



Facultad de Química

Departamento de Ingeniería Química

TESIS DOCTORAL

# BIOOXIDACIÓN DE TIOSALES CON MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS



Doctorando

**Cristina Montes Rosúa**

Director/Tutor

**Francisco Carranza Mora**

Director

**Alfonso Mazuelos Rojas**

Sevilla, 2017

# Índice

1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	8
2.1. Generación y química de las tiosales.....	8
2.1.1. Ion tiosulfato.....	12
2.1.1.1. Oxidación con I <sub>2</sub> .....	12
2.1.1.2. Escisión del enlace s-s con HgCl <sub>2</sub> .....	13
2.1.1.3. Dismutación en medio ácido.....	13
2.1.1.4. Oxidación en presencia de Cu (II).....	15
2.1.1.5. Reacciones con otras tiosales.....	18
2.1.1.6. Oxidación con Fe <sup>3+</sup> .....	18
2.1.2. Ion tetrionato.....	19
2.1.2.1. Oxidación con I <sub>2</sub> .....	19
2.1.2.2. El ion tetrionato en medio ácido y básico.....	19
2.1.2.3. El ion tetrionato y el ion férrico.....	20
2.1.2.4. El ion tetrionato en presencia de otras tiosales.....	20
2.1.2.5. Oxidación con aire catalizada con Cu (II).....	21
2.1.2.6. Reacciones con radicales OH <sup>*</sup> .....	21
2.1.2.7. El HgCl <sub>2</sub> como oxidante, base de técnicas analíticas.....	22
2.1.3. Ion tritonato.....	22
2.1.3.1. El ion tritonato en medio ácido y básico.....	22
2.1.3.2. Tiosales en presencia de Cu (II).....	23
2.2. Métodos instrumentales de análisis de tiosales.....	23
2.2.1. Análisis cromatográfico. Cromatografía iónica y cromatografía líquida.....	23
2.2.2. Análisis espectrofotométrico.....	25
2.2.3. Análisis electroforético.....	26

2.3. Tecnología para el tratamiento de tiosales.....	27
2.3.1. Proceso de neutralización con cal.....	28
2.3.2. Oxidación biológica.....	29
2.3.3. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /sulfato férrico.....	30
2.3.4. Degradación natural.....	30
2.3.5. Oxidación electroquímica.....	31
2.4. Catálisis biológica.....	32
2.4.1. Catálisis enzimática.....	32
2.4.1.1. Enzimas del metabolismo de tiosales.....	32
2.4.1.2. Mecanismos enzimáticos para la oxidación del ion tiosulfato.....	33
2.4.1.3. Mecanismos enzimáticos para la oxidación del ion tetrionato.....	34
2.4.2. Catalisis microbiana.....	35
2.4.2.1. El género <i>Acidithiobacillus</i> .....	35
2.4.3. Biooxidación microbiológica del ion tiosulfato.....	37
2.4.4. Biooxidación microbiológica del ion tetrionato.....	40
2.5. Influencia de la temperatura.....	42
2.6. Biorreactores.....	45
2.6.1. Biorreactor continuo.....	46
2.6.2. Biorreactor con células soportadas.....	46
2.6.3. Biorreactor de lecho fijo inundado.....	50
2.6.4. Aireación.....	52
3. Materiales y métodos.....	54
3.1. Métodos analíticos.....	54
3.1.1. Determinación de tiosulfato y sulfito por yodometría.....	54
3.1.2. Determinación de tiosales totales mediante el método descrito por Makhija y Hitchen, 1978. ....	55
3.1.3. Determinación de la concentración de tiosales mediante cromatografía iónica.....	56
3.1.4. Determinación de pH, conductividad y concentración de	

metales.....	57
3.2. Origen, obtención y adaptación de cepas bacterianas.....	57
3.2.1. El cultivo FNN-9K.....	57
3.2.2. Cultivos autóctonos presentes en las aguas reales. las cepas DPS o DP2.....	58
3.2.3. Medios de crecimiento.....	58
3.3. Identificación de cepas bacterianas.....	59
3.4. Cinética del crecimiento en discontinuo. Metodología y plan de experiencias. ....	61
3.5. Relación de la medida de conductividad con la concentración de politionatos.....	63
3.5.1. Ensayos con disoluciones sintéticas.....	64
3.5.2. Ensayos con cultivos.....	64
3.5.3. Tratamiento estadístico.....	65
3.6. Efecto de la temperatura.....	65
3.6.1. Cepa.....	66
3.6.2. Estudio del efecto de la temperatura sobre la biooxidación discontinua de tiosales.....	67
3.7. Formación de biopelículas sobre diferentes soportes.....	68
3.8. Eliminación de tiosulfato en presencia de ácido y cobre.....	71
3.9. Ensayos para el establecimiento de una hipótesis de cambio metabólico.....	71
3.9.1. Experimentación.....	72
3.9.2. Detección de azufre elemental.....	73
3.10. Biorreactores.....	73
3.10.1. Descripción del dispositivo experimental en continuo .....	73
3.10.2. Caracterización del reactor.....	74
3.10.3. Soporte para las biopelículas .....	76
3.10.4. Lavado del material soporte .....	77
3.10.5. Carga de biorreactores .....	78
3.10.6. Análisis.....	79
3.10.7. Ensayo de distribución del tiempo medio de residencia, DTR.....	79

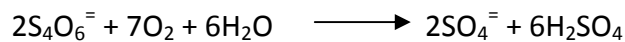
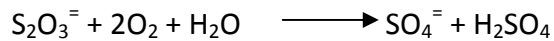
3.10.8. Corte de aire en el reactor.....	84
3.10.9. Recuperación tras el corte en el suministro de aire.....	84
4. Resultados.....	85
4.1. Caracterización de las aguas reales de planta.....	85
4.2. Obtención de cepas bacterianas.....	86
4.2.1. Cepas autóctonas obtenidas a partir de aguas reales de planta: el cultivo DPS.....	88
4.2.1.1. Concentración de cepas autóctonas.....	92
4.2.2. Cepas obtenidas por adaptación del cultivo propio FNN-9k: el cultivo FNN. ....	94
4.2.2.1. Concentración del cultivo FNN.....	98
4.3. Ensayos de bio-oxidación de tiosales en discontinuo.....	101
4.3.1. Biooxidación de tetrionato.....	101
4.3.2. Biooxidación de tiosulfato.....	107
4.4. Relación de la medida de conductividad con la concentración de politionatos.....	114
4.4.1. Relación entre conductividad y concentración de politionatos totales en soluciones ácidas sintéticas.....	115
4.4.2. Relación entre conductividad y concentración de politionatos en la biooxidación de efluentes reales.....	118
4.4.3. Evaluación de la medida continua de conductividad para monitorizar la degradación de politionatos. Método de conductividad vs. método de Makhija.....	121
4.5. Efecto de la temperatura.....	125
4.5.1. Relación de la concentración de tetrionato con la conductividad total del sistema a distintas temperaturas.....	125
4.5.2. Degradación de tetrionato a diferentes temperaturas.....	128
4.5.3. Cálculo de la energía de activación.....	131
4.5.4. Cálculo de la temperatura óptima a través del coeficiente de temperatura $Q_{10}$ .....	132
4.5.5. Aplicación de la ecuación de Ratkowsky a los datos de bio-oxidación.....	133
4.6. Formación de biopelículas sobre diferentes soportes.....	137
4.7. Primeros ensayos de biooxidación en continuo en biorreactor de	

película bacteriana soportada. Biorreactor 1.....	141
4.7.1. Campaña 1.....	142
4.7.2. Campaña 2.....	144
4.8. Biooxidación discontinua de mezclas de politionatos y tiosulfato.....	145
4.9. Eliminación de tiosulfato en presencia de Cu(II) y ácido.....	157
4.9.1. Eliminación de tiosulfato en medio ácido en disoluciones sintéticas simples de 1 g/L.....	158
4.9.2. Eliminación de tiosulfato en medio ácido en disoluciones sintéticas mixtas de 1 g/l de tiosulfato y 4 g/l de tetrionato.....	165
4.9.3. Eliminación de tiosulfato en aguas de planta, DP1.....	171
4.9.4. Consideraciones finales sobre la eliminación de tiosulfato.....	178
4.10. Ensayos en continuo en reactores de diferente tamaño y material soporte.....	179
4.10.1. Biorreactor 2. Espuma de poliuretano.....	179
4.10.2. Biorreactor 3. Espuma de poliuretano y 2 m de altura.....	184
4.10.2.1. Distribución de tiempo de residencia (DTR).....	184
4.10.2.2. Operación en continuo con DP1.....	186
4.10.2.3. Operación en continuo con DPS.....	188
4.11. El efecto de la limpieza y recuperación del Biorreactor 3.....	190
4.12. El efecto de la supresión de la alimentación de aire.....	191
4.13. Ensayos para el establecimiento de un mecanismo de cambio metabólico.....	194
4.13.1. Hipótesis del cambio metabólico.....	194
4.13.2. Confirmación experimental.....	196
5. Conclusiones.....	199
6. Bibliografía.....	202
7. Tablas y figuras.....	223



## 1. Resumen y objetivos.

Las tiosales son compuestos químicos presentes en los licores de proceso en plantas para la concentración de menas de sulfuros metálicos por molienda y flotación. Las condiciones de alcalinidad empleadas y los reactivos añadidos favorecen la conversión parcial de los sulfuros en tiosales. La acumulación de estas tiosales en los circuitos de la planta generan problemas de carácter técnico y medioambiental a partir de ciertas concentraciones ya que son especies metaestables que se oxidan finalmente para formar ácido sulfúrico mediante complejas reacciones en serie que, de forma simplificada, pueden representarse para las principales especies, tiosulfato y tetratiónato, por:



Estas sustancias en sí mismas no son consideradas sustancias tóxicas, pero tras su vertido a cauce público, pueden tener un impacto indirecto sobre el medio ambiente: las tiosales reaccionan con el oxígeno del aire, oxidándose, y generando ácido sulfúrico como producto final. Los efectos son disminución del pH y de la concentración de oxígeno disuelto en el cuerpo receptor, afectando al equilibrio químico y biológico de ríos y lagos.

La bibliografía recoge una amplia variedad de propuestas para realizar la mencionada oxidación utilizando procedimientos basados en métodos fotolíticos directos e indirectos; irradiación ultrasónica; adsorción sobre hidróxidos de hierro; empleo de agentes oxidantes diversos como ozono, oxígeno, agua oxigenada, mezcla  $\text{SO}_2$  – aire,  $\text{Fe(III)}$  –  $\text{O}_2$ , etc. La mayoría de ellas no pasan de ser meras propuestas académicas con escasa viabilidad, incluso técnica.



La oxidación con agua oxigenada es una de las opciones más atractivas por sus grandes ventajas desde el punto de vista técnico: suaves condiciones de operación, rápida cinética, elevada eficacia de oxidación y no incorpora sustancias extrañas al medio que necesiten ser eliminadas posteriormente. Los inconvenientes de este reactivo son el elevado precio, su escasa disponibilidad y su peligrosidad como fuerte oxidante en contacto con materiales orgánicos, catalizadores o impurezas.

En el medio natural, las reacciones que conducen a la oxidación de las tiosales se realizan con oxígeno aportado desde el aire, si bien estas reacciones suelen estar catalizadas por microorganismos extremófilos entre los que ocupan posición destacada algunas especies del género *Acidithiobacillus*. La utilización adecuada de este fenómeno catalítico podría dar lugar a un método de tratamiento, denominado biooxidación, con todas las ventajas descritas para el agua oxigenada y sin su costoso inconveniente. Existe una gran variedad de microorganismos con habilidad sulfooxidante para participar en el ciclo del azufre. En este estudio, se utilizará una cepa de *Acidithiobacillus thiooxidans*, la cual se adaptará para su crecimiento en tetrationato y tiosulfato principalmente, compuestos mayoritarios en las aguas reales de procesos.

El objetivo de esta tesis doctoral es el de evaluar las posibilidades de desarrollo de una tecnología para tratar la eliminación bacteriana de tiosales en aguas conteniendo unos 4 g/L de politionatos totales y 0,5 g/L de tiosulfato a través de la consecución de los siguientes objetivos parciales:

- Disponer de cultivos bacterianos activos para la utilización de tiosales como sustratos energéticos.
- Estudiar la cinética de crecimiento bacteriano en discontinuo.
- Estudiar variables sensibles para el diseño como la temperatura, composición de la alimentación y materiales de soporte para la biomasa.

- Estudiar los mecanismos de reacción implicados en la oxidación de tetrionato y tiosulfato, en presencia y ausencia de oxígeno.
- Analizar las posibles dificultades para el desarrollo de la tecnología. Proponer y aplicar soluciones.
- Diseñar una metodología para la monitorización en línea de la concentración de tiosales.
- Ensayar la operación de biooxidación en continuo.

La metodología aplicada y los resultados obtenidos han permitido demostrar que es posible la operación eficiente, en continuo y en estado estacionario de biorreactores conteniendo tiosales provenientes de aguas industriales, eliminando su carácter contaminante intrínseco asociado a la generación de ácido por oxidación en condiciones atmosféricas.

## 2. Introducción.

### 2.1. Generación y química de las tiosales.

El azufre es el segundo elemento del grupo VI de la tabla periódica. La disponibilidad de orbitales “d” para formar enlaces le confiere estados de oxidación en un rango que va de -2 (sulfuro) hasta +6 (sulfato), siendo los valores intermedios más comunes 0 (azufre elemental) y +4 (sulfito). La multiplicidad de estados de oxidación del azufre y la posibilidad de concatenidad en el enlace S-S, da lugar a una gama de oxianiones mucho más variada que para otros elementos. Los más representativos son: sulfato  $\text{SO}_4^{2-}$ , sulfito  $\text{SO}_3^{2-}$ , tiosulfato  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , tritionato  $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$  ( $^-\text{O}_3\text{S-S-SO}_3^-$ ) y tetracionato  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  ( $^-\text{O}_3\text{S-S-S-SO}_3^-$ ).

En el ión sulfato, el azufre presenta el máximo estado de oxidación, +6, y en el ión sulfito, +4. El ión tiosulfato tiene dos átomos de azufre y sus propiedades sugieren una posible combinación de azufre (0) con sulfito (+4), ó sulfuro (-2) con trióxido de azufre (+6), con un estado de oxidación efectiva de +2 por átomo de azufre. El resto de oxianiones tienen un número n de átomos de azufre y sus propiedades sugieren que los unidos sólo a átomos de azufre tienen valencia -2 y los unidos también al oxígeno tienen valencia +6.

Otros oxianiones del S son: ditionato  $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$  (valencia +5 para el S), disulfito  $\text{S}_4\text{O}_5^{2-}$  (valencia +4 para el S), ditionito  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$  (valencia +3 para el S).

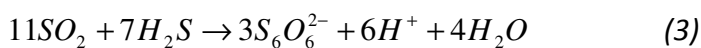
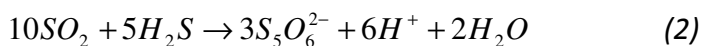
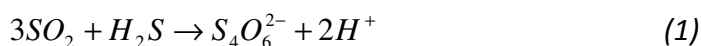
Las sales de los oxioaniones formulados anteriormente distintos al ión sulfato se conocen como tiosales. Así, se puede definir el término tiosal como aquella sal de un oxianión de S que es producto intermedio en la oxidación del ión sulfuro a ión sulfato. Se completa esta definición aclarando que, con excepción del ión sulfito, estos oxianiones presentan más de un átomo de S, pudiendo ser el estado de oxidación para este elemento en ellos distinto de +4 y +6. Entre los oxianiones que cumplen estas condiciones están los politionatos. Los politionatos pueden ser representados a través de la fórmula empírica general:  $\text{S}_n\text{O}_6^{2-}$  ( $^-\text{O}_3\text{S-S}_{n-2}\text{-SO}_3^-$ ), donde n es mayor que 3 y menor que 10.

Los átomos de S también se pueden unir entre ellos formando cadenas de carácter polimérico en la que todos presentan estado de oxidación 0. Una formación muy común y estable contiene 8 átomos de S formando un anillo octogonal,  $S_8$ . Esta especie, conocida comúnmente como azufre elemental, es muy poco soluble en agua ( $5 \mu\text{g/L}$  a  $25^\circ\text{C}$ ).

También son asociaciones poliméricas del S los polisulfanos ( $\text{R-S-S}_n\text{-S-R}$ , donde R puede un resto orgánico o H) y los polisulfuros ( $[\text{S-S}_n\text{-S}]^{2-}$ ). En estas asociaciones los átomos de S presentan estado de oxidación 0 excepto los terminales (-2).

Las tiosales no son consideradas tóxicas, sin embargo, la presencia de especies como  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$  y  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  en ciertos efluentes puede indirectamente impactar en el medioambiente. Las tiosales son descargadas a los ríos y lagos donde allí, catalizadas por la presencia de bacterias, son oxidadas hasta ácido sulfúrico, contaminando las aguas y afectando a peces y organismos. La dificultad del problema depende principalmente de la concentración y de la velocidad de flujo de tiosales en las aguas. Además del pH, otros efectos que pueden ocasionar las tiosales son disminución de la concentración de oxígeno disuelto, disminución de la capacidad tampón del agua y disolución de metales del suelo (Dinardo y Sally, 1998).

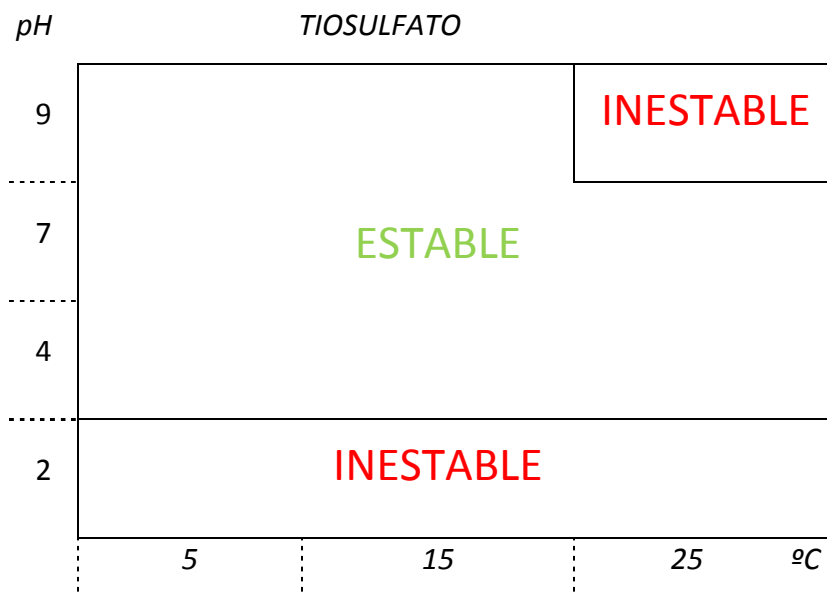
Las tiosales aparecen en lagos fuertemente ácidos cercanos a volcanes y en la escorrentía de sitios excavados que contienen azufre y bacterias metabolizadoras de azufre (Takano y col., 1994).



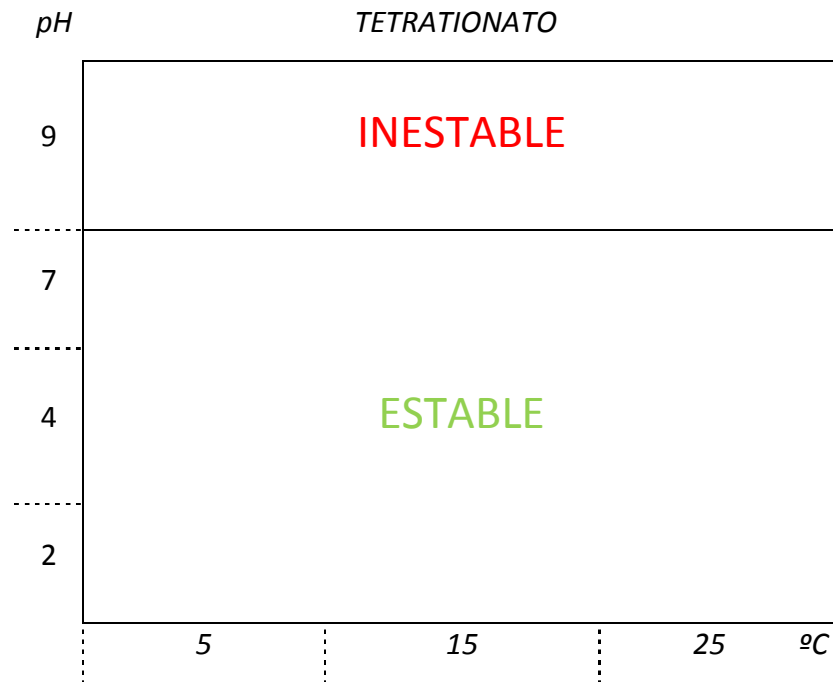
Las tiosales también se forman por la oxidación incompleta de minerales sulfuros en los circuitos de molienda y flotación particularmente de aquellos que contienen piritita ( $\text{FeS}_2$ ), el sulfuro mineral más común en la tierra (Schippers y col., 1996b; Sasaki y col., 1995).

La acumulación de tiosales en los circuitos de planta para la concentración de menas de sulfuros metálicos puede generar problemas de carácter técnico y medioambiental a partir de ciertas concentraciones. Esta acumulación afecta negativamente a la eficiencia de los procesos de molienda y flotación, haciendo por ello necesario el tratamiento de efluentes que contienen tiosales.

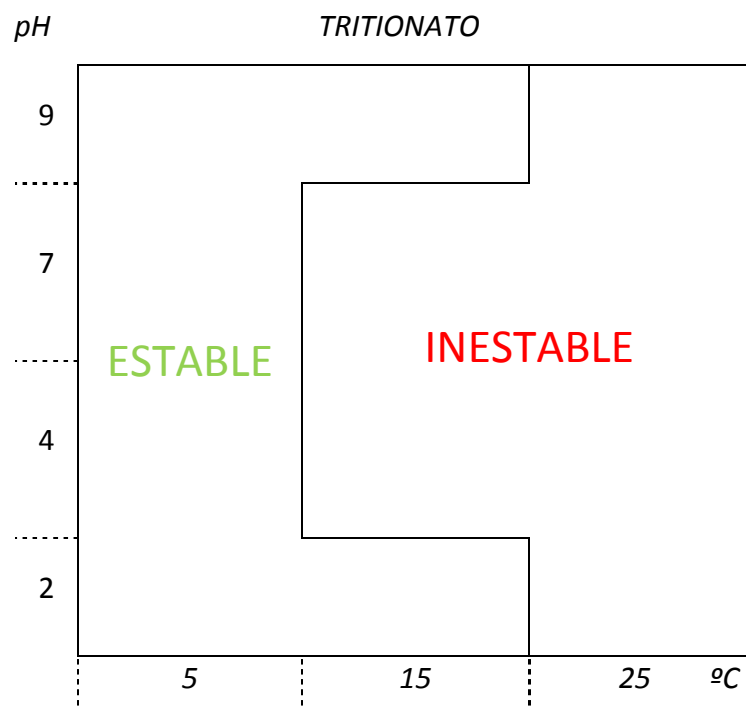
Desde principio de los 90, se estudia el comportamiento de las tiosales en disolución acuosa identificando las condiciones bajo las cuales éstas reaccionan. En general se puede concluir que la estabilidad de los politionatos aumenta con la disminución de la temperatura y hay muchas rutas de descomposición dependiendo del pH, temperatura y presencia de agentes oxidantes (Schippers y col., 1996a). En ausencia de catalizadores y pH neutro las tiosales son relativamente estables. Las condiciones de pH y temperatura en las cuales las tiosales son inestables se resumen en la Fig.1 (Vongporm, 2008):



**Figura 1a.** Estabilidad del tiosulfato en disolución acuosa.



**Figura 1b.** Estabilidad del tetrionato en disolución acuosa.



**Figura 1c.** Estabilidad del tritonato en disolución acuosa.

Como se muestra en la Fig. 1a bajo condiciones ácidas, el tiosulfato no es estable y reacciona para formar otros politionatos y sulfato. En general, la descomposición suele aumentar con la temperatura. También merece destacar que en medio alcalino el tetracionato es inestable, Fig. 1b.

