, U_0), el sistema lineal correspondiente está representado por:

$$\dot{\tilde{x}}(t)=A\tilde{x}(t)+B\tilde{u}(t)$$

Entonces, la matriz Jacobiana de las derivadas parciales del sistema es calculado para determinar los eigenvalores (valores propios) (Fadali y Visioli, 2013). Basado en esto, si los valores propios de la matriz A presentar parte real negativa, el punto de equilibrio se considera asintóticamente estable; mientras que, si uno de los valores propios de la matriz A posee parte real positiva, se considera que el punto de equilibrio es inestable para el sistema no lineal. Sin embargo, los sistemas no lineales pueden presentar múltiples puntos de equilibrio y su comportamiento de estabilidad no es global (Demirel y Gerbaud, 2019).

4.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico para comparación de medias de los valores de las constantes obtenidos en el ajuste de paramétrico bajo diferentes condiciones operativas se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía usando $\alpha=0.05$.

4.9 Software

Los modelos matemáticos que constaron de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOs) fueron implementados en la herramienta Simulink que trabaja con la plataforma de Matlab® (R2016a). Simulink® simuló el oxidación de Fe(II) y As(III), la precipitación de As(V) y la formación de bioscorodita en términos de diagramas de bloques con interconexiones. Los datos de salida del modelo son enviadas a Matlab para análisis posteriores. Las simulaciones fueron realizadas con el solucionador de ecuaciones (solver) ode-4-Runge-Kutta, el cual fue

seleccionado en Simulink, con un tamaño de paso fijo de 0.01. Para los análisis de bifurcación, el modelo se implementó en un programa (script) de Matlab, empleando los parámetros de bifurcación de interés. Para la solución de las EDOs, se utilizó el solver *ode23s* de Matlab, el cual es empleado para la solución de EDOs rígidas con funciones que usan t y y como parámetros de entrada. El análisis de estabilidad se realizó con un programa de Matlab donde se programaron las funciones y se establecieron condiciones iniciales para la solución en estado estacionario, empleado el comando *fsolve* de Matlab. El análisis de varianza fue realizado en Excel (Microsoft®, 2020).

4.10 Colecta de datos experimentales para la validación de los modelos

Datos experimentales para el sistema continuo de oxidación de Fe(II)

Los datos experimentales para la oxidación de Fe(II) fueron tomados del trabajo de González-Contreras et al. (2012). Estos autores reportan la oxidación en un reactor tanque agitado continuo (abreviado CSTR en inglés), empleando un cultivo de *Sulfolobales*. El consorcio microbiano estaba compuesto principalmente por *Acidianus brierleyi* con un 98-99%, y *Metallosphaera sedula* con 1-2%. El biorreactor fue equipado con electrodos para la medición de oxígeno disuelto, pH y temperatura. Los experimentos fueron realizados a temperatura constante (75 °C) y el pH inicial fue fijado a 1.3. Se utilizó un difusor de acero inoxidable para inyectar aire al reactor a una tasa de 0.4 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto, usando un rotámetro. El aire suministra el oxígeno y el dióxido de carbono para la oxidación bioquímica de Fe(II) y para el crecimiento microbiano. El Fe(II) fue alimentado al reactor mediante una solución con una concentración de 3 g L⁻¹. Después, el reactor fue operado con diferentes tasas de dilución (D). Las concentraciones de las especies de hierro fueron determinadas por una técnica espectrofotométrica y las células fueron contadas en una cámara Bürker-Türk. Debido a que las unidades de células están definidas en masa por unidad de

volumen en el modelo, las concentraciones celulares fueron convertidas a g L^{-1} usando un factor de conversión promedio. Para los demás detalles técnicos con respecto al medio de cultivo empleado o la configuración experimental, el lector es referido a González-Contreras et al. (2012b).

Datos experimentales para para la validación del modelo para el sistema continuo de oxidación de Fe(II)/As(III), precipitación de As(V) y formación de bioscorodita

La precipitación de escorodita generalmente es evaluada en condiciones extremófilas de cultivo, es decir, alta temperatura y pH ácido, para proveer un ambiente óptimo para el crecimiento microbiano y promover la formación de la bioscorodita. Los experimentos descritos en esta sección fueron realizados con *Acidianus brierleyi*. Este microorganismo puede ser cultivado en un medio con características propias de una solución proveniente del proceso de refinación de cobre, i.e., alta temperatura (50-70 °C), pH ácido (pH 1-2) y concentraciones de As(III) y Fe(II) de ~1000 ppm (Okibe et al 2014). Estas características pueden proveerle a *A. brierleyi* condiciones favorables para su crecimiento, dado que su pH y temperatura óptimos son pH=1-2 y 70 °C, respectivamente.

Para la validación del modelo de este sistema, se emplearon tres conjuntos de datos experimentales reportados por Okibe et al (2014), y Tanaka et al. (2017). Los experimentos en los cuales se observó la formación de bioscorodita, fueron empleados para la validación del modelo. Todas las corridas fueron realizadas usando un medio de cultivo definido suplementado con extracto de levadura (0.01-0.02 p/v %) en matraces agitados de 500 mL con 200 mL de volumen de operación, usando temperatura y agitación constante de 70 °C y 100 rpm, respectivamente. En todas las corridas experimentales se usó una relación molar Fe(II)/As(III)=1.4. Solamente en el experimento de Tanaka et al. (2017) se consideró el uso de material semilla (escorodita).

Datos experimentales para la validación del modelo para el proceso industrial THIOTEQ™ Scorodite

THIOTEQ™ Scorodite es un proceso patentado por PAQUES B.V. (Holanda) para el tratamiento de efluentes que contienen arsénico (PAQUES Technology, 2020). Brevemente, el proceso consiste en un biorreactor anaerobio (reactor neumático airlift) el cual tiene entradas para la alimentación de Fe(II) y As(V). La inyección de aire al reactor airlift induce el mezclado, pero también provee el oxígeno y el dióxido de carbono (del aire) requeridos para la oxidación bioquímica de Fe(II) y para el crecimiento microbiano. En el reactor, Fe(III) y As(V) reaccionan para formar scorodita, la cual es recuperada por sedimentación para su disposición final. Un diagrama general del proceso se muestra en la **Figura 5**. Una parte de los datos experimentales de la prueba de principio, la selección del reactor y evaluación de condiciones de operación para desarrollar este proceso se utilizaron para la estimación de parámetros y la validación del modelo. Los datos experimentales fueron publicados anteriormente por González-Contreras et al. (2012). Este proceso de un solo paso tiene lugar en un biorreactor airlift a pH=2 y 72 °C. El uso de este tipo de reactor se justifica principalmente por la mezcla inducida por la inyección de aire, las bajas tasas de estrés cortante y los bajos costos de inversión y operación en comparación con los reactores tradicionales de agitación mecánica.

En resumen, los experimentos fueron realizados en un reactor de cristal de 9-L equipado con un control de flujo de aire para obtener una velocidad superficial de 45 cm s⁻¹, y baños de enfriamiento para condensar el agua y regresarlo al reactor, y para mantener el reactor a 72 °C. El reactor fue primero operado en régimen batch durante 35 días, cambiando a régimen continuo durante 37 días mediante la activación de un flujo de entrada al reactor con $D=0.1$ d⁻¹. La concentración inicial ($t=0$) de Fe(II) y As(V) fueron de 1.8 y 2.4 g L⁻¹, respectivamente, resultando en una relación molar Fe/As=1. Al activarse el flujo de entrada al reactor, una solución fue alimentada al reactor con concentraciones de Fe(II) y as(V) de 2.4 g L⁻¹, resultando

en una relación molar Fe/As=1.3. El consorcio utilizado para la oxidación de Fe(II) es el mismo descrito en la Sección 4.11.2. Por otra parte, se tomaron muestras del reactor periódicamente para analizar las concentraciones de Fe(II) espectrofotométricamente y arsénico mediante cromatografía de exclusión de iones aniónicos seguida de detección de UV. No se añadió al reactor ninguna especie de material semilla. Para la caracterización de los precipitados y los estudios de distribuciones de tamaño de los cristales producidos en el reactor, se tomaron tres muestras al día 30 del cultivo batch, y a los días 41 y 72 del cultivo continuo. Todas las muestras fueron identificadas como escorodita cristalina por análisis de difracción de rayos X. El tamaño del cristal fue calculado mediante la determinación del diámetro Stokes de los cristales, que se basa en las tasas de sedimentación. La densidad de los cristales fue de $3,322 \text{ kg m}^{-3}$ (Mineralogy database, 1997). Para más detalles técnicos, el lector es referido al trabajo realizado por González-Contreras et al. (2012).

Capítulo 5

Resultados y Discusión

5.1 Análisis de la oxidación de hierro usando un consorcio de *Sulfolobus* en condiciones de alta temperatura y pH ácido

En esta sección se analiza la oxidación de Fe(II) en un reactor tanque agitado continuo, considerando la siguiente estrategia: i) se realizó el ajuste de diferentes modelos cinéticos para la predicción de la tasa específica de crecimiento del consorcio microbiano (*Sulfolobales*), empleando modelo de limitación e inhibición por sustrato; ii) una vez seleccionado el modelo se procedió al ajuste paramétrico con datos experimentales de oxidación de Fe(II), considerando una cinética de inhibición por Fe(II) y por limitación de oxígeno. iii) finalmente, se realizó un análisis del sistema en estado estacionario, mediante análisis de bifurcación y estabilidad para determinar regiones de operación factibles.

5.1.1 Comparación de modelos cinéticos no estructurados para la tasa específica de crecimiento microbiano

En esta sección se discute la comparación de los modelos cinéticos no estructurados para el proceso de oxidación de Fe(II) en régimen por lote. El modelo seleccionado fue empleado después para realizar las simulaciones en régimen continuo, variando la tasa de dilución. Para este análisis se emplearon los modelos cinéticos de Monod, Teissier, Webb, Aiba y Andrews, considerando un rendimiento biomasa-Fe(II) constante ($Y_{x/Fe(II)}$) (**Figura 6A**). Para el ajuste de los modelos cinéticos se empleó la herramienta Ajuste de curvas de Matlab®, utilizando el algoritmo Trust-Region. La **Tabla 4** muestra los valores de los parámetros ajustados y los coeficientes de determinación (R^2) para cada modelo. En esta tabla se puede observar que los modelos con menor R^2 fueron Monod y Luong. Esto es debido a que estos modelos no consideran la inhibición por sustrato. Por otro lado, los modelos que sí consideran inhibición por sustrato presentaron $R^2 > 0.96$. González-Contreras et al. (2012b) señala una concentración de inhibición de 8 g L^{-1} de Fe(II). Este efecto se puede observar en la **Figura 6A**. Por lo tanto, se consideró necesaria la selección de un modelo cinético que considere este fenómeno. De manera general, utilizando el R^2 como criterio estadístico para la evaluación de los modelos, las expresiones cinéticas que consideran inhibición por sustrato (modelos de Andrews, Webb y Teissier) describen de una manera más adecuada la tasa específica de crecimiento en función de la concentración de Fe(II). A partir de esto, se seleccionó el modelo de Andrews, el cual presentó un R^2 de 0.95. La **Figura 6B** muestra los residuales (diferencia entre dato calculado y dato medido en función de la variable independiente), los cuales están distribuidos aleatoriamente respecto al eje horizontal cero, indicando que el modelo de Andrews representa los datos adecuadamente.

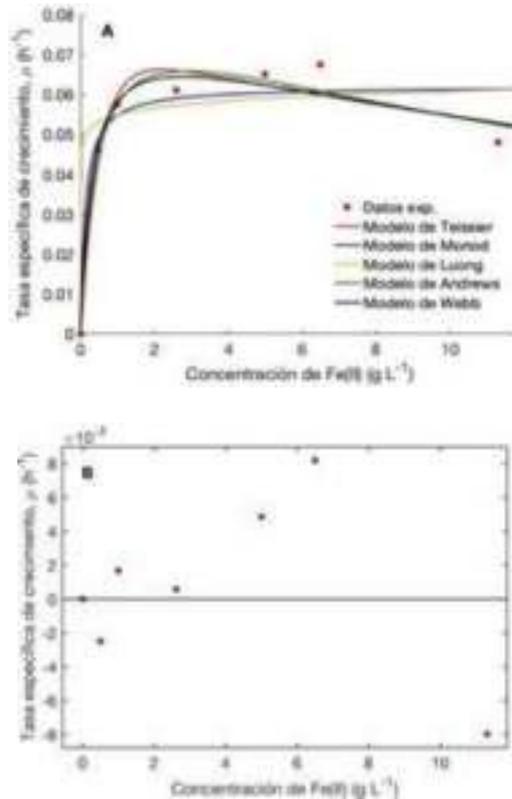


Figura 6. Modelado del crecimiento microbiano en un reactor en lote: A) Datos experimentales y simulados de la tasa específica de crecimiento en función de la concentración de Fe(II), usando varios modelos cinéticos no estructurados. B) Gráfico de residuales indicando la bondad de ajuste para el modelo de Andrews.

Es importante notar que la selección del modelo cinético es de relevancia, dada la no linealidad de los sistemas, aunado a los comportamientos dinámicos complejos que pueden presentar, como oscilaciones, comportamiento caótico o multiplicidad de estados estacionarios, los cuales pueden ser caracterizados por análisis posteriores del sistema mediante herramientas numéricas, como el análisis de bifurcación y estabilidad (Estrada-Figueroa et al. 2020).

Tabla 4. Comparación de modelos de limitación e inhibición por sustrato para la tasa específica de crecimiento microbiano.

Modelo	Expresión cinética	Parámetros					R ²
		μ_{\max} (h ⁻¹)	K_{SFe2} (g L ⁻¹)	K_{iFe2} (g L ⁻¹)	φ (-)	α (-)	
Monod	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}$	0.0675	0.23	-	-	-	0.89
Luong	$\mu = \mu_{\max} \frac{S^n}{K_S + S^n}$	0.0675	0.25	-	-	0.525	0.90
Andrews	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}$	0.0675	0.19	59.83	-	-	0.95
Webb	$\mu = \mu_{\max} \frac{S \left(1 + \frac{\varphi S}{K_I}\right)}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}$	0.0675	0.19	51.45	0.126	-	0.95
Teissier	$\mu = \mu_{\max} \left(\exp\left(-\frac{S}{K_I}\right) - \exp\left(-\frac{S}{K_S}\right) \right)$	0.0675	0.44	51.05	-	-	0.96

5.1.2 Análisis paramétrico

En la sección anterior se analizaron modelos cinéticos para la predicción de la tasa de crecimiento en función de la concentración de sustrato. En esta sección se utiliza el modelo de Andrews el cual fue seleccionado. Además, dado que el proceso es dependiente de la concentración de oxígeno en el medio líquido, se consideró una estructura de Monod para esta variable. El análisis paramétrico fue realizado de la siguiente manera: primero se realizó un análisis de sensibilidad local, después de conocer los parámetros con mayor influencia en el modelo se procedió al ajuste de éstos, considerando los datos experimentales de González-Contreras et al. (2012b), con las siguientes condiciones iniciales: $X_0=0.035$ g L⁻¹, $Fe(II)_0=2.07$ g L⁻¹, $Fe(III)_0=0$ g L⁻¹, $O_{2,0}=0.1$ ppm y pH=1.33. El reactor fue operado con tres diferentes tasas de dilución (D , d^{-1}): $D_1=0.40$, $D_1=0.43$ y $D_1=0.46$, durante un periodo de 100 días. Las simulaciones fueron realizadas corriendo el diagrama de bloques en Simulink®, donde fueron establecidos tres switches para activar y modificar el flujo de entrada al reactor con una concentración de $Fe(II)=3$ g L⁻¹. Los resultados del análisis de sensibilidad local se muestran

en la **Figura 7**. Los puntos muestran los resultados de la evaluación cada conjunto de valores de parámetros mediante la solución del modelo, usando el requerimiento “SignalMatching” en el software. El gráfico de barras muestra el índice de sensibilidad de cada parámetro para la variable Fe(II).

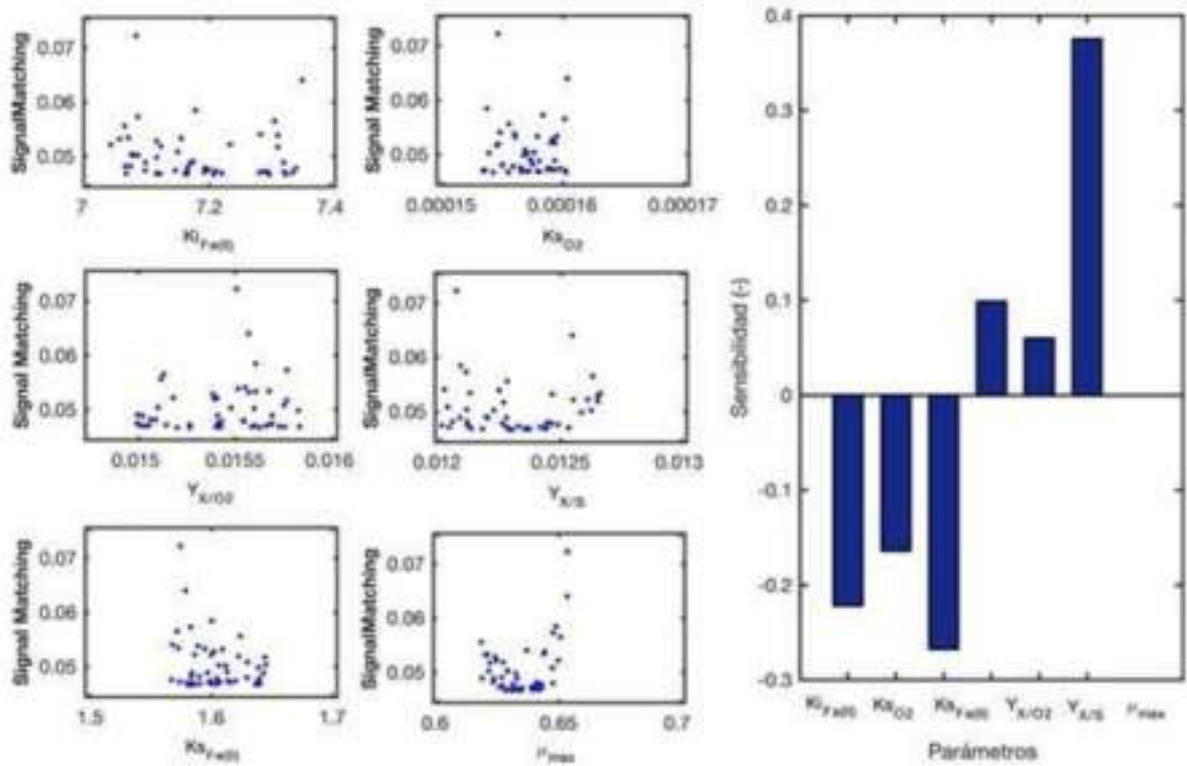


Figura 7. Análisis de sensibilidad para el modelo de oxidación de Fe(II) en sistema continuo.

Bajo las consideraciones anteriores, por un lado se puede observar que es posible reducir el espacio de parámetros mediante el establecimiento de los rendimientos (Y_{X/O_2} y $Y_{X/Fe(II)}$) de acuerdo con valores encontrados en la literatura, y ajustando solamente los parámetros más sensibles (μ_{max} , $K_{s_{Fe(II)}}$, $K_{i_{Fe(II)}}$, $K_{s_{O_2}}$). Por otro lado, con relación a la variable biomasa, es posible la elección de un modelo que considere la concentración de la biomasa como una constante (Sheng et al. 2017). Sin embargo, para nuestro caso de estudio creemos necesaria la consideración de esta variable en el modelo, debido a que se ha observado experimentalmente

que la concentración celular puede influenciar significativamente las velocidades de oxidación (Okibe et al. 2014). El ajuste de los parámetros se realizó dejando fijas las constantes Y_{X/O_2} y $Y_{X/Fe(II)}$ de acuerdo con González-Contreras et al. (2012a). La **Tabla 5** muestra los valores de los parámetros ajustados mediante la minimización de la función objetivo (**Ec. 49**, F_{obj}). Es posible notar que los valores de las constantes $K_{S_{Fe(II)}}$ y $K_{i_{Fe(II)}}$ están de acuerdo con lo reportado por González-Contreras et al. (2012b), quienes obtuvieron una $K_{S_{Fe(II)}}=0.18 \text{ g L}^{-1}$, y observaron que el crecimiento microbiano se inhibe a concentraciones de Fe(II) mayores a 8 g L^{-1} .

Tabla 5. Parámetros cinéticos del modelo de oxidación en un sistema continuo.

Parámetro	Descripción	Unidades	Valores
μ_{max}	Tasa específica máxima de crecimiento	d^{-1}	0.477
$K_{S_{Fe(II)}}$	Constante de afinidad de Fe(II)	$g \text{ L}^{-1}$	0.176
$K_{i_{Fe(II)}}$	Constante de inhibición de Fe(II)	$g \text{ L}^{-1}$	7.976
K_{SO_2}	Constante de afinidad de oxígeno	ppm	0.10
$Y_{X/Fe(II)*}$	Rendimiento biomasa-Fe(II)	$g \text{ g}^{-1}$	0.014
Y_{X/O_2*}	Rendimiento biomasa-oxígeno	$g \text{ g}^{-1}$	0.013
K_{La}^*	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	d^{-1}	130
F_{obj}	Valor de la función objetivo	-	0.05
R^2	Coefficiente de determinación	-	0.86

*Parámetros definidos con base a la literatura (González-Contreras et al. 2012).

También se ajustó la constante μ_{max} , la cual fue estimada previamente por los autores antes mencionados (1.584 d^{-1}). Es posible notar que el valor ajustado (0.47 d^{-1}) es aproximadamente tres veces menor que el dato obtenido por González-Contreras et al. (2012b). Sin embargo, como es sabido, la tasa de dilución ($D=F/V$) máxima en un sistema continuo está dada por la tasa específica máxima de crecimiento, de otra manera, el reactor estaría en una región de lavado, donde la biomasa es expulsada del biorreactor. Como se verá en la siguiente

sección, la tasa máxima aplicada al reactor continuo fue cercana a 0.46 d^{-1} , en la cual no se observó crecimiento microbiano (mediante simulación). Este valor de D está cercano a la $\mu_{\text{max}}=0.47 \text{ d}^{-1}$.

Es importante resaltar que, aunque la tasa de dilución fue variada en el tiempo de operación del reactor, todas las simulaciones fueron realizadas con un único conjunto de parámetros, evitando una re-identificación de los parámetros para cada escenario, lo cual permite a la vez determinar las limitaciones de la estructura del modelo propuesto, así como la viabilidad de la aplicación de enfoques de optimización, control o escalamiento en el futuro.

5.1.3 Validación del modelo

La capacidad del modelo para predecir el proceso de oxidación de Fe(II), fue evaluada mediante el valor de la función objetivo (F_{obj}) y el coeficiente de determinación (R^2) de regresión lineal. El valor menor de F_{obj} fue de 0.05 y el $R^2=0.86$, con $p<0.001$, indicando de esta manera que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el dato simulado y el experimental.

En esta sección al mencionar detalles experimentales, nos referiremos particularmente al conjunto de experimentos realizados por González-Contreras et al. (2012b). El lector es referido a esta referencia para obtener mayores detalles.

El experimento fue realizado con una tasa de dilución (D) inicial de 0.40 d^{-1} , posteriormente fue incrementada a 0.43 d^{-1} después de 24 días, y finalmente fue aumentada a 0.46 d^{-1} después de 46 días, la cual fue mantenida hasta el final del cultivo (tiempo total=100 días). Una solución con una concentración de Fe(II)= 3 g L^{-1} y pH=1.2 fue alimentada al biorreactor, con las condiciones iniciales mencionadas en la sección anterior. Es importante notar que el experimento se operó inicialmente con una concentración de 6 g L^{-1} , sin embargo, debido a inestabilidades posiblemente relacionadas a la inhibición de las células a altas

concentraciones de hierro, la concentración de Fe(II) de entrada al reactor fue disminuida a 3 g L⁻¹, donde se observó nuevamente un comportamiento estable. La región con comportamiento estable fue usada para la validación del modelo cinético. La estrategia experimental empleada fue aumentar D , tanto como sea posible a la tasa máxima específica de crecimiento, empleando una trayectoria tipo escalonada para D (0.40 a 0.46 d⁻¹). Resulta importante destacar que, aunque el pH genera un efecto en el proceso de oxidación, para la simulación se consideró un pH constante (1.2), debido a que experimentalmente no se observaron cambios significativos en esta variable (~0.01 unidades).

La **Figura 8** muestra los datos experimentales y simulados para la concentración de Fe(II), donde se puede observar que las simulaciones siguen la tendencia observada en la experimentación. También se puede observar que conforme la D se acerca a 0.46 d⁻¹, la concentración de Fe(II) a la salida del reactor tiende a alcanzar la concentración de alimentación, lo cual a su vez disminuye la productividad ($P=[Fe(II)]*D$) (**Figura 8A**). Es necesario aclarar que debido a que en este proceso se busca aumentar la oxidación de Fe(II), por ende la productividad debe ser la menor posible. La concentración de Fe(II) cercana a 3 g L⁻¹ a la salida es explicada principalmente por el lavado del reactor, donde la tasa de crecimiento (~0.32 d⁻¹) es menor a D (0.4-0.46 d⁻¹), observándose una concentración menor a 1x10⁴ células mL⁻¹ al final del cultivo. Además, debido a estas condiciones, la productividad es la más alta posible, ~1.3 g L⁻¹ d⁻¹. Por otro lado, la baja tasa de oxidación de Fe(II) se ve reflejada en la concentración de O₂ en el seno líquido, la cual alcanza la concentración de saturación (3.71 ppm a 75°C) después del día 50, indicando un bajo consumo por los microorganismos.

Las predicciones de la concentración de O₂ están de acuerdo con los datos experimentales, que indican que la concentración de O₂ permanece cercana a 3.23 ppm en el reactor. Experimentalmente se observó que el pH en el medio de cultivo tendió a mantenerse en 1.2. Este efecto se le atribuyó a la adaptación del consorcio microbiano a este pH ácido. Sin

embargo, se pudo observar que este efecto también puede ser explicado principalmente por la baja concentración de biomasa la cual utiliza los protones en su metabolismo, por lo cual, el biorreactor tiende a igualar el pH de la solución alimentada.

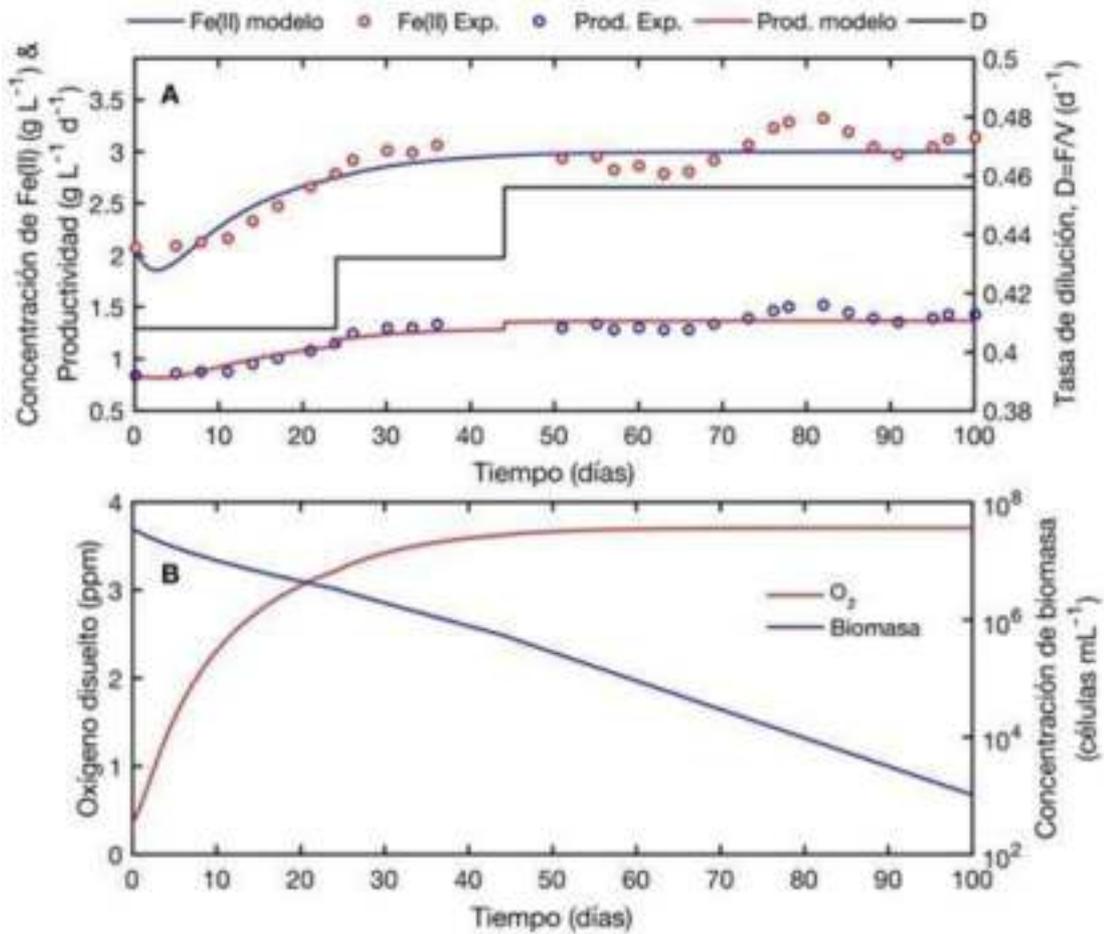


Figura 8. Comparación de datos experimentales y simulados para la oxidación continua de Fe(II). A) Concentración de Fe(II), productividad y tasa de dilución. B) concentración de oxígeno disuelto y concentración de biomasa.

Una vez que fue evaluada la capacidad de predicción del modelo cinético, se procedió al empleo de este para la realización de un análisis basado en modelos para la construcción de superficies de respuesta para poder identificar regiones adecuadas de operación del biorreactor para mejorar la productividad del reactor.

5.1.4 Análisis del reactor en estado estacionario

El modelo matemático fue usado para realizar un estudio exploratorio y encontrar regiones factibles de operación del biorreactor. Para esto se realizó un análisis de bifurcación usando la tasa de dilución y la concentración de Fe(II) a la entrada del reactor ($\text{Fe(II)}_{\text{in}}$) como parámetros de bifurcación, lo cual permitió la construcción de diagramas de contorno, las cuales ilustran el efecto de ambos parámetros en la concentración de Fe(II) a la salida del reactor y en la concentración de oxígeno disuelto. El rango de D fue $0.025\text{-}0.45\text{ d}^{-1}$ y el intervalo para $\text{Fe(II)}_{\text{in}}$ fue $0.45\text{-}8\text{ g L}^{-1}$. Ambos intervalos fueron seleccionados considerando valores encontrados en la literatura abierta (González-Contreras et al. 2012b; Okibe et al. 2013). En particular, los límites superiores fueron elegidos considerando la D en la que se observó (mediante simulación) lavado de la biomasa, y la concentración de $\text{Fe(II)}_{\text{in}}$ fue la que puede presentar inhibición del crecimiento microbiano (8 g L^{-1}). La **Figura 9** muestra los diagramas de contorno obtenidos del análisis de bifurcación. En esta figura se puede observar que mientras más baja sea la tasa de dilución, la cantidad de Fe(II) oxidada aumenta, debido al mayor tiempo de residencia del líquido en el reactor, lo cual aumenta el tiempo para la biorreacción. También es posible notar que al emplear $\text{Fe(II)}_{\text{in}}=8\text{ g L}^{-1}$ y $D>0.1\text{ d}^{-1}$, la concentración a la salida tiende a aumentar, lo cual puede ser explicado ya sea por inhibición microbiana debido a la alta concentración de Fe(II) o el acercamiento de D a la tasa de lavado (0.46 d^{-1}).

Por otro lado, es importante remarcar que se deben seleccionar condiciones de operación del reactor considerando que es posible caer en regiones de limitación por oxígeno. De manera general, en la **Figura 9** se puede observar que al utilizar valores de $D>0.35\text{ d}^{-1}$, la concentración de oxígeno es entre 3 y 3.7 ppm, es decir que en esta región no hay una limitación por consumo de oxígeno, ya que las concentraciones son mantenidas cercanas a la concentración de saturación. Sin embargo, en la región $0.1<D<0.22\text{ d}^{-1}$ y $3<\text{Fe(II)}_{\text{in}}<8\text{ g L}^{-1}$ se puede observar que la concentración de O_2 está cercana a 0 ppm. Es preciso mencionar que en estas condiciones

de baja concentración de O_2 la actividad microbiana puede verse afectada; por ende, estas regiones de operación deben evitarse, o bien emplearse estrategias para mejorar el transporte de oxígeno hacia la fase acuosa. Entre estas alternativas está el empleo de una mayor velocidad de agitación o la disminución del diámetro de burbuja en el reactor mediante el uso de aireadores con tamaños de poro más pequeños (AL-Mashhadani et al. 2015). Debido a que estas estrategias han sido ampliamente estudiadas y la factibilidad de su aplicación es alta, no se consideró necesaria la integración de una estructura de inhibición por oxígeno en el modelo cinético.

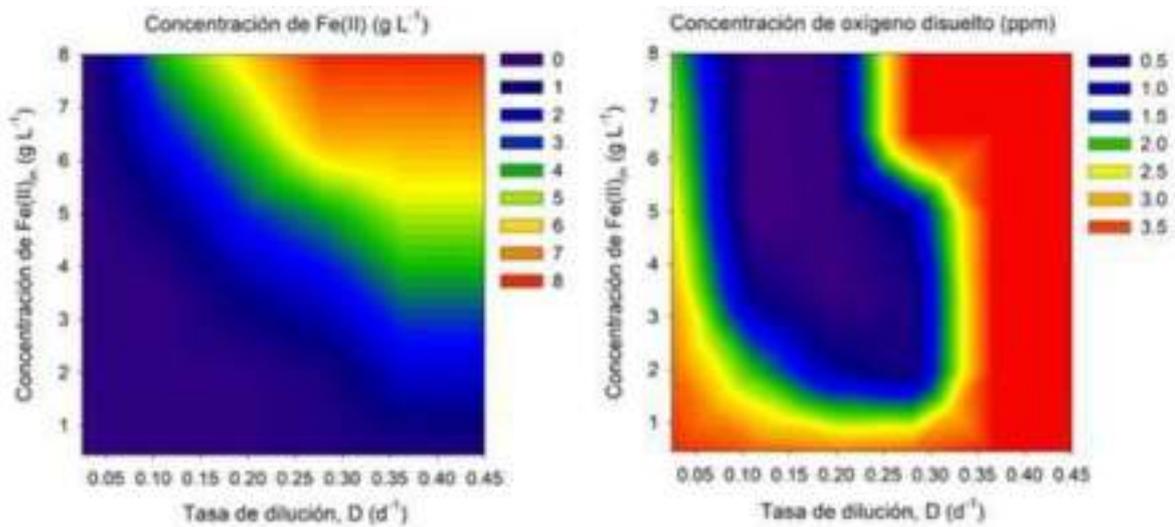


Figura 9. Diagramas de contorno obtenidos del análisis de bifurcación, considerando la tasa de dilución (D) y la concentración de $Fe(II)$ en la alimentación al reactor ($Fe(II)_{in}$) como parámetros de bifurcación.

Por otro lado, se ha observado que cuando se emplean microorganismos extremófilos (como cepas de *Sulfolobales*), una exposición prolongada a una alta concentración de oxígeno mayor a 4 ppm puede reducir considerablemente la actividad microbiana (De Kock et al. 2003). Sin embargo, debido a que la concentración de saturación de oxígeno en fase acuosa no excede 3.7 ppm (a 75 °C), este límite no tiene relevancia en las consideraciones para la construcción

del modelo. De la **Figura 9** se sugiere el empleo de $D < 0.1 \text{ d}^{-1}$ como la región con mayor productividad sin observar alguna limitación por oxígeno.

El análisis de estabilidad mediante la determinación de los valores propios del sistema ($\lambda_{\text{Fe(II)}}$, λ_{O_2} y λ_X), mostró que para la región $0.025 < D < 0.45$ cubriendo todo el rango de concentraciones de Fe(II) ($0.45 < \text{Fe(II)}_{\text{in}} < 8$) el sistema se comporta estable, es decir, de acuerdo con el segundo criterio de Lyapunov todos los valores $\lambda_{\text{Fe(II)}}$, λ_{O_2} y λ_X tienen parte real negativa. En un solo caso de todo el rango de condiciones se observó inestabilidad. Es decir, empleando $D = 0.365 \text{ d}^{-1}$ y $\text{Fe(II)}_{\text{in}} = 0.45 \text{ g L}^{-1}$, para la variable O_2 se observó un valor positivo para λ_{O_2} (4.72×10^{-8}). La **Figura 10** muestra las oscilaciones en la variable O_2 en el tiempo, las cuales se encuentran en el rango 3.704-3.712 ppm. Es preciso resaltar que este comportamiento no es de gran relevancia en el proceso debido a que la concentración está cercana a la saturación (3.7 ppm), además, estos cambios son difícilmente detectados por los sensores, ya que la variación está en el orden de 10^{-5} g L^{-1} .

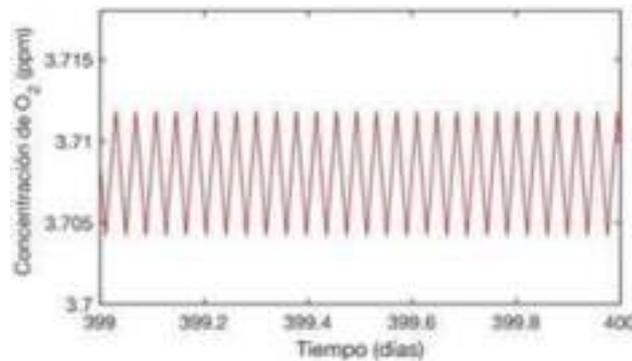


Figura 10. Oscilaciones en la variable O_2 evaluando $D = 0.365 \text{ d}^{-1}$ y $\text{Fe(II)}_{\text{in}} = 0.45 \text{ g L}^{-1}$.