La gama de reacciones en las que participa el S es muy amplia por dos motivos principalmente:

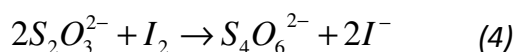
- La variedad de estados de oxidación. Es un elemento susceptible de participar en numerosos procesos de intercambio de electrones.
- La capacidad de formar cadenas a través de enlace S-S, que lo hace susceptible de interacción química con nucleófilos. Un nucleófilo es una especie que reacciona cediendo un par de electrones libres a otra especie (el electrófilo), combinándose y enlazándose covalentemente con ella. El CN<sup>-</sup> es un nucleófilo fuerte que rompe el enlace S-S para formar el ión SCN<sup>-</sup>.

A continuación se muestran algunas reacciones químicas que se consideran de interés para el estudio, agrupándolas en tres apartados referidos a los oxianiones más comunes y abundantes en los efluentes del procesamiento de minerales sulfuros en circuitos de molienda y flotación: los iones tiosulfato, tetracionato y tritionato. Seguidamente, se relatan, entre otros, las reacciones existentes en presencia de microorganismos, las tecnologías actuales de tratamiento de tiosales y las posibilidades de tratamiento de tiosales en biorreactores.

### **2.1.1. Ion tiosulfato:**

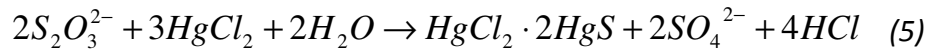
#### **2.1.1.1. Oxidación con I<sub>2</sub>.**

El ion tiosulfato se oxida con yodo hasta ion tetracionato, siendo ésta la base para su análisis por yodometría (Kurtenacker y Bittner, 1924; KoH, 1990),

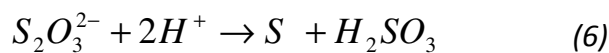


**2.1.1.2. Escisión del enlace S-S con HgCl<sub>2</sub>.**

También dentro del plano de las técnicas analíticas (Jay, 1953; KoH, 1990; Suzuki, 1999) resulta de interés la reacción del ion tiosulfato con el cloruro de mercurio:

**2.1.1.3. Dismutación en medio ácido.**

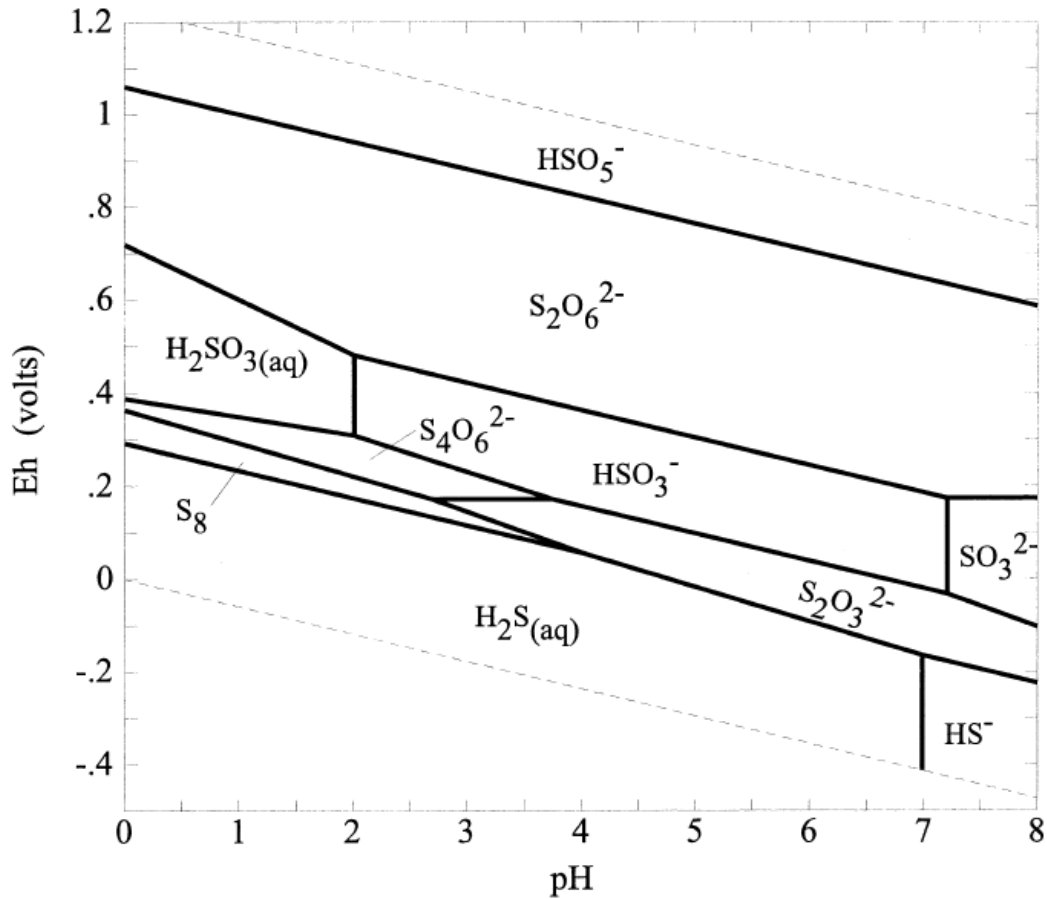
Entre pH 4 y pH 7 el ión tiosulfato es una especie estable hasta los 30 °C (Druschel y col., 2003). En un medio moderadamente ácido (pH < 4) el ión tiosulfato sufre una reacción de dismutación generando azufre elemental e ión sulfito:



Es característica de esta reacción la aparición de turbidez en el medio. Esta se debe a la suspensión coloidal del azufre elemental (S<sub>8</sub>).

Al tener lugar la reacción en medio ácido estos oxianiones se protonan parcialmente. El pK<sub>a1</sub> para el ión tiosulfato es 1,6, y para el ión sulfito, pK<sub>a1</sub> = 7 y pK<sub>a2</sub> = 2. Si el medio es fuertemente ácido (pH << 1,6) el ion tiosulfato da lugar a la formación de ácido tiosulfúrico H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> que es muy inestable y se descompone de forma inmediata en azufre elemental y dióxido de azufre. Estas apreciaciones se esquematizan en el diagrama de Pourbaix que se muestra en la Fig.2.





**Figura 2.** Diagrama de Pourbaix para el azufre.

La velocidad de la reacción de dismutación del ion tiosulfato es proporcional a la concentración de protones y a la concentración de ion tiosulfato al cuadrado; el orden total de la reacción es, por tanto, de 3 (Johnston y McAmish, 1973):

$$-r_{S_2O_3^{2-}} = \frac{-d[S_2O_3^{2-}]}{dt} = k \cdot [H^+] \cdot [S_2O_3^{2-}]^2$$

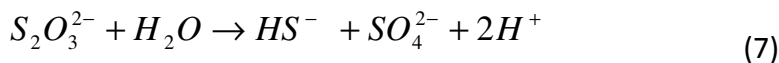
El coeficiente cinético  $k$  viene dado por la siguiente expresión de Arrhenius, función de la temperatura.

$$k = 1,64 \pm 0,13 \cdot 10^{11} \cdot \text{EXP}[-15930 \pm 160 / RT] \text{ en } L^2 \cdot \text{mol}^{-2} \cdot s^{-1}$$

A  $\text{pH} > 7$  la reacción de dismutación revierte.

El ion sulfito formado como producto se puede oxidar rápidamente hasta ion sulfato en presencia de oxígeno y sales de Cu (II) ó Co (II) (Bengtssons y Bjerleb, 1975; Lara Wild y Midoux, 1995) o tiosulfato (Chen y Morris, 1972).

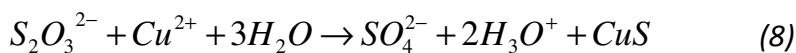
Jorgensen (1990) propuso una probable ruta de desproporción del tiosulfato en condiciones anóxicas, de acuerdo con la siguiente reacción, en un tiempo alrededor de 200 horas.



#### 2.1.1.4. Oxidación en presencia de Cu (II).

Fuera del rango de pH en el que tiene lugar la reacción de dismutación del tiosulfato (pH < 4), la oxidación del ión tiosulfato en presencia de aire u oxígeno es muy lenta; se oxida menos de un 30% tras 5 días. Se ha ensayado la catálisis de este proceso con ión cúprico formando parte de un organometálico. La asociación Cu (II)-polivinilpiridina permite reducir la concentración de ión tiosulfato de 0,2 a 0 g/L para dar ión sulfato en tiempos inferiores a 15 horas (Chanda y col., 1984). Este proceso tiene lugar vía ion tetrionato como producto intermedio, siguiendo la secuencia de reacciones detalladas en el apartado 2.4.1.2.

Entre pH 4 y 5, el ion tiosulfato se oxida con ion cúprico dando lugar a la formación de ion sulfato y sulfuro de cobre (Gonzalez-Lara y col., 2009).



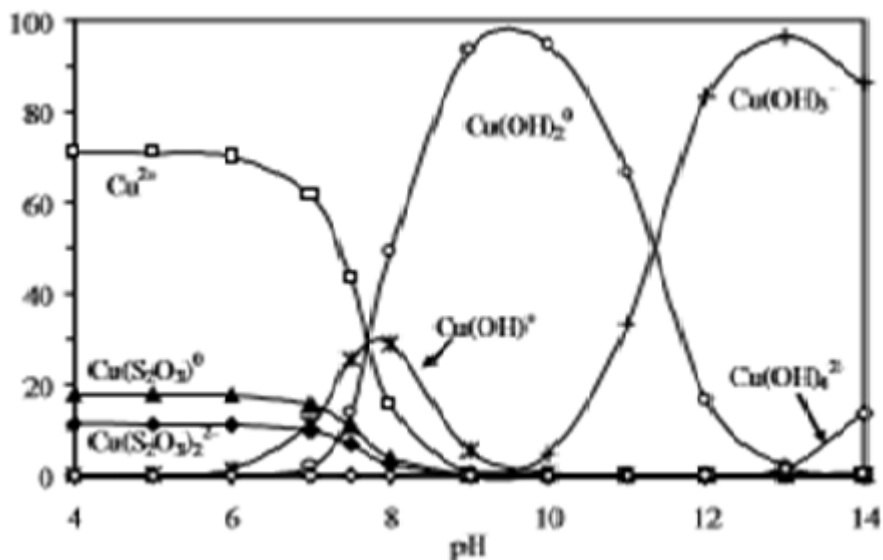
Esta reacción está cinéticamente favorecida por la temperatura; por cada 10 °C de aumento de la temperatura la velocidad se triplica, en el rango de temperatura comprendido entre 30 y 60 °C. La energía de activación es de 98 kJ/mol.

La cinética de la reacción es de orden global 0,4, presentando este mismo orden parcial para el Cu (II) y, por tanto, orden cero respecto de los iones hidronio y tiosulfato:

$$X = 9.73 \cdot 10^{13} \cdot e^{-98000/RT} [Cu^{2+}]^{0.4} \cdot [H_3O^+]^0 \cdot [S_2O_3^{2-}]^0 \cdot t$$

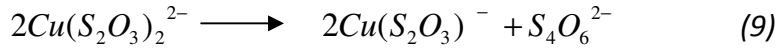
En esta ecuación cinética,  $X$  es la conversión de tiosulfato,  $T$  la temperatura en grados Kelvin,  $t$  el tiempo en minutos y las concentraciones de los iones cúprico, hidronio y tiosulfato vienen expresadas en mol/L. Esta ecuación es válida para temperaturas en el rango entre 30 y 60 °C, pH entre 4 y 5,  $[Cu(II)]$  entre 0,21 y 0,85 g/L y concentración de ion tiosulfato entre 0,88 y 2 g/L.

En medio ácido, en presencia de sulfato de cobre y en concentraciones de 0,001 M de tiosulfato las especies presentes en disolución son:  $Cu^{2+}$ ,  $Cu(S_2O_3)_2^{2-}$  y  $Cu(S_2O_3)^0$ , como se puede ver en Fig.3 (Senanayake, 2005a):



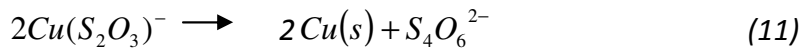
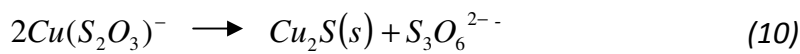
**Figura 3.** Efecto del pH en la formación de distintas especies de Cu (II) en una disolución 0,001 M de tiosulfato.

En estas condiciones el Cu (II) oxida al ion tiosulfato hasta ion tetrionato vía formación de complejos,  $Cu(S_2O_3)_n(H_2O)_p^{-2(n-1)}$ , estableciéndose una reacción de redox en el mismo complejo con la consecuente formación de tetrionato:

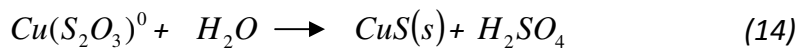
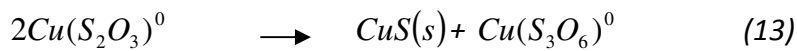
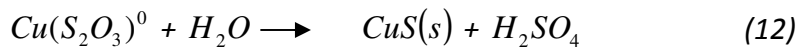


En concentraciones altas de tiosulfato, el complejo de cobre (I) formado se estabiliza, formando otras especies como  $Cu(S_2O_3)_2^{3-}$  y  $Cu(S_2O_3)_3^{5-}$  (Senanayake, 2005a).

En disoluciones deficientes en tiosulfato donde no hay un exceso para estabilizar a dicho complejo, el  $Cu(S_2O_3)^-$  puede dar lugar a la formación de sulfuro de cobre (I) y cobre elemental a través de las siguientes reacciones:



Por otro lado,  $Cu(S_2O_3)^0$  puede dar lugar a sulfuro de cobre (II) mediante:



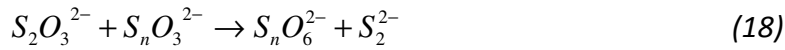
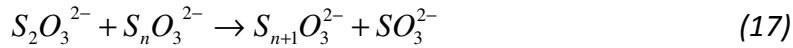
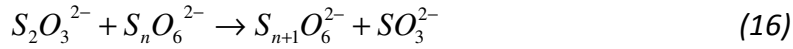
Por último, como se indica en la Fig. 3, la especie más abundante a pH ácido, el ion  $Cu^{2+}$ , cataliza la oxidación de sulfito hasta sulfato (Habashi, 1981; Moses y Herman, 1990):



En medio amoniacal, el ion  $Cu(II)$  forma diversos complejos con el amoniacal catalizando la oxidación con oxígeno del ion tiosulfato hasta sulfato (Senanayake, 2005b).

#### 2.1.1.5. Reacciones con otras tiosales.

En medio ácido, el ion tiosulfato reacciona con otras tiosales según las estequiometrías siguientes (Druschel, 2003):

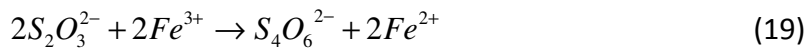


Las dos primeras son de desplazamiento nucleofílico (el ion tiosulfato es el nucleófilo), y la tercera es de oxido-reducción.

A neutro y pH básico, el tiosulfato actúa de catalizador en las reacciones de tetrionato (Moses y col., 1987).

#### 2.1.1.6. Oxidación con $Fe^{3+}$ .

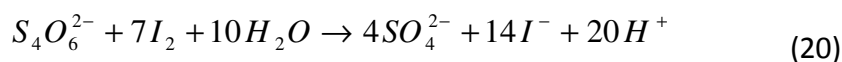
El ion férrico oxida al ion tiosulfato, vía formación del complejo intermedio  $FeS_2O_3^+$ . El complejo  $FeS_2O_3^+$  (color violeta) reacciona inmediatamente con Fe(III) dando lugar a los iones tetrionato y Fe(II) (Page, 1953; Page, 1954; Patnaik y Mahapatra, 1955; Tykodi, 1990; Druschel y col., 2003). El proceso global es representado por la siguiente estequiometría:



#### 2.1.2. Ión tetrionato.

##### 2.1.2.1. Oxidación con $I_2$ .

Kerek y Horvath (2007) estudiaron la oxidación de tetrionato por yodo. La reacción es la siguiente:



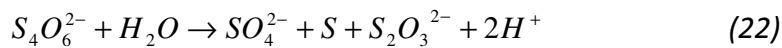
La reacción es independiente del pH en el rango de 4,25-5,55 y la cinética de esta reacción es compleja con una constante del orden de  $10^{-5}$ .

### 2.1.2.2. El ion tetrionato en medio ácido y básico.

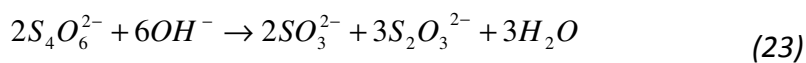
En disoluciones ácidas y a temperaturas inferiores a 30 °C, el ión tetrionato es muy estable (Druschel, 2003). En presencia de aire prácticamente no reacciona, pudiendo dar en tiempos muy prolongados reacciones de transposición a tritionato y pentationato como productos.



En ciertas condiciones de pH y oxígeno y catalizado por bacterias, el tetrionato se hidroliza según la siguiente ecuación (Suzuki, 1999):



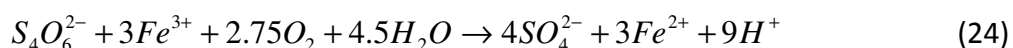
Varga y Horvath (2007) llevaron a cabo estudios en medio básico donde el tetrionato se descompone en tiosulfato y sulfito según la siguiente reacción:



### 2.1.2.3. El ion tetrionato y el ion férrico.

En presencia de ion férrico y en ausencia de oxígeno el ion tetrionato no reacciona.

En medio ácido y en presencia oxígeno e ion férrico se oxida a sulfato como único producto:



La cinética de este proceso es muy lenta. Se puede acelerar por activación térmica. La cinética de este proceso a 70 °C y pH entre 1 y 2 viene dada por la expresión (Druschel, 2003):

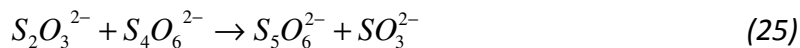
$$-r_{S_4O_6^{2-}} = 10^{-6.61 \pm 0.3} \cdot [S_4O_6^{2-}]^{0.3 \pm 0.08} [Fe^{3+}]^{0.15 \pm 0.09}$$

en moles/L·s, para concentraciones de férrico entre 0,5 y 5 mM.

Read y col. (2001) estudiaron la oxidación de tetrionato por ferrato potásico. Éstos descubrieron que el mecanismo de reacción cambia a pH aproximadamente 8,6.

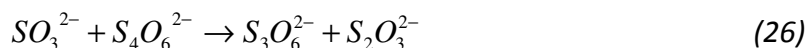
#### 2.1.2.4. El ion tetrionato en presencia de otras tiosales.

En presencia de otras tiosales el ion tetrionato se vuelve algo inestable. Así en medio ácido reacciona con ion tiosulfato mediante el ataque nucleofílico de éste último (Suzuki, 1999):



Esta reacción revierte a pH superior a 7.

También por ataque nucleofílico, aunque a pH > 7, reacciona con el ion sulfito (Suzuki, 1999):



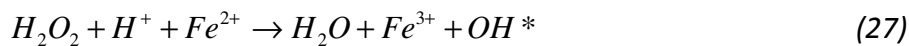
Esta reacción revierte a pH inferior a 7.

#### 2.1.2.5. Oxidación con aire catalizada con Cu (II).

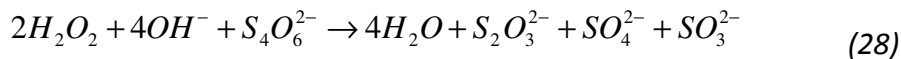
Al igual que ocurría con el tiosulfato, también es posible la oxidación rápida del ion tetrionato con oxígeno con catalizador químico Cu(II)-polivinilpiridina, pasando de 0,7 a 0,1 g/L en tiempos inferiores a 15 horas (Chanda, 1984).

### 2.1.2.6. Reacciones con radicales OH\*.

En ausencia de Fe(II), los politionatos no reaccionan apreciablemente con el agua oxigenada. Las tiosales en general, y el tetratiónato en particular, así como el sulfito reaccionan rápidamente y completamente hasta sulfato a pH ácido con radicales OH\* (Druschel y col., 2003). Los radicales OH\* se pueden generar a través del reactivo Fenton (una disolución ácida de agua oxigenada e ion ferroso).



En el caso de medio básico, Voslar y col. (2006) identificaron tiosulfato como intermediario en la oxidación de tetratiónato con peróxido de hidrógeno acorde con las siguientes ecuaciones:



El tiempo de esta reacción es de 2 min. El sulfito puede además de oxidarse, actuar como nucleófilo según las condiciones y podría generar otros intermediarios tales como el tritiónato. La velocidad de la reacción por Voslar y col. (2006) es:

$$-d [S_4O_6^{2-}] / dt = 1,5 \times 10^2 (M_2S)^{-1} [S_4O_6^{2-}] [H_2O_2] [OH^-]$$

### 2.1.2.7. El HgCl<sub>2</sub> como oxidante, base de técnicas analíticas.

En el plano de las técnicas analíticas resulta de interés la reacción del tetratiónato con el cloruro de mercurio (Jay, 1953; Makhija y Hitchen, 1978; Suzuki, 1999; KoH, 1990):





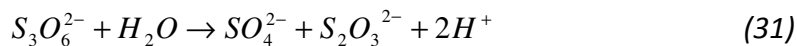
En general, este oxidante degrada a todas las tioales.

Este método ofrece muy buena precisión (0,1 mg). Sin embargo, este método es extenso, laborioso, requiere de un gasto de varios reactivos, necesita de la preparación de una serie de disoluciones y de una cantidad de toma de muestra de manera continuada para un análisis completo. Además no permite el seguimiento de la degradación de tioales de un cultivo en línea, solo es posible la realización de medidas discretas.

### 2.1.3. Ion tritionato.

#### 2.1.3.1. El ion tritionato en medio ácido y básico.

El ion tritionato también es muy común en efluentes del procesamiento de minerales sulfuros. Este politionato tiene un comportamiento químico similar al ion tetracionato pero con cinéticas algo más rápidas. Es más inestable que el ion tetracionato; así a pH inferior a 4 genera espontáneamente los iones sulfato y tiosulfato (Druschel, 2003):



El tiosulfato producido puede estar sujeto a otras reacciones (Meyer y Ospina, 1982; Mizoguchi y col., 1976).

La cinética de degradación del tritionato en medio básico ha sido estudiada por Ahern, Dreisinger y Van Weert (2006) y Rolia y Chakrabarti (1982). En medios fuertemente alcalinos, el tritionato se oxidará a azufre elemental, sulfato y dióxido de azufre.



#### 2.1.3.2. Tioales en presencia de Cu (II).

En presencia de cobre, el tritionato es un intermediario de la reacción de tiosulfato y tetracionato para dar sulfato como propusieron Chanda y Rempel (1987). Sin embargo,

bajo condiciones moderadamente ácidas, la reacción de tetratiónato para producir sulfato no lleva consigo la aparición de tritiónato como intermediario.