5.2 Modelado de la cristalización de bioscorodita en condiciones extremas: Aspectos cinéticos de la biooxidación *in-situ* de Fe(II)/As(III), y precipitación de As(V)

5.2.1 Ajuste paramétrico, estadística y análisis de sensibilidad

El ajuste paramétrico se llevó a cabo para tres conjuntos de datos experimentales reportados por Okibe et al. (2014) y Tanaka et al. (2017). Los parámetros cinéticos del modelo fueron obtenidos ajustando el modelo a los datos experimentales, mediante la minimización de la función objetivo (**Ec. 49**). Los parámetros para el Sistema 1 fueron obtenidos considerando las siguientes condiciones iniciales (mM): $Fe(II)_0=9$, $As(III)_0=6.5$, $O_{2,0}=0.07$; para el Sistema 2, $Fe(II)_0=18$, $As(III)_0=13$, $O_{2,0}=0.07$; y para el Sistema 3, $Fe(II)_0=4.35$, $As(III)_0=6$, $O_{2,0}=0.07$. Las concentraciones de As(V) y Fe(III) fueron consideradas cero a $t=0$ para todos los casos. Todos los experimentos fueron realizados con un pH inicial de 1.5, temperatura constante de 70 °C, y una concentración de inóculo (*Acidianus brierleyi*) de 1×10^7 células mL^{-1} (0.01 g L^{-1}). Los sistemas 1 y 2 fueron realizados bajo las mismas condiciones operacionales, variando únicamente la concentración inicial de Fe(II) y As(III) (misma $Fe(II)/As(III)=1.4$). El sistema 3 fue realizado bajo las mismas condiciones operacionales, con una concentración inicial de extracto de levadura diferente y una relación molar de $Fe(II)/As(III)=1.4$. La **Tabla 6** muestra los valores de los parámetros ajustados para cada sistema evaluado. Como se esperaba, los valores de las constantes variaron para cada sistema. Esto es posible considerando que las condiciones de cultivo tienen un efecto en las constantes de afinidad (K_s) y las constantes de velocidad de reacción (Owens and Legans, 1987). La **Tabla 6** muestra los valores de la función objetivo (F_{obj}) y los coeficientes de determinación (R^2) global usando los datos experimentales y las predicciones del modelo de Fe(II), As(III) y As(V). Los valores de R^2 y F_{obj} fueron usados como criterio para evaluar la capacidad de predicción del modelo. El valor de F_{obj} más bajo fue obtenido para el sistema 3, seguido por el 1 y 2, con valores de R^2 entre 0.96 y 0.98, siendo Fe(II) y As(II) las variables con mayores R^2 individuales ($R^2 > 0.98$).

Tabla 6. Valores de los parámetros del modelo de oxidación de Fe(II) y As(III), y precipitación de As(V) en régimen batch.

Parámetro	Descripción	Unidades	Valor		
			Sistema 1 ^a	Sistema 2 ^a	Sistema 3 ^b
$k_{\text{Fe(II)}}$	Constante de velocidad de reacción de Fe(II)	mM d ⁻¹	43.189±7.618	43.55±5.63	42.387±2.41
$k_{\text{As(III)}}$	Constante de velocidad de reacción de As(III)	mM d ⁻¹	12.291±2.576	5.401±0.195	13.251±5.233
$k_{\text{As(V)}}$	Constante de precipitación de As(V)	L mmol ⁻¹ d ⁻¹	6.4x10 ⁻³ ±1x10 ⁻⁴	1.83x10 ⁻² ±2x10 ⁻⁴	3x10 ⁻³ ±2x10 ⁻⁴
$K_{\text{SFe(II)}}$	Constante de saturación de Fe(II)	mM	4.945±0.375	3.22±1.231	0.698±0.258
K_{SO_2}	Constante de saturación de O ₂	mM	0.236±0.001	0.21±0.04	0.206±0.001
$K_{\text{SAs(III)}}$	Constante de saturación de As(III)	mM	0.638±0.070	0.80±0.20	0.610±0.071
F_{obj}	Valor de la función objetivo	-	0.108	0.110	0.021
R^2	Coefficiente de determinación	-	0.97	0.96	0.99

^a Datos experimentales tomados de Okibe et al. (2014). ^b Datos experimentales tomados de Tanaka et al. (2017).

Para la variable As(V) se obtuvieron R^2 ($\alpha=0.05$) entre 0.88 y 0.98. En términos globales, esto indica que el modelo tiene una adecuada capacidad de predicción. Es importante resaltar que el modelo puede presentar algunas imprecisiones que pueden estar relacionadas a procesos de adsorción de As(V), los cuales no fueron considerados en la estructura del modelo cinético (Vanlier et al. 2013).

Por otro lado, se realizó un análisis estadístico para los valores de las constantes obtenidas en el ajuste paramétrico, dado que las condiciones ambientales y operacionales en el biorreactor pueden tener un efecto significativo sobre los valores de los parámetros de la cinética de Monod (Muloiwa et al. 2020). Fue interesante observar que para los parámetros $k_{Fe(II)}$, $k_{As(III)}$, $K_{SAs(III)}$ y K_{SO_2} no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$) para los tres sistemas. De manera general, esto puede estar relacionado a que independientemente de las concentraciones iniciales de Fe(II), *A. brierleyi* puede mantener su capacidad metabólica para oxidar Fe(II) y As(III). Además, del análisis de K_{SO_2} , se puede interpretar que el oxígeno no es un sustrato limitante para el proceso, lo cual está de acuerdo a las hipótesis generalmente consideradas para el modelado matemático de la oxidación de Fe(II) en biorreactores (Sheng et al. 2017). Sin embargo, es necesario considerar la concentración del O_2 en la velocidad de oxidación, debido a que, usando concentraciones más altas de hierro o evaluando sistemas continuos de oxidación, el O_2 puede tener efectos significativos en la oxidación, observándose como una limitante en el proceso (Acevedo, 2000; Plessis et al. 2006). Además, esta variable puede ser utilizada como una variable manipulable fácilmente medible para realizar inferencias globales del sistema (Esquivel-Ríos et al. 2014; Ordaz-Cortés et al. 2019). Para los parámetros $k_{As(V)}$ y $K_{SFe(II)}$ existieron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$) entre los tres sistemas. Una discusión más detallada de la fenomenología involucrada en los cambios relacionados a las constantes se puede encontrar en la siguiente sección.

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de sensibilidad paramétrica para identificar los parámetros que tienen más influencia en las predicciones del modelo cinético. De esta forma se pueden optimizar parámetros objetivo (identificados del análisis de sensibilidad) en una futura exploración experimental, disminuyendo costos experimentales relacionados a la determinación de parámetros que no tienen influencia en las predicciones del modelo. Con este análisis se puede reducir el espacio de parámetros cinéticos (Jarret et al. 2015), con la ventaja de generar un “modelo reducido”, el cual puede disminuir el tiempo de cómputo requerido. De manera general, cuando un parámetro tiene una sensibilidad baja, se considera que tiene un efecto despreciable en la simulación, y los parámetros altamente sensibles tienen una influencia fuerte en las predicciones del modelo y requieren un nivel de certidumbre para realizar simulaciones robustas (Croicu et al. 2017). El análisis de sensibilidad se realizó mediante simulaciones de Monte Carlo considerando los seis parámetros ajustados del modelo. Se generaron valores aleatorios de cada parámetro con una distribución normal, los cuales fueron evaluados mediante la solución del modelo para generar los índices de sensibilidad que se muestran en diagramas de Tornado, usando la regresión lineal estandarizada. El signo indica si un aumento del valor del parámetro corresponde a un aumento o disminución del valor de requerimiento (SignalMatching). Las sensibilidades fueron calculadas usando el modelo propuesto y el conjunto de parámetros para el sistema 1, considerando las siguientes condiciones iniciales (mM): $Fe(II)_0=6.5$, $As(III)_0=13$, $O_{2,0}=0.07$, $As(V)_0=0$, $Fe(III)_0=0$; y los datos experimentales correspondientes. Las concentraciones de Fe(II), As(III) y As(V) fueron fijadas como variables de referencia para determinar la sensibilidad. La **Figura 11** muestra los resultados del análisis de sensibilidad, donde se puede observar que para las tres variables, los parámetros más sensibles fueron $k_{Fe(II)}$, $k_{As(III)}$, $K_{SFe(II)}$.

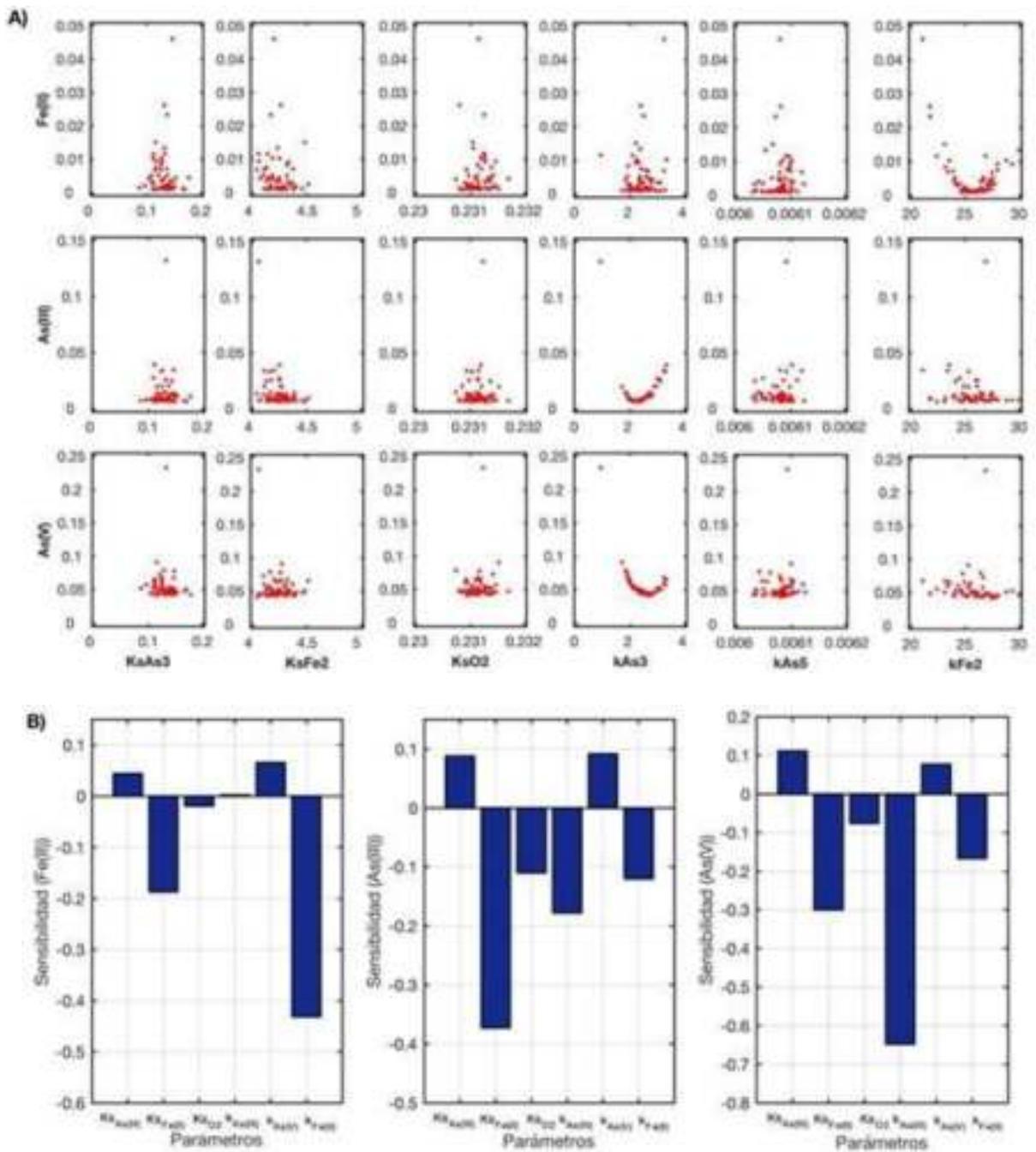


Figura 11. Análisis de sensibilidad. A) Gráfico de dispersión de las evaluaciones del modelo para las variables Fe(II), As(III) y As(V). B) Índices de sensibilidad.

La sensibilidad de As(V) muestran dependencia de las velocidades de oxidación de Fe(II) y As(III), lo cual es consistente con la literatura, donde se encuentra que la precipitación de arsénico como escorodita es dependiente de la relación molar Fe/As (Tanaka et al. 2018). A

partir de esto, se desprende que se requiere una calibración posterior de los parámetros sensibles para mejorar la calidad de predicción del modelo, mediante evaluaciones cinéticas con diferentes concentraciones de Fe(II) y As(III), así como la concentración de inóculo. Los parámetros $k_{As(V)}$, $K_{SAs(III)}$, K_{SO_2} mostraron un efecto menor en las predicciones del modelo (**Figura 11**). Este análisis permite reducir el vector de parámetros al dejar fijos los valores menos influyentes, de manera que se pueden optimizar los parámetros más sensibles del modelo (Kostrysia et al. 2018).

5.2.2 Evaluación del modelo: Cinética de biooxidación, precipitación y cristalización

En esta sección se analiza la inmovilización de As(III) usando el arqueón termoacidófilo *Acidianus brierleyi* para evaluar la capacidad de predicción del modelo bajo diferentes condiciones, dado que la formación de scorodita biogénica por *A. brierleyi* es afectada por diversos factores, tales como la relación molar Fe(II)/As(III), pH, temperatura, adición de material semilla, oxígeno disuelto o la composición del medio de cultivo (Okibe et al. 2018; Okibe et al. 2017; Vega-Hernández et al. 2019). Los datos experimentales usados para el ajuste del modelo matemático presentaron formación de scorodita. De manera general, usando relaciones molares Fe(II)/As(III) entre 2.5 y 6 se promueve la precipitación de jarosita, donde el As(V) puede adsorberse; y otros minerales amorfos. A una relación molar de 1.4 se obtiene scorodita cristalina. Esta relación molar está muy cercana a la composición teórica de Fe/As=1. Los experimentos seleccionados fueron realizados usando Fe(II)/As(III)=1.4, con diferentes concentraciones iniciales. La descripción de estos datos se encuentra en la Sección 2.11.2. El ajuste paramétrico se realizó para cada ensayo, dado que la composición del medio de cultivo puede promover cambios en la cinética de Monod, i.e., las constantes de velocidad de oxidación y las constantes de afinidad al sustrato (Muloiwa et al. 2020). Las **Figuras 12-14** muestran la comparación entre datos simulados y datos experimentales para los tres sistemas

evaluados. Para el Sistema 1 (**Figura 12**), se observa que más del 97 % de Fe(II) y As(III) es oxidado en los primeros 2 y 4 días, respectivamente, lo cual es comparable con los datos simulados. En este sistema se observó por simulación que la concentración de oxígeno disuelto en la fase acuosa alcanza la concentración de saturación (~ 0.132 mM) después de los cuatro días, lo cual corresponde al tiempo donde se observa la oxidación de Fe(II) y As(III) por el microorganismo. Asimismo, para la mayoría del tiempo de cultivo el índice de saturación para escorodita fue mayor a 0, lo cual indica que el mineral precipitó. El tamaño de cristal estimado a $t=14$ d fue de 1.1 micras. Estas estimaciones del modelo están de acuerdo con lo observado experimentalmente por Okibe et al. (2014). Obsérvese que de acuerdo a los datos simulados, más del 90% de As(III) es oxidado, sin embargo la concentración de As(V) disminuye cerca del 28% al día catorce (comparable con $\sim 32\%$ de remoción experimental), lo cual es explicado principalmente por una constante de velocidad de precipitación relativamente baja (**Tabla 6**). Por otro lado, debido a que la tasa de precipitación depende de las concentraciones de Fe(III) y As(V), es posible aumentar la velocidad al utilizar mayores concentraciones de ambos sustratos.

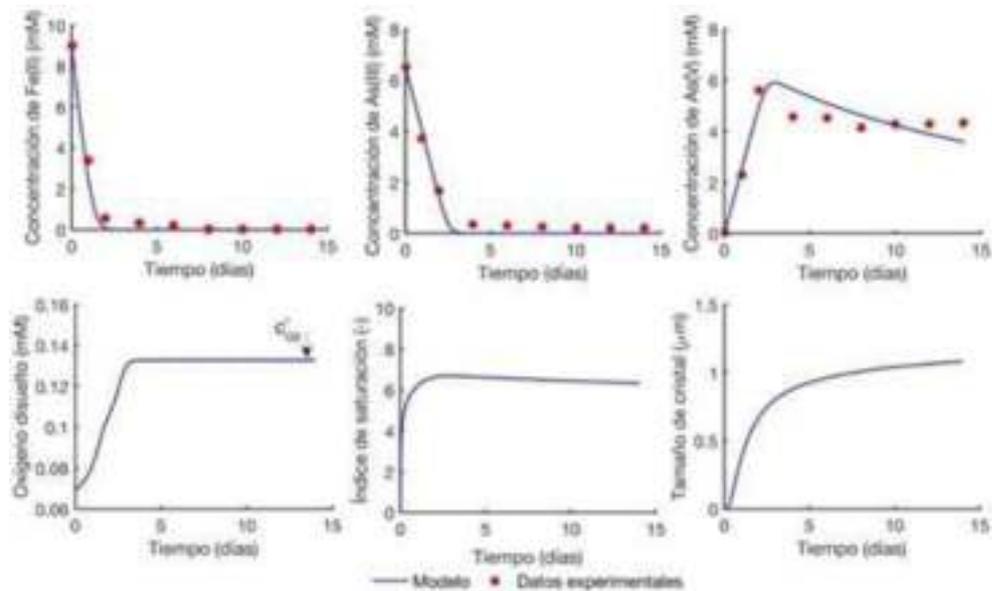


Figure 12. Datos experimentales y simulados del Sistema 1. Biooxidación de Fe(II) y As(III), precipitación de As(V), oxígeno disuelto, índice de saturación de escorodita y tamaño de cristal.

Fuente de datos experimentales: Okibe et al. (2014).

Esto puede observarse en la **Figura 13** (Sistema 2), donde es posible notar un aumento de la precipitación de As(V) (82% simulado, comparable con 86% experimental) a los 14 días, usando concentraciones iniciales de Fe(II) y As(III) de 18 y 13 mM, respectivamente, donde cerca de la totalidad de Fe(II) y As(III) fueron oxidados en 2.5 y 10 días, respectivamente. La **Figura 14** muestra el comportamiento dinámico del Sistema 3, donde se observa una precipitación de As(V) del 18.7% (comparable con 21.27% simulado). Este experimento fue realizado usando material semilla (escorodita), donde se observa por simulación que se obtiene un tamaño final cerca de 69 micras. El tamaño promedio inicial del cristal se consideró de 60 micras según observaciones de Tanaka et al. (2017). Los datos experimentales y las simulaciones muestran que la cantidad de remoción de As(V) aumenta al aumentar las concentraciones de hierro y arsénico.

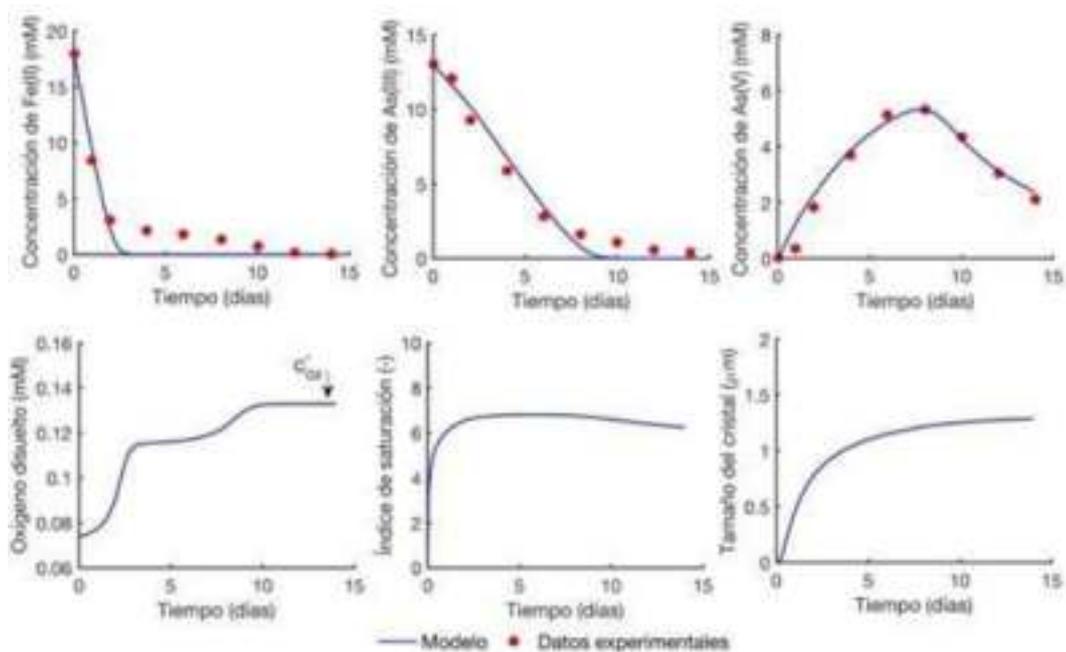


Figura 13 Datos experimentales y simulados del Sistema 2. Biooxidación de Fe(II) y As(III), precipitación de As(V), oxígeno disuelto, índice de saturación de escorodita y tamaño de cristal. Fuente de datos experimentales: Okibe et al. (2014).

Cuando *Acidianus brierleyi* crece con $\text{As(III)}_0=6.5$ mM, se observa un aumento en el número de células (de 1×10^7 a 6×10^7). Sin embargo, no hay crecimiento cuando el proceso se lleva a cabo con $\text{As(III)}_0=13$ mM, sino que se induce in mecanismo de desintoxicación de As(III) cuando la concentración de As(III) alcanza un nivel requerido. Los experimentos fueron realizados usando una concentración inicial de 1×10^6 células mL^{-1} y entre 0.015-0.02 %(p/v) de extracto de levadura. Según las observaciones de Okibe et al. (2014), la oxidación puede ser mejorada significativamente añadiendo este último sustrato al medio de cultivo, lo cual promueve la producción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), las cuales a su vez pueden generar un cambio en la superficie celular (considerada como mediador de electrones). De esta manera, se forma un compartimiento SPE de reacción donde los iones de Fe(III) y As(III) se concentran por complejación (Sand and Gehrke, 2006), donde la oxidación de As(III) acoplada con la reducción de Fe(III) tiene lugar en el compartimiento SPE. Estas SPE también han sido observadas en el proceso continuo de oxidación de Fe(II) (en ausencia de arsénico y con extracto de levadura) usando un consorcio microbiano identificado que tenía la cepa *Acidianus brierleyi* como componente principal (98-99%) (González-Contreras et al. 2012b). Debido a este mecanismo usado por *Acidianus brierleyi* esta cepa es capaz de oxidar mayores concentraciones de Fe(II) (54 mM), como se observa en el trabajo de González-Contreras et al. (2012b). Un experimento adicional realizado por Okibe et al. (2014) fue simulado, donde se utilizó una concentración de inóculo de 1×10^8 células por mL^{-1} . Bajo estas condiciones se observó una velocidad de oxidación más rápida en comparación con el uso de concentraciones de inóculo más bajas (1×10^6 - 1×10^7 células por mL^{-1}). Naturalmente, esto se esperaba debido a que una mayor cantidad de células en el medio acuoso tienen acceso a ambos sustratos (**Figura 15**). Además, bajo estas condiciones, se favoreció la formación de una scorodita más cristalina. De manera que el uso de altas concentraciones de $\text{Fe(II)}/\text{As(III)}$ (no necesariamente mayores relaciones molares) pueden mejorar la cristalización del mineral. Experimentalmente, se

observó que el As(V) precipitó en su totalidad cerca del día ocho, lo cual difiere con la simulación. Esto es explicado por un incremento en la velocidad de precipitación bajo estas condiciones (Tabla 6).

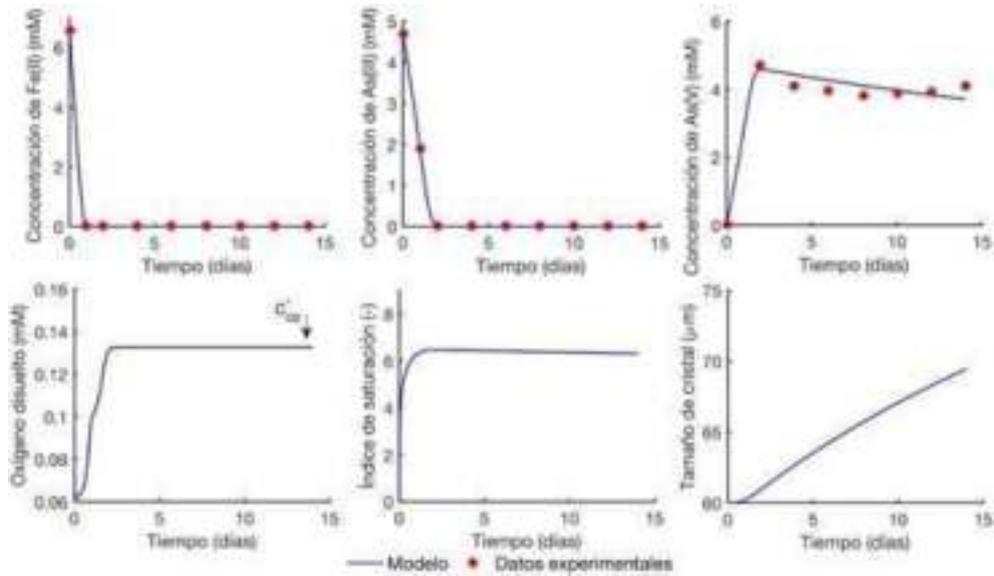


Figura 14 Datos experimentales y simulados del Sistema 3. Biooxidación de Fe(II) y As(III), precipitación de As(V), oxígeno disuelto, índice de saturación de escorodita y tamaño de cristal.

Fuente de datos experimentales: Tanaka et al. (2017).

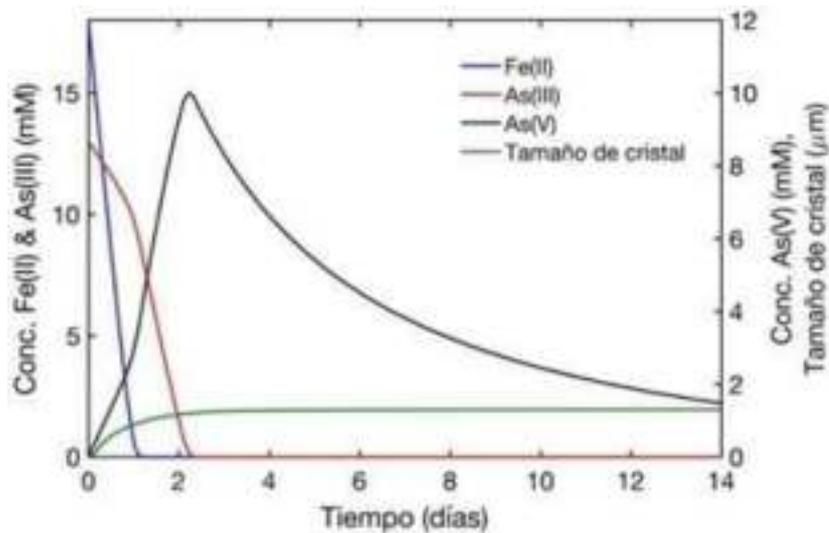


Figura 15. Experimento simulado con las condiciones reportadas por Okibe et al. (2014) con una concentración de inóculo de 1×10^8 células por mL^{-1} .

Otro factor importante en el proceso de oxidación es la concentración de oxígeno disuelto, dado que es el aceptor de electrones. En las **Figuras 12-14** se puede observar un cambio en la tasa de consumo de oxígeno en los primeros días de cultivo como resultado de diferentes velocidades de consumo del Fe(II) y As(III). De acuerdo con los datos simulados en sistemas batch, el oxígeno puede ser considerado como un sustrato que no limita el proceso de oxidación, dado que las tasas de transferencia de oxígeno se acercan a cero conforme el tiempo de cultivo transcurre. Esto es debido a que el biorreactor se encuentra continuamente agitado, alcanzando la concentración de saturación al consumirse el Fe(II) y As(III) en su totalidad. Sin embargo, en sistemas continuos de oxidación con altas concentraciones de sustrato existen parámetros de oxígeno requeridos para no limitar el proceso, debido a la alta demanda microbiana de oxígeno. En sistemas de oxidación de Fe(II), biolixiviación de minerales como pirita o enargita, o formación de scorodita, se requieren coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno (k_{LaO_2}) entre 120 y 720 d^{-1} (González-Contreras et al. 2012a; Acevedo, 2000). Por consiguiente, debido a la viabilidad de escalar el proceso para aplicación industrial en sistemas continuos, estos parámetros deben ser analizados a futuro con mayor detalle a nivel experimental. En la siguiente sección se analiza el efecto de algunos factores que pueden controlar la dinámica del proceso.

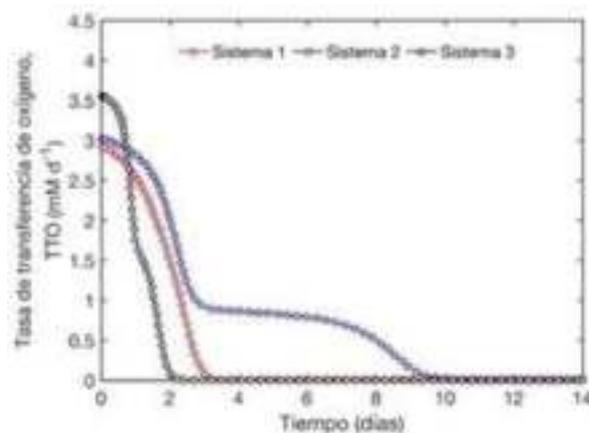


Figura 16. Tasas de transferencia de oxígeno para los tres sistemas.

5.2.3 Factores de control en la cinética: Inóculo, y concentraciones iniciales de Fe(II) y As(III).

El análisis de bioprocesos basado en modelos matemáticos provee información valiosa de la dinámica del proceso bajo diferentes escenarios operacionales. El objetivo de esta sección es emplear el modelo cinético propuesto para evaluar mediante simulaciones numéricas la inmovilización de As(V) como scorodita y su sensibilidad a varios factores, tales como las concentraciones iniciales de Fe(II) y As(III), así como la concentración de inóculo y oxígeno disuelto. El valor de la relación molar Fe(II)/As(III) inicial puede fijarse a un valor recomendado por la literatura (Min et al. 2015), donde se sugiere el uso de Fe/As=1.5, que es el valor más cercano a la relación molar Fe/As dada por estequiometría para scorodita (Fe/As=1). No obstante, las concentraciones iniciales de Fe(II)₀ y As(III)₀ pueden variar, siendo mantenida la misma relación molar. Por otro lado, aunque el pH es un factor que puede afectar el proceso de manera significativa, para efectos de simulación se consideró constante (1.5) debido su rango óptimo específico observado experimentalmente (pH=1.2-1.5). Las simulaciones se realizaron con el modelo desarrollado y con el conjunto de parámetros ajustados para el Sistema 2 (ver **Tabla 6**), variando las concentraciones de Fe(II) y As(III) en un rango de 9-31.3 y 6.5-22.6 mM, respectivamente. Para la serie de experimentos numéricos, la Fe(II)/As(III) fue fijado a 1.4, de acuerdo con la sugerencia de Okibe et al. (2014), quienes sugieren este valor para la cristalización de scorodita, evitando la formación de otros minerales amorfos o la adsorción de As(V) en jarosita. Por otro lado, dado que se han observado que la cantidad de biomasa esencialmente no cambia a la largo del cultivo, la concentración de biomasa se asume constante. Sin embargo, de acuerdo con el estudio de Okibe et al. (2014), el incremento de la concentración de inóculo puede mejorar la oxidación de hierro y arsénico, además de mejorar la cristalinidad de la scorodita. En general, los bajos rendimientos de biomasa se consideran un cuello de botella para procesos de oxidación de Fe(II). Para efectos de evaluación numérica de la concentración de inóculo se utilizaron los siguientes valores:

1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 células mL^{-1} , considerando un peso promedio de las células de 1 pg. El sistema se consideró isotérmico ($70\text{ }^\circ\text{C}$), sin adición de material semilla y un tiempo de cultivo de 15 días.

La **Figura 17** muestra el efecto de las concentraciones de Fe(II), As(III) e inóculo en la precipitación de As(V) y el perfil de concentraciones de oxígeno disuelto en fase acuosa. En general, el aumento de la concentración de inóculo influyó en las cantidades de Fe(II) y As(III) oxidadas durante el tiempo de cultivo para todo el rango de concentraciones iniciales. Para la concentración de inóculo de 1×10^6 células mL^{-1} , el aumento de las concentraciones de Fe(II) y As(III) resultó en una disminución de la precipitación de As(V) del 36 al 12%. Aunque los sustratos están biodisponibles para los microorganismos debido a su solubilidad, el bajo número de células contribuye a disminuir la tasa de oxidación de ambos sustratos, lo cual resulta en una baja velocidad de precipitación. Para esta concentración de inóculo, los tamaños de cristal obtenidos fueron entre 1.04 y 1.066 micras. Para la concentración de inóculo de 1×10^7 células mL^{-1} , los porcentajes de precipitación de As(V) variaron entre 96 y 99% para todo el rango de concentraciones iniciales. Los porcentajes de remoción de As(V) para la concentración de inóculo de 1×10^8 células mL^{-1} variaron entre 98 y 100%. Esta precipitación de As(V) mayores al 96% están relacionadas a la completa oxidación (99%) de Fe(II) y As(III) en los 15 días de cultivo. Para el inóculo de 1×10^7 células mL^{-1} se obtuvieron tamaños de cristal entre 1.2 y 1.4 micras. Este rango fue similar para el inóculo de 1×10^8 células mL^{-1} , lo cual está relacionado a las cantidades de As(V) precipitado, las cuales fueron similares.

Adicionalmente, al utilizar las diferentes concentraciones de inóculo, se pudieron observar diferencias en las velocidades de consumo de oxígeno. Esto se debido a que aunque la oxidación de Fe(II) y As(III) se lleva a cabo simultáneamente, estas ocurren a diferentes velocidades, siendo la oxidación de As(III) más lenta según lo observado experimentalmente,

lo cual conduce a la obtención de perfiles de concentración de O₂ como se observa en la **Figura 17B2**.

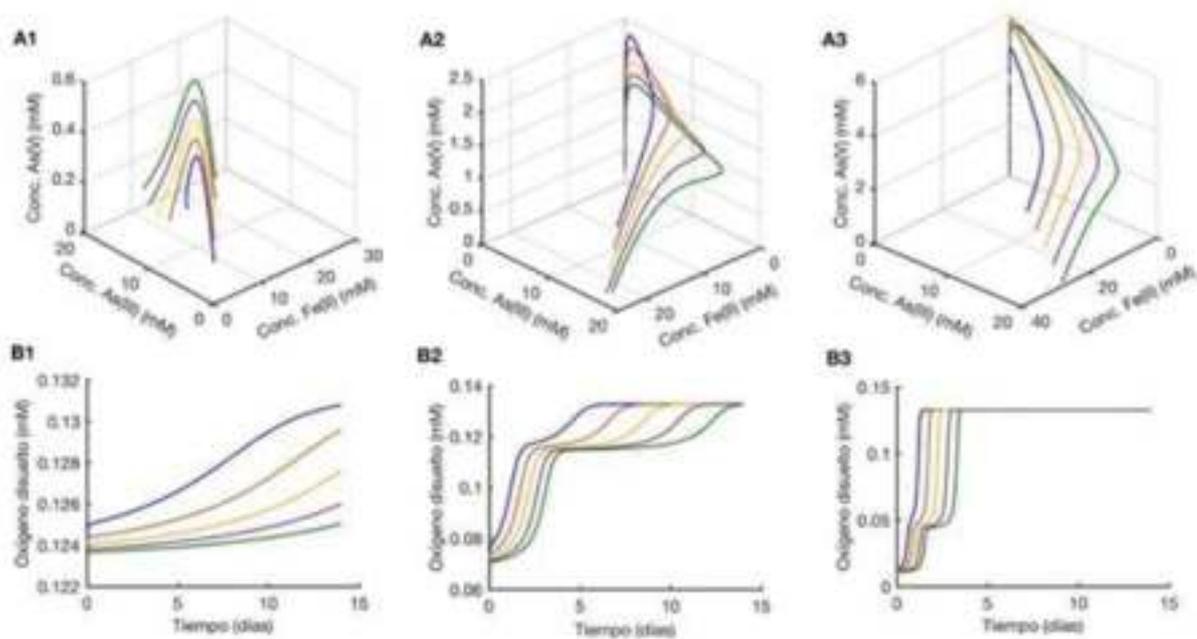


Figura 17. Precipitación de As(V) y concentración de O₂ en función de la concentración inicial de Fe(II) y As(III). Inóculo: 1×10^6 (A1,B1), 1×10^7 (A2,B2), 1×10^8 (A3,B3) células mL⁻¹. Fe(II)₀/As(III)₀ (mM): 9/6.5 (azul), 13.6/9.8 (naranja), 18/13.97 (amarillo), 22.4/16.2 (morado) y 26.9/19.4 (verde).