## **2.2. Métodos instrumentales de análisis de tiosales.**

### **2.2.1. Análisis cromatográfico. Cromatografía iónica y cromatografía líquida.**

Los análisis de especies del azufre se han centrado en el sulfato. Sin embargo, el impacto medioambiental que causan las especies intermedias del azufre ha llevado a profundizar en el desarrollo de técnicas de cromatografía iónica para su análisis.

Takano y Watanuki (1988) presentaron un trabajo pionero de separación de tiosales y determinación de politionatos en cromatografía líquida. En este trabajo, se desarrolla un método sensible para separar politionatos combinando una columna de HPLC con detección electroquímica. La separación fue alcanzada en una columna de intercambio iónico y confirmada con un detector de UV. Sin embargo, la detección electroquímica fue un desafío ya que la mitad de los picos eran parecidos y se solapaban. La separación de los picos se consiguió con una mezcla de varios componentes (Etanol-CsCl-Cloruro de tetrametilamonio) como electrolito soporte.

Hanfa Zou (1993) desarrolló un método para la separación de sulfato, tiosulfato y politionatos por cromatografía líquida en fase reversa. El método se aplicó para la determinación de tiosales en diferentes soluciones extraídas de oro. La limitación de los politionatos es que son aniones hidrofóbicos fuertemente retenidos por las resinas iónicas observándose picos asimétricos. La retención de los picos puede ser regulada por las propiedades, la concentración del modificador orgánico y por competición de un ion con la misma carga que el analito. La columna de separación usada fue un Dionex MPIC-NSI (200 x 3mm I.D.) con un guarda columna (Dionex NGI, 50 X 3 mm I.D.). La diferencia de concentraciones del eluyente utilizado permite mejorar la forma de los picos y disminuir el tiempo de retención del analito en la columna.

Friedhelm y col. (1993) desarrollaron una técnica para la determinación de tetratiónato y tiosulfato en cultivos microbianos. El eluyente en este procedimiento

corresponde con una mezcla de acetonitrilo/metanol. Los tres componentes son cuantificados en menos de diez minutos con límites de detección bajos. El equipo utilizado es una columna de HPLC conectado a un detector ultravioleta. La longitud de onda del detector fue de 216 nm, óptimo para la detección de tiosulfato y tetrionato. El sulfato fue el único medido por cromatografía iónica con supresión química. La columna de intercambio iónico usada fue originalmente diseñada para medir  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ .

Weir y Butlerb (1994) utilizaron cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detector de UV para la determinación de politionatos en medio salino. La precolumna es una columna iónica seguida de una columna en fase reversa. La fase móvil estaba compuesta de una mezcla de acetonitrilo-agua y tetrabutilamonio con tampón de carbonato. Con este método se consigue diferenciar el tiosulfato, tritronato, tetrionato y pentationato en un tiempo de análisis de 20 min. El propósito de este estudio fue encontrar condiciones cromatográficas óptimas las cuales toleraran también altos niveles de cloruro sin afectar a las diferentes especies. Para ello se utilizó el detector UV.

Miura y Watanabe (2001) mostraron la detección de tiosales con columnas de octadecilsilica (ODS) usando acetonitrilo-agua como fase móvil y con la posterior reducción con yodo.

Haddad (1997) presentó el primer estudio comparando resultados entre cromatografía iónica (IC) y electroforesis capilar (CE) para la separación de tiosales. Haddad, Philip, y Miroslav en 1999 desarrollaron una técnica de separación de iones inorgánicos por ambos métodos. Jones y Handik en 1992 presentaron soluciones de muestras complicadas aplicando esta práctica.

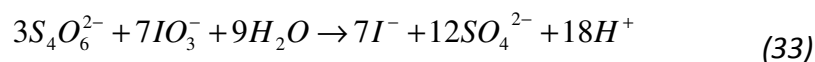
Jeffrey y Brunt (2007) utilizaron cromatografía iónica con detector de UV, de conductividad o detección electroquímica. El perclorato es usado como eluyente en la resina.

### **2.2.2. Análisis espectrofotométrico (IR/UV).**

Miura y Koh (1986) mostraron que el pentationato puede ser estequiométricamente oxidado reaccionando con permanganato en una reacción similar del tiocianato con permanganato en medio ácido. La cuantificación se realiza indirectamente a través del yoduro formado medido en un espectrofotómetro Shimadzu Model UV-240 con regulador de temperatura.

Koh y Miura (1987) llevaron a cabo otra determinación de sulfuro, sulfito, y tiosulfato en una mezcla midiendo la absorbancia completa de tiosulfato, sulfuro y sulfito, y después enmascarando sulfito con formaldehído y determinando tiosulfato y sulfito. Para alcanzar la medida de tiosulfato se llevó a cabo un procedimiento de eliminación de sulfuro con carbonato básico de zinc. Las interferencias posibles son Cu (II), Fe (III) y Mn (II). Este método fue aplicado en soluciones condensadas procedentes de fumarolas.

En otro estudio, el tetrionato reaccionó con yodato y el yoduro formado se midió espectrofotométricamente (Miura y col., 1991). El tetrionato fue cuantitativamente oxidado, con solución estándar de yodato, hasta sulfato acorde con la siguiente ecuación:



Los blancos se prepararon libres de yodato para corregir los errores en las absorbancias. Sin embargo, interferencias de otros iones presentes tales como Cu (II), Fe (II), y nitrito dificultan el procedimiento incluso cuando ellos están presentes en pequeñas cantidades.

### 2.2.3. Análisis electroforético.

Se han realizado muchos trabajos de electroforesis capilar para oxianiones del azufre en diferentes medios. Esta técnica analítica consiste en la separación de analitos en un electrolito con la aplicación de un campo eléctrico y detección espectrométrica (absorción, Raman, quimioluminiscencia, espectrometría de masas) o electroquímica (conductividad, potenciometría, amperometría).

Esta técnica tiene una ventaja sobre la mayoría de las técnicas analíticas para aniones, que es la rapidez en la medida, el uso de consumibles baratos, tiene grandes eficiencias de separación y es tolerable a diferentes matrices. Además, es muy sensible comparado con otros métodos como la cromatografía iónica y puede ser acoplado a detectores de espectrometría de masas. Se pueden disponer de diferentes electrolitos y se han aplicado para la separación de mezclas de iones en diferentes ambientes como aguas residuales, plantas y alimentos (Buchberger y Haddad, 1992; Corr y Anacleto, 1996; Harrold y col. ,1993; Jones y Jandik, 1992; Kuban, 1997; Rhemrev-Boom, 1994; Zemmann, 1997). Sin embargo, pocas publicaciones han sido enfocadas para politionatos.

### ***2.3. Tecnologías para el tratamiento de tiosales.***

Las tiosales han llegado a ser un problema para las compañías mineras debido a su potencial de toxicidad y bajada de pH. La razón se encuentra en que las tiosales en contacto con el oxígeno del aire se oxidan con el paso del tiempo generando como producto final ácido sulfúrico, catalizado por iones metálicos en disolución y por la acción metabólica de microorganismos sulfooxidantes (Dinardo y Sally, 1998). La estrategia de tratamiento común es completar la oxidación de tiosales a sulfato. Sin embargo, el tratamiento tradicional de aguas residuales lleva a cabo una neutralización con álcali una vez finalizada la degradación natural, los cuales son procesos baratos pero lentos y no fiables a bajas temperaturas por la disminución de la actividad sulfooxidante de los microorganismos (Wasserlauf y Dutrizac, 1982).

Las condiciones específicas del lugar donde se sitúen las tiosales tiene efecto en la química y estabilidad de ellas, por lo tanto, seleccionar la mejor tecnología para su tratamiento depende del lugar donde se encuentren las tiosales. Los criterios para la elección de una tecnología para su tratamiento dependen de (Dinardo y Sally, 1998)

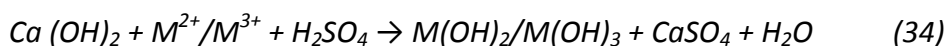
los costes de instalación y de operación, costes de mantenimiento, disponibilidad tecnológica y seguridad.

Kuyucak (1998) dividió las tecnologías de tratamiento de las tiosales en los siguientes grupos: (a) convencional, la cual incluye la neutralización del efluente mediante el uso de reactivos en general; (b) fisicoquímico, el cual incluye intercambiador iónico, procesos con membrana y extracción con disolventes; (c) biológico, con bacterias oxidantes en humedales; (d) pasiva, la cual también pueden incluir bacterias oxidantes.

Otra división en las tecnologías de tratamiento es simplemente tratamiento activo y pasivo. El tratamiento activo incluiría la convencional, el tratamiento fisicoquímico y el biológico según la subdivisión hecha por Kuyucak (1998) y se caracterizan por la necesidad de equipamiento, energía eléctrica y personal especializado. Por otra parte, la tecnología pasiva no necesita energía eléctrica con bajo coste de mantenimiento y operacional (Kuyucak, 2006).

### 2.3.1. Proceso de neutralización con cal.

El proceso de neutralización no está enfocado en la reducción de la concentración de tiosales sino más bien la neutralización del ácido ya presente y la precipitación de metales tales como Fe, Zn, Cu, Al, y Pb según la siguiente ecuación general (Kuyucak, 1998):



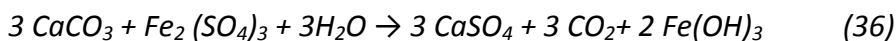
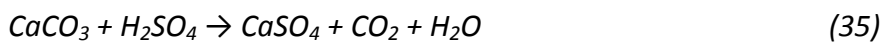
El lodo formado debido a la precipitación de metales es separado a través de la clarificación donde los sólidos suspendidos alcanzan menos de 1 mg/L. La densidad del lodo residual varía entre 1-30% sólidos (Kuyucak y col., 2001). Sin embargo, un sistema más avanzado de obtención de lodo de alta densidad (HDS) puede alcanzar una concentración de sólido entre el 60-70% (Kuyucak y col., 2001). Los principios

generales de operación de este proceso son el uso de más de un reactor de neutralización, el reciclado del lodo y la aireación de la reacción con control de pH.

Otros compuestos usados para la neutralización además de la cal son:

- Neutralización con carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ).

El carbonato es usado para eliminar la acidez y precipitar el hierro según las siguientes reacciones (Kuyucak y col., 2001):



El  $\text{CO}_2$  producido proporciona un tampón capaz de llevar la solución a pH 6.5; sin embargo, reduce la capacidad de precipitar otros metales que requieren alto pH de precipitación (Kuyucak y col., 2001).

- Hidróxido de magnesio ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ )

La capacidad de amortiguación del hidróxido de magnesio es alrededor de 9, por lo tanto es capaz de precipitar un amplio rango de metales; esto también produce un lodo más denso que reduce el coste de eliminación de desechos. Sin embargo, la velocidad de neutralización es relativamente lenta comparado con otros compuestos químicos (Kuyucak y col., 2001).

### 2.3.2. Oxidación biológica.

La oxidación de tiosales por bacterias está altamente influida por las condiciones del medio; estas condiciones determinarán las especies y el mecanismo de reacciones que

las tiosales seguirán para su oxidación. Independientemente de las especies, el producto final de la oxidación es sulfato con la consecuente bajada de pH.

En general, *Acidithiobacillus* está relacionado con valores de pH bajos pero muchos géneros de bacterias son capaces de oxidar tiosales a otros rangos de pH según la tabla 1 (Dinardo y Sally, 1998):

**Tabla 1.** Rango de pH de diferentes especies *Acidithiobacillus*.

Nombre	Rango de pH
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	1.0-6.0
<i>Acidithiobacillus thioparus</i>	7.0
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	4.5-7.8
<i>Acidithiobacillus novellus</i>	5.0-9.5
<i>Acidithiobacillus denitrificans</i>	6.0-8.0

El principio de los reactores biológicos es usar la capacidad de oxidación de estas bacterias para eliminar tiosales. Actualmente, en la bibliografía no existe información alguna respecto a la biooxidación de tiosales en continuo, de ahí la novedad del estudio.

### 2.3.3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Sulfato férrico.

El objetivo del tratamiento de las tiosales es completar la oxidación de especies intermedias del azufre hasta sulfato. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) es uno de los más fuertes oxidantes disponibles (Dinardo y Sally, 1998) y tiene algunas ventajas como la facilidad de operación y la generación de productos no tóxicos. Sin embargo, la velocidad de oxidación con peróxido es lenta y muy poco selectiva respecto de los productos (se generan politionatos con número de átomos de azufre que van desde 2 a 7 (Lu y col., 2010). Por tanto, el uso de catalizadores, como reactivo Fenton, para ayudar en la reacción es imprescindible (Druschel, 2003b).



Como resultado de la oxidación de tiosales y la consecuente disminución de pH, la neutralización es un paso común después de la utilización de peróxido de hidrógeno al efluente. Esta tecnología ha sido usada para eliminar tiosales de efluentes contaminados a concentraciones por debajo de 10 mg/L. Dinardo y Sally (1998) sugirieron que este tratamiento no era adecuado debido al gasto de reactivo y la necesidad de pasos intermedios para eliminar metales usados como catalizadores (Kuyucak, 2006).

#### **2.3.4. Degradación natural.**

Actualmente, parece ser que la mejor opción para el tratamiento de efluentes que contienen tiosales consiste en ubicarlos en balsas en las que se da tiempo a la oxidación natural de las mismas (Kuyucak, 2007). La degradación natural es un método convencional para el tratamiento de tiosales que conlleva el uso de las bacterias presentes naturalmente para degradar las especies intermedias del azufre (Dinardo y Sally, 1998; Gould y col., 2004). Este proceso conlleva largos periodos de tiempo, especialmente en lugares donde la actividad biológica disminuye durante el invierno. Lo ideal sería hasta un año, para que la oxidación tuviera lugar, pero esto no es efectivo (Dinardo y Sally, 1998). Por otra parte, la degradación debería ser un tratamiento efectivo durante los meses de verano, no es muy caro, ni requiere grandes mantenimientos (Dinardo y Sally, 1998).

Algunas compañías mineras han aplicado este tratamiento, finalizando con éxito para efluentes contaminados con tiosales. Sin embargo, las concentraciones medias finales están usualmente por debajo de 200 mg/L y alguna modificación en las tiosales de entrada afectará al resultado final (Fedath, 2010).

Los factores que limitan el proceso de degradación natural son la temperatura y la disponibilidad de oxígeno, mientras que los nutrientes y la población de bacterias no determinan la eficiencia del proceso (Gould y col., 2004). Otros contratiempos de la degradación natural son el uso de grandes estanques para aumentar el tiempo de conservación y la falta de control en el proceso.

### **2.3.5. Oxidación electroquímica.**

La oxidación electroquímica de las tiosales es posible, sin embargo, es económicamente factible para volúmenes bajos de efluentes con concentración de tiosales por debajo de 500 ppm (Dinardo y Sally, 1998). Los principales productos de este proceso son sulfato y ditionato. El uso de compuestos tales como cloro podría prevenir la generación de ditionato. Como la mayoría de los procesos de tratamiento de tiosales, se necesita una neutralización después de la oxidación. Algunas de las ventajas de este proceso son la alta eficiencia del proceso puesto que la concentración final de tiosales disminuye por debajo de 10 mg/L y la inexistencia de compuestos químicos envueltos en el tratamiento. Sin embargo, los principales inconvenientes son el alto coste operacional, el bajo beneficio para bajas concentraciones de flujo, y los altos costes de mantenimiento.

### **2.4. Catálisis Biológica.**

Como se ha mencionado anteriormente, la amplia variedad de estados de oxidación del S da lugar a diversas especies químicas y multitud de reacciones. Estas pueden ser catalizadas por diversos tipos de enzimas (hidrolasas, transferasas y oxidasas) acoplándose al ciclo energético de numerosos organismos vivos (Ghosh y Dam, 2009).

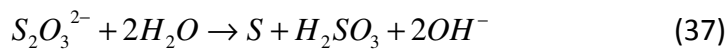
En la biooxidación de tiosales, las reacciones puramente biológicas interaccionan con otras reacciones químicas que se dan en el entorno, y todas son dependientes de las condiciones de la operación (temperatura y composición) (Ghosh y Dam, 2009). En estos sistemas probablemente no sea posible caracterizar el balance de materiales con una estequiometría simple.

### 2.4.1. Catálisis enzimática.

#### 2.4.1.1. Enzimas del metabolismo de tiosales.

A continuación se muestra un conjunto de reacciones catalizadas por enzimas que afectan al metabolismo de tiosales (Suzuki, 1999):

- Dismutación del ion tiosulfato en azufre elemental e ion sulfito, reacción catalizada por Rhodanasa, que es una S-transferasa, siendo la estequiometría:



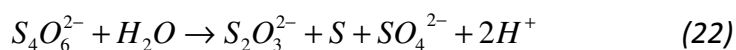
- Oxidación parcial del ion tiosulfato hasta ion tetrionato, catalizada por la enzima tiosulfato deshidrogenasa:



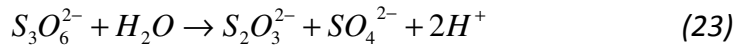
Esta es una de las reacciones fundamentales en el metabolismo del ion tiosulfato.

La enzima tiosulfato deshidrogenasa tiene su máximo rendimiento catalítico a pH 3. Por debajo de pH 2 y por encima de pH 7 disminuye sensiblemente su actividad. Se inhibe fuertemente por la presencia de sulfito. Los politionatos, como ion tritionato e ion tetrionato, también son agentes inhibidores de esta enzima. Está presente en microorganismos como *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*; ha sido purificada a partir de *Thiobacillus acidophilus* (Meulemberg y col., 1993).

- Hidrólisis del ion tetrionato, catalizada por la enzima tetrionato hidrolasa.



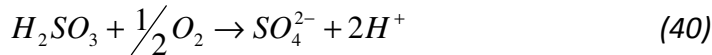
- Hidrólisis del ion tritionato, catalizada por la enzima tritionato hidrolasa.



- Oxidación del azufre elemental, catalizada por la enzima S-oxidasa.



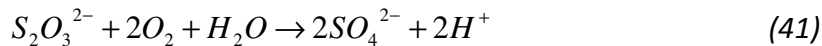
- Oxidación del ion sulfito, catalizada por la enzima sulfito oxidasa.



#### 2.4.1.2. Mecanismos enzimáticos para la oxidación del ion tiosulfato.

Para explicar los procesos metabólicos de tiosales se proponen modelos (Suzuki, 1999) que combinan las reacciones catalizadas por las enzimas vistas en el apartado anterior.

Para la oxidación del ion tiosulfato se postulan dos posibles mecanismos que llegan a la misma estequiometría global (Xu and Schoonen, 1995), ambas con energías de Gibbs favorables (Thauer y col, 1977):



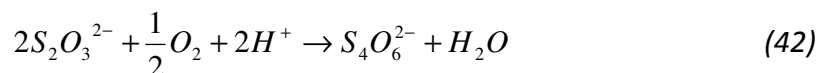
##### Mecanismo 1

El mecanismo 1 sigue la secuencia de reacciones: (37) + (39) + 2 x (40)

##### Mecanismo 2 (vía tetrionato)

Según Sorokin and Tourova (2005) el mecanismo más probable para la oxidación de tiosulfato a sulfato con microorganismos es a través de tetrionato como intermedio.

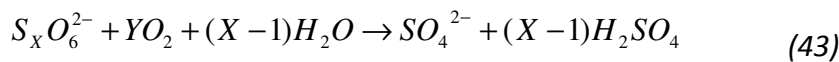
Parte de acoplar la reacción (38) a  $\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$ , siendo este primer paso representado por la estequiometría



Así el mecanismo 2 sigue la secuencia de reacciones: (42) + (22) + (39) + (40)

### 2.4.1.3. Mecanismo enzimático para la oxidación del ion tetrionato.

En la bibliografía se encuentran varios mecanismos posibles para la oxidación de tetrionato y tritionato. Sin embargo, la reacción global no deja de ser la misma para ambos mecanismos:



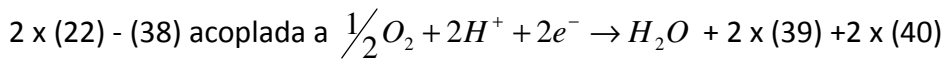
$$Y = 5 \text{ para } X = 5$$

$$Y = (X - 1) \text{ para } X = 3$$

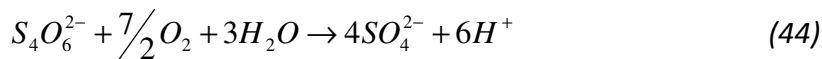
$$Y = (X - 1/2) \text{ para } X = 4 \text{ ó } 6$$

$$Y = (X - 3/2) \text{ para } X = 2$$

Un mecanismo posible para la oxidación del ion tetrionato sigue la siguiente secuencia de reacciones:



cuya estequiometría global está dada por la ecuación:



## 2.4.2. Catálisis microbiana.

### 2.4.2.1. El género *Acidithiobacillus*.

Existe una gran variedad de microorganismos que participan en el ciclo del S con habilidad sulfooxidante. De entre ellos se destacan los del género *Thiobacillus*. Los microorganismos del género *Thiobacillus* se caracterizan por metabolizar especies reducidas del azufre y presentar forma de bacilo.

La clasificación taxonómica de las células del género *Thiobacillus* se vio modificada en el año 2000, para distinguir de entre ellas a las especies microbiológicas capaces de

soportar condiciones de acidez extremas, apareciendo un nuevo grupo taxonómico denominado género *Acidithiobacillus* (Kelly y Wood, 2000).

En zonas dedicadas a la actividad de la minería metálica o del carbón es común el desarrollo de ecosistemas cuyos rasgos característicos son la acidez, la presencia de aniones de S en sus distintos estados de oxidación y metales pesados, como sulfuro y en disolución, en especial Fe, así como de microorganismos de carácter acidófilo (Hedrich, Schlomann y Johnson, 2011; Dopson y Johnson, 2012). En estos entornos, suelen ser muy frecuentes las células del género *Acidithiobacillus* (Bernier y Warren, 2007), siendo habitual que la especie microbiológica más abundante sea *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Del mismo género, aunque en niveles de concentración considerablemente menores, suele ser frecuente la presencia de *Acidithiobacillus thiooxidans* (Khan y col., 2012). Otras especies sulfooxidantes del género *Acidithiobacillus* también presentes en estos ecosistemas son *Acidithiobacillus caldus* y *Acidithiobacillus prosperus* (Kelly y Tuovinen, 1975; Kelly y Wood, 2000, Friedrish y col., 2001, Rawling, y Johnson, 2004; Rzhepishevskaya y col., 2007; Ghosh y Dam, 2009; Shiers, Ralph y Watling, 2011) y *Acidithiobacillus intermedius* (Wentzien y col., 1994). Otra bacteria del mismo género descubierta recientemente es *Acidithiobacillus ferrivorans* (Hallberg y col., 2010, Liljeqvist y col., 2011) que se desarrolla en condiciones psicrófilas.

*Acidithiobacillus ferrooxidans*, además de tener la capacidad de metabolizar especies reducidas del azufre, cataliza la oxidación del ion Fe(II), al que toma como sustrato prioritario para obtener la energía que necesita para sus funciones de crecimiento y mantenimiento. De hecho, la mayoría de los estudios sobre *A. ferrooxidans* están dirigidos al metabolismo del ión Fe (II) (Jensen y Webb, 1995, Nemati y col., 1998). En la Fig.4 se resumen las características taxonómicas de *A. ferrooxidans*.