En las **Figuras 17B1-B3** se puede apreciar que al aumentar la concentración de inóculo, el tiempo de oxidación de Fe(II) y As(III) es reducido, alcanzando más rápido la concentración de saturación de O₂ (0.132 mM). En un sistema por lotes, donde no hay entradas ni salidas en el sistema, el O₂ puede ser considerado como un sustrato que no limita el proceso (sustrato no limitante) debido a que el sistema está tiene inyección de aire y agitación constantes. Sin embargo, en sistemas continuos la capacidad del biorreactor para transferir O₂ a la fase acuosa (k_{LaO_2}) toma relevancia, debido que el proceso es altamente demandante de O₂. Además, para la evitar la inhibición de los microorganismos extremófilos, es necesario mantener una

concentración de O_2 en el rango de 0.031 a 0.125 mM para evitar la inhibición de la biomasa (De Kock et al. 2003). Valores por debajo de 0.031 mM pueden disminuir 50% la oxidación de Fe(II), mientras que concentraciones mayores a 0.125 mM en condiciones de exposición prolongada puede disminuir la actividad de oxidación de Fe(II) entre 20 y 60%. De esta forma, se sugiere que para determinar condiciones operacionales en sistemas continuos (sin limitación por oxígeno), se deben realizar posteriormente estudios experimentales relacionados al efecto del coeficiente volumétrico de transferencia de O_2 sobre el proceso global de oxidación. Además, dada la viabilidad del escalamiento del proceso a nivel industrial, resulta necesaria la exploración y determinación de regiones de operación del reactor que promuevan un desempeño adecuado del proceso con altos rendimientos al menor costo operacional posible.

5.3 Análisis de la oxidación de Fe(II), precipitación de As(V) y cristalización de bioscorodita en un reactor con agitación neumática

En esta sección se analizan los procesos de oxidación de Fe(II), precipitación de As(V) y la cristalización de scorodita biogénica, los cuales ocurren simultáneamente en el mismo biorreactor usando un consorcio de *Sulfolobales*. Para cumplir nuestro objetivo se construyó un modelo matemático para cada fenómeno que ocurre en el reactor neumático. Se realiza un análisis de sensibilidad, seguido por un ajuste paramétrico. Después se realizó la validación del modelo con datos experimentales en un sistema por lote y continuo (CSTR). Finalmente se realizaron simulaciones para evaluar parámetros operacionales en ambos regímenes de operación, tales como la relación molar Fe/As, la concentración de inóculo y la tasa de dilución.

5.3.1 Análisis paramétrico

La oxidación de Fe(II) ha sido ampliamente estudiada mediante el empleo de microorganismos mesófilos y termófilos, lo cual ha derivado en la generación de diversos modelos matemáticos que evalúan la temperatura, pH o concentración de sustrato principalmente, empleando modelos cinéticos que consideran limitación o inhibición por sustrato en la tasa específica de crecimiento microbiano (Nemati y Harrison, 2000; Pina et al. 2010). Sin embargo, en sistemas de oxidación simultánea de Fe(II) en presencia de As(III) o As(V), se ha observado que la concentración de biomasa no cambia significativamente, por lo cual esta variable se ha considerado como constante para efectos de simulación. La **Figura 18** muestra las regresiones lineales y los coeficientes de determinación (R^2) para las variables Fe(II) y As(V) empleando el modelo descrito en la Sección 4.3. Los parámetros ajustados para el modelo se muestran en la **Tabla 7**. Las condiciones consideradas para el ajuste de parámetros se muestran en la **Tabla 8**. El valor de la función objetivo (F_{obj}) fue de 0.35. El análisis de regresión muestra que para las variables Fe(II) y As(V), los R^2 son de 0.90 y 0.86,

respectivamente (con $p\text{-value}<0.001$), lo cual indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre datos simulados y datos experimentales, mostrando que el modelo tiene una buena capacidad predictiva.

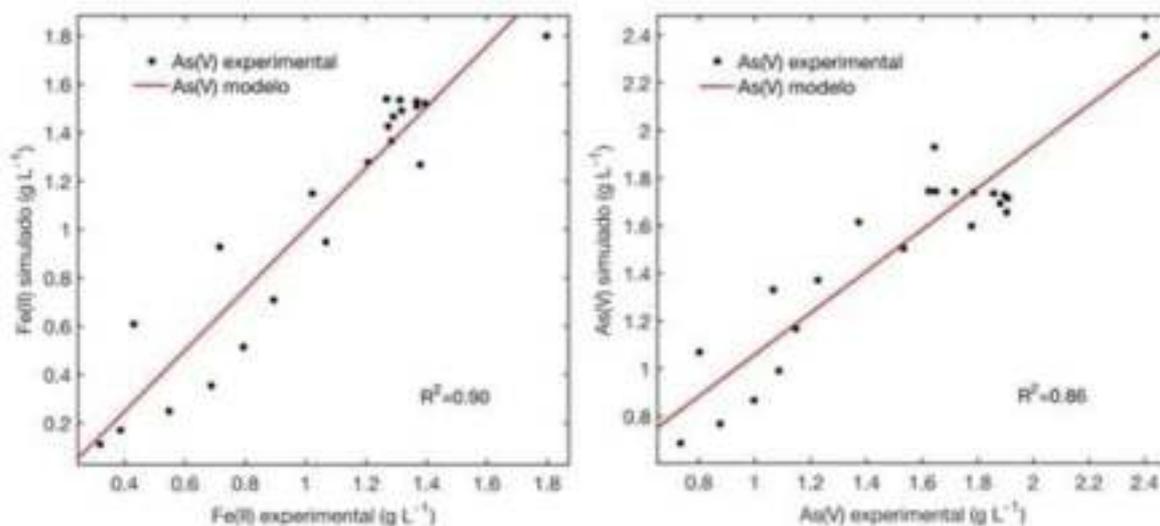


Figura 18. Regresiones lineales para las variables Fe(II) y As(V).

Tabla 7. Parámetros cinéticos utilizados para realizar simulaciones en regímenes batch y continuo.

Parámetro	Descripción	Unidades	Valor	Sensibilidad	
				Fe(II)	As(V)
$k_{b,Fe(II)}$	Constante de oxidación de Fe(II)	$g L^{-1} d^{-1}$	974.14	-0.730	-0.727
$K_{S_{Fe(II)}}$	Constante de saturación de Fe(II)	$g L^{-1}$	1.647	-0.390	-0.434
K_{SO_2}	Constante de saturación de O_2	$g L^{-1}$	0.0016	-0.651	-0.672
$k_{As(V)}$	Constante de precipitación de As(V)	$L g^{-1} d^{-1}$	0.180	0.023	0.231
$L_{c,b}$	Tamaño característico de cristal para el régimen batch	μm	66	-	-
$L_{c,c}$	Tamaño característico de cristal para el régimen continuo	μm	400	-	-
F_{obj}	Valor de la función objetivo	-	0.28	-	-

Tabla 8. de parámetros operacionales empleados para la simulación.

Parámetro	Descripción	Unidades	Valor
$C_{\text{bio},0}$	Concentración de biomasa inicial	células L^{-1}	0.001
$Fe(II)_{\text{in}}$	Concentración de hierro férrico inicial	$g L^{-1}$	1.8
$As(V)_{\text{in}}$	Concentración de arsenato inicial	$g L^{-1}$	2.4
D	Tasa de dilución ($D=F/V$)	d^{-1}	0.1
$k_{L,a}$	Coefficiente volumétrico de transferencia de O_2	d^{-1}	480

Como pudo observarse en la Sección 4.3, cuatro parámetros conforman el espacio de parámetros, a saber, la constante de oxidación de Fe(II) ($k_{b,Fe(II)}$), las constantes de saturación ($K_{SFe(II)}$, K_{SO_2}) y la constante de precipitación de As(V). En análisis de sensibilidad de este conjunto de parámetros fue realizado mediante simulaciones de Monte Carlo, considerando el régimen de operación batch ($D=0 d^{-1}$) y las siguientes condiciones iniciales: $Fe(II)=1.8 g L^{-1}$, $Fe(III)=0 g L^{-1}$, $X=0.001 g L^{-1}$, $As(V)=2.4 g L^{-1}$, $O_2=4.11 ppm$. El valor de pH se asumió constante para la realización de las simulaciones. Generalmente, los parámetros con bajo índice de sensibilidad presentan un efecto despreciable en las predicciones del modelo, contrariamente, los parámetros más influyentes requieren un nivel de certidumbre mayor para mejorar la robustez del modelo (Vanlier et al. 2013). La sensibilidad de los parámetros para la simulación de las variables Fe(II) y As(V) se muestran en la **Tabla 7**, donde se puede observar que la constante $k_{b,Fe(II)}$ es el parámetros más sensible, seguido por las constantes de afinidad $K_{SFe(II)}$, K_{SO_2} . Por un lado, la sensibilidad de estos parámetros guarda congruencia con la literatura donde se encuentra que la tasa de oxidación y la disponibilidad de oxígeno son factores considerados como cuellos de botella en procesos continuos de oxidación de Fe(II) y de cristalización de bioscorodita para inmovilización de arsénico (Bertoldo et al. 2004). De este análisis se puede observar que, del espacio de parámetros explorado, estos tres

parámetros deben ser determinados con tanta precisión como sea posible para mejorar la confianza en las predicciones. Por otro lado, se puede observar que la constante de precipitación de As(V) es el parámetro menos sensible. Esto está relacionado a que la precipitación de As(V) es dependiente de la disponibilidad de Fe(III), la cual a su vez depende de la velocidad de oxidación de Fe(II). Es importante remarcar que las limitaciones del proceso antes mencionadas, pueden ser consideradas como un área potencial de investigación para realizar estudios exploratorios enfocados en la optimización del rendimiento del biorreactor. Por ejemplo, el empleo de microorganismos modificados genéticamente puede proveer ventajas importantes, como el aumento de la tolerancia a altas concentraciones de Fe(II) o aumentar la velocidad de biooxidación (Gumulya et al. 2018).

El ajuste paramétrico fue realizado mediante la solución del modelo en Simulink®, usando las siguientes condiciones iniciales ($t=0$): $Fe(II)=1.8 \text{ g L}^{-1}$, $Fe(III)=0 \text{ g L}^{-1}$, $X=0.001 \text{ g L}^{-1}$, $As(V)=2.4 \text{ g L}^{-1}$, $O_2=0.00411 \text{ g L}^{-1}$. El reactor continuo fue operado con una tasa de dilución de 0.1 d^{-1} después de 35 días de operación en batch. La **Tabla 7** presenta los valores ajustados de los parámetros del modelo. Nótese que se evitó una re-identificación paramétrica para cada régimen de operación, obteniendo un solo conjunto de parámetros, el cual fue usado para las simulaciones en régimen batch y continuo, y para la realización de los análisis de bifurcación y estabilidad. El valor del parámetros $k_{b,Fe(II)}$ obtenido ($63.63 \text{ 22.6 g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) fue comparable con el valor máximo ($22.6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) obtenido por Sheng et al. (2017), quienes evaluaron la capacidad de oxidación de microorganismos aislados de sedimentos de minas en biorreactores continuos. Las diferencias de estos valores pueden ser atribuidas a las condiciones de cultivo, por ejemplo, la composición del cultivo mixto o el pH ($pH > 2.7$). El valor de $K_{S_{Fe(II)}}$ (1.64 g L^{-1}) fue comparable con el valor obtenido por Nemati y Harrison, (2000), quienes determinaron $K_{S_{Fe(II)}}=1.30 \text{ g L}^{-1}$ para *Acidianus brierleyi*, la cual es la cepa con mayor presencia en el consorcio microbiano. En el mismo sentido, este valor fue similar al observado (1.22 g L^{-1}) en

la oxidación de Fe(II) en sistemas continuos (Sheng et al. 2017). El valor de la constante afinidad de oxígeno fue similar a los obtenidos en los sistemas de oxidación de Fe(II) y As(III) (ver Secciones 3.1 y 3.2). Las simulaciones de la cristalización de bioscorodita fueron realizadas considerando un tamaño de cristal característico para el cultivo en batch (L_{cb}) y otro para el cultivo en régimen continuo (L_{cc}), esto debido a que este último inició con una carga de masa de cristales. Estos valores fueron ajustados a $L_{cb}=66 \mu\text{m}$ y $L_{cc}=400 \mu\text{m}$. Estos valores están de acuerdo con los encontrados en experimentos para la evaluación de la tasa de crecimiento de cristal (González-Contreras et al. 2012a). A continuación, se discute la validación del modelo con el conjunto de parámetros cinéticos antes descritos.

5.3.2 Evaluación del modelo

El coeficiente de determinación (R^2) y el valor de la función objetivo (F_{obj}) fueron empleados como criterios para evaluar la capacidad del modelo para predecir la oxidación de Fe(II), la precipitación de As(V) y la cristalización de scorodita. El valor más bajo de F_{obj} fue de 0.28, y los R^2 para Fe(II) y As(V) fueron 0.87 para ambas variables, con $p\text{-value}<0.001$, lo que indica que no hay diferencia significativa entre los datos experimentales y los predichos por el modelo. Es común evaluar la bondad de ajuste por los coeficientes R^2 en combinación con los gráficos de los residuales. En la **Figura 19** se puede observar para ambas variables que los residuales se encuentran distribuidos aleatoriamente respecto al eje horizontal cero, lo cual indica que el modelo representa los datos experimentales correctamente.

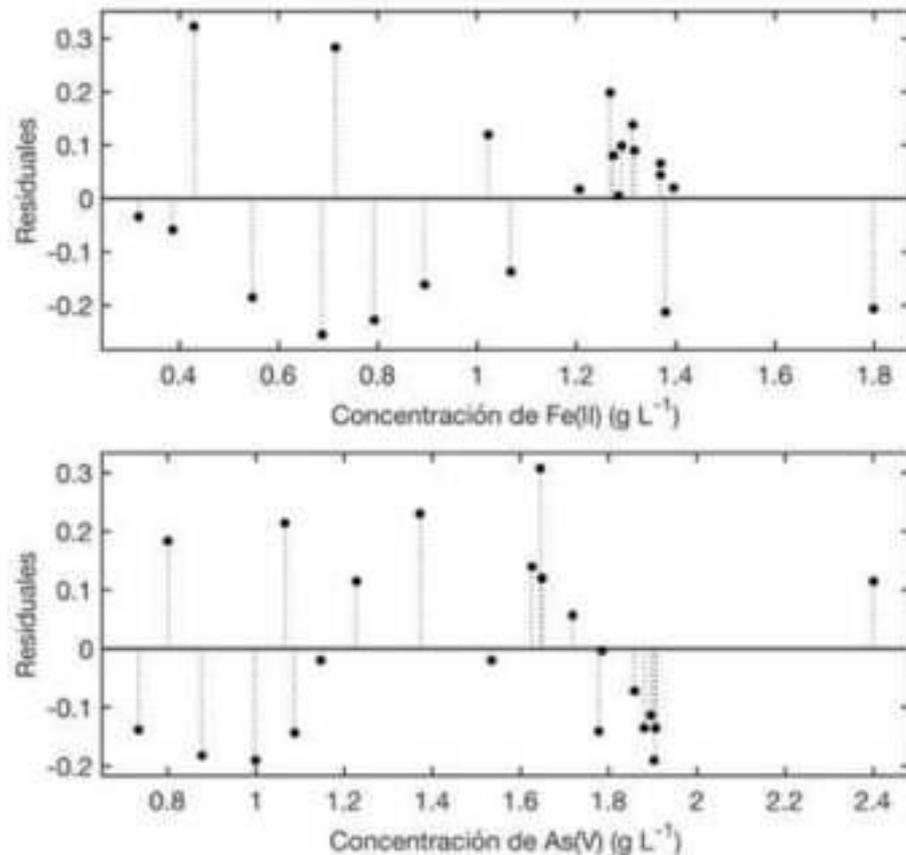


Figura 19. Gráfico de residuales para las variables Fe(II) y As(V).

La **Figura 20A-B** muestra los datos experimentales y las predicciones del modelo para la oxidación de Fe(II) y la precipitación de As(V). En esta figura se puede observar que a los 35 días se activó el flujo de entrada al reactor con una $D=0.1 \text{ d}^{-1}$. En sistema batch, se pudo observar una oxidación del 80% y una precipitación de As(V) de 69%. Estos datos experimentales fueron comparables con los datos simulados, 83% y 67%, respectivamente. Es posible notar además que la simulación guarda congruencia con los datos experimentales en régimen continuo. Las diferencias observadas entre datos experimentales y simulados pueden atribuirse a errores en la medición debido que las muestras no son medidas en línea, sino que son tomadas del biorreactor y analizadas aparte. También, estas diferencias pueden ser explicadas por mecanismos de regulación o inhibición que no son considerados en la estructura del modelo.

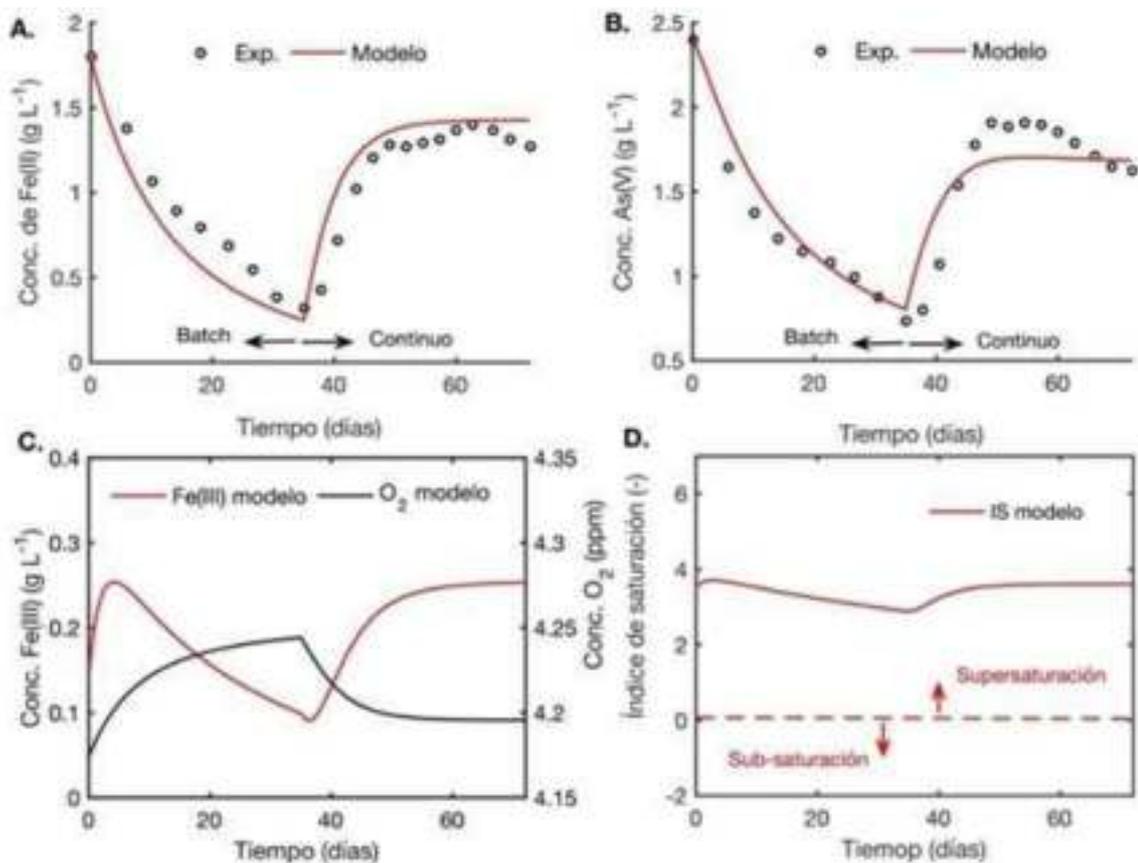


Figura 20. Datos experimentales y simulados para Fe(II) (A) y precipitación de As(V) (B). Predicciones del modelo para las variables Fe(III) y O₂ (C) e índice de saturación (D).

Las **Figuras 20C-D** muestran la concentración de Fe(III), oxígeno disuelto y el índice de saturación de bioscorodita en la fase líquida. Se puede observar que la concentración de Fe(III) es menor a la concentración de Fe(II) en el tiempo debido a que el Fe(III) precipita con As(V) como escorodita. La **Figura 20D** muestra que el índice de saturación nunca fue cero (equilibrio), pero fue mayor a cero durante el tiempo que As(V) precipitó para ambos regímenes de operación. Por otro lado, de la caracterización de los cristales de bioscorodita, se obtuvieron las frecuencias de distribución de tamaño de los cristales producidos en el reactor a los días 30 (fin del cultivo batch) y a los días 41 y 72 del reactor continuo. Se ajustaron distribuciones normales, obteniendo los siguientes resultados para media (μ) y desviación estándar (σ):

$\mu_1=157.85$ y $\sigma_1=33.48$ para día 30, $\mu_2=49.36$ y $\sigma_2=21.47$ para día 41, $\mu_3=65.64$ y $\sigma_3=20.31$ para el día 72. Los datos experimentales y las predicciones de los tamaños de cristal para estos días se presentan en la **Figura 21**.

En biorreactores bioquímicos, los parámetros relacionados al oxígeno, como el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{LA}) y la tasa de transferencia de oxígeno (TTO), son de importancia en el proceso debido a que el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones en la oxidación biológica.

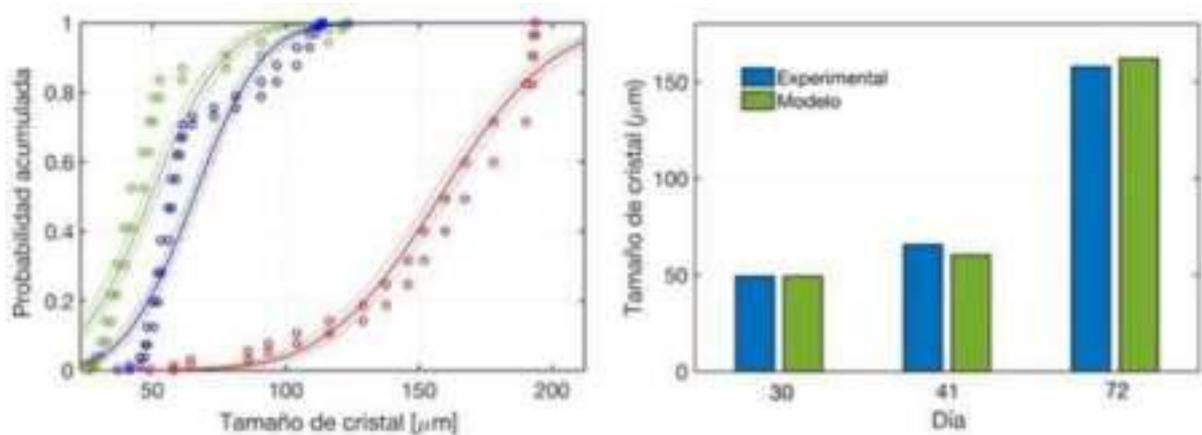


Figura 21. Frecuencias de distribución de tamaño de cristales de bioscorodita producidos en el reactor a diferentes tiempos. Frecuencias día 30 (verde), 41 (azul) y 72 (rojo).

González-Contreras et al. (2012a) indica que el proceso de oxidación de Fe(II) para la cristalización de bioscorodita se observa una limitación por transporte de masa de oxígeno. Esto puede estar relacionado a la alta temperatura del proceso, lo que disminuye la concentración de saturación de oxígeno en agua (4.25 ppm a 72°C). Se puede observar en la **Figura 20D**, que la concentración de oxígeno en la fase acuosa se mantiene cercana a 4.25 ppm, lo cual está de acuerdo con las observaciones experimentales, donde se observa que el O₂ se mantuvo entre

3.8 y 4.2 ppm. Debido a que los fenómenos de transporte de oxígeno pueden representar una etapa limitante en el proceso (Bertoldo et al. 2004), se deben realizar estudios posteriores enfocados en el mejoramiento de la transferencia de O_2 en condiciones de cultivo extremas.

5.3.3. *Análisis de parámetros operacionales basado en modelos: Reactores en régimen batch y continuo*

En esta sección se discute el efecto de variables de operación (concentración de inóculo y la relación molar Fe/As) en un biorreactor batch. También, se discute el efecto de relación molar y la tasa de dilución en la operación en un reactor continuo. Las simulaciones fueron realizadas considerando el modelo y el conjunto de parámetros mostrados en la **Tabla 7**, con las siguientes condiciones iniciales ($t=0$): $Fe(II)=1.8 \text{ g L}^{-1}$, $Fe(III)=0 \text{ g L}^{-1}$, $X=0.001 \text{ g L}^{-1}$, $As(V)=2.4 \text{ g L}^{-1}$, $O_2=4.11 \text{ ppm}$.

Entre las principales variables de diseño de reactores batch para la remoción de arsénico como bioscorodita se encuentran la relación molar Fe/As, la concentración de inóculo y el pH. Sin embargo, debido a que el rango de pH óptimo para la biomasa y la formación de scorodita en el reactor es muy específico, el valor de este factor se consideró constante ($pH=1.2$) para fines de simulación. La **Figura 22** muestra el efecto de la concentración de inóculo en la oxidación de Fe(II), la generación de Fe(III) y su impacto en la precipitación de As(V). El efecto del aumento de precipitación de As(V) al aumentar la concentración de inóculo es esperado debido a la dependencia de la variable As(V) en la concentración de Fe(III) disponible en el medio.

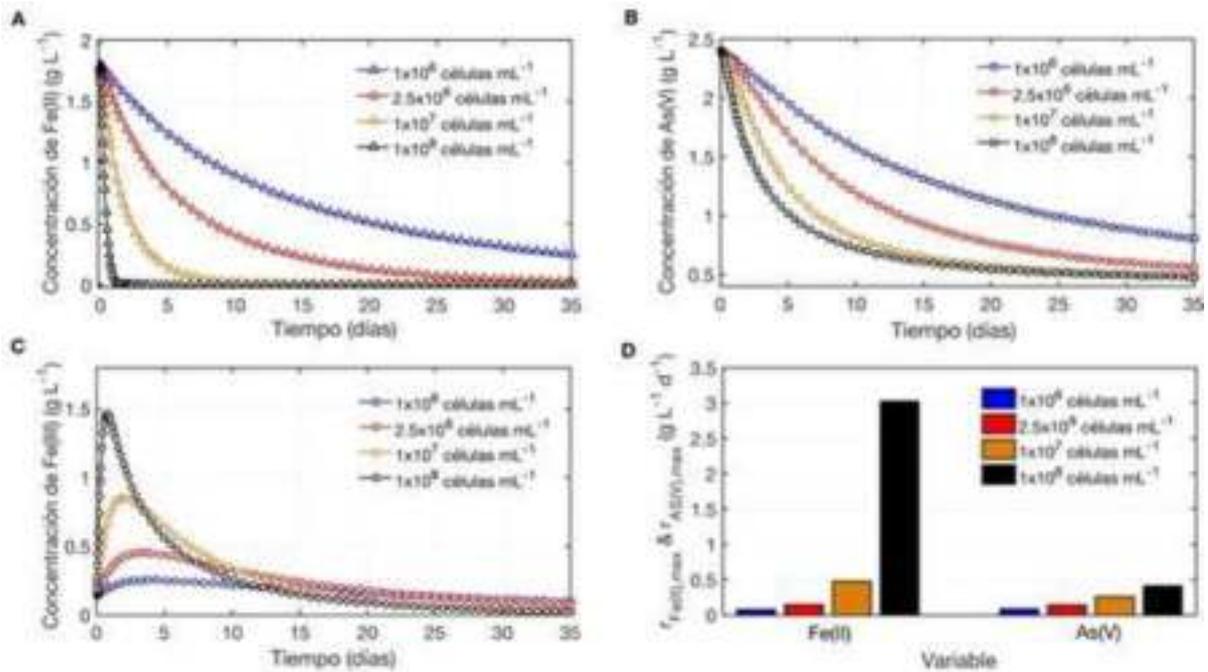


Figura 22. Efecto de la concentración de inóculo en: A) la oxidación de Fe(II), B) precipitación de As(V), C) generación de Fe(III) y velocidades máximas de oxidación de Fe(II) y precipitación de As(V).

De manera general, el incremento en la concentración de inóculo mejora la precipitación de As(V). Cabe resaltar que el rango de concentración de biomasa fue elegido conforme a la literatura (González-Contreras et al. 2012a; Okibe et al 2014). Okibe et al. (2014) observaron que el incremento de inóculo aumenta significativamente la oxidación de Fe(II) y As(III), lo cual mejoró al mismo tiempo la precipitación de As(V). Como se puede observar, el empleo de 1×10^8 células mL⁻¹ aumenta la tasa de generación de Fe(III) (tasa máxima de oxidación de Fe(II) y precipitación de $3.02 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $0.41, \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente (Figura #-D)), en los primeros días, alcanzando una concentración de 1.5 g L^{-1} . Se puede observar este efecto observado las pendientes más pronunciadas al incrementar la concentración de biomasa. Es importante resaltar que, en la operación de reactores por lotes, el tiempo de inactividad (t_i) entre los lotes es un factor de relevancia (Fitzpatrick, 2019). Del anterior análisis podemos rescatar que el

empleo de concentraciones de inóculo puede reducir el t_i , ya que se observa que el 67% de As(V) es removido en 35 días empleando el inóculo de 1×10^6 células mL^{-1} , comparado con 18 días (50% menos tiempo) utilizando un inóculo de 1×10^8 células mL^{-1} . Los tamaños de cristales observados para todo el rango de concentraciones de inóculo varían entre 50 y 54 μm al final del cultivo.

Otro factor importante en la remoción de As(V) como scorodita es la relación molar Fe/As, la cual determina la cantidad de arsénico removido. En la **Figura 23** se muestra el efecto de este factor en el porcentaje de precipitación de As(V) y en el tamaño de cristal al final del cultivo de 35 días, usando un inóculo de 1×10^6 células mL^{-1} . Se observa un comportamiento asintótico en la precipitación de As(V) y el tamaño de cristal conforme Fe/As aumenta, aunque a partir de Fe/As=1.75 se puede notar que las diferencias con los valores obtenidos al aumentar Fe/As no cambian más del 3% para ambas variables dependientes. Para Fe/As=1.75 se observa una remoción de 95% y un tamaño de cristal de 58 μm . Sin embargo, uniendo el análisis de la concentración de inóculo con el efecto de Fe/As, se observa que empleando Fe/As=1.5 y un inóculo de 1×10^7 células mL^{-1} es posible aumentar la cantidad de precipitación de As(V) a 99%. Esta observación está completamente de acuerdo con Okibe et al. (2014), quienes indican que, empleando la misma concentración de inóculo, la relación Fe/As óptima para el proceso es 1.4, que es el valor que más se acerca a la relación estequiométrica para scorodita (Fe/As=1). Así, se sugiere que el empleo de una mayor concentración de inóculo puede disminuir la cantidad de Fe(II) utilizada para la precipitación, lo que a su vez implica que el proceso puede ser mejorado en relación con los costos de operación, considerando que la scorodita es un material ampliamente recomendado para la inmovilización de arsénico debido al empleo de relaciones molares bajas para su cristalización. Finalmente, es importante notar que bajo estas condiciones no se observó ninguna limitación por O_2 , obteniéndose concentraciones cercanas a la saturación

(4.25 ppm), debido principalmente a la consideración de que el sistema está continuamente aireado mediante inyección de aire al biorreactor.

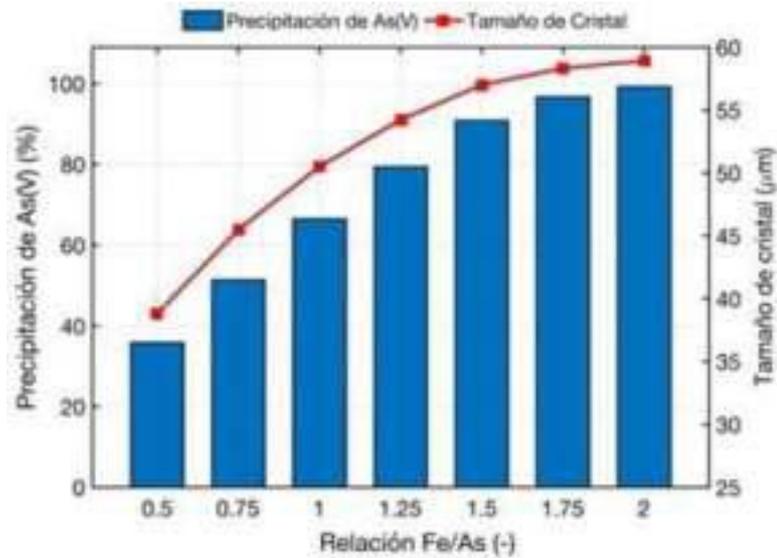


Figura 23. Efecto de la relación molar Fe/As en la precipitación (%) de As(V) y la cristalización de escorodita (μm).

Los reactores en régimen continuo presentan ventajas sobre los procesos en batch, principalmente por la ausencia de tiempos de inactividad, mayores productividades o la flexibilidad operativa, entre otras. El análisis del sistema continuo fue realizado en estado estacionario, empleando la tasa de dilución y la relación molar Fe/As como variables manipulables (parámetros de bifurcación). También se demostró numéricamente si los puntos en estado estacionario son operacionalmente estables mediante el criterio de estabilidad de Lyapunov.

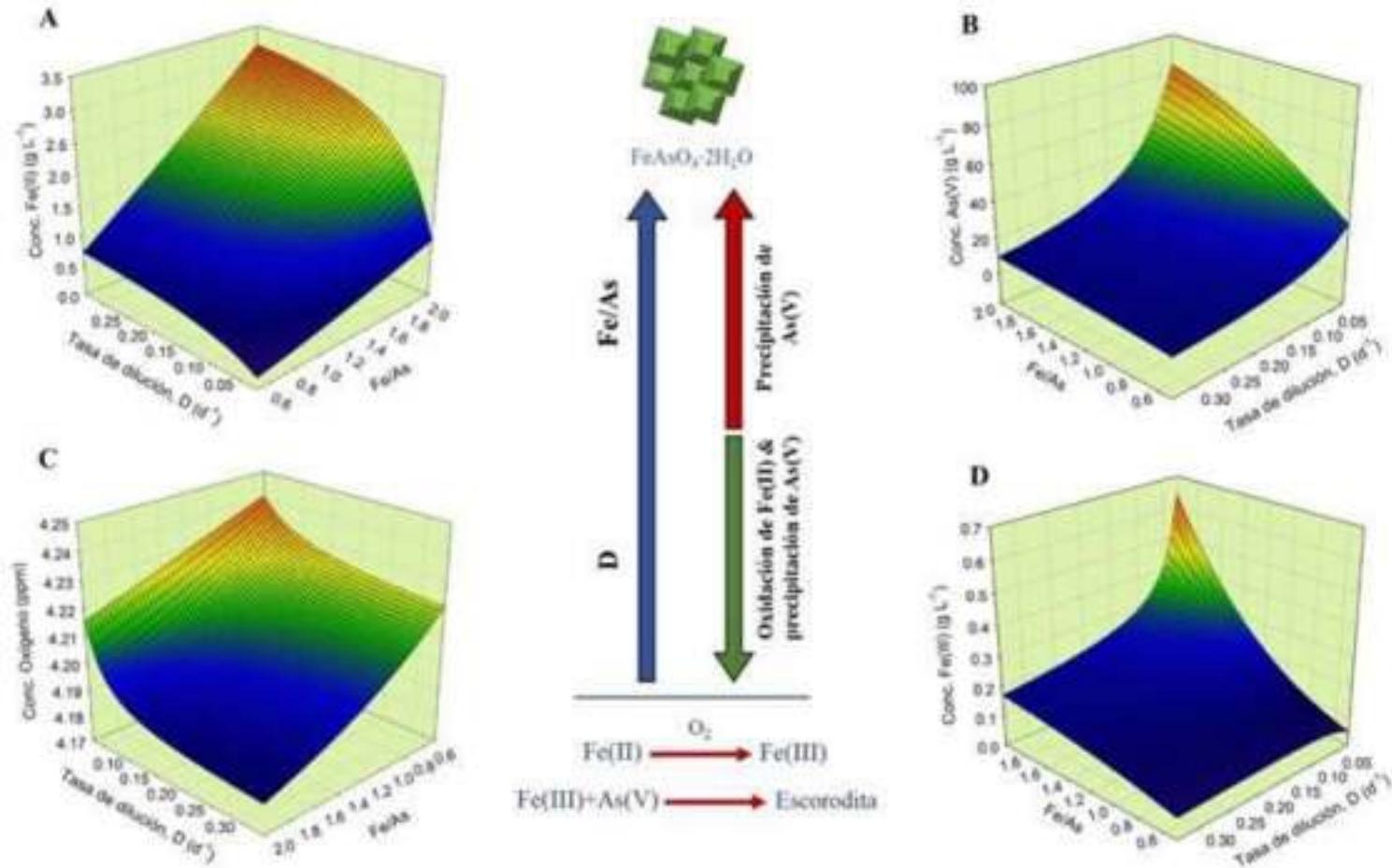


Figura 24. Análisis de bifurcación para el sistema de precipitación continua de As(V). Análisis en estado estacionario de: A) Fe(II), B) Precipitación de As(V), C) Concentración de oxígeno y D) Concentración de Fe(III).

En este análisis se consideró una concentración de inóculo de 1×10^6 células mL^{-1} , la cual fue la utilizada en la validación del modelo matemático. El rango de Fe/As fue de 0.5 a 2, y la tasa de dilución de 0.025 a 0.335 d^{-1} . La tasa de dilución máxima (D_{max}) fue seleccionada con base a la observación de la oxidación de Fe(II), i.e., la D donde la oxidación fuera al menos 10-15%. La evaluación de la tasa de dilución (D , d^{-1}) y la relación Fe/As en la dinámica del proceso se muestra en la **Figura 24**. De manera general, es posible observar que el incremento de la relación molar Fe/As aumenta la precipitación de As(V) como escorodita. Además, el incremento de D disminuye ambos, la oxidación de Fe(II) y la precipitación de As(V). Según nuestros resultados, para lograr altas remociones de As(V) se requiere el empleo de bajas D y Fe/As mayores a 1. Un análisis detallado de la bifurcación con $D=0.1 \text{ d}^{-1}$, sugiere el uso de Fe/As=1.4, donde mayores a este valor solo podría representar un incremento en el gasto operacional debido principalmente al uso de mayores cantidades de Fe(II) para la precipitación. Para Fe/As=1.4 se obtiene una remoción de 30%, mientras que para Fe/As=2 solo aumenta un 7%, con una productividad de Fe(III) de 0.021 y $0.029 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Estas observaciones están de acuerdo con la sugerencia de Okibe et al. (2014), quienes indican que Fe/As=1.4 es el valor óptimo para la cristalización de bioscorodita empleando *Acidianus brierleyi* como microorganismo oxidante. Por otro lado, se puede notar que, en la región evaluada para el análisis de bifurcación, el oxígeno no representa un sustrato limitante en el proceso. Esto está relacionado a la continua aireación del sistema, donde debido a la característica propia de los reactores airlift, existe una adecuada transferencia de masa.