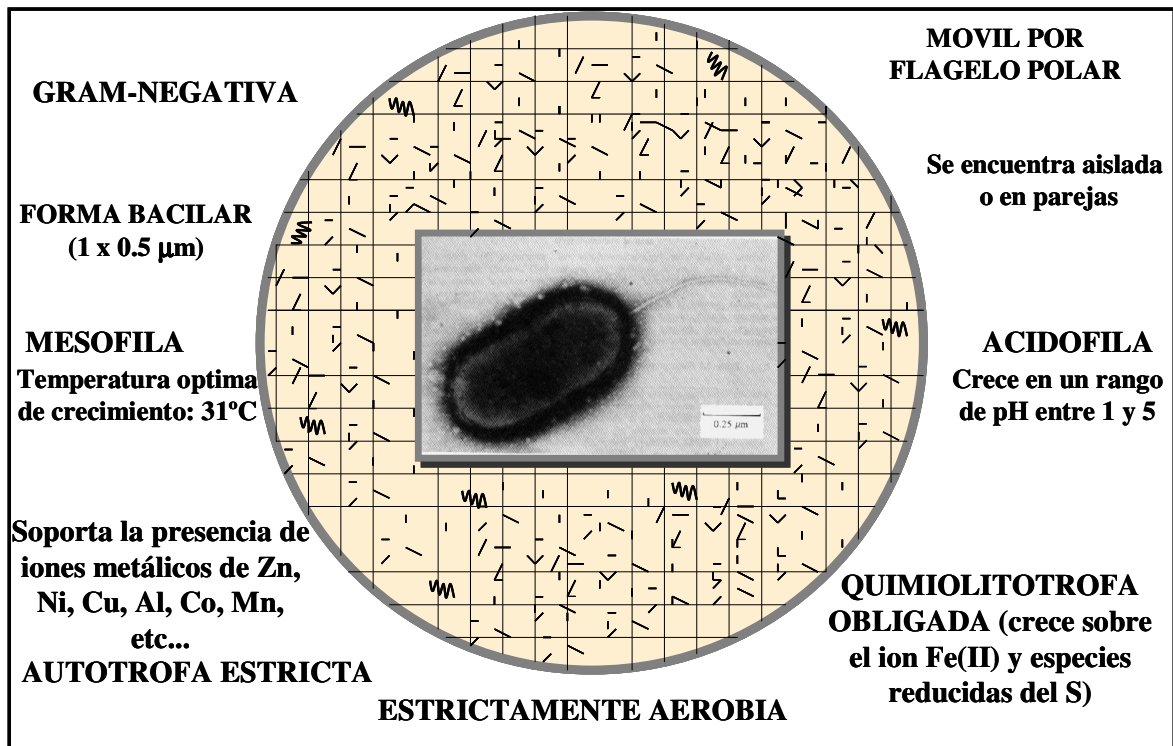


Figura 4. Características de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

*A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* pueden crecer tomando sulfuros, azufre elemental, tiosulfato y politionatos como única fuente de energía (Eccleston y Kelly, 1978; Pronk y col., 1990; Rohwerderet y Sand, 2007).

#### 2.4.3. Biooxidación microbiológica del ion tiosulfato.

*A. ferrooxidans* crece sobre ion tiosulfato (Colmer, 1962). Pero lo hace con dificultad cuando previamente sólo ha crecido sobre Fe(II); la enzima fundamental en el metabolismo de tiosulfato en *A. ferrooxidans* es la tiosulfato deshidrogenasa, y se encuentra inactiva en células que sólo han metabolizado Fe (Beard y col., 2011; Kikumoto y col., 2013).

Para conseguir que *A. ferrooxidans* metabolice tiosulfato es imprescindible su adaptación, siendo para ello necesarias acumulaciones de células en muy alta

concentración y varias resiembras (Tuovinen y Kelly, 1974; Kelly, 1975). Este artificio es obligado en *A. ferrooxidans*, ya que vive de forma natural en ambientes ácidos conteniendo Fe en disolución, condiciones en las que el ion tiosulfato prácticamente no existe por ser muy inestable (Ghosh y Dam, 2009).

Se ha demostrado que *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* crecen aeróbicamente sobre ion tiosulfato excretando ión tetracionato como metabolito intermedio (Peck, 1962; Tuovinen y Kelly, 1974; Kelly, 1975; Eccleston y Kelly, 1978; Pronk y col., 1990; Ghosh y Dam, 2009; Beard y col., 2011; Khan, 2012). La enzima tiosulfato deshidrogenasa da como único producto ion tetracionato (Kikumoto, 2013).

Aunque ha sido posible la extracción de Rhodanasa a partir de cultivos de *A. ferrooxidans*, enzima que cataliza la hidrólisis del ion tiosulfato hacia ion sulfito y azufre elemental (37), parece poco probable que esta enzima juegue un papel significativo en la biooxidación del ion tiosulfato, a la vista de que el ion tetracionato se sintetiza en cantidades cercanas a la estequiométrica (Pronk, 1990).

La generación de ion tetracionato tiene lugar como una etapa inicial en el metabolismo del ion tiosulfato, y es metabolizado posteriormente pudiendo generar azufre elemental, ion tiosulfato e ion sulfato, productos habituales de la catálisis por la enzima tetracionato hidrolasa (Beard, 2011). Parece ser que esta etapa tiene lugar una vez el ion tiosulfato es escaso como fuente de energía para las células.

La concentración de ion tiosulfato y el pH del medio afectan fuertemente al metabolismo de este sustrato por *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Tuovinen, 1974; Eccleston, 1978). No es del todo claro el margen de pH al cual *A. ferrooxidans* metaboliza el ion tiosulfato:

- Margen de pH inferior. Se ha descrito (Eccleston, 1978) que a pH constante de 2, *A. ferrooxidans* metaboliza el ion tiosulfato a concentraciones inferiores a 7 g/L. A concentraciones mayores se dan efectos inhibitorios severos. Contrario a



ello, se ha informado sobre la imposibilidad de crecer *A. ferrooxidans* sobre ion tiosulfato a pH inferior a 3,5 (Tuovinen, 1974).

- Margen de pH superior: *A. ferrooxidans* no crece a pH superior a 4,7, siendo los tiempos de latencia muy grandes (superior a 3 días) a pH superior a 4,4 (Tuovinen, 1974).

A pH constante de 4 no se dan efectos inhibitorios a menos que las concentraciones de ion tiosulfato sean muy grandes, > 20 g/L. Operar a pH constante de 4 permite, además de metabolizar elevadas concentraciones de ion tiosulfato, minimizar la dismutación química de este sustrato, reacción que en caso de darse obligaría a *A. ferrooxidans* a metabolizar también el ion sulfito generado.

No se tiene constancia de que *A. ferrooxidans* pueda crecer sobre ion sulfito como única fuente de energía. Parece ser que a pH 3 da lugar a velocidades algo significativas en la oxidación de este ion (Pronk y col., 1990). A diferencia del resto de Thiobacilli, *A. ferrooxidans* tiene un sistema para el metabolismo de ion sulfito: Fe(III) oxido-reductasa acoplado al sistema de oxidación del Fe(II) (Takeushi y Suzuki, 1994). La acumulación de iones sulfito y bitiosulfato se postula como la causa de la inhibición del crecimiento de este microorganismo sobre ion tiosulfato (Tuovinen, 1974). La enzima tiosulfato deshidrogenasa purificada a partir de *A. ferrooxidans* pierde buena parte de su actividad catalítica en presencia de ion sulfito en concentración superior a 2mM (0,16 g/L) y totalmente a partir de concentración 10 mM (0,8 g/L) (Kikumoto, 2013).

En cultivos continuos de *A. ferrooxidans*, realizados en quimiostato, alimentados con disolución de ion tiosulfato de concentración 2,25 g/L, manteniendo el pH constante a 2,5 por dosificación de carbonato potásico, es posible la oxidación completa del ion tiosulfato hasta ion sulfato y alcanzar tasas de dilución de hasta 0,129 h<sup>-1</sup> (Eccleston, 1978).

*A. thiooxidans* es capaz de oxidar el ion tiosulfato a velocidad 55 mg/Lh en condiciones óptimas (Silver y Dinardo, 1981); estas son: pH<sub>inicial</sub>: 3,75, Temperatura: 30 °C, concentración de amonio superior a 2 mg/L, de fosfato superior a 1 mg/L y concentración de tiosulfato 4,4 g/L. Este último dato no es consistente con el publicado por Kurosawa y col. 1991, que ha descrito efectos inhibitorios por sustrato a concentraciones superiores a 2,24 g/L. El pH neto durante el cultivo es decreciente. *A. thiooxidans* presenta dificultades para crecer sobre tiosulfato a pH inferior a 2 y superior a 5. Se recomienda que el metabolismo de esta tiosal se desarrolle a pH constante con un medio de crecimiento tamponado (Lors, Chehade y Damidot, 2009). Metales pesados como Cu, Cd, Ag, Pb y Zn inhiben el crecimiento de *A. thiooxidans* sobre tiosales.

Al parecer, *Acidithiobacillus thiooxidans* es capaz de metabolizar el ion sulfito aunque se inhibe severamente su crecimiento a pH inferior a 2,3 (Masau, Oh y Suzuki, 2001). Crece apreciablemente sobre ion sulfito a partir de pH 4,5 estando el pH óptimo comprendido entre 6 y 8 (Takeushi y Suzuki, 1993).

El ion Fe(III) acelera el proceso de biooxidación del ion tiosulfato. Se postula que este oxidante es un elemento clave en la oxidación del ion tiosulfato por catálisis microbiana, haciendo mayor el avance de la reacción hacia ion sulfato; el Fe (III) promueve la aparición de ion tetratiónato (Warren, Norlund y Bernier, 2008), primer estadio en la oxidación del ion tiosulfato.

#### **2.4.4. Biooxidación del ion tetratiónato.**

*A. ferrooxidans* crecido anteriormente sobre Fe (II) toma como sustrato preferente al ion tetratiónato frente al ion tiosulfato (Kelly y Tuovinen, 1975; Ghosh y Dam, 2009). Esto puede deberse a que en los ambientes en los que existe esta bacteria (extremadamente ácidos y con presencia de metales pesados en disolución) el ion tetratiónato es estable, al contrario de lo que pasa con el ion tiosulfato; de manera que

el sistema metabólico que degrada el ion tetrionato en *A. ferrooxidans* suele estar siempre activo (Sugio y col., 1996).

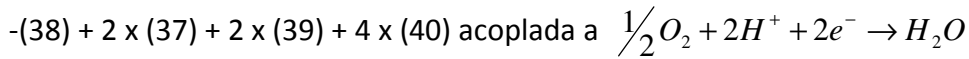
*A. ferrooxidans* metaboliza el ion tetrionato en el rango de pH entre 1,3 y 4,4. Fuera de este rango difícilmente crece (Tuovinen y Kelly, 1974). La temperatura óptima se encuentra en torno a los 25 °C (Kupka y col., 2009).

Cuando *A. ferrooxidans* crece sobre ion tetrionato como única fuente de energía puede generar como productos iones sulfato, tiosulfato y otros politionatos, como el ion tritionato, así como azufre elemental. No obstante, es posible conseguir la oxidación completa del ion tetrionato, obteniéndose como único producto ion sulfato, tanto en cultivos discontinuos como continuos.

En cultivos discontinuos, *Acidithiobacillus ferrooxidans* puede crecer exponencialmente metabolizando ion tetrionato, cuando la concentración inicial de este politionato es 2,25 g/L y el pH es constante (controlado con carbonato potásico); el crecimiento se detiene súbitamente cuando todo el ion tetrionato es consumido (Eccleston y Kelly, 1978). En estas condiciones no se genera los iones tiosulfato y tritionato en ningún momento, siendo la velocidad de oxidación del ion tetrionato a 30 °C del orden de 40 mg/L·h. A pH 2 existen efectos inhibitorios severos por sustrato a partir de concentración de ion tetrionato de 10 g/L. Este efecto inhibitorio es mínimo a pH 3, pudiendo llegar a metabolizar concentraciones de hasta 18 g/L con velocidades específicas de crecimiento similares en el rango de concentración inicial de ion tetrionato entre 2 y 18 g/L.

En cultivos continuos de *A. ferrooxidans* alimentados con disolución de ion tetrionato en concentración de 2,25 g/L, manteniendo el pH constante a 2,5 con carbonato potásico, es posible la oxidación completa del ion tetrionato hasta sulfato; la máxima velocidad de dilución es de 0,06 h<sup>-1</sup> (Eccleston y Kelly, 1978). La estequiometría de este proceso viene dada por la ecuación (44), es decir, la misma que para el mecanismo enzimático simple mostrado anteriormente. No obstante, hay

autores que postulan una ruta metabólica alternativa asimilable a la siguiente secuencia de reacciones (Eccleston y Kelly, 1978):



No todos los productos del metabolismo del ion tetrionato se excretan al exterior de las células; también se pueden acumular en glóbulos en el interior de la célula. En este sentido se han detectado como metabolitos intracelulares politionatos de cadena larga unidos a azufre elemental  $S_8$  (Pronk y col., 1990; Warren y col., 2008; Ghosh y Dam, 2009; Beard y col., 2011). Cabe indicar que la formación de estos metabolitos intracelulares no parece ser una vía obligada en la degradación del ion tetrionato.

Cuando *A ferrooxidans* crece sobre ion tetrionato puede tomar como aceptor final de electrones al Fe (III) en lugar del oxígeno, generando Fe (II). La reducción del Fe (III) hasta Fe(II) está catalizada por una enzima que posee este microorganismo llamada Fe(III)-reductasa (Sugio y col., 2009). Los tiempos de generación de *A ferrooxidans* tomando como sustrato ion tetrionato e Fe (II) son similares.

## ***2.5. Influencia de la temperatura.***

Los parámetros más importantes que afectan al metabolismo del género *Acidithiobacillus* son: la concentración de sustrato inicial, el pH, la temperatura, el oxígeno disuelto, la concentración de dióxido de carbono y los posibles sólidos inertes (Jones y Kelly, 1983). Al igual que las reacciones químicas, las reacciones biológicas son también dependientes de la temperatura y, en estudios realizados en igualdad de condiciones, el principal factor determinante en la velocidad específica de biooxidación es la temperatura. Durante los meses de verano, las tiosales están totalmente oxidadas en las balsas si el tiempo de permanencia en ellas es suficientemente largo. Debido a que la actividad bacteriana aumenta durante el

verano, la concentración de tiosales en las aguas disminuye alcanzando un mínimo en esta estación y es importante determinar la temperatura a la cual la velocidad es máxima (Tekin y col., 2014). Esto conlleva a una diferencia en el pH del agua durante las distintas estaciones del año.

En estudios realizados con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y llevando a cabo la ruta metabólica ferro-oxidativa, la temperatura óptima ha sido reconocida ser dependiente del pH. Una disminución del pH inicial, para ensayos en igualdad de condiciones, conlleva a una bajada de la temperatura óptima en el crecimiento de esta bacteria (Dong-Jin y col., 2008). En la literatura, la temperatura óptima de *Acidithiobacillus ferrooxidans* es 33°C a un pH inicial de 2,5 y 30°C a pH 1,5. (MacDonald y Clark, 1970). En estudios realizados con *Acidithiobacillus thiooxidans* con S<sub>0</sub> como sustrato y a un pH inicial de 1,8, el óptimo de temperatura se consigue a 32,8°C entre un intervalo de temperatura comprendido entre -4,2 y 39,7°C (Franzmann y col., 2005).

En la bibliografía se encuentran algunas aproximaciones resumidas por Zwietering y col. (1991) para predecir el comportamiento de cultivos bacterianos tomando como única variable la temperatura, entre ellas los modelos de Hinshelwood (1946), Ratkowsky y col. (1983) y Schoolfield y col. (1981). Estos modelos se caracterizan por ser algo más complejos en su ecuación que la ecuación tipo Arrhenius (45), sin embargo esta última aproximación es la más utilizada para predecir la energía de activación de la reacción (Ojumu y col., 2009; Franzmann y col., 2005):

$$\ln \mu = -E_a / RT + \ln A \quad (45)$$

Donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento bacteriano o pendiente de la recta correspondiente a la zona lineal de la ecuación semilogarítmica de la concentración de bacterias frente al tiempo a una temperatura T (en Kelvin),  $E_a$  es la energía de activación, R es la constante de los gases ideales (8,314 J K<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>), y A es el “factor pre-exponencial”. Si el coeficiente de rendimiento o la relación existente entre la biomasa producida y el sustrato consumido es constante durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano, la velocidad específica de crecimiento ha de ser igual a la de biooxidación. Este hecho permite seguir el control del cultivo analizando la

concentración de sustrato, método mucho más fácil y preciso que el de análisis de la concentración bacteriana. De esta manera, midiendo la concentración de analito en cada momento y realizando una representación de  $\ln \mu$  frente a  $1/T$  se obtiene una recta de pendiente  $-E_a/R$ . La energía de activación obtenida de esta manera para la biooxidación de azufre elemental por *Acidithiobacillus thiooxidans* es de  $47 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Franzmann y col., 2005).

El modelo de Hinshelwood expone que la bajada inmediata de la velocidad específica de biooxidación cuando alcanza una determinada temperatura máxima es debido a la desnaturalización irreversible y coagulación de las enzimas de las células. Hinshelwood expresa  $\mu$  como la contribución de dos términos tipo Arrhenius, uno de síntesis y otro de degeneración, dada por la siguiente expresión, (Eq. (46)):

$$\mu = A_1 e^{-E_A/RT} - A_2 e^{-E_D/RT} \quad (46)$$

Donde  $E_A$  es la energía de activación de la enzima y  $E_D$ , la energía de desactivación, considerablemente más grande que  $E_A$ .

El modelo de Ratkowsky corresponde a la Eq. (47):

$$(1/t)^{1/2} = b (T - T_{\min}) \cdot (1 - e^{c(T - T_{\max})}) \quad (47)$$

Donde  $T$  es temperatura en  $^{\circ}\text{C}$ ;  $T_{\min}$  y  $T_{\max}$  son la mínima y máxima temperatura respectivamente,  $b$  y  $c$  parámetros de ajuste y el parámetro  $t$ , el tiempo necesario para alcanzar una condición específica, generalmente el tiempo de generación o duplicación bacteriana, expresado en la Eq. (48) como:

$$t_{1/2} = \ln 2 / \mu \quad (48)$$

El modelo modificado de Ratkowsky viene dado por la Eq. (49), donde la caída de  $1/t$  hacia  $T_{\max}$  está descrita por una función exponencial y no por la raíz cuadrada de la función exponencial. El modelo modificado de Ratkowsky, se aproxima más a los resultados experimentales de crecimiento de biooxidación de sustrato durante un

intervalo más amplio de temperatura. Sin embargo, el modelo de Ratkowsky se aproxima solo a temperaturas altas (Zwietering y col. 1991):

$$(1/t) = b (T - T_{\min})^2 \cdot (1 - e^{c(T - T_{\max})}) \quad (49)$$

Según estudió Zwietering y col. (1991), el modelo modificado de Ratkowsky es el más adecuado para conocer la temperatura óptima en el crecimiento microbiano, remarcado por Kupka y col. 2009.

## **2.6. Biorreactores.**

Las pautas preliminares para el diseño de biorreactores para la biooxidación de tiosales se deben concretar en bajos costes de inversión y operación, velocidad de oxidación de tiosales suficiente para cubrir la capacidad del tratamiento a nivel industrial, en equipos cuyo tamaño permita controlar las condiciones de operación, en especial del flujo, aireación y temperatura (Iglesias y col., 2016).

En lo que respecta al apartado 2.5, se debe tener en cuenta que todas las reacciones del metabolismo de tiosales son exotérmicas y dependientes de la temperatura en estrechos márgenes. Las especies celulares *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* son mesófilas y tienen su óptimo de temperatura en torno a los 30 °C. Mientras su adaptación a ambientes más fríos es posible, la exposición continua a temperaturas superiores a los 45 °C provoca una pérdida de viabilidad total (Silver, 1985).

Respecto del flujo, éste debe proveer a toda la biomasa de sustratos a la velocidad que esta demande para que el metabolismo sea lo más selectivo respecto del producto y rápido posible.

La aireación suele ser un factor clave en las fermentaciones aeróbicas, como es la de tiosales. La baja solubilidad del oxígeno en disoluciones acuosas dificulta grandemente la tarea de cubrir la velocidad de demanda de oxígeno de la población celular. Por este motivo, el suministro de oxígeno puede ser un factor limitante de la cinética de este tipo de procesos.



### 2.6.1. Biorreactor continuo.

En líneas generales, la operación continua de biorreactores es más favorable en términos productivos que la discontinua por dos motivos (Bailey y Ollis, 1986):

- Se evitan los periodos no productivos de carga y descarga del reactor en cada ciclo de reacción.
- Se evitan los estados celulares de latencia, crecimiento acelerado y crecimiento retardado, causados por la variación de concentración de sustratos y productos en el medio a lo largo del tiempo, en los que la velocidad específica de crecimiento es distinta de la máxima.

Adicionalmente, el metabolismo de *Acidithiobacillus* creciendo sobre fuentes reducidas del S puede verse negativamente afectado por reacciones secundarias como la generación de ion sulfito. Uno de los factores que afectan en mayor medida al avance de estas reacciones deriva de la generación de protones durante la biooxidación. Para controlar las interferencias de reacciones abióticas, y dirigir el proceso hacia un único producto, se recomienda la operación continua estacionaria (Pronk, 1990; Ghosh, 2009).

### 2.6.2. Biorreactor con células soportadas.

Los procesos microbianos continuos pueden llevarse a cabo con las células suspendidas en el caldo de cultivo o con las células adheridas a un sustrato o soporte. Con las células dispersas en el líquido el reactor más empleado es el tanque agitado continuo. En este tipo de reactores una parte de la biomasa generada en el reactor lo abandona arrastrada por el líquido en la corriente de efluente, por lo que la concentración de células en el interior del reactor está sensiblemente afectada por el caudal de alimentación. La concentración de células por unidad de volumen de reactor se aumenta considerablemente si éstas se fijan sobre un soporte sólido. De esta

manera la concentración celular en el biorreactor puede, teóricamente, ser independiente respecto del caudal de alimentación.

Se ha descrito en la bibliografía un tipo de biorreactor continuo para la biooxidación de tiosales por *A ferrivorans* en un lecho estructurado plástico (Liljeqvist y col., 2011). Este reactor necesita estar asistido por otro de tanque para que la concentración de biomasa no disminuya en el tiempo. Este aspecto no concuerda con el concepto del modelo de película bacteriana soportada en el que la concentración de biomasa en el reactor llega a ser estable a través de biopelículas consolidadas sobre el soporte. Los rendimientos de oxidación de tiosales en este biorreactor fueron siempre inferiores al 50%.

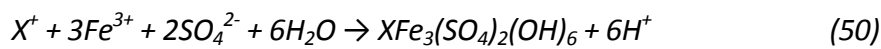
Se han ensayado ampliamente biorreactores con *A. ferrooxidans* soportado para la biooxidación del ion Fe(II) en los que es posible alcanzar condiciones estacionarias. *Acidithiobacillus ferrooxidans* tiene la capacidad de fijarse sobre distintos tipos de materiales, como carbón activo, vidrio, alginato cálcico, espuma de poliuretano, espuma de poliestireno, poliestireno extrusionado, fibra de níquel, PVA, PVC, alginato sódico y piedra silíceo (Lancy y Tuovinen, 1984; Armentia y Webb, 199; Gomez y col., 2000; Mazuelos y col., 2001; Wood y col., 2001; Long y col., 2004; Yujian y col., 2007). Sobre este último material se consiguen las mayores tasas de fijación de células. La piedra silíceo es, además, un material no manufacturado, de bajo precio y fácilmente disponible.

Los microorganismos producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que son mezclas complejas de biopolímeros constituidos básicamente por polisacáridos, así como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Los EPS constituyen el espacio intercelular de los agregados microbianos y forman la estructura y la arquitectura de la matriz de la biopelícula. Las funciones clave de los EPS son la mediación en la adhesión inicial de las células a diferentes soportes y la protección frente al estrés medioambiental y la deshidratación (Dubois y col. 1956).