Simulaciones adicionales mostraron que el empleo de una mayor concentración de inóculo mejora significativamente la oxidación, mejorando a su vez la precipitación de As(V), sin observarse tampoco limitación por oxígeno. Sin embargo, es necesario realizar experimentos en el futuro para comprobar estas observaciones numéricas.

Capítulo 6

Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- ‡ La biooxidación de Fe(II) en condiciones extremas es una parte esencial en el proceso de remoción de arsénico como bioscorodita. Para el análisis del proceso se seleccionó el modelo de Andrews para la simulación del proceso ($R^2=0.86$), encontrándose que los parámetros μ_{\max} y las constantes de afinidad e inhibición ($K_{S_{Fe(II)}}$, $K_{i_{Fe(II)}}$ y K_{SO_2}) fueron los parámetros más sensibles del modelo. El modelo cinético permitió la determinación de una región operativa adecuada para el proceso: $D < 0.15 \text{ d}^{-1}$ y $3 < Fe(II)_{in} < 7 \text{ g L}^{-1}$. El empleo de mayores concentraciones no fue recomendable debido a la posible inhibición del crecimiento microbiano por altas concentraciones de Fe(II).
- ‡ La construcción de un modelo matemático validado experimentalmente para los procesos simultáneos de biooxidación de Fe(II)/As(III) por *Acidianus brierleyi*, precipitación de As(V) y cristalización de scorodita, permitió el análisis de factores que controlan la biocinética. Encontrándose que el proceso puede ser mejorado al emplear concentraciones celulares mayores a 1×10^7 células mL^{-1} y empleando una relación molar Fe(II)/As(III)=1.4 como valor óptimo.
- ‡ La construcción de un modelo cinético validado para el proceso THIOTEQ™ Scorodite (oxidación de Fe(II), precipitación de As(V) y cristalización de bioscorodita en un reactor

neumático) permitió analizar el proceso mediante simulación numérica y determinar condiciones óptimas de operación en regímenes batch y continuo. Encontrándose que la inmovilización de As(V) se mejora empleando concentraciones celulares iguales o mayores a 1×10^7 células mL^{-1} y una relación molar Fe/As=1.4. Para el reactor continuo las condiciones óptimas fueron similares, añadiendo el empleo de $D \sim 0.1 \text{ d}^{-1}$.

- ‡ En los sistemas analizados separadamente, se observó que el oxígeno es un sustrato que no limita los procesos de oxidación.

6.2 Recomendaciones

- ‡ Desarrollar modelos cinéticos que consideren el efecto de la temperatura en las constantes cinéticas.
- ‡ Corroborar experimentalmente la dinámica de las condiciones óptimas de operación determinadas mediante simulación numérica en reactores batch y continuo.
- ‡ Evaluar el modelo matemático en diferentes configuraciones de reactor, como el reactor semicontinuo, continuo en serie o flujo pistón.
- ‡ Analizar los sistemas de biorreacción para la remoción de arsénico desde una perspectiva de consumo energético y aspectos económicos.
- ‡ Construir modelos cinéticos para sistemas que empleen materiales que contribuyan al mejoramiento del proceso de oxidación de Fe(II) y precipitación de arsénico, como el uso de carbón activado.

Bibliografía

- Acevedo F. (2000) The use of reactors in biomining processes. *Electron. J. Biotechnol.* 3:184-194.
- AL-Mashhadani M.K.H., Wilkinson S.J., Zimmerman W.B. (2015). Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes. *Chem. Eng. Sci.* 137:243-253.
- Ante A., Bröckl R., Cabezas J.A.S., Schönbrunner S. (2005) Production of marketable gypsum from weak waste acids—saving disposal volume and costs. *World of Metallurgy-ERZMETAL.* 58:75-82.
- ATSDR. (2007) Toxicological Profile for Arsenic, Atlanta, Georgia.
- Bahar M.M., Megharaj M., Naidu R. (2013) Bioremediation of Arsenic-Contaminated Water: Recent Advances and Future Prospects. *Water Air Soil Pollut.* 224:1722.
- Bahrami A., Ghorbani Y., Hosseini M.R., Kazemi F., Abdollahi M., Danesh A. (2019) Combined Effect of Operating Parameters on Separation Efficiency and Kinetics of Copper Flotation. *Mining Metall.* 36: 409-421.
- Bertoldo C., Dock C., Antranikian G. (2004) Thermoacidophilic microorganisms and their novel biocatalysts. *Eng. Life Sci.* 4:521-532.
- Bissen M., Frimmel F.H. (2003) Arsenic—a review. Part I: occurrence, toxicity, speciation, mobility. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31:9-18.
- Chisti Y. (1989) Airlift reactors: current technology. In: Chisti Y. (ed.), *Airlift Bioreactors*. Elsevier, London, pp. 33–86.
- Constales D., Yablonsky G.S., D’hooge D.R., Thybaut J.W., Marin G.B., 2017. *Advanced Data Analysis & Modelling in Chemical Engineering*, 1st ed. Elsevier, Netherlands.
- Cope R. (2017) Metalloids, in: Dalefield R. (Ed), *Veterinary Toxicology for Australia and New Zealand*, Elsevier, pp. 255-277.
- Croicu A.M., Jarrett A.M., Cogan N.G., Hussaini M.Y. (2017). Short-Term antiretroviral treatment recommendations based on sensitivity analysis of a mathematical model for HIV infection of CD4 T cells. *Bull. Math. Biol.* 79: 2649–2671.
- De Klerk R.J., Feldmann T., Daenzer R., Demopoulos G.P. (2015) Continuous circuit coprecipitation of arsenic (V) with ferric iron by lime neutralization: The effect of circuit staging, co-ions and equilibration pH on long- term arsenic retention. *Hydrometallurgy.* 151:42-50.

- De Kock S.H., Barnard P., du Plessis C.A. (2003). Oxygen and carbon dioxide kinetic challenges for thermophilic mineral bioleaching processes. *Biochem. Soc. Trans.* 32:273-275.
- Demirel Y., Gerbaud V. (2019) Using the Second Law: Thermodynamic Analysis. In: Demirel Y., Gerbaud V. (eds), *Nonequilibrium Thermodynamics*. Elsevier, Amsterdam, pp. 187-265.
- Demopoulos G.P., Droppert D.J., van Weert G. (1995) Precipitation of crystalline scorodite ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) from chloride solutions. *Hydrometallurgy*. 38:245–261.
- Dove P. M., Rimstidt J. D. (1985) The solubility and stability of scorodite, $\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *Am. Mineral.* 70:838– 844.
- Duarte A.A.L.S., Cardoso S.J.A., Alçada A.J. (2009) Emerging and Innovative Techniques for Arsenic Removal Applied to a Small Water Supply System. *Sustainability*. 1:1288-1304.
- Esquivel-Rios I., Ramirez-Vargas R., Hernández-Martinez G.R., Vital-Jacome M., Ordaz A., Thalasso F., (2014). A microrespirometric method for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of heterotrophic and autotrophic cultures. *Biochem. Eng. J.* 83:70-78.
- Fadali M.S., Visioli A. (2013) Elements of Nonlinear Digital Control Systems. In: Fadali M.S., Visioli A. (eds), *Digital Control Engineering*. Academic Press, USA, pp. 439-489.
- Figuroa-Estrada J.C., Neria-González M.I., Rodríguez-Vázquez R., Tec-Caamal E.N., Aguilar-López R. (2020). Controlling a continuous stirred tank reactor for zinc leaching. *Min. Eng.* 157:106549.
- Filippou D., Demopoulos G.P. (1997) Arsenic immobilization by controlled scorodite precipitation. *JOM*. 49:52-55.
- Fitzpatrick J. J. (2019) Insights from Mathematical Modelling into Energy Requirement and Process Design of Continuous and Batch Stirred Tank Aerobic Bioreactors. *Chemengineering* 3: 65
- Fujita T., Taguchi R., Abumiya M., Matsumoto M., Shibata E., Nakamura T. (2008). Novel atmospheric scorodite synthesis by oxidation of ferrous sulfate solution. Part I. *Hydrometallurgy*. 90:92-102.
- García-Ríos M., De Windt L., Luquot L., Casiot C. (2020) Modeling of microbial kinetics and mass transfer in bioreactors simulating the natural attenuation of arsenic and iron in acid mine drainage. *J. Hazard. Mater.*, In Press.

- Gonzalez-Contreras P., Weijma J., Buisman C.J.N. (2009) Arsenic immobilization by biological scorodite crystallization: effect of high ferric concentration and foreign seeds. *Adv. Mater. Res.* 71-73:629-632.
- González-Contreras P., Weijma J., van der Weijden R., Buisman C.J.N. (2010) Biogenic scorodite crystallization by *Acidianus sulfidivorans* for arsenic removal. *Environ. Sci. Technol.* 44:675-680.
- González-Contreras P., Weijma J., Buisman C.J.N. (2012) Bioscorodite crystallization in an airlift reactor for arsenic removal. *Cryst. Growth Des.* 12:2699-2706.
- González-Contreras P., Weijma J., Buisman C. J. N. (2012a). Continuous bioscorodite crystallization in CSTRs for arsenic removal and disposal *Water Res.* 18: 5883-5892.
- González-Contreras P., Weijma J., Buisman C. J. N. (2012b) Kinetics of ferrous iron oxidation by batch and continuous cultures of thermoacidophilic Archaea at extremely low pH of 1.1–1.3 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 1295-1303.
- Grund S.C., Hanusch K., Wolf H.U. (2008) Arsenic and Arsenic Compounds. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.*
- Guiyesse B., Quijano G., Munoz R. (2011) Airlift bioreactors. In: M. Moo-Young (ed.) *Comprehensive Biotechnology.* Academic Press, Burlington, pp199–212.
- Gumulya Y., Boxall N.J., Khaleque H.N., Santala V., Carlson R.P., Kaksonen A.H. (2018). In a question for engineering acidophiles for biomining applications: challenges and opportunities. *Genes.* 9:116.
- Hartwig A., MAK Commission. (2016) Arsenic and its inorganic compounds (with the Exception of Arsine) [MAK Value Documentation, Supplement 2014]. The MAK Collection for Occupational Health and Safety, 1:1558–1641.
- Henke, K.R., Hutchison, A.R. (2009) Arsenic Chemistry, Arsenic: Environmental Chemistry, Health Threats, and Waste Treatment (pp. 9-69). Chichester, UK: Wiley.
- Hofmann K., Hammer E., Köhler K., Brüser B. (2001) Oxidation of triphenylarsine to triphenylarsine oxide by *Trichoderma harzianum* and other fungi. *Chemosphere*, 44:697-700.
- Hong Y.S., Song K.H., Chung J.Y. (2014) Health Effects of Chronic Arsenic Exposure. *J. Prev. Med. Public Health.* 47:245-252.
- IARC. (2012) Arsenic, Metals, Fibres and Dusts. *ARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, No. 100C.
- Ilbert M., Bonnefoy V. (2013) Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochim Biophys Acta.* 1827:161–175.

- Jarret A.M., Liu Y., Cogan N.G., Hussaini M.Y. (2014) Global sensitivity analysis used to interpret biological experimental results. *J. Math. Biol.* 71:151-170.
- Jarrett A.M., Liu Y., Cogan N.G., Hussaini M.Y. (2015). Global sensitivity analysis used to interpret biological experimental results. *J. Math. Biol.* 71: 151–170.
- Jia Y.F., Demopoulos G.P., Chen N., Cutler J.N., Jiang D.-T. (2003) Preparation, Characterization and Solubilities of Adsorbed and Co-Precipitated Iron (III)-Arsenate Solids. In: Young C., Alfantazi A., Anderson C., James A., Dreisinger D., Harris B. (eds.) *Electrometallurgy and Environmental Hydrometallurgy*, vol 2. John Wiley & Sons, Inc., NJ.
- Johnson D.B., Kanao T., Hedrich S. (2012) Redox transformations of iron at extremely low pH: fundamental and applied aspects. *Front. Microbiol.* 3:96.
- Kirby C.S., Thomas H.M. Southam G., Donald R. (1999) Relative contributions of abiotic and biological factors in Fe (II) oxidation in mine drainage. *Appl. Geochem.* 14:511.
- Kostrysia A., Papirio S., Mattei M.R., Frunzo L., Lens P.N.L., Esposito G. (2018). Sensitivity analysis for an elemental sulfur-based two-step denitrification model. *Water Sci. Technol.* 78:1296–1303.
- Lièvremont D., Bertin P.N, Lett M.C. (2009) Arsenic in contaminated waters: biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie.* 91:1229-1237.
- Luo L., Liu F., Xu Y., Yuan J. (2011) Hydrodynamics and mass transfer characteristics in an internal loop airlift reactor with different spargers. *Chem. Eng. J.* 175:494-504.
- Mbamba C.K., Batstone D.J., Flores-Alsina X., Tait S. (2015) A generalised chemical precipitation modelling approach in wastewater treatment applied to calcite. *Water. Res.* 68:342-353.
- Melton E.D., Swanner E.D., Behrens S., Schmidt C., Kappler A. (2014) The interplay of microbially mediated and abiotic reactions in the biogeochemical Fe cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 12:797-808.
- Min X.B., Liao Y.P., Chai L.Y., Yang Z.H., Xiong S., Liu L., Li Q.Z., (2015). Removal and stabilization of arsenic from anode slime by forming crystal scorodite. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 25:1298-1306.
- Mineralogy database, 1997. Scorodite Mineral Data. <http://webmineral.com/data/Scorodite.shtml#.XsVRv2hKjIW> (accessed 16 Dic 2020).
- Mullin, J.W., 2001. *Crystallization*, fourth ed. Butterworth-Heinemann, Oxford.

- Muloiwa M., Nyende-Byakika S., Dinka M. (2020) Comparison of unstructured kinetic bacterial growth models. *S. Afr. J. Chem. Eng.* 33:141-150.
- Murwanashyaka T., Shen L., Yang Z., Chang J-S., Manirafasha E., Ndikubwimana T., Chen C., Lu Y. (2020) Kinetic modelling of heterotrophic microalgae culture in wastewater: Storage molecule generation and pollutants mitigation. *Biochem. Eng. J.* 157:107523.
- National Research Council (1977) Committee on Medical and Biological Effects of Environmental Pollutants. Arsenic: Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants. Washington (DC): National Academies Press.
- Naujokas M.F., Anderson B., Ahsan H., Aposhian H.V., Graziano J.H., Thompson C, William A.S. (2013) The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem, *Environ. Health Perspectives.* 121:295–302.
- Nazari A.M., Radzinski R., Ghahreman A. (2017) Review of arsenic metallurgy: Treatment of arsenical minerals and the immobilization of arsenic. *Hydrometallurgy.* 17:258-281.
- Nemati M., Harrison S.T.L. (2000) A comparative study on thermophilic and mesophilic biooxidation of ferrous iron. *Miner. Eng.* 13:19-24.
- Nicomel N.R., Leus K., Folens K., van Der Voort P., Laing G.D. (2016) Technologies for Arsenic Removal from Water: Current Status and Future Perspectives, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 13:62.
- O'Day P.A. (2006) Chemistry and Mineralogy of Arsenic. *Elements*, 2:77-83.
- Okibe N., Koga M., Sasaki K., Hirajima T., Heguri S., Asano S. (2013) Simultaneous oxidation and immobilization of arsenite from refinery waste water by thermoacidophilic iron-oxidizing archaeon, *Acidianus brierleyi*, *Miner. Eng.* 48: 126-134.
- Okibe N., Koga M., Morishita S., Tanaka M., Heguri S., Asano S., Sasaki K., Hirajima T. (2014) Microbial formation of crystalline scorodite for treatment of As(III)-bearing copper refinery process solution using *Acidianus brierleyi*. *Hydrometallurgy.* 143 : 34-41.
- Okibe N., Morishita S., Tanaka M., Sasaki K., Hirajima T., Hatano K., Ohata A. (2017). Bioscorodite crystallization using *Acidianus brierleyi*: Effects caused by Cu(II) present in As(III)-bearing copper refinery wastewaters. *Hydrometallurgy* 168:121-126.
- Ordaz A., Ramirez R., Hernandez-Martinez G.R., Carrión M., Thalasso F.(2019). Characterization of kinetic parameters and mass transfer resistance in an aerobic fixed-bed reactor by in-situ respirometry. *Biochem. Eng. J.* 146: 194-202.

- Owens J.D., Legan J.D. (1987) Determination of the Monod substrate saturation constant for microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:419-432.
- Paktunc D., Dutrizac J., Gertsman V. (2008) Synthesis and phase transformations involving scorodite, ferric arsenate and arsenical ferrihydrite: Implications for arsenic mobility. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 72:2649–2672.
- PAQUES Technology, 2020. THIOTEQ™ Scorodite. <https://en.paques.nl/products/other/thioteqscorodite> (accessed 16 Dic 2020).
- Pesic B., Oliver D.J., Wichlacz P. (1989) An electrochemical method of measuring the oxidation rate of ferrous to ferric iron with oxygen in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Bioeng.* 33:428.
- Pina P.S., Oliveira V.A., Cruz F.L.S., Leão V.A. (2010) Kinetics of ferrous iron oxidation by *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *Biochem. Eng. J.* 51:194-197.
- Plessis C.A.D., Batty J.D., Dew D.W. (2007) Commercial applications of thermophile bioleaching. In Ralings D.E., Johnson B.D. (eds), *Biomining*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Riveros P.A., Dutrizac J.E., Spencer P. (2001) Arsenic Disposal Practices in the metallurgical industry, *Can. Metall. Q.* 40:395-420.
- Roy P., Saha A. (2002) Metabolism and Toxicity of Arsenic: A Human Carcinogen, *Current Science.* 82:38-45.
- Sand W., Gehrke T. (2006) Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Res. Microbiol.* 157:49–56.
- Schwarzenbach R.P., Egli E., Hofstetter T.B., von Gunten U., Wehrli B. (2010) Global Water Pollution and Human Health, *Annu. Rev. Environ. Resour.* 35:109-136.
- Shaji E., Santosh M., Sarath K.V., Prakash P., Deepchand V., Divya B.V. (2020) Arsenic contamination of groundwater: A global synopsis with focus on the Indian Peninsula. *Geosci. Front.* In Press.
- Sheng Y., Kaley B., Bibby K., Grettenberger C., Macalady J.L., Wang G., Burgos W. D., (2017) Bioreactors for low-pH iron(II) oxidation remove considerable amounts of total iron. *RSC Adv.* 7: 35962-35972.
- Tanaka M., Hirajima T., Sasaki K., Okibe N. (2017). Optimization of Bioscorodite Crystallization for Treatment of As(III)-Bearing Wastewaters. *Solid State Phenomena* 262: 555-558.

- Tanaka M., Okibe N. (2018). Factors to Enable Crystallization of Environmentally Stable Bioscorodite from Dilute As(III)-Contaminated Waters. *Minerals*. 8: 23.
- Tec-Caamal E.N., Jiménez-González A., Ramirez-Vargas R., Medina-Moreno S.A., Lizardi-Jiménez M.A. (2018) Hydrodynamic effect of dispersed phase fraction on the mass transfer and uptake rate of hexadecane by an oil-degrading microbial consortium in an airlift bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 130:47-54.
- Tec-Caamal E.N., Rodríguez-Vázquez Torres-Bustillos L.G., Aguilar-López R. (2019) Kinetic analysis via mathematical modeling for ferrous iron oxidation in a class of SBR-type system. *Chin. J. Chem. Eng.* 27:2472-2480.
- Thewlis, J., 1973. Concise dictionary of physics. Pergamon Press, Oxford, p. 248.
- Vanlier J., Tiemann C.A, Hilbers P.A.J., van Riel N.A.W. (2013). Parameter uncertainty in biochemical models described by ordinary differential equations. *Mathematical Biosciences* 246:305–314.
- Vanlier J., Tiemann C.A., Hilbers P.A.J., van Riel N.A.W. (2013) Parameter uncertainty in biochemical models described by ordinary differential equations. *Math. Biosci.* 246:305-314.
- Vega-Hernández S., Weijma J., Buisman C.J.N. (2019). Immobilization of arsenic as scorodite by a thermoacidophilic mixed culture via As(III)-catalyzed oxidation with activated carbon. *J. Hazard. Mater.* 368:221-227.
- Velázquez-Sánchez H.I., Montes-Horcasitas M.C., Aguilar-López R. (2014) Development of a phenomenological kinetic model for butanol production using *Clostridium beijerinckii*. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 13:103-112.
- WHO. (2001) Arsenic and Arsenic Compounds (Environmental Health Criteria 224), 2nd ed. Geneva: World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.
- WHO. (2011) Arsenic in drinking-water, Background document for development of WHO guidelines for drinking water quality, Geneva.
- WHO. (2017) Guidelines for drinking-water quality, fourth edition incorporating the first addendum, Geneva.
- WHO. (2019) Preventing disease through healthy environments: exposure to arsenic: a major public health concern.

Lista de publicaciones

Artículos:

1. Observer-based control for uncertain nonlinear systems applied to continuous biochemical reactors. *Mathematical Problems in Engineering*. Publicado.
2. Controlling a continuous stirred tank reactor for zinc leaching. *Minerals Engineering*. Publicado.
3. Kinetic analysis of arsenic and iron oxidation by *Acidianus brierleyi* for biogenic scorodite formation. *Chemical Papers*. Publicado.
4. Kinetic analysis *via* mathematical modeling for ferrous iron oxidation in a class of SBR-type system. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. Publicado.

Capítulos de libro:

1. Mycoremediation through redox mechanisms of organic and inorganic pollutants. *Springer-Nature*. En Prensa.
2. Experimental and mathematical modeling of plasmid DNA production by *Escherichia coli* DH5 α . Nova Science Publishers. Sometido.
3. Mathematical modelling of the closed-loop performance of a continuous bioreactor under a feedback polynomial-type controller. Nova Science Publishers. Sometido.
4. Dynamical optimal control for a class of nonlinear system. Nova Science Publishers. Submitted. Sometido.

Anexos



Kinetic analysis of arsenic and iron oxidation by *Acidianus brierleyi* for biogenic scorodite formation

Edgar N. Tec-Caamal¹ · Refugio Rodríguez-Vázquez¹ · Ricardo Aguilar-López¹

Received: 1 June 2018 / Accepted: 23 November 2018 / Published online: 28 November 2018
© Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences 2018

Abstract

The contamination of arsenic from natural processes and anthropogenic activities represents a global concern; therefore, the study of arsenic transformation is an important research topic. This work proposes a simple phenomenological kinetic model that describes the removal of arsenic by means of the crystallisation of scorodite using an extremophile archaeon (*Acidianus brierleyi*), considering the chemical reaction network to propose the corresponding mass balances. To determine the satisfactory predictive capacity of the kinetic model structure and the usefulness of the parametric identification, two additional experimental campaigns of the formation of bioscorodite performed in shaking flasks with initial As(III) concentrations of (mM): 4.3–13 and Fe(II) concentrations of (mM): 6–18 were tested. Furthermore, a parametric sensitivity analysis was performed to determine points of special importance related to analytical techniques, to improve the precision of the results that can be used for further in silico studies. Statistical results suggest that the proposed model showed an acceptable fit for all tested conditions.

Keywords Arsenic removal · Bioscorodite · Kinetic analysis · *Acidianus brierleyi* · Parametric sensitivity analysis

Introduction

In the environment, arsenic (As) is found in organic and inorganic compounds, predominantly with the oxidation states of As³⁺ (arsenite) and As⁵⁺ (arsenate), with arsenite being more toxic than the latter (Henke 2009). These compounds can be released into the environment in natural ways, such as via volcanic emissions and forest fires, and via anthropogenic mechanisms, such as pesticide application, metal melting and mining activities (Tchounwou et al. 1999; Leist et al. 2000). In the metallurgical industry, arsenic-rich dust may contain about 76% arsenite (As₂O₃). Also, due to the low investment in technology for arsenic recovery, concerns arise (Kuan et al. 2004). Nevertheless, several technologies have been developed for the removal of arsenic, such as adsorption, coagulation–flocculation, ion exchange, reverse osmosis or ultrafiltration (Kuan et al. 2004; Eljamal et al.

2013). However, most of these methods are useful only when the arsenic concentration is low (i.e. ppb levels) and could be dependent on pH and the presence of other ions (Nicomel et al. 2016). One of the safest methods for the removal and storage of arsenic is the induced crystallisation of scorodite (useful for As levels of mg L⁻¹), due to its low solubility and high stability (Gonzalez-Contreras et al. 2010). Scorodite (FeAsO₄ · 2H₂O) is a naturally occurring arsenic mineral, often found as a secondary supergene mineral formed from arsenic-bearing primary minerals (Salzsauler et al. 2005). This process may be carried out by means of chemical or biological oxidation, with the first being a procedure performed under high temperature (80–150 °C) and low pH (≥ 2) conditions (Gonzalez-Contreras et al. 2010; Okibe et al. 2014; Filippou and Demopoulos 1997); this may use strong oxidants such as hydrogen peroxide, pure oxygen, chlorine and ozone (Nicomel et al. 2016; Fujita et al. 2008) as a previous step for the oxidation of ferrous iron and arsenite to scorodite reactants (arsenate and ferric iron) (Hug and Leupin 2003; Okibe et al. 2014; Gonzalez-Contreras et al. 2010). A biotechnological approach is the use of microorganisms that are capable of oxidising arsenite to arsenate and ferrous iron to ferric iron under extremophile conditions that lead to the formation of biogenic scorodite in the presence or

✉ Ricardo Aguilar-López
raguilar@cinvestav.mx

¹ Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, C.P. 07360 Mexico City, Mexico



Article

Kinetic analysis *via* mathematical modeling for ferrous iron oxidation in a class of SBR-type systemEdgar N. Tec-Caamal¹, Refugio Rodríguez-Vázquez¹, Luis G. Torres-Bustillos², Ricardo Aguilar-López^{1,*}¹ Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, C.P. 07360 Ciudad de México D.F., Mexico² Interdisciplinary Professional Unit of Biotechnology-National Polytechnic Institute (UPIBI-IPN), Acueducto s/n, La Laguna Ticomán, Gustavo A. Madero, 07340, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2018

Received in revised form 24 April 2019

Accepted 24 April 2019

Available online 4 May 2019

Keywords:

Bifurcation analysis

Hydrogen peroxide

Iron oxidation

Modeling

Simulation

ABSTRACT

This paper analyses the oxidation of ferrous iron *via* chemical and biological means in a class of Sequential Batch Reactors (SBR-type). For this, a kinetic model for the study of iron oxidation system is proposed, followed by a parametric sensitivity analysis and a bifurcation analysis, which allow selecting the most influential kinetic parameters in order to ensure a suitable prediction capacity of the mathematical structure. The system consists of two SBR bioreactors, the first being used to produce hydrogen peroxide (H₂O₂) that is fed to a second reactor where the iron oxidation is carried out by chemical–biological processes. Model predictions were compared with experimental data for the production of H₂O₂ and for ferrous iron oxidation, finding suitable correlation coefficients ($r^2 > 0.98$) for each state variable. The bifurcation analysis showed the trajectories of the main variables, such as, biomass, H₂O₂ and ferrous iron, under the change of the most influential kinetic parameters. This analysis demonstrates the usefulness of the constructed model to predict the kinetic behaviour of the SBR-type process.

© 2019 The Chemical Industry and Engineering Society of China, and Chemical Industry Press Co., Ltd.

All rights reserved.

1. Introduction

The production of hydrogen peroxide and the oxidation of ferrous iron by bacteria are well-known in the literature [1,2]. As a coupled process they can present interesting properties [3,4]. The importance of the first one is based on the high oxidizing strength of H₂O₂ (0.695 V), which oxidizes a wide range of pollutants of environmental concern. The interest of the latter is due to the modification of the oxidation state of Fe²⁺ since this property facilitates its removal by physicochemical techniques, or its immobilization by joining it to other compounds such as sulfur or arsenic by biological processes [5,6]. On the one hand, bacterial species of *Lactobacillus* are known to be suitable producers of H₂O₂ [7] and have been cultivated in aerated bioreactors using a wide range of carbon sources [2,8]. Although lactic acid bacteria could be cultivated under aerobic conditions, this does not imply that oxygen is used in its energetic metabolism, but it can affect its physiology, by inducing an oxidative stress that seems to be key to obtaining an overproduction of H₂O₂, since the oxidative enzymes (such as pyruvate-oxidase or NADH-oxidase) of these microorganisms reduce oxygen, probably due to a detoxification mechanism [7,8]. On the other hand, the oxidation of ferrous iron carried out using chemical and biological methods simultaneously have presented an interesting performance in bioreactors [3,9]. For instance, in the iron oxidation realized by

H₂O₂ and bacteria in the same container, the microorganisms act as a catalyzer since the oxidation of ferrous iron under acidic conditions is slow, moreover the use of high concentrations of H₂O₂ (low molar ratios of Fe²⁺/H₂O₂ between 0.33 and 33) may lead to an oxidative stress/damage to the microorganism [10]. Bacterial species of the genera *Acidithiobacillus*, *Thiobacillus*, *Sulfolobus*, among others, are reported to be iron-oxidizing microorganisms, which can carry out several redox reactions to transform ferrous iron into ferric iron, which in turn may be delivered from the cell to the aqueous medium to avoid precipitation [1].

Computational modeling of bioprocesses is a useful tool that aims to develop predictive and explanatory models for describing complex systems [11], which in many cases vary under different conditions. This requires the construction of a mathematical structure that considers the phenomenology of the case study as much as possible, since the complexity of describing metabolic pathways as well as measurements *in vitro* may lead to inaccuracies [12,13]. Once a model has predicted the behaviour of the experimental data, it can proceed to realize further analyses to improve the certainty and confidence of the model predictions, which commonly includes identifiability, uncertainty quantification, and sensitivity analysis [11]. The last one is performed using a local or global sensitivity analysis, which consists of perturbing one or more parameters and comparing the simulations with a reference output [14].

A bifurcation of a dynamical system of the form $\dot{x} = f(x, \omega)$, $x \in R^n$, $\omega \in R^k$, takes place when one or more of these parameters (ω) change.

* Corresponding author.

E-mail address: raguilar@cinvestav.mx (R. Aguilar-López).



Controlling a continuous stirred tank reactor for zinc leaching

J.C. Figueroa-Estrada^a, M.I. Neria-González^b, R. Rodríguez Vázquez^a, E.N. Tec-Caamal^a,
R. Aguilar-López^{a,*}

^a Department of Biotechnology and Bioengineering, CINVESTAV-IPN, San Pedro Zacatenco, Mexico City, Mexico

^b Chemical and Biochemical Engineering Division, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Ecatepec, Edo. de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Smooth STSM controller
Continuous chemical reactor
Zinc leaching
Oxidation

ABSTRACT

This work focuses on the open-loop and closed-loop analysis of a continuous stirred tank reactor for zinc leaching from sphalerite (ZnS) via modeling and simulation approaches. The corresponding process analysis is based on a multi-input multi-output, approach by considering the inlet flows of minerals, acid solution, and aeration as process inputs and dissolved oxygen, ZnS concentrations, and pH as process outputs. An analysis of the relative gain array matrix was performed to determine the best control input pairs. In addition, a bifurcation analysis was carried out considering the process inputs as bifurcation parameters to show adequate operating regions. A local stability analysis of the selected equilibrium points in the chemical reactor under the previously selected operating conditions is presented, employing an eigenvalue analysis. Finally, a class of smooth super twisting sliding-mode controller is proposed to regulate the corresponding dissolved oxygen and pH in the reactor, which leads to increased sphalerite leaching; its performance was compared with a standard super twisting sliding-mode controller. The controllability of the reactor was analyzed via the dynamic behavior of the uncontrolled variables (zero dynamics). Numerical experiments show the satisfactory performance of the proposed controller under the selected operating conditions.

1. Introduction

Chemical reactors are process equipment with highly non-linear behavior due to the complex nature of the reactions. Therefore, the basic aspects of operation are complicated, such as selecting the input/output pairs, the local control capacity characteristics, the stability of the open and closed-loop operation, and the selection of regions of operation. For this reason, it is important to use optimization and/or control strategies that allow improving the process performance. Unfortunately, whole operation analyses for leaching systems are not frequent in the open literature. There are tools that can help improve the design and operation of reactors. The relative gain matrix (RGA) is an analysis that allows obtaining parameters to select the best input/output pairs (Jain and Babu, 2015; Valverde-Pérez et al., 2016; Yin and Liu, 2017). Bifurcation analysis allows the identification of possible operating regions with high performance, determining the responses of variables at steady-state under selected variations of some parameter (Velázquez-Sánchez et al., 2019; Velázquez-Sánchez and Aguilar-López, 2018). In addition, for control purposes, the local stability of the operating regions can be determined through the analysis of their eigenvalues (Lyapunov's first method). The objective and control strategies

are oriented to reach and maintain the mass concentrations of the selected chemical species at the reactor outlet conditions by manipulating some reactor control input (Liu and Granata, 2018; Zhou et al., 2018). The regulation tasks for chemical reactors have been achieved with linear PID, predictive, adaptive, fuzzy, neural, and I/O linearizing controllers, among others that have been successful in the design and application of state feedback controllers (Ali Reza and Mehdi, 2017; Flores-Hernández et al., 2018).

In particular, the named sliding-mode systems are designed to bring the process states onto a specific and stable surface in the state space, named sliding surface (SS). When the process reaches the SS, the sliding mode control keeps the states on the neighborhood of the SS. The standard design of the sliding mode control has two main steps. The first step is related with the design of a SS so that the sliding motion satisfies design specifications. The second is concerned with the selection of a discontinuous control law that will make the switching surface attractive to the system state in finite time (Kravaris and Savoglidis, 2012; Musmade and Patre, 2015; Zhao et al., 2015). There are two main advantages of sliding mode control. First is that the dynamic behavior of the system may be tailored by the particular choice of the sliding function. Secondly, the closed loop response becomes totally insensitive

* Corresponding author.

E-mail address: raguilar@cinvestav.mx (R. Aguilar-López).

Research Article

Observer-Based Control for Uncertain Nonlinear Systems Applied to Continuous Biochemical Reactors

Ricardo Aguilar-López ¹, Edgar N. Tec-Caamal ¹ and M. Isabel Neria-González ²

¹Department of Biotechnology and Bioengineering,
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico, Ciudad de México,
C.P. 07360, Mexico

²Chemical and Biochemical Engineering Division, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Ecatepec de Morelos,
Estado de México, C.P. 55210, Mexico

Correspondence should be addressed to Ricardo Aguilar-López; raguilar@cinvestav.mx

Received 18 December 2019; Revised 7 July 2020; Accepted 14 July 2020; Published 30 July 2020

Academic Editor: Marco Spadini

Copyright © 2020 Ricardo Aguilar-López et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The purpose of this paper is to present an observer-based control design with application to continuous bioreactors. For this purpose, phenomenological bioreactor models were represented by identified linear models plus unknown modelling error terms. Therefore, an uncertainty-based observer with a polynomial structure capable of estimating the unknown modelling error of the reactor representation is coupled to a linear input-output controller. The proposed methodology was evaluated in a sulphate reduction bioprocess and an acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation process for butanol (biofuel) production, under continuous regimes. Experimentally validated mathematical models were considered for this purpose. A theoretical framework is presented to demonstrate the corresponding closed-loop stability of the systems, and numerical simulations were carried out to corroborate the satisfactory performance of the proposed methodology.

1. Introduction

Biochemical reactors (BRs) are important process equipment in the transformation industry, which are currently employed in biomedical, food, fuel, and waste industries with great success [1–3]. However, despite the great progress of bioprocess engineering, several operating problems persist due to the high complex behaviour of these types of systems. From the above, processes design, operation analysis, optimization, and process control are important research issues, which can help to assure satisfactory performance of the bioreactor behaviour. Nonlinear behaviour is inherent in BR, where the state multiplicity, instabilities, and multiplicity of input, among others, make the operation of this process equipment a real challenge for process engineers [4–6]. This situation has led to intensive research in nonlinear dynamic analysis and consequently to the design of well performing nonlinear control techniques, such as

predictive control, adaptive control, sliding-mode control, and neural control, among others [7–9]. The proposal of nonlinear control techniques has been very important to study the closed-loop response of BR under a theoretical framework, but unfortunately the complexity of these techniques makes difficult the real-time implementation for industrial plants. However, despite the aforementioned problems, BRs are generally controlled employing linear control designs. Among these, proportional-integral (PI) and proportional-integral-derivative (PID) controllers are widely accepted for industrial applications due to their ability to compensate most practical industrial processes. In addition, some robustness properties can be achieved with an adequate choice of controller gains [10, 11]. In particular, these controllers perform well for processes with benign dynamics and modest performance requirements [12]. From the above, it is important to consider the practical importance of developing a robust controller design to achieve

Chapter 3

**DYNAMIC OPTIMAL CONTROL FOR
A CLASS OF NONLINEAR SYSTEM**

Ricardo Aguilar-López^{1,}, PhD,
Edgar N. Tec-Caamal¹
and Juan L. Mata-Machuca², PhD*

¹Department of Biotechnology and Bioengineering, CINVESTAV-IPN,
Mexico City, Mexico

²Department of Advanced Technologies, Instituto Politécnico Nacional,
Mexico City, Mexico

ABSTRACT

Nowadays, the application of control approaches to complex process is an important issue in the industry, since those systems are sensible to external perturbations or forces that can modify their dynamic behavior. To deal with some regulation tasks in reactor engineering processes, in this work, a Lagrangian expression based on the state equation of a class of nonlinear system is proposed to develop the corresponding functional. From this, a control law is developed, and by employing the classical Euler-Lagrange approach the operation of the system was led to a critical

* Corresponding Author's Email: raguilar@cinvestav.mx.