Los EPS producidos por *Acidithiobacillus ferrooxidans* son azúcares neutros, (predominantemente ramnosa, fructosa y glucosa) y lípidos (Harneit y col., 2006). Los

constituyentes químicos varían dependiendo del tipo de sustrato sobre el que las células crecen. El modo de unión también difiere en función del sustrato.

Las células en presencia de un sólido tienden a adherirse sobre él estableciendo uniones a través de exopolisacáridos que excreta (Chan y col., 2009). Creciendo sobre Fe(II), una vez fijado sobre el sólido, y como resultado de la actividad metabólica de las células, en la que se consumen protones y se genera Fe(III), se producen gradientes de pH y concentración de Fe(III) locales en el entorno más inmediato del sólido que dan lugar a la precipitación de jarositas sobre él (Toro y col. 1989), Eq.(50).



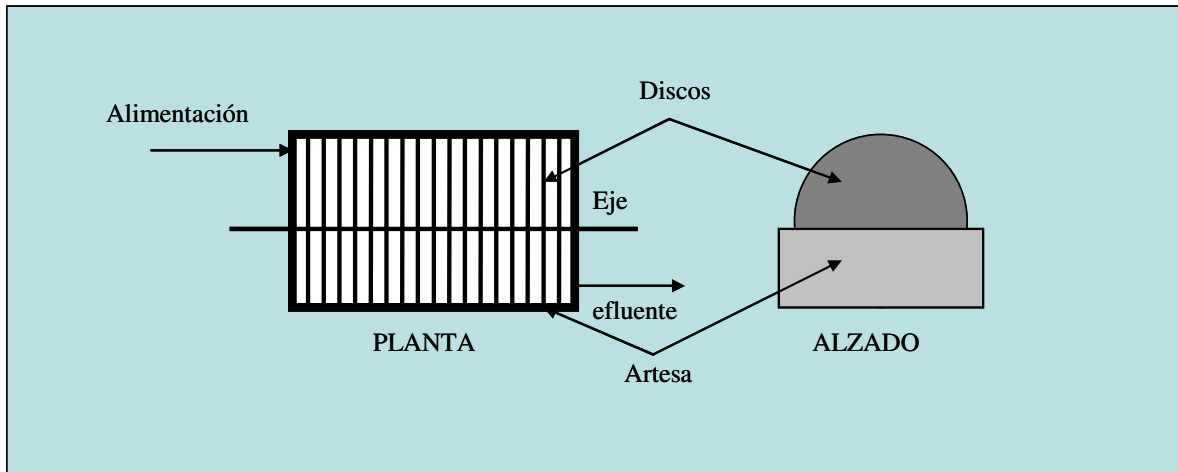
$XFe_3(SO_4)_2(OH)_6$  es la fórmula empírica de las jarositas, donde X es un catión monovalente ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$  y  $H_3O^+$ )

Con el paso del tiempo, estos precipitados férricos, que se fijan fuertemente al sólido, constituyen una estructura continua tridimensional porosa que acaba convirtiéndose en el verdadero soporte de las células (Karamanev, 1991). El conjunto de las células y la capa de jarosita es la naturaleza típica de una película bacteriana o biopelícula en la biooxidación del ión ferroso.

Se ha descrito en la bibliografía que *A. thiooxidans* y *T. thioparus* tienen la capacidad de adherirse sobre sólidos, como la espuma de poliuretano en biofiltros percoladores para la eliminación de ácido sulfhídrico (Ramirez y col., 2009; Starosvetsky, Zukerman, Armon, 2013). *A. thiooxidans* también se ha logrado inmovilizar sobre partículas cerámicas (Silver, 1985; Lee y Wookryu, 2005).

Se han ensayado diversos tipos de biorreactores en los que *Acidithiobacillus ferrooxidans* se encuentra inmovilizado sobre un soporte sólido formando biopelículas. De entre ellos los de uso más extendido en la biooxidación del ion Fe(II) son el contactor biológico rotatorio (Olem y Unz, 1977), lecho fluidizado (Nikolov y Karamanev, 1987) y lecho fijo (Livesey, Tunley y Nagy, 1977).

El contactor biológico rotatorio consiste en un conjunto de discos parcialmente sumergidos en un líquido contenido en una artesa, cuyos planos se orientan en vertical y que giran solidariamente impulsados por un mismo eje y a velocidad muy baja (Fig. 5).



**Figura 5.** Esquema de un contactor biológico rotatorio

La biomasa se soporta sobre los discos, de tal forma que al girar estos se establecen ciclos en los que las células entran en contacto con el líquido y posteriormente con el aire. Dada la complejidad mecánica de este tipo de biorreactores y que el área para constituir biopelículas se encuentra muy limitado, los costes de operación suelen ser mayores y las productividades por unidad de volumen más bajas que para reactores de lecho fijo y lecho fluidizado.

Los bioreactores de lecho fluidizado presentan excelentes condiciones para la transferencia de materia. La bibliografía describe reactores de lecho fluidizado inverso o airlift (Fig. 6) usando como soporte de la biopelícula basalto y carbón activo (Nikolov, 1987).

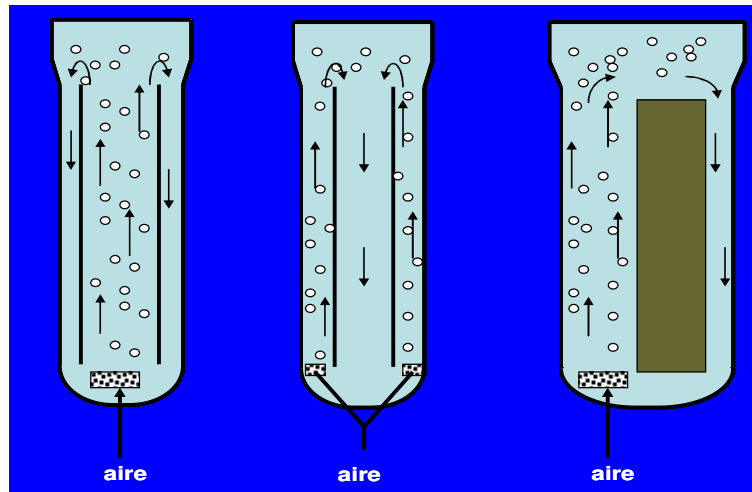


Figura 6. Esquema de reactores airlift.

No obstante, en el transcurso de la operación pueden presentar problemas de control por desestabilización de la biopelícula, por el efecto abrasivo derivado del choque entre las partículas y con las paredes del recipiente, y en la estabilidad del flujo, por la variación en el tiempo de la densidad de las partículas, que es función del desarrollo de la biopelícula sobre ellas.

### 2.6.3. Biorreactor de lecho fijo inundado.

Los biorreactores de lecho fijo son fáciles de operar, en ellos la biopelícula es muy estable al estar fijada sobre partículas inmóviles y acumulan elevadas concentraciones celulares.

El reactor de lecho fijo puede operar de dos formas distintas en continuo:

- Con el líquido y el gas portador del oxígeno, normalmente aire, circulando en contracorriente; el líquido desciende y el gas asciende. Estos reactores se conocen como reactores de lecho fijo de riego por percolación ( Livesey-Goldblatt, Tunley y Nagy, 1977).
- Con ambos fluidos circulando en corrientes ascendentes. Estos reactores se conocen como reactores de lecho fijo inundado (Mazuelos y col., 1999).

En los reactores de lecho fijo de riego por percolación el flujo de líquido suele distribuirse irregularmente en el lecho dando lugar a canalizaciones y zonas muertas. Además, el tiempo medio de residencia del líquido no es una variable controlable durante la operación, ya que la velocidad lineal de paso de éste, para un reactor dado, está fijada por la fuerza de la gravedad. Otro problema inherente a este tipo de reactor es que el área para la transferencia del oxígeno del gas al líquido no es modificable, entrando en contacto en una superficie cuya extensión es similar a la superficie expuesta por el lecho.

Las dificultades asociadas a la operación del reactor de lecho fijo de riego por percolación se pueden superar utilizando el reactor de lecho fijo inundado:

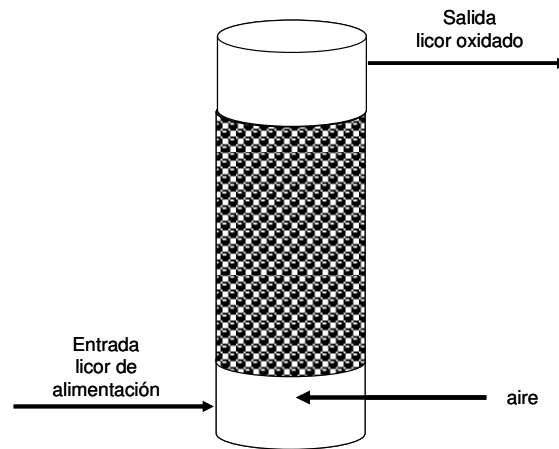
- En él, el tiempo medio de residencia del líquido es mayor por unidad de volumen de reactor y es controlable desde el caudal de alimentación, pudiéndose conseguir un riego más homogéneo y controlado de la biomasa.
- El área de transferencia gas-líquido depende de las condiciones de inyección del gas, siendo posible conseguir superficies interfaciales gas-líquido muchísimo mayores.

Estas ventajas permite al reactor de lecho fijo inundado alcanzar las mayores velocidades de biooxidación del ion Fe(II) encontradas en la bibliografía (Tabla 2).

**Tabla 2.** Comparativa de productividades alcanzadas en reactores de lecho fijo según los modelos de percolación e inundado.

Cita: Autor/año	Dimensiones diámetro/altura (cm)	Modo de flujo	Soporte	Productividad g/hm <sup>2</sup>
Livesey/1977	38/225	Percolación	PVC	480
Armentia/1992	5.2/30.6		poliuretano	289
Carranza/1990	5/30		Mineral marginal	132
			Carbón activo	351
Mazuelos/2000	8.4/84	inundado	Arena sílicea	3591

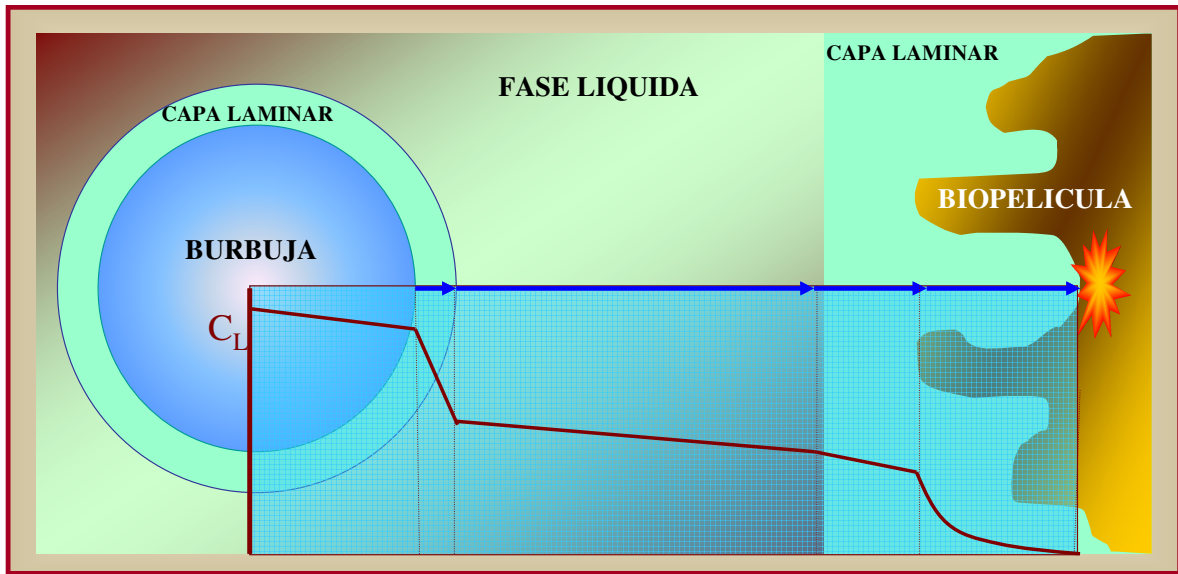
En la Fig. 7 se muestra un diagrama que resume las bases para el flujo en reactores de lecho fijo inundado.



**Figura 7.** Biorreactor de lecho fijo inundado.

#### 2.6.4. Aireación.

La biooxidación de tiosales se puede catalogar como reacción heterogénea, en la que tanto el catalizador como los reactivos se encuentran inicialmente en fases distintas. Por lo tanto, se tendrán que considerar, además de la propia reacción bioquímica, los fenómenos de transporte de materia. Así, el oxígeno inicialmente en fase gas atraviesa la interfase gas-líquido, viaja en el líquido hasta alcanzar la biopelícula, se difunde a través de los poros de la misma, hasta alcanzar la célula, reaccionando en su interior (Fig.8).



**Figura 8.** Diagrama del transporte de oxígeno en biorreactores aerobios de película bacteriana soportada y perfil de concentraciones en función de la posición.

Todos los estímulos que reciba el reactor en la dirección de mejorar este proceso de transferencia de materia se traducirán en un aumento del rendimiento en condiciones limitantes de oxigenación. Operar biorreactores aeróbicos en condiciones limitantes de oxigenación es una situación muy probable en la casuística de este tipo de reactores (Doran, 1995; Bailey y Ollis, 1986). Así en el caso concreto de la biooxidación del ión ferroso por *Acidithiobacillus ferrooxidans* en reactores de lecho fijo la aireación es el elemento clave del diseño (Mazuelos y col., 2002).

Por tanto cabe esperar que el rendimiento del biorreactor para oxidar tioales sea sensible a las modificaciones en las condiciones de aireación, sobre todo en lo que respecta al tipo de difusor para la inyección el aire en el medio líquido, caudal al que se inyecte el aire, condiciones de flujo para el líquido. Estos factores influyen conjuntamente sobre el área interfacial gas-líquido y sobre el nivel de participación de los mecanismos difusional y convectivo en la transferencia. La composición del licor a biooxidar también afectará a la cinética de la transferencia del oxígeno del gas líquido; la solubilidad de este gas en el medio es tanto menor cuanto mayor es su contenido salino, por el efecto salting-out (Narita y col., 1983; Tromans, 2000; Ojumu y col., 2008; Mazuelos y col., 2010; Mazuelos y col., 2012).





### 3. Materiales y métodos.

#### 3.1. Métodos analíticos.

Para el control analítico de las aguas a tratar y del proceso de depuración de tiosales, se han empleado los siguientes métodos analíticos:

##### 3.1.1. Determinación de tiosulfato y sulfito mediante yodometría.

Las disoluciones de yodo, tras ser preparadas por pesada a un valor de normalidad objetivo de  $0,5 \cdot 10^{-3}$ , fueron contrastadas con tiosulfato estandarizado previamente con yodo naciente.



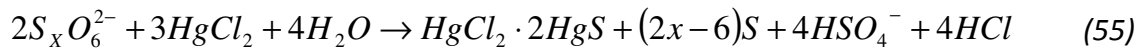
Una vez estandarizada la disolución de yodo, tanto el tiosulfato como el sulfito reaccionan con el yodo de forma cuantitativa:



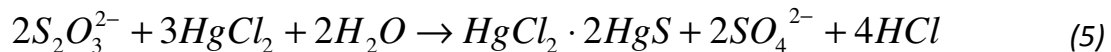
Es posible discriminar entre estas especies añadiendo a la muestra formaldehído (disolución al 38%); el formaldehído enmascara al ion sulfito permitiendo valorar al ion tiosulfato independientemente (Harris, 2010; Kurtenacker, 1924; KoH, 1990). La valoración se realiza a pH 4,5; ajustado con NaOH ó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluidos, según el caso. Se utilizó como indicador una disolución de almidón al 0,5%.

### 3.1.2. Determinación de tiosales totales mediante el método descrito por Makhija y Hitchen, 1978.

El método de Makhija y Hitchen, 1978 se aplica a la determinación conjunta de politionatos y tiosulfato. Se basa en una acidimetría aplicada sobre la muestra una vez han sido oxidadas las tiosales que contiene con  $HgCl_2$ . De acuerdo con la reacción genérica:



Para el tetrionato y tiosulfato serían respectivamente:

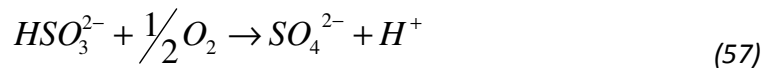


La muestra (en alícuota de 5-10 mL) conteniendo entre 0,1 y 25mg de tiosales, se lleva inicialmente a un pH de 4,3 (valor de referencia inicial y final) (Jay, 1953, KoH, 1990). Se agregan 5 mL de  $HgCl_2$  al 5% y se agita durante cinco minutos. Se lleva a ebullición para que completen las reacciones indicadas de generación de ácido. Se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se agrega gota a gota una disolución de KI al 20%; al principio aparece un precipitado naranja de  $HgI_2$  que se redisuelve en exceso de yoduro, momento en que se deja de añadir. El objeto es el de secuestrar el exceso de mercurio, cuya precipitación como hidróxido consumiría álcali en la acidimetría posterior, que se realiza llevando de nuevo la disolución hasta un valor de pH de 4,3 con hidróxido 0,05 N, estandarizada con ftalato ácido de potasio.

La masa de hidróxido sódico añadida se multiplica por el siguiente factor, de manera que se obtiene directamente la concentración de tiosales en g/L:

$$FACTOR = \frac{N_{NaOH} \cdot 112}{2 \cdot V_{MUESTRA}} \quad (56)$$

La presencia de sulfito contribuye a la generación de ácido, aunque de forma un tanto errática. A valores de pH entre 4-5, el sulfito puede encontrarse como bisulfito, que al oxidarse a sulfato, bien con oxígeno o con cloruro de mercurio, libera protones según la siguiente reacción:



Para eliminar esta fuente de error se ha optado por introducir una modificación del método consistente en la adición controlada de disolución de yodo, antes del ajuste de pH, que oxida el sulfito a sulfato. También oxida al tiosulfato, pero el tetrionato producido mantiene estequiométricamente la generación de ácido en el ataque posterior con cloruro de mercurio.

### **3.1.3. Determinación de la concentración de tiosales mediante cromatografía iónica.**

Para la determinación de la concentración de iones, principalmente sulfato, tiosulfato, tritronato y tetrionato se usó el cromatógrafo 883 Basic IC Plus (Methrom) que posee un módulo de supresión química (MSM) para detección por conductividad. El eluyente utilizado posee 3,2 mM de carbonato de sodio, 1,0 mM de bicarbonato de sodio y 5% de acetona. Los renovadores de la columna tras cada análisis son 250 mM de ácido sulfúrico y agua destilada de calidad ultrapura. Como precolumna se utilizó Metrosep RP2 Guard/3.5, caracterizada por no aumentar el tiempo de elución de los iones en el cromatograma. Como columnas se utilizaron dos precolumnas Metrosep A Supp 4/5 Guard 4.0. La calibración de tiosulfato y tetrionato se realiza de forma conjunta desde 10 a 200 mg/L. Las muestras fueron diluidas entre 20 y 40 veces según el ensayo.

### **3.1.4. Determinación de pH, conductividad y concentración de metales.**

Para la determinación de pH se ha utilizado un pH-metro WTW-3310 equipado con software para el calibrado multi-patrón. El electrodo es de vidrio, combinado con una sonda para la compensación automática de la temperatura. La marca de la sonda es WTW, modelo Sentix 41. Esta sonda permite medir en el rango de temperaturas entre 0 y 80 °C. Los patrones usados para el calibrado del equipo fueron de la marca Panreac, y correspondían a los pH 1, 2, 3, 4, 7, 10 y 12, seleccionados en parejas o tríos según el rango de pH de la medida.

Se midió la conductividad utilizando un conductímetro de la marca Radiometer Analytical, modelo MeterLab CDM210, siendo calibrado a 30°C.

Para la determinación de Ca, Cu y Fe se ha empleado la espectrofotometría de absorción atómica. El equipo usado es la marca Perkin Elmer, modelo 2380.

## ***3.2. Origen, obtención y adaptación de cepas bacterianas.***

### **3.2.1. El cultivo FNN-9K.**

Desde la década de los 80 del siglo pasado el grupo de investigación Biohidrometalurgia mantiene, en medio 9K (Silverman, 1959) a 31 °C, cultivos mixtos de especies ferro y sulfooxidantes obtenidos a partir de efluentes de la mina de Riotinto (Huelva). El punto de muestreo concreto fue Filón Norte.

La estructura poblacional de estos cultivos fue determinada, previamente a la realización de esta tesis, mediante métodos microbiológicos clásicos de aislamiento e identificación. Los microorganismos mayoritarios fueron *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*. También se detectaron heterótrofos de la familia *Acidiphillium* (Mazuelos y col., 2012).

### **3.2.2. Cultivos autóctonos presentes en las aguas reales. Las cepas DPS o DP2.**

Con el objetivo de generar cultivos autóctonos, adaptados ya a las condiciones del proceso, como posible inóculo de reactores biológicos para oxidar tiosales, se procedió a concentrar las bacterias procedentes de las aguas reales.

Para obtener cepas concentradas autóctonas a partir de la muestra DPS se sembraron las células que contiene sobre un medio sintético con mayor concentración en tiosales. Este proceso se inició pelletizando las células contenidas en 3,5 L de la muestra DPS, por centrifugación a 16000 g. El pellet obtenido se dividió en tres fracciones que se sembraron sobre medio tetrionato, medio tiosulfato y mezcla de estas tiosales.

### **3.2.3. Medios de crecimiento.**

Los métodos aplicados para el crecimiento de células son la siembra en placa y el cultivo discontinuo en medio líquido.

Como primera etapa en la concentración de células se realizó la siembra en césped sobre placa de Petri con medio de crecimiento solidificado. Para la preparación de los medios de cultivo solidificados se han utilizado diferentes tipos de Agar y Gelrite, un polisacárido producido por la bacteria *Pseudomonas eiodea*, que ha dado los mejores resultados para el crecimiento de microorganismos extremófilos en medios de media salinidad. Una vez son visibles las colonias, y contrastada su morfología por microscopía, la placa se inunda de medio salino y se agita en un agitador orbital, dispersándose las colonias. Se obtiene así un inóculo de elevada concentración apto para la siembra en medio líquido. También se ha utilizado la siembra de placa para mantenimiento de cepas (siembra en estrías) y para aislamiento (siembra en dilución).

Se han empleado diferentes tipos de medio de crecimiento en fase líquida: tiosulfato, tetracionato, 9K y Leathen. En la tabla 3 se muestra la composición de los estos medios de cultivo. Salvo cuando se indique algo distinto, los datos numéricos se expresan en gramos.

**Tabla 3.** Composición química de los medios de cultivo empleados.

Sal	Tiosulfato	Tetracionato	9k	Leathen
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,2	3,0	3,0	0,2
KCl	-	-	0,1	0,05
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	3,0	3,0	0,5	0,05
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,5	0,5	0,5
$\text{CaNO}_3$	-	-	0,01	0,01
$\text{CaCl}_2$	0,2	0,2	-	-
$\text{H}_2\text{O}$ (mL)	1000	1000	700	1000
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5,0	-	-	-
$\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	4,0	-	-
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	-	300 mL (14,7%)	10 mL (10%)

### ***3.3. Identificación de cepas bacterianas.***

Para la identificación de microorganismos se han empleado técnicas de biología molecular, consistentes en la extracción de ADN, amplificación por PCR del ADN para la subunidad 16S del ARNr, secuenciación y análisis filogenético (Weisburg y col., 1991; Sambrook y Russell, 2001; Dereeper y col., 2008; Steffan y Atlas, 1991). A continuación se describen estas etapas.

- **Extracción ADN:** Para la extracción de ADN se emplean 5 ml de cultivo, que se sedimentan por centrifugación durante 3 minutos en centrífuga de mesa a máxima velocidad. El ADN del sedimento celular se extrajo con el kit AquaPure (BioRad). Para ello, las células se rompieron con el tampón de lisis incubando 15 minutos a 80 °C y 30 minutos a temperatura ambiente. El ARN se eliminó empleando ARNasa y las proteínas se eliminaron con la solución de precipitación correspondiente. Finalmente, el ADN se precipitó con isopropanol y centrifugación en centrífuga de mesa durante 10 minutos a máxima velocidad. El ADN precipitado se resuspendió en el tampón de hidratación.
- **PCR:** Las amplificaciones se realizaron mediante PCR en 50 microlitros de volumen de reacción conteniendo ADN molde, 25 microM de los cebadores “forward” y “reverse”, 200 microM dNTP, 2mM MgCl<sub>2</sub> y 1 U de *Taq* polimerasa. Las condiciones de ciclación fueron 94 °C durante 3 minutos, seguido de 35 repeticiones del siguiente ciclo: 94 °C, 30 segundos; 51 °C, 30 segundos; 72 °C, 129 segundos. Finalmente se empleó un ciclo de extensión a 72 °C durante 5 minutos.
- **Clonación:** Los productos de PCR (amplicones) se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampon TBE. Los amplicones se cortaron de los geles de agarosa y se purificaron mediante el kit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para las reacciones de ligación se emplearon los amplicones purificados. Estas reacciones de ligación se llevaron a cabo en volúmenes de 10 microlitros contenido el plásmido pGEMT-Easy (Promega), el tampón y la ligasa vendidos con el plásmido, siguiendo las instrucciones del proveedor. Las reacciones de ligación se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Una alícuota de 1 microlitro de la reacción de ligación se usó para transformar las células competentes XL-10 GOLD (Agilent), siguiendo el protocolo del proveedor. Las células transformadas se sembraron en medio LB agar



conteniendo, ampicilina, tetraciclina, IPTG y X-Gal. Las colonias blancas se seleccionaron como presuntas positivas. Para comprobar si eran o no positivas, las colonias se crecieron en medio LB durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, el ADN plasmídico se extrajo usando el PureYield Plamid Miniprep System (Promega), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Finalmente, los plásmidos aislados se sometieron a restricción con los enzimas *EcoRI/HindIII* y electroforesis en gel de agarosa.

- Secuenciación: Los plásmidos aislados se sometieron a secuenciación empleando un sistema automático provisto por Sistemas Genómicos.

El protocolo descrito en el apartado anterior se ha sido aplicado para la identificación de la cepa DPS.

### ***3.4. Cinética de cultivos discontinuos. Metodología y plan de experiencias.***

Para el estudio cinético de los cultivos se programó un conjunto de experiencias. Para nombrar los ensayos se utilizará el siguiente criterio: cepa-concentración de tiosal-pH.

Para cada ensayo, se realizó un seguimiento del pH y de la concentración de los iones tetrionato, tiosulfato y sulfito a lo largo del tiempo. El volumen total de los cultivos fue de 120 mL, de los cuáles 24 mL correspondieron al inóculo y 96 mL al medio de crecimiento. Como recipiente se emplearon matraces de Erlenmeyer de 250 mL idénticos, esterilizados y tapados con una torunda de algodón. La temperatura fue de 31 °C. Las experiencias se realizaron en agitación (180 rpm). Para conseguir las condiciones de temperatura y agitación adecuadas se empleó un incubador orbital (Gallenkamp).

El programa de ensayos utiliza como variables sensibles las siguientes:

- Cepas: FNN y DPS. Esta última obtenida a partir de aguas reales de planta, lo que se detallará en el apartado 4.2 de resultados.
- Sustratos energéticos: Ion tetrionato, ion tiosulfato y mezcla de ambos.
- Concentración de sustrato energético.
- pH.

Como medios de cultivo se emplearon los medios tetrionato y tiosulfato (este último también para mezclas de tiosales), modificados en la concentración de sustrato energético y pH. El ajuste del pH se realizó con ácido sulfúrico diluido. El inóculo se preparó a partir de un cultivo de la misma composición biológica, crecido, pelletizado y resuspendido en el mismo volumen de medio salino.

En la tabla 4 se resume el plan de ensayos:

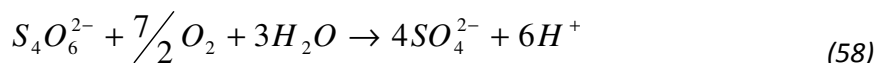
**Tabla 4.** Plan de experiencias para el estudio cinético de cultivos de bio-oxidación de tiosales.

Nombre del ensayo	cepa	iones sustrato	Concentración inicial (g/L)	pH inicial	Agitación
<b>FNN-3,5-3</b>	FNN	tetrionato	3,5	3	si
<b>FNN-3,5-2</b>	FNN	tetrionato	3,5	2	si
<b>FNN-3,5-1,5</b>	FNN	tetrionato	3,5	1,5	si
<b>FNN-2-3</b>	FNN	tetrionato	2	3	si
<b>FNN-5-3</b>	FNN	tetrionato	5	3	si
<b>FNN-0,25-3</b>	FNN	tiosulfato	0,25	3	si
<b>FNN-0,25-2</b>	FNN	tiosulfato	0,25	2	si
<b>FNN-0,25-1,5</b>	FNN	tiosulfato	0,25	1,5	si
<b>FNN-0,75-3</b>	FNN	tiosulfato	0,75	3	si
<b>FNN-1,25-3</b>	FNN	tiosulfato	1,25	3	si
<b>DPS-0,25-3</b>	DPS	tiosulfato	0,25	3	si

<b>DPS-0,25-2</b>	DPS	tiosulfato	0,25	2	si
<b>DPS-0,25-1,5</b>	DPS	tiosulfato	0,25	1,5	si
<b>DPS-0,75-3</b>	DPS	tiosulfato	0,75	3	si
<b>DPS-1,25-3</b>	DPS	tiosulfato	1,25	3	si
<b>FNN-3,5-0,25-3</b>	FNN	tetrionato + tiosulfato	3,5 + 0,25	3	si
<b>DPS-3,5-0,25-3</b>	DPS	tetrionato + tiosulfato	3,5 + 0,25	3	si
<b>FNN-3,5-1-2</b>	FNN	Tetrionato+ tiosulfato	3,5+1	2	si
<b>FNN-3,5-1-1,75</b>	FNN	Tetrionato+ tiosulfato	3,5+1	1,75	si
<b>FNN-3,5-1-1,5</b>	FNN	Tetrionato+ tiosulfato	3,5+1	1,5	si

### ***3.5. Relación de la medida de conductividad con la concentración de politionatos.***

Observando la reacción de oxidación del tetrionato, se puede deducir que la oxidación de esta especie con el tiempo produce un aumento de la conductividad debido principalmente a la generación de ácido. Es por ello que se pretende resolver un estudio sobre la cinética de tiosales atendiendo a medidas de conductividad.



La conductividad de una disolución (K), se define como la inversa de la resistividad específica ( $\rho$ ) o como la conductancia de un cubo de disolución de electrolito de  $1 \text{ cm}^3$

de lado. Es una magnitud aditiva, lo que significa que en una disolución electrolítica, donde contribuye tanto el soluto como el disolvente, se puede escribir:

$$K_{\text{Disolucion}} = K_{\text{solute}} + K_{\text{Disolvente}} \quad (59)$$

Para un mismo electrolito, la K de sus disoluciones es función directa de la concentración de la disolución y de la T,  $K = f(T, c)$ . Su valor depende del número de iones (concentración) por unidad de volumen, además de la naturaleza de los iones (electrolitos). Como K depende del movimiento de los iones y este depende de la temperatura, todas las medidas de conductividad deben ser a temperatura constante. Se plantea como objetivo llevar a cabo un estudio cinético de cultivos conteniendo *Acidithiobacillus* utilizando medidas de conductividad.

### 3.5.1. Ensayos con disoluciones sintéticas.

Se utilizan disoluciones de tetrionato sintético en agua destilada acidificada con ácido sulfúrico en un rango de concentración entre 0 y 6 g/L y un pH entre 1,3 y 1,8 para correlacionar la conductividad en función de la concentración de tetrionato y la acidez. También se utilizan disoluciones ácidas exentas de tetratioanto. Para ello, la conductividad, el pH y la concentración de politionatos fueron medidos en estas disoluciones a una temperatura de 30 °C.

### 3.5.2. Ensayos con cultivos.

Un volumen de 4,8 L de efluente real exento de tiosulfato conteniendo politionatos se inocula con 1,2 L de un cultivo FNN agotado en tetrionato sintético (20% v/v), bajo las siguientes condiciones: 30 °C en baño termostatado, 400 rpm de velocidad de agitación y suministro de aire mediante bomba y difusor.

La conductividad se mide en continuo durante el ensayo y a tiempos específicos, el pH y la concentración de tetrionato por el método acidimétrico. Para el análisis de politionatos las muestras se filtraron con filtro de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  para retener las bacterias y detener la bio-oxidación. Este ensayo se repite siete veces de manera que la concentración de politionatos, conductividad y pH fueron medidas en dos puntos, uno al inicio y otro al final del crecimiento. El objetivo es observar el valor de las pendientes en la relación politionatos frente a conductividad.

El conductímetro utilizado fue el descrito en el apartado 3.1.3., calibrado a 30 °C y conectado a un sistema de adquisición de datos. Labview se utiliza para el diseño de un diagrama de bloques para la recopilación de datos de conductividad en continuo.

### **3.5.3. Tratamiento estadístico.**

El test-t de muestras emparejadas se utiliza para determinar si existen diferencias significativas entre la determinación de politionatos por Makhija y Hitchen (1978) y el resultado indirecto obtenido por la medida de conductividad en continuo durante la degradación de tetrionato en un cultivo (Montgomery y Runger, 2010). Se acepta como hipótesis nula que no existen diferencias significativas en las medidas de los dos métodos, asumiendo un 95 % del nivel de confianza ( $\alpha = 0.05$ ).

### **3.6. Efecto de la temperatura.**

A través del estudio propuesto en el apartado anterior donde es posible determinar tiosales totales en continuo realizando medidas de conductividad, se plantea un estudio con el objetivo de conocer la temperatura a la cual se consigue el máximo crecimiento de población de un cultivo microbiano para optimizar el diseño de bioreactores, y de este modo economizar el proceso (Franzmann y col., 2005). Para generalizar el estudio, en los ensayos se utiliza como sustrato tetrionato sintético,

principal especie presente en aguas de proceso, especie bastante estable a pH por debajo de 2 y en un amplio rango de temperatura (Vongporm, 2008).

### 3.6.1. Cepa.

La cepa FNN adaptada a tetrionato se hace crecer en el medio descrito de la tabla 5, denominado “medio tetrionato modificado”. Este medio está caracterizado por la ausencia de calcio y una cantidad menor del resto de sales con el objetivo principal de evitar la precipitación de sulfato de calcio durante la biooxidación de tetrionato y eliminar la mayor cantidad posible de interferencias en los ensayos.

**Tabla 5.** Composición química del medio tetrionato modificado.

<b>Sales</b>	<b>(g/L)</b>
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,15
<b>KCl</b>	0,05
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0,05
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0,5
<b>Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	4,0
<b>H<sub>2</sub>O (mL)</b>	1000

La resiembra se realiza en medio líquido en matraces de Erlenmeyer de 250 ml. Para ello, 20 ml de cultivo finalizado se añaden a 80 ml de medio tetrionato modificado bajo las siguientes condiciones: agitación orbital a 180 rpm y temperatura de 30 °C

(mismo protocolo que en el apartado 3.4). Los cultivos así sembrados muestran un pH inicial de aproximadamente 2 y evoluciona hasta 1,3, una vez el tetrionato se ha consumido por completo. El pH se mide al inicio y final de cada cultivo para comprobar el buen desarrollo de cada resiembra. El tiempo medio de finalización es de 30 horas en estas condiciones. Para asegurar inóculos de iguales características en cada ensayo, la resiembra se realiza en torno a ese tiempo.

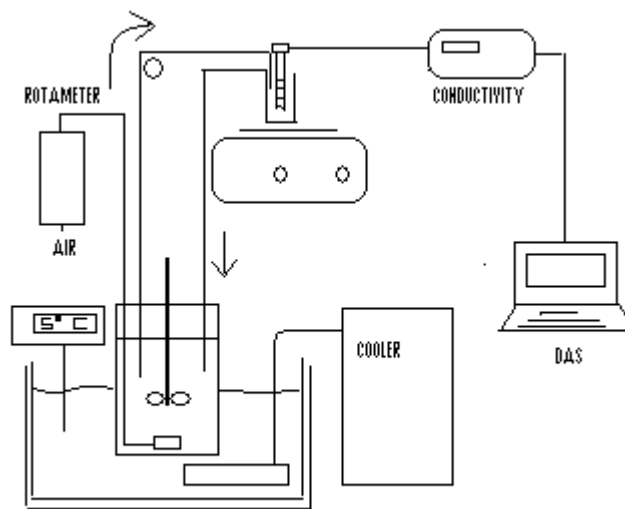
Se pretende conocer el tipo de microorganismos que hay en la cepa FNN una vez adaptada a tiosales, es decir, si ha existido proliferación de alguna especie *Acidithiobacillus* presente en menor cantidad pero originaria en la FNN. Para ello, se sigue el método de identificación molecular descrito en el apartado 3.3 de esta tesis.

### **3.6.2. Estudio del efecto de la temperatura sobre la biooxidación discontinua de tiosales.**

Para el estudio del efecto de la temperatura sobre la biooxidación de tiosales se utiliza un reactor cilíndrico (800 ml) con cuatro deflectores. Para cada ensayo, se añaden al reactor 640 ml de medio tetrionato y 160 ml de inóculo. El recipiente se encuentra sumergido en un baño con agua. La temperatura se controla a través de un termostato. El líquido contenido dentro del reactor se mantiene agitado mediante un agitador vertical con dos turbinas Rushton, con una separación entre ellas de cuatro centímetros. La velocidad de agitación fue de 450 rpm. Para la aireación del cultivo se suministra aire a un caudal de 1 L/min a través de un difusor colocado en el fondo del recipiente. Éste está conectado a un rotámetro para el control del caudal de aire.

Desde el reactor se impulsa la muestra mediante una bomba peristáltica hasta un vaso de 15 ml de capacidad donde se sitúa un electrodo de conductividad. El vaso se encuentra agitado mediante agitación magnética. La posición del conductímetro es ligeramente inferior al tubo de silicona que introduce el líquido en el vaso, para evitar

posibles entradas de aire en el conductímetro y fallos en la señal. El líquido sale del vaso por inundación y regresa al reactor. El conductímetro está conectado a un ordenador y mediante un sistema de adquisición de datos (Labview 7.0) se registra de manera continua en el tiempo, la conductividad y la temperatura (Fig. 9).



**Figura 9.** Dispositivo experimental para la adquisición de datos de conductividad en continuo en cultivos provistos de saturación de aire y a temperatura controlada.

Se estudia la biooxidación de tetrionato a las siguientes temperaturas: 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 32,5; 35,5; 37,5 y 40,0 °C. La concentración de tetrionato se correlaciona con la conductividad, según la metodología detallada en el apartado 4.4 de resultados.

### ***3.7. Formación de biopelículas sobre diferentes soportes.***

Se realizan cultivos en tubos de ensayo (3 ml) sobre 7 materiales de soporte diferentes: sílice, carbón activo, anillos mini de polipropileno, piritita, bolas de vidrio, silicona y carbón pirólítico. Los sustratos empleados son tiosulfato ( $1,5\text{g/L S}_2\text{O}_3^{2-}$ ),



tetrionato ( $3,5 \text{ g/L S}_4\text{O}_6^{2-}$ ) y mezcla de ambos ( $0,25 \text{ g/L S}_2\text{O}_3^{2-}$  y  $3,5 \text{ g/L S}_4\text{O}_6^{2-}$ ) contenido en las sales del medio tiosulfato, tetrionato y tiosulfato respectivamente (2ml). Se realizan ensayos utilizando como inóculo (1ml) la cepa FNN y manteniendo las mismas características anteriores pero con la cepa DPS. El método se basa en que todos los azúcares incluyendo los polisacáridos se deshidratan con ácido sulfúrico concentrado formando furfurales o alguno de sus derivados, que a su vez condensan con fenoles para dar compuestos de coloración naranja amarillento cuya intensidad se mide espectrofotométricamente.

En la tabla 6 se muestra la superficie determinada para los distintos materiales utilizados como soporte. El cálculo del área se realiza seleccionando los materiales más parecidos en tamaño y forma (en particular, la silicona y la pirita) y efectuando una media de cinco medidas.

**Tabla 6.** Superficie expuesta por cada material

<b>Material</b>	<b>Area (mm<sup>2</sup>)</b>
<b>SILICE</b>	186
<b>CARBON ACTIVO</b>	118
<b>ANILLOS MINI PP</b>	540
<b>PIRITA</b>	145
<b>VIDRIO</b>	121
<b>SILICONA</b>	212
<b>CARBÓN PIROLÍTICO</b>	245

El crecimiento de los cultivos se sigue mediante el control del pH a lo largo del tiempo de duración de cada ensayo. Una vez finalizados los cultivos se retiró el medio líquido y se analizó el contenido en glucosa sobre los soportes según el siguiente método:

Las partículas sólidas se tratan con 2 ml de agua, 1 mL de fenol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Tras su agitación, se mantiene a 95°C durante 5 minutos en baño termostatzado y luego se enfría a 30°C en otro baño. Una vez atemperado se mide la transmitancia a la longitud de onda de 490 nm.

El mismo ataque se realiza sobre las partículas sólidas sin contacto previo con los cultivos, para determinar si estos sólidos dan coloración con el método empleado.

Con el fin de cuantificar el contenido en azúcares se construye una curva de calibrado con disoluciones de glucosa en el rango de concentración entre 0 y 100 ppm. Sobre 2 mL de estas disoluciones se adiciona 1mL de fenol al 5% y 5mL de ácido sulfúrico concentrado. Se mide la transmitancia de los diferentes patrones a una longitud de onda de 490 nm y se representa la absorbancia ( $A=-\log T$ ) frente a la concentración.

Según la ley de Beer:

$$A = \epsilon b c \quad (60)$$

La absorbancia (A) es directamente proporcional a la concentración (c, mol/L), al coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ,  $M^{-1}cm^{-1}$ ) y al ancho de celda (b, cm).

El coeficiente de extinción molar determina la absorbancia de una sustancia a una longitud de onda dada.

### ***3.8. Eliminación de tiosulfato en presencia de cobre y ácido.***

Como posible complemento al tratamiento biológico de mezclas complejas de tiosales se ha estudiado la eliminación previa de tiosulfato y sulfito por vía química simple.

Todos estos ensayos se realizaron en matraces de Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con un volumen total de disolución de 150 mL a 30 °C de temperatura y con agitación orbital de 180 rpm. Todo el material utilizado en estas pruebas fue esterilizado y las disoluciones filtradas a través de filtros millipore, con el objeto de evitar la presencia de microorganismos que falseen los resultados. En todas las pruebas realizadas se analizó la concentración de los iones tiosulfato y sulfito a distintos tiempos de reacción, información que se presenta en el apartado 4.9. de este trabajo.

### ***3.9. Ensayos para el establecimiento de una hipótesis de cambio metabólico.***

La bibliografía informa que los microorganismos del género *Acidithiobacillus* pueden catalizar la dismutación de politionatos por vía hidrolítica en condiciones carentes de oxígeno dada por la siguiente reacción (Suzuki, 1999):



Esta reacción implica una reducción hasta azufre elemental y tiosulfato, una oxidación parcial del tetracionato hasta sulfato, y una menor generación de ácido respecto a la reacción de oxidación completa del tetracionato dado por:



El tiosulfato generado en la reacción (22) puede plantear otras reacciones secundarias, como la dismutación.

Este estudio tiene importancia en el funcionamiento de biorreactores conteniendo politionatos y sembrado con *Acidithiobacillus*. La realización está justificada con los hechos que se comentarán en el apartado de resultados.

### **3.9.1. Experimentación.**

Se realizaron dos ensayos en recipientes de 1L con tapón roscado provisto de una apertura lateral para la entrada de N<sub>2</sub> en este caso. Se añaden 200 mL de inóculo FNN activo (después de tres resiembras continuadas y satisfactorias) a 800 mL de medio tetracionato modificado de manera que la disolución contiene 3g/L de tetracionato sintético. Uno de ellos se mantiene inactivo frente a la toma de muestra para el posterior control del azufre generado. Se suministra una corriente de nitrógeno durante 15 minutos para asegurarnos de que el oxígeno disuelto en el líquido ha sido desplazado por moléculas de nitrógeno. Esto se repite cada vez que el recipiente es abierto a la atmósfera para la toma de muestra. Se toman muestras a diferentes tiempos. Los dos matraces se mantienen en una cámara a temperatura estable de 30 °C.

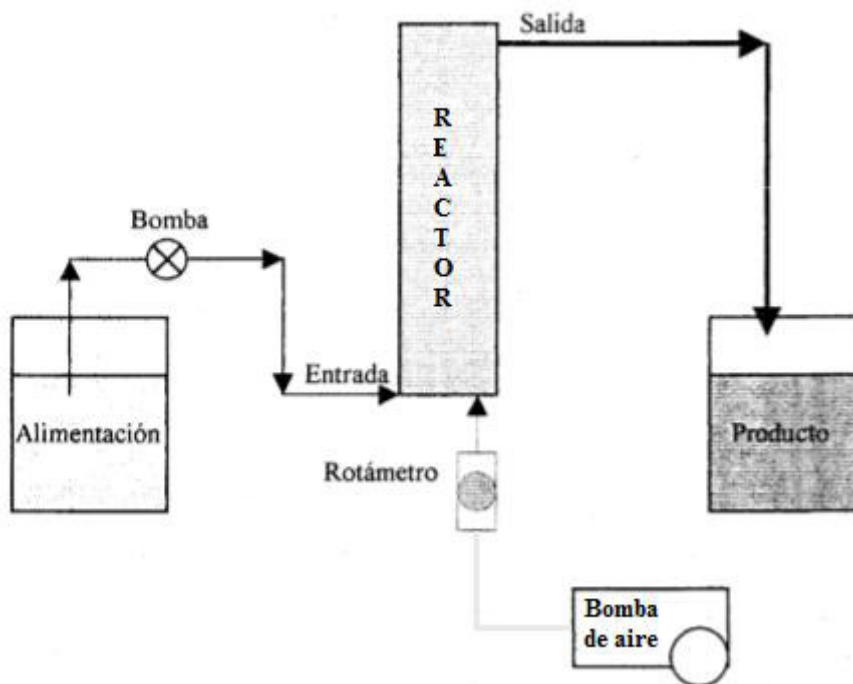
En cada muestra se mide pH y conductividad a 30 °C; se analizan politionatos totales por el método acidimétrico; tiosulfato y sulfito por yodometría; sulfato, tiosulfato y tetracionato por cromatografía iónica y el ácido generado con hidróxido sódico 0,05 M mediante valorador automático (Radiometer analytical, TIM900; Autoburette ABU901) conectado a un portátil para la adquisición de datos a través del programa Labview 7.0. La cantidad de tritionato se predijo por diferencia entre politionatos totales y la suma de los diferentes iones obtenidos por cromatografía iónica.

### 3.9.2. Detección de azufre elemental.

Una vez que el cultivo ha finalizado, se filtra utilizando filtro de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro acoplado a una bomba de vacío. El filtro se introduce en un vaso de precipitados de 50 ml y se añade unos 2 ml de  $\text{CS}_2$ . Una vez disuelto el contenido del filtro y evaporado el disolvente, aparecen cristales de azufre coloidal de color amarillo. El sólido es pesado en balanza de precisión.

### 3.10. Bioreactores.

#### 3.10.1. Descripción del dispositivo experimental en continuo.



**Figura 10.** Esquema del dispositivo experimental para operar en continuo

En la Fig. 10 se muestra un esquema del dispositivo experimental. La alimentación se encuentra contenida en una garrafa de 25 L de capacidad y es bombeada mediante una bomba peristáltica de caudal variable de la marca Heidolph Pump Drive 5001 a la

entrada del reactor. El licor saliente se dirige por acción de la gravedad a otra garrafa de iguales características que la de la alimentación. El paso del líquido se realiza por conductos de silicona. El aire se suministraba al reactor a través de una bomba siendo el caudal de éste regulable con el rotámetro de la marca Cole Parmer.

### **3.10.2. Caracterización del reactor.**

Para los biorreactores 1 y 2, se dispone un reactor de lecho fijo inundado de 1 L de capacidad de carcasa cilíndrica de 17 cm de altura con un radio de 4,5 cm, con doble entrada de aire, y una entrada de alimentación en la parte inferior y salida de producto por la parte superior. Las entradas y salida de fluidos en este reactor tienen lugar a través de espitas atravesando la pared de 10 mm de diámetro interno en el caso de la salida de producto y de 6 mm en el caso de las entradas de aire y alimentación. El reactor consta de dos partes diferenciadas:

- Piso 0: Donde tienen lugar las entradas de aire y alimentación.
- Piso 1: Zona ocupada por el lecho y salida de producto mediante rebose.

En el interior del reactor se introducen al azar las partículas del material soporte que conforman el lecho. Estas partículas estaban soportadas sobre una rejilla de plástico que a la vez servía de separación entre el Piso 0 y el Piso 1. Para conocer la cantidad de líquido existente en cada uno de los dos pisos del reactor se controla la cantidad de agua que ocupa cada uno de ellos. En primer lugar se llena el piso 0 hasta el enrase con la rejilla que separa los dos pisos. La determinación se realiza por pesada y mediante la densidad se calcula el volumen de dicho piso. Posteriormente se llena el piso 1 hasta que salga la primera gota de líquido por rebose de la parte superior del reactor. Se determina así que el volumen del piso 0 es de 0,300 L y el del piso 1 de 0,780 L.

Finalmente, se mide el volumen que ocupa el aire en el reactor. Para ello, se añade al Piso 1 las partículas que constituirán el lecho junto con el agua destilada. A continuación, se hace pasar una corriente de aire a un caudal de flujo dado. En el momento en el que cesa la salida de agua, el sistema ha alcanzado el estado estacionario, y se puede determinar el volumen de aire que es el mismo que el volumen de agua desplazada que ha salido del reactor.

En la Fig. 11 se observa el biorreactor utilizado donde se aprecian las entradas de aire y alimentación y la salida de líquido por rebose.



**Figura 11.** Reactor visto de frente (izquierda) y visto desde arriba (derecha)

Las características dimensionales del biorreactor 3 son las siguientes:

- Diámetro interno: 6,4 cm
- Altura total: 200 cm
- Piso cero: 7 cm
- Altura de relleno: 185 cm
- Altura columna líquido para rebose: 5 cm

- Masa de poliuretano: 80,3 g
- Área sección transversal del reactor: 32,17 cm<sup>2</sup>
- Volumen ocupado por el lecho: 5951 cm<sup>3</sup>
- Volumen total: 6177 cm<sup>3</sup>

En la Fig. 12 se observa el biorreactor 3:



**Figura 12.** Biorreactor 3. Escala piloto

En el biorreactor 3, la alimentación de aire se ha realizado mediante un equipo constituido por compresor, manorreductor, válvula de aguja y rotámetro. El caudal de aire para los biorreactores 1 y 2 es de 900 ml/min frente a los 400 mL/min del biorreactor 3.



### 3.10.3. Soporte para las biopelículas.

En el biorreactor 1, el lecho está constituido por partículas de arena silícea con tamaños de partícula comprendidos entre 6 y 8 mm. En los biorreactores 2 y 3, el lecho fijo está constituido por cubos de poliuretano de 1 cm de arista; la densidad de la espuma es de 25 kg/m<sup>3</sup>.

El poliuretano muestra unas características atractivas para ser utilizado como soporte. En primer lugar es resistente a los ácidos y puede ser reutilizable: en el caso de otros materiales, como la arena silícea, la limpieza y el desalojo del reactor es mucho más laborioso. Además, destaca su disponibilidad, su bajo precio, la variedad de densidades que se comercializan y la facilidad para conseguir partículas de dimensiones cualesquiera. En la Fig. 13 se muestra el aspecto de la arena silícea utilizada como soporte en el biorreactor 1 y de la espuma de poliuretano en los biorreactores 2 y 3.



**Figura 13.** Arena silícea y espuma de poliuretano utilizada como soporte.

### 3.10.4. Lavado del material soporte.

Tanto la arena silícea como las espumas deben curarse previamente en una disolución de ácido sulfúrico 1 N (pH de aproximadamente 1,25) para eliminar posibles impurezas (como por ejemplo restos alcalinos que pueden consumir ácido durante la operación en el reactor), y a continuación se lava con abundante agua hasta eliminar el ácido del material. Una vez caracterizado el reactor debe secarse el material que se utiliza como

soporte para perder el agua contenida, sobre todo en el caso de la espuma de poliuretano por su gran capacidad de adsorción.

### **3.10.5. Carga de Bioreactores.**

Para la carga inicial de la biopelícula ferrooxidante en el bioreactor 1, se utiliza el protocolo de tres etapas:

Impregnación: el inóculo FNN-9k, el medio de cultivo con 8 g/L en  $\text{Fe}^{++}$  y la arena silíceas entran en contacto en el reactor. El paso de aire se abre en el sistema. La relación de volúmenes inóculo/medio líquido es 1:4.

Recirculación: Agotado el sustrato en la etapa anterior, se aporta más sustrato al reactor mediante alimentación desde un depósito fuente de sustrato externo conectado en recirculación con el reactor. La relación de volúmenes reactor/depósito es de 1:4.

Continuo: Agotado el sustrato en la etapa anterior, se abre el circuito comenzando la operación en continuo.

Para la carga inicial del biorreactor 2, se utiliza un protocolo basado en utilizar los cubos como inóculos de ensayos en discontinuo. Estos ensayos se realizan en estático para obligar a la colonización del interior del material. Después de tres resiembras consecutivas, se extraen los cubos del cultivo en discontinuo, se drena por gravedad la fase líquida que retienen y se introducen en el biorreactor conformando el lecho fijo. Se añade solución con tiosales exenta de tiosulfato (1,8 g/L) y se mantiene la aireación sin alimentación de líquido durante 48 horas. A continuación se pone en continuo con DP1 tratado (4,4 g/L de tiosales).

Para la carga inicial del biorreactor 3, se introducen 4 litros de inóculo reciente y se pone en recirculación con un depósito que contiene 8 litros de DP1 con 2,88 g/L de tiosales exento de tiosulfato, a un caudal de 240 mL/h. A las 70 horas, el contenido en

tiosales del depósito de recirculación es de 0,96 g/L y a la salida del reactor, de 0,07 g/L. Para decidir la puesta en marcha a continuo se procede a medir la productividad puntual y media del sistema. Puesto que la primera es de 215 mg/h y la segunda ligeramente superior, 218 mg/h, se decide comenzar la operación en continuo. El proceso de carga ha durado tres días.

### **3.10.6. Análisis**

Para el control de biorreactores se analiza tiosales totales, caudal, pH y conductividad a la entrada y a la salida. Además se realiza medidas de tiosales, pH y conductividad al volumen acumulado de líquido durante todo el tiempo que ha estado en continuo el reactor.

Se realizan medidas de conductividad a la salida, conectando la señal del electrodo a un sistema de adquisición de datos en continuo, con el objetivo de controlar las tiosales a la salida del reactor.

Se limpian las entradas de líquido y aire mediante inyección de agua a presión de forma periódica y se controlan ambos caudales (líquido y aire) durante todos los días en los que ha estado en marcha el reactor.

### **3.10.7. Ensayo de distribución del tiempo medio de residencia, DTR.**

En el biorreactor 3, previo a la carga y la operación en continuo, se realiza una determinación del modelo de flujo en el biorreactor mediante ensayos de distribución de tiempos de residencia (DTR) por el método del impulso. Se define  $t_R$  como el tiempo que permanece un elemento de fluido en el interior del biorreactor y DTR, la distribución de tiempos en la corriente de fluido que sale del reactor.

La función distribución de tiempo de residencia  $E(t)$  se define como la función de distribución de los tiempos de permanencia de los elementos del fluido en el interior del biorreactor. Tiene dimensiones de frecuencia,  $T^{-1}$ . Es una función de distribución normalizada; es decir, cuando se representa  $E(t)$  frente a  $t$ , el área total bajo la curva vale 1;  $\int_0^{\infty} E(t)dt = 1$

En la caracterización del flujo en biorreactores reales se suelen utilizar tres momentos de la función de distribución de tiempos de residencia  $E(t)$ :

- El tiempo medio de residencia.
- La varianza.
- El sesgo.

El primer momento de la distribución de tiempos de residencia es el **tiempo medio de residencia**  $\bar{t}$ . Es el tiempo medio que los elementos del fluido han permanecido en el interior del biorreactor, y viene dado por el valor medio de la distribución:

$$\bar{t} = \int_0^{\infty} t \cdot E(t) dt$$

Coincide con el tiempo espacial cuando se manejan fluidos de densidad constante.

El segundo momento es la amplitud de la distribución, que frecuentemente se mide mediante la **varianza** ( $\sigma^2$ ) o cuadrado de la desviación estándar, y que se define como

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - \bar{t})^2 E(t) dt$$

La varianza representa el cuadrado de la amplitud de la distribución y sus dimensiones son  $T^2$ .

La relación entre varianzas referidas al tiempo y al tiempo adimensional es:

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{\sigma^2}{\bar{t}^2}$$

La magnitud del **sesgo** mide la extensión en que una distribución se desvía en una dirección u otra con respecto al valor medio, y se define como:

$$s^3 = \frac{1}{\sigma^{3/2}} \int (t - \bar{t})^3 E(t) dt$$

El sesgo es el grado de asimetría de una distribución. Las curvas sesgadas a la izquierda o con sesgo negativo presentan una cola a la izquierda del tiempo medio de residencia. Las curvas sesgadas a la derecha o con sesgo positivo presentan una cola a la derecha.

Los ensayos de entrada en impulso del trazador consisten en inyectar súbitamente una cantidad del trazador ( $N_0$ ) en la corriente de entrada del biorreactor. A la salida se mide la concentración del trazador como función del tiempo. La curva concentración-tiempo que se obtiene se denomina curva C.

La cantidad de trazador,  $\Delta N$ , que abandona el reactor en el intervalo de tiempo existente entre  $t$  y  $t + \Delta t$  es

$$\Delta N = C(t)v\Delta t$$

donde  $v$  es flujo volumétrico del efluente.

En otras palabras, se puede decir que,  $\Delta N$  es la cantidad de material que ha permanecido en el biorreactor un tiempo comprendido entre  $t$  y  $t + \Delta t$ .

Si se divide  $\Delta N$  por la cantidad total de material inyectado en el reactor ( $N_0$ ) se obtiene la fracción de material que ha tenido un tiempo de residencia entre  $t$  y  $t + \Delta t$ .

$$\frac{\Delta N}{N_0} = \frac{C(t)v}{N_0} \Delta t$$

Es decir,

$$\frac{\Delta N}{N_0} = E(t)\Delta t$$

Entonces

$$E(t) = \frac{C(t)v}{N_0}$$

Si no se conoce directamente el valor de  $N_0$ , o si se quiere comprobar que todo el trazador ha salido del reactor, se puede calcular a partir de la medida de la concentración a la salida, sumando todos los  $\Delta N$  entre el tiempo  $t = 0$  y  $t = \infty$

$$dN = vC(t)dt$$

$$N_0 = \int_0^{\infty} vC(t)dt$$

Como el flujo volumétrico es constante

$$E(t) = \frac{C(t)v}{N_0} = \frac{C(t)v}{v \int_0^{\infty} C(t)dt} = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (61)$$

Se tiene la expresión de la función  $E(t)$  como el cociente de la concentración del trazador  $C(t)$  y la integral de  $C(t)dt$ , la cual viene dada por el área bajo la curva  $C$ .

La función de distribución de tiempo de residencia acumulativa  $F(t)$  se define como la fracción de la corriente de salida que ha permanecido en el reactor un tiempo comprendido entre 0 y  $t$ . Representa también la probabilidad de que un elemento de fluido que entró en el reactor a tiempo  $t = 0$  haya salido del reactor en un tiempo  $t$  o inferior a  $t$ . Puesto que se define como una fracción, no tiene dimensiones.

Además,

$F(0) = 0$ , ningún fluido (de edad 0) sale del reactor antes de  $t = 0$

$F(\infty) = 1$ , todo el fluido sale del reactor entre  $t = 0$  e infinito.

$F(t)$  y  $E(t)$  están relacionadas.

$$F(t) = \int_0^t E(t)dt$$

Como  $E(t) = \frac{dF(t)}{dt}$ ,  $E(t)$  se puede obtener calculando la pendiente en cada punto de la curva  $F(t)$ .



## **5. Conclusiones.**

1. Una biopelícula ferrooxidante se transforma en sulfooxidante por simple cambio del medio que aporta el sustrato energético.
2. A partir, tanto de una cepa ferrooxidante propia como de aguas industriales conteniendo tiosales, se han obtenido cepas activas sulfooxidantes con excelentes propiedades cinéticas.
3. Se confirma que la biooxidación del tiosulfato, tanto por la cepa inicialmente ferrooxidante como por la cepa autóctona, da lugar a la formación de tetratiónato que, posteriormente, es oxidado a sulfato. Ambos sustratos coexisten en el medio y la oxidación del tiosulfato es preferencial.
4. Cualquiera de las dos cepas ensayadas en la biooxidación en discontinuo de aguas conteniendo mezclas de tiosulfato y tetratiónato, muestran efectos inhibitorios si el pH del medio desciende a valores próximos a 2 cuando aún no se ha agotado el tiosulfato.
5. La biooxidación de las tiosales es factible. Para mantener una cinética favorable en este proceso es necesario evitar la coexistencia de tiosulfato, politiónatos, microorganismos y  $\text{pH} < 2,5$ . Cuando se dan todas estas circunstancias, la compleja química del sistema actúa contra el proceso induciendo un drástico descenso de la velocidad.
6. La biooxidación de aguas reales de planta conteniendo tiosales requiere la eliminación previa del tiosulfato, en caso de estar presente.
7. Se ha ensayado con éxito la eliminación de tiosulfato mediante la dismutación en medio ácido y en presencia de  $\text{Cu(II)}$ , siendo el pH la variable más influyente.



8. Se ha desarrollado, con éxito, un método indirecto para la determinación de tiosales basado en medidas de conductividad. Dicho método puede ser aplicado en el control en línea de la biooxidación en continuo.
9. Se ha modificado un método de determinación de polisacáridos y se ha aplicado a la detección de biopelículas. Cada cepa ensayada ha mostrado capacidad para formar biopelículas sobre una amplia variedad de soportes sólidos.
10. La temperatura óptima de biooxidación en discontinuo es de 34°C. A 40°C la actividad biológica de las cepas utilizadas cesa por completo.
11. Un biorreactor de película bacteriana soportada ha permitido la biooxidación de tiosales en continuo. No existen referencias bibliográficas que informen de algo similar.
12. Existe una relación lineal entre el flujo másico de tiosales a la entrada del reactor y la velocidad de biooxidación del mismo. En las condiciones ensayadas, el proceso se encuentra limitado por la concentración de tiosales.
13. La introducción de 100 ppm de tiosulfato en el biorreactor reduce la velocidad de biooxidación en continuo un 85% de forma inmediata. Este efecto parece ser irreversible.
14. La espuma de poliuretano ha mostrado una excelente capacidad para albergar biopelículas y de forma rápida.
15. La ausencia de oxígeno induce a los microorganismos a la utilización de una ruta metabólica alternativa, pasando de la ruta oxidativa a la hidrolítica. La restitución de la entrada de aire no consigue, por sí sola, la recuperación del reactor.
16. Se ha establecido un protocolo de limpieza y recuperación en biorreactores que permite, en pocos días, restaurar el funcionamiento normal. El protocolo es simple, barato y fácil de ejecutar.

17. Se propone un nuevo mecanismo que explica la ruta hidrolítica con tiosulfato, sulfito, y tritionato como productos intermedios y sulfato y azufre elemental como productos finales.
18. La principal garantía para una operación estable de la biooxidación en continuo de tiosales reside en evitar la entrada de tiosulfato y asegurar un suministro ininterrumpido de aire al sistema.



## 6. Referencias bibliográficas.

1. Ahern, N., Dreisinger, D., and Van Weert, G. (2006). Kinetics of trithionate degradation. *Canadian Metallurgical Quarterly*, 45, 135–144.
2. Armentia, H., Webb, C., (1992). Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans* cells immobilised in polyurethane foam support particles. *Appl Microbiol Biotechnol*, 36:697-700.
3. Bailey, J.E., Ollis, D.F. (1986). Biochemical engineering fundamentals, 2nd ed. *McGraw-Hill*, New York, 457-512.
4. Beard, S., Paradela, A., Abar, J.P., Jerez, C.A., (2011). Growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 in thiosulfate under oxygen-limiting conditions generates extracellular sulfur globules by means of a secreted tetrathionate hydrolase. *www.frontiersin.org | Volume 2 | Article 79*
5. Bengtssons, S., Bjerleb, I., (1975). Catalytic oxidation of sulphite in diluted aqueous solution. *Chemical Engineering Science*, Vol. 30, pp. 1429-1435.
6. Bernier, L., Warren, LA., (2007). Geochemical diversity in S processes mediated by culture-adapted and environmental-enrichments of *Acidithiobacillus* spp., *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71, 5684–5697.
7. Buchberger, W., and Haddad, P. R. (1992). Effects of carrier electrolyte composition on separation selectivity in capillary zone electrophoresis of low-molecular-mass anions. *J. Chromatography*, 608, 59–64

8. Carranza, F., García, MJ., (1990). Kinetic comparison of support materials in de bacterial ferrous iron oxidation in packed-bed columns. *Biorecovery*, 2, 15-27.
9. Chan, CS, Fakra, SC, Edwards, DC, Emerson, D, Banfield, JF, (2009). Iron oxyhydroxide mineralization on microbial extracellular polysaccharides, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73, 3807–3818
10. Chanda, M., O'driscoll, K.F. Rempel, G.L., (1984). Catalyzed air oxidation for treatment of thiosalt effluents. *Applied Catalysis*, 9, 291- 307.
11. Chanda, M., and Rempel, G. L. (1987). Catalyzed air oxidation of thiosalts. *Canadian Metallurgical Quarterly*, 26, 227–237.
12. Chen, K., and Morris, J. (1972). Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by O<sub>2</sub>. *Environ. Sci. Technol.*, 6 (6), pp 529–537.
13. Colmer A.R. (1962). Relation of the iron oxidizer, Thiobacillus ferrooxidans, to thiosulfate. *J Bacteriol.* Apr;83:761-5
14. Corr, J. J., and Anacleto, J. F. (1996). Analysis of inorganic species by capillary electrophoresis–mass spectrometry and ion exchange chromatography–mass spectrometry using an ion spray source (crystal). *Analytical Chemistry*, 68, 2155–2163. *Environmental Science and Technology*, 6, 529–537.
15. Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard JF., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie JM., Gascuel O. (2008). Phylogeny.fr:

- robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36:W465-W469.
16. Dinardo, O., and Sally, J. (1998). Treatment of thiosalts in milling effluent: A review of treatment process.: Mining and Mineral Sciences Laboratories Report presented at Thiosalts Consortium-Phase II.
  17. Dong-Jin K., Pradhan D., Kyung-Ho Park, Jong-Gwan Ahn and Seung-Won Lee, (2008). Effect of pH and Temperature on Iron Oxidation by Mesophilic Mixed Iron Oxidizing Microflora *Materials Transactions*, 49, 10, 2389- 2393.
  18. Dopson, M., Johnson, DB., (2012). Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environmental Microbiology*. 14(10), 2620–2631
  19. Doran P. M., (1995). Bioprocess engineering principles. *Academic Press Ltd.*, 196-216.
  20. Druschel, G.K., Hamers, R.J., Banfield, J.F. (2003a) Kinetics and mechanism of polythionate oxidation to sulfate at low pH by O<sub>2</sub> and Fe<sup>3+</sup>. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 67, No. 23, 4457–4469
  21. Druschel, G.K., Hamers, R.J., Luther, GW., Banfield, J.F. (2003b). Kinetics and Mechanism of Trithionate and Tetrathionate Oxidation at Low pH by Hydroxyl Radicals. *Aquatic Geochemistry* 00: 1–20.
  22. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers P. A. and Smith F. (1956). *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. *Analytical Chemistry* 28(3) pp 350-356.

23. Eccleston, M., Kelly, D.P., (1978), Oxidation Kinetics and Chemostat Growth Kinetics of Thiobacillus ferrooxidans on Tetrathionate and Thiosulfate. *Journal of bacteriology*, Vol. 134, No. 3, p. 718-727
24. Fedath, L (2010, May). *Thiosalt treatment at Kidd Metallurgical. Paper presented at the Thiosalt Consortium Meeting.*
25. Franzmann P.D., Haddad C.M., Hawkes R.B., Robertson W.J., Plumb J.J., (2005). Effects of temperature on the rates of iron and sulfur oxidation by selected bioleaching Bacteria and Archaea: Application of the Ratkowsky Equation. *Minerals Engineering* 18, 1304-1314.
26. Friedhelm, B., Schuhmann, A., and Jansen, K. (1993). Determination of tetrathionate and thiosulfate in natural samples and microbial cultures by a new, fast and sensitive ion chromatographic technique. *FEMS Microbiology Ecology*, 12, 257–264.
27. Friedrich, CG., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., Fischer, J., (2001). Oxidation of Reduced Inorganic Sulfur Compounds by Bacteria: Emergence of a Common Mechanism?, *Applied and environmental microbiology*, 2873–2882 Vol. 67, No. 7
28. Gould, W., Kawaja, P., Bedard, P., and Dinardo, O. (2004). Characterization of natural degradation of thiosalts within a tailing pond: Spring 2003 sampling campaign–final report. *Mining and Mineral Sciences Laboratories Report presented at Thiosalts Consortium.*

29. Ghosh, W., Dam, B., (2009). Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfuroxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* 33 999–1043
30. Gomez, J.M, Cantero, D, Webb, C, (2000). Immobilization of *Thiobacillus ferrooxidans* on nickel alloy fibre for ferrous sulphate oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 335-340
31. González-Lara, J.M, Roca, A., Cruells, M, Patiño, F, (2009) The oxidation of thiosulfates with copper sulfate. Application to an industrial fixing bath, *Hydrometallurgy* 95, 8–14
32. Habashi, F. (1981). Formation and decomposition of thiosulfate in the ferrous sulphide sulfurdioxide reaction. *Inorganic Chemistry*.
33. Haddad, P. R. (1997). Comparison of ion chromatography and capillary electrophoresis for the determination of inorganic ions. *Journal of Chromatography A*, 770, 281–290.
34. Haddad, P. R., Philip, D., and Miroslav, M. (1999). Developments in sample preparation and separation techniques for the determination of inorganic ions by ion chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 856, 145–177.
35. Harris, D. C. (2010). *Quantitative chemical analysis* (8th ed.). New York, NY: W. H. Freeman.



36. Hallberg, KB, Gonzalez-Toril, E., Johnson, DB, (2010), *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* 14:9–19
37. Harrold, M. P., Wojtusik, M. J., Riviello, J., and Henson, P. (1993). Parameters influencing separation and detection of anions by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 640, 463–471.
38. Hedrich, S, Schlomann, M, Johnson, DB, (2011). The iron-oxidizing proteobacteria, *Microbiology*, 157, 1551–1564
39. Hinshelwood, C.N., (1946). Influence of temperature on the growth of bacteria, 254-257. In the chemical kinetics of the bacterial cell. Clarendon Press, Oxford.
40. Harneit, K.; Goksel, A.; Kock, D.; Klock, J.H.; Gehrke, T.; Sand, W. (2006). Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*. 83, 245-254.
41. Hanfa Zou, (1993). Separation of aqueous polythionates by reversed-phase ion-pair liquid chromatography with suppressor-conductivity detection. *Analytica Chimica Acta* Volume 284, Issue 1, 20 Pages 59-65.
42. Iglesias, N., Romero, R., Montes-Rosúa, C., Carraza, F., (2016). Treatment of tetrathionate effluents by continuous oxidation in a flooded packed-bed bioreactor. *International Journal of mineral processing* 155, 91-98.

43. Jay, RR, (1953), Determination of polythionic acids, *Analytical Chemistry*. 25:2: 288-290.
44. Jeffrey, M. I., and Brunt, S. D. (2007). The quantification of thiosulfate and polythionates in gold leach solutions and on anion exchange resins. *Hydrometallurgy*, 89, 52–60.
45. Jensen, A.B., Webb, C., (1995) Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a review, *Process Biochemistry* 30, 225-236.
46. Jorgensen, B. B. (1990). A thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science*, Vol. 249, Issue 4965, pp. 152-154.
47. Johnston, F., McAmish, L. (1973) A Study of the Rates of Sulfur Production in Acid Thiosulfate Solutions Using S-35. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 42, No. 1, January, 112-119)
48. Jones, W. R., and Jandik, P. (1992). Various approaches to analysis of difficult sample matrices of anions using capillary ion electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 608, 385–93.
49. Jones, C. A., Kelly, D. P., (1983). Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron in chemostat culture: influence of product and substrate inhibition. *J. Chem. Technol. Biotech.* 33, 241.
50. Kanao T, Kamimura K, Sugio T. (2007). Identification of a gene encoding a tetrathionate hydrolase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biotechnology* Vol. 132(1):16-22

51. Karamanev, D.G. (1991) Model of the biofilm structure of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biotechnology* 20, 51-64.
52. Kelly, D.P., Tuovinen, O.H., (1975), Metabolism of inorganic sulphur compounds by *thiobacillus ferrooxidans* and some comparative studies on *thiobacillus a2* and *t. neapolitanus*. *Plant and Soil* 43, 77-93
53. Kelly, D.P., Wood, A.P., (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov. *Hlothiobacillus* gen. nov. and *Thermitiobacillus* gen. nov., *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 50, 511-516
54. Kerek, A., and Horvath, A. (2007). Kinetic and mechanism of the oxidation of tetrathionate by Iodine in a slightly acidic medium. *Journal of Physical Chemistry*, 111, 4235–4241.
55. Khan, S, Haq, F\*, Hasan, F, Saeed, K, Ullah, R, (2012), Growth and Biochemical Activities of *Acidithiobacillus thiooxidans* Collected from Black Shale. *Journal of Microbiology Research*, 2(4): 78-83
56. Kikumoto, M, Nogami, S., Kanao, T., Takada, J., Kamimuraa, K., (2013) Tetrathionate-Forming Thiosulfate Dehydrogenase from the Acidophilic, *Chemolithoautotrophic Bacterium Acidithiobacillus Ferrooxidans* *Applied and Environmental Microbiology* 79 (1), 113-120
57. KoH, T. (1990) A Review Analytical Chemistry of Polythionates and Thiosulfate. *Analytical sciences*, vol. 6, 3-14.

58. Koh, T., and Miura, Y. (1987). Spectrophotometric determination of micro amountsof sulfide, sulphite and thiosulfate. *Analytical Sciences*, 3, 543–547.
59. Kuban, P., Buchberger, W., Haddad, P. R. (1997). Determination of metallo-cyanides by capillary electrophoresis after concentration on supported liquid membranes. *Journal of Chromatography A*, 770, 243–251
60. Kupka, D, Liljeqvist, M, Nurmi, P, Puhakka, JA, Tuovinen, OH, Dopson, M, (2009). Oxidation of elemental sulfur, tetrathionate and ferrous iron by the psychrotolerant Acidithiobacillus strain SS3, *Research in Microbiology* 160 767-774.
61. Kurosawa, H, Nakagomi, T, Kanda, K, Nakamura, K, Amano, Y, (1991). High Density Cultivation of Thiobacillus thiooxidans S3 in a Fermentor with Cross-Flow Filtration, *Journal of fermentation and bioengineering*, Vol. 72, 1, 36-40.
62. Kurtenacker, A, Bittner, K, (1924), Iodometric analysis of a mixture of sulphide, sulphite and thiosulphate, *Z. anorg. Chem.*. 141, 297-303.
63. Kuyucak, N., Yaschyshyn, D. (2007) Managing thiosalts in mill effluents: “studies conducted at the kidd metallurgical site” *Paper presented at Mining and the Environment IV Conference*, Sudbury, Ontario, Canada, October 19-27
64. Kuyucak, N. (1998). Mining, the environment and the treatment of mine effluents. *International Journal of Environment and Pollution*, 10, 315–325

65. Kuyucak, N. (2006). Going passive: The solution for mine wastewater treatment? *CIM Magazine*, 1(4).
66. Kuyucak, N., Antonio Serrano, J. R., Hultqvist, J., and Eriksson, N. (2001). Removal of thiosalts from mill effluents. *Waste Processing and Recycling IV*, 481–495.
67. Lancy, DE, Tuovinen, OH, (1984), Ferrous ion oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* immobilized in calcium alginate. *Appl Microbiol Biotechnol*, 20:94-99
68. Lara Marquez, A, Wild, G, Midoux, N, (1994), A review of recent chemical techniques for the determination of the volumetric mass-transfer coefficient  $k_a$  in gas-liquid reactors, *Chemical Engineering and Processing*, 33, 247-260
69. Lee, EY, Cho, K, Wookryu, H, (2005). Simultaneous Removal of H<sub>2</sub>S and NH<sub>3</sub> in Biofilter Inoculated with *Acidithiobacillus thiooxidans* TAS. *Journal of bioscience and bioengineering*, Vol. 99, No. 6, 611–615.
70. “Ingeniería de las reacciones químicas” Tercera Edición, Levenspiel Octave. Ed. Limusa Wiley, 2012.
71. Liljeqvist, M, Sundkvist, J-E, Saleh, A, Dopson, M, (2011). Low Temperature Removal of Inorganic Sulfur Compounds From Mining Process Waters, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 108, No. 6
72. Livesey-Goldblatt, E., Tunley, T.H., Nagy, I.F. (1977) Pilot plant film oxidation (bacfox process) of recycled acidified uranium plant ferrous sulphate leach

- solution. *Conference Bacterial Leaching*, W. Shwartz, de., Verlag Chemie, Weinheim, FRG, 175-190.
73. Long, Z, Huang, Y, Cai, Z, Cong, W, Ouyang, F, (2004), Immobilization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by a PVA–boric acid method for ferrous sulphate oxidation. *Process Biochemistry* 39, 2129–2133
74. Lors, C, Chehade, MH, Damidot, D, (2009) pH variations during growth of *Acidithiobacillus thiooxidans* in buffered media designed for an assay to evaluate concrete biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 880–883
75. Lu, Y, Gao, Q, Xu, L, Zhao, Y, Epstein, IR, (2010), Oxygen-Sulfur Species Distribution and Kinetic Analysis in the Hydrogen Peroxide-Thiosulfate System. *Inorg. Chem.* 49, 6026–6034
76. MacDonald, D.G., Clark, R.H., (1970). The oxidation of aqueous ferrous sulphate by *thiobacillus ferrooxidans*. *Journal Chemical Engineering.* 48
77. Makhija, R, Hitchen, A, (1978), Determination of polythionates and thiosulphate in mining effluents' and mill circuit solutions, *Talanta*, 25, 79-84.
78. Masau, R.J.Y., Oh, J.K., Suzuki, I., (2001), Mechanism of oxidation of inorganic sulphur compounds by thiosulfate-grown *Thiobacillus thiooxidans*. *Can. J. Microbiol.* 47: 348–358
79. Mazuelos, A., Romero, R., Palencia, I., Iglesias, N., Carranza, F., (1999) Continuous ferrous iron biooxidation in flooded packed bed reactors. *Mineral Eng.* 12, 559-564.

80. Mazuelos, A., Carranza, F., Palencia, I., Romero, R., (2000) High efficiency reactor for the biooxidation of ferrous iron. *Hydrometallurgy* 58, 269-275.
81. Mazuelos, A., Palencia, I., Romero, R., Rodriguez, G., Carranza, F., (2001), Ferric iron production in packed bed bioreactors: influence of pH, temperature, particle size, bacterial support material, and type of air distributor. *Minerals engineering*, 14, 5: 507-514.
82. Mazuelos, A., Romero, R., Palencia, I., Carranza, F., Borjas, F.J., (2002) Oxygen transfer in ferric iron biological production in a packed-bed reactor, *Hydrometallurgy* 65, 15-22
83. Mazuelos, A., Iglesias, N., Romero, R., Mejías, M.A., Carranza, F., (2010), Influence of zinc on ferrous iron biooxidation: biological or physical nature. *Biochemical Engineering Journal*, 49, 235-340.
84. Mazuelos, A., Moreno, J.M., Carranza, F., Palomino, C., Torres A., Villalobo, E.(2012). Biotic factor does not limit operational pH in packed- bed bioreactor for ferrous iron bioxidation, *J Ind Microbiol Biotechnol* 39:1851-1858.
85. Meyer, B., and Ospina, M. (1982). Raman spectrometric study of the thermal decomposition of aqueous tri- and tetrathionate. *Phosphorus and Sulfur*, 14, 23–36.
86. Meulemberg, R, Pronk, JT, Hazeu, W, van Dijken, JP, Frank, J, Kuenen, JG, (1993). Purification and partial characterization of thiosulphate dehydrogenase from *Thiobacillus acidophilus*, *Journal of general microbiology*, 139, 2033-2039.

87. Miura, Y., and Koh, T. (1986). Spectrophotometric determination of micro amountsof pentathionate via permanganate reactions. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 59,
88. Miura, Y., Kitamura, H., and Koh, T. (1991). Spectrophotometric determination of micro amounts of tetrathionate via its oxidation with permanganate. *Microchimica. Acta (Vienna)*.
89. Miura, Y., and Watanabe, M. (2001). Ion-pair chromatography of polythionates and thiosulfate with detection based on their catalytic effects on the postcolumn azide–iodine reaction, *Journal of Chromatography*
90. Mizoguchi, T., Takei, Y., and Okabe, T. (1976). The chemical behavior of low valence sulfur compounds. X. Disproportionation of thiosulfate, trithionate, tetrathionate and sulphite under acidic conditions. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 49.
91. Montgomery, D. C. and Runger, G. C. (2010). Applied Statistics and Probability for Engineers Chapter 10. Arizona State University. *John Wiley & Sons, Inc.*
92. Moses, C., Nordstrom, D. K., Jerman, J. S., and Mills, A. L. (1987). Aqueous pyrite oxidation by dissolved oxygen and by ferric iron. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51.
93. Moses, C., and Herman, J. (1990). Pyrite oxidation at circumneutral pH. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 55,



94. Narita, E., Lawson, F., Han, K.N. (1983), Solubility of oxygen in aqueous electrolyte solutions. *Hydrometallurgy*, 10, 21-37.
95. Nemati, M., Harrison, S.T.L., Hansford, G.S., Webb, C. (1998), Biological oxidation of ferrous iron by *Thiobacillus ferrooxidans*: a review on the kinetic aspects. *Biochemical Engineering Journal*, 1, 171-190
96. Nikolov, L, Karamanev, DG, (1987). Experimental study of the inverse fluidized bed biofilm reactor. *Can. J. Chem, Eng.*, 65, 214-217.
97. Ojumu, T.V., Petersen, J., Hansford, G., (2008). The effect of dissolved cations on microbial ferrous iron oxidation by *Leptospirillum ferriphilum* in continuous culture. *Hydrometallurgy*; 94: 69-76.
98. Ojumu, T.V., Hansford G.S., Petersen J., (2009). The kinetics of ferrous-iron oxidation by *Lepstospirilum ferriphilum* in continuous culture: The effect of temperature. *Biochemical Engineering Journal* 46, 161-168.
99. Olem, H., Unz, R.F., (1977) Acid mine drainage treatment with rotating biological contactors, *Biotechnology and Bioengineering* 19 1475-1491.
100. Page, FM, (1953). The reaction between thiosulphate and ferric ions. Part 1. *Trans. Faraday soc.* 49, 635.
101. Page, FM, (1954), The reaction between thiosulphate and ferric ions. Part 2. *Trans. Faraday soc.* 50, 120.
102. Patnaik, D, Mahapatra, GN, (1955), Spectrophotometric studies of the kinetics of ferric thiosulphate reaction. *Current Science*, 6, 195-196.

103. Peck, H.D., (1962) Symposium on metabolism of inorganic compounds' vs. comparative metabolism of inorganic sulfur compounds in microorganisms. Vol 26, pp. 67-94.
104. Pronk, J. T., R. Meulenber, W. Hazeu, P. Box, and J. G. Kuenen, (1990), Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic thiobacilli *FEMS Microbiol. Rev.* 75:293-306.
105. Ramírez, M, Gómez, JM, Aroca, G, Cantero, D, (2009), Removal of hydrogen sulfide by immobilized Thiobacillus thioparus in a biotrickling filter packed with polyurethane foam, *Bioresource Technology* 100, 4989–4995.
106. Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E., (1983). Model of bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Bacteriology* 154, 1222-1226.
107. Rawlings, DE, Johnson, DB, (2004). Ecology and biodiversity of extremely acidophilic microorganisms. *Biological, physiological and health sciences - sample chapters*.
108. Rhemrev-Boom, M. M. (1994). Determination of anions with capillary electrophoresis and indirect ultra violet detection, *J. Chromatography*, 680, 675–684.
109. Rohwerder, T, Sand, W, (2007), Oxidation of Inorganic Sulfur Compounds in Acidophilic Prokaryotes, *Eng. Life Sci.*, 7, No. 4, 301–309

110. Rolia, E., and Chakrabarti, C. L. (1982). Kinetics of decomposition of tetrathionate, trithionate, and thiosulfate in alkaline media. *Environmental Science & Technology*, 16.
111. Read, J., John, J., Macpherson, J., Shcaubel, C., and Theriault, A. (2001). The kinetics and mechanism of the oxidation of inorganic oxysulfur compounds by potassium ferrate. Part I: Sulfite, thiosulfate and dithionate ions. *Inorganica Chimica Acta*, 315.
112. Rzhepishevskaya, OI, Valdes, J, Marcinkeviciene, L, Gallardo, CA, Meskys, R, Bonnefoy, V, Holmes, DS, Dopson, M, (2007). Regulation of a Novel Acidithiobacillus caldus Gene Cluster Involved in Metabolism of Reduced Inorganic Sulfur Compounds, *Applied and environmental microbiology*, 7367–7372.
113. Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. *CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY*.
114. Sasaki, K., Tsunekawa, M., Ohtsuka, T., and Konno, H. (1995). Confirmation of a sulfur-rich layer on pyrite after oxidative dissolution by Fe(III) ions around pH 2. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59,
115. Schippers, A., VongRege, H., and Sand, W. (1996a). Impact of microbial diversity and sulfur chemistry on safeguarding sulfidic mine waste. *Minerals Engineering*, 9, 1069–1079.
116. Schippers, A., Jozsa, P., and Sand, W. (1996b). Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Applied and Environmental Microbiology*, 62.

117. Schoolfield, R.M., Sharpe P.J.H. and Magnuson C.E., (1981). Non linear regression of biological temperature-dependent rate models based on absolute reaction-rate theory. *J. Theor. Biol.* 88, 719-731.
118. Senanayake, G, (2005a). Role of copper(II), carbonate and sulphite in gold leaching and thiosulphate degradation by oxygenated alkaline non-ammoniacal solutions. *Minerals Engineering* 18, 409–426
119. Senanayake, G, (2005b). Gold leaching by thiosulphate solutions: a critical review on copper(II)–thiosulphate–oxygen interactions. *Minerals Engineering* 18, 995–1009
120. Shiers, D.W., Ralph, D.E., Watling, H.R., (2011). Batch culture of *Acidithiobacillus caldus* on tetrathionate, *Biochemical Engineering Journal* 54 185–19.
121. Silver, M., Dinardo, O., (1981). Factors Affecting Oxidation of Thiosalts by Thiobacilli. *Applied and environmental microbiology*, June, p. 1301-1309.
122. Silver M, (1985). Parameters for the Operation of Bacterial Thiosalt Oxidation Ponds, *Applied and environmental microbiology*, 663-669.
123. Silverman MP, Lundgren DG (1959). Studies in the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J Bacteriol* 77:642-647
124. Sorokin, D., and Tourova, T. (2005). Oxidation of thiosulfate to tetrathionate by anhaloarchaeon isolated from hypersaline habitat. *Extremophiles*, 9, 501–504.

125. Starosvetsky, J, Zukerman, U., Armon, RH, (2013). A simple medium modification for isolation, growth and enumeration of *Acidithiobacillus thiooxidans* (syn. *Thiobacillus thiooxidans*) from water samples. *Journal of Microbiological Methods* 92,178–182.
126. Steffan, R.J., Atlas, R.M., 1991. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. *Ann. Rev. Microbiol.* 45, 137–161.
127. Sugio, T, Kanao,T, Furukawa, H, Nagasawa, T, Blake, RC, (1996). Isolation and Identification of an Iron-Oxidizing Bacterium Which Can Grow on Tetrathionate Medium and the Properties of a Tetrathionate-Decomposing Enzyme Isolated from the Bacterium, *Journal of fermentation and bioengineering*, 82, 3, 233-238.
128. Sugio, T, Taha, TM, Takeuchi, (2009). Ferrous iron production mediated Tetrathionate hydrolase, in tetrathionate, sulphur, and iron-grown *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 73 (6), 1381-1386.
129. Suzuki, I., Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* 45: 97–105 (1999).
130. Thauer, R. K., Jungermann, K., and Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41,
131. Takano, B., and Watanuki, K. (1988). Quenching and liquid chromatographic determination of polythionates in natural water. *Talanta*, 35,

132. Takano, B., Ohsawa, S., and Glover, R. B. (1994). Surveillance of Ruapehu crater lake, New Zealand by aqueous polythionates. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 60,
133. Takeuchi, T.L., Suzuki, I. (1994) Effect of pH on Sulfite Oxidation by Thiobacillus thiooxidans Cells with Sulfurous Acid or Sulfur Dioxide as a Possible Substrate vol. 176, no. 3 *Journal of Bacteriology*, feb. 1994, p. 913-916
134. Tekin, D., Yoruk S., Bayhan Y.K., (2014). The effect of temperature on rate of bacterial oxidation of Fe (II). *Bulgarian Chemical Communications* 46, 117 – 119.
135. Tykodi, RJ, (1990). In praise of thiosulphate, *Journal of chemical education*, 67, 2, 146-149.
136. Toro, L., Paponetti, B., Cantalini, C. (1989) Precipitate formation in the oxidation of ferrous ions in the presence of Thiobacillus ferrooxidans. *Hydrometallurgy*, 20, 1-9.
137. Tromans, D, (2000), Modeling Oxygen Solubility in water and electrolyte solutions. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 39, 805-812.
138. Tuovinen, O. H., and D. P. Kelly. (1974). Studies on the growth of Thiobacillus ferrooxidans. V. Factors affecting growth in liquid culture and development of colonies on solid media containing inorganic sulphur compounds. *Arch. Microbiol.* 98:351-364.
139. Varga, D., and Horvath, A. K. (2007). Kinetics and mechanism of tetrathionate ion in alkaline medium. *Inorganic Chemistry*, 46,

140. Vongporm, Y. (2008). *Thiosalt behaviour in aqueous media. MEng Thesis, Memorial University of Newfoundland.*
141. Voslar, M., Matejka, P., and Schreiber, I. (2006). Oscillatory reactions involving hydrogen peroxide and thiosulfate: kinetics of the oxidation of tetrathionate by hydrogen peroxide. *Inorganic Chemistry*, 45,
142. Warren, L.A. Norlund, K.L.I., Bernier, L., (2008), Microbial thiosulphate reaction arrays: the interactive roles of Fe(III), O<sub>2</sub> and microbial strain on disproportionation and oxidation pathways. *Geobiology*, 6, 461–470.
143. Wasserlauf, M., and Dutrizac, J. E. (1982). The chemistry, generation and treatment of thiosalts in milling effluents: A non-critical summary of CANMET investigations. *CANMET Report: CANMET-MMSL*
144. S.I. Weir. E.C.V. Butler. P.R. Haddad (1994). Ion chromatography with UV detection for the determination of thiosulfate and polythionates in saline waters. *Journal of Chromatography A*. Volume 671, Issues 1–2, 10, Pages 197-203.
145. Wentzien, S., Sand, W., Albertsen, A., and Steudel, R. (1994). Thiosulfate and tetrathionate degradation as well as biofilms generation by *Thiobacillus intermedius* and *Thiobacillus versutus* studied by microcalorimetry, HPLC and ion-pair chromatography. *Archives of Microbiology*, 161,
146. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697-703.

147. Wood, TA, Murray KR, Burgess, JG, (2001). Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans* cells immobilised on sand for the purpose of treating acid mine-drainage, *Appl Microbiol Biotechnol* 56:560–565
148. Xu, Y., and Schoonen, M. A. A. (1995). The stability of thiosulfate in the presence of pyrite in low-temperature aqueous solutions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59
149. Yujian, W, Xiaojuan, Y, Wei, T, Hongyu, L., (2007). High-rate ferrous iron oxidation by immobilized *Acidithiobacillus ferrooxidans* with complex of PVA and sodium alginate. *Journal of Microbiological Methods* 68, 212–217.
150. Zhang, H., and Dreisinger, D. B. (2002). The kinetics for the decomposition of tetrathionate in alkaline solutions. *Hydrometallurgy*, 66,
151. Zemann, A. J. (1997). Sub-minute separations of organic and inorganic anions with co-electroosmotic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 787, 243–251
152. Zwietering, M-H. De Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C., vant Riet K., (1991). Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1094-1101.





## 7. Tablas y figuras.

**Tabla 1.** Rango de pH de diferentes especies *Acidithiobacillus*.

**Tabla 2.** Comparativa de productividades alcanzadas en reactores de lecho fijo según los modelos de percolación e inundado.

**Tabla 3.** Composición química de los medios de cultivo empleados.

**Tabla 4.** Plan de experiencias para el estudio cinético de cultivos de biooxidación de tiosales.

**Tabla 5.** Composición química del medio tetrionato modificado.

**Tabla 6.** Superficie expuesta por cada material

**Tablas 7.** Composición y conductividad medias de las aguas reales muestreadas en DP1.

**Tablas 8.** Composición y conductividad medias de las aguas reales muestreadas en DPS.

**Tabla 9.** Constitución de las cepas concentradas DPS-tetrionato y DPS-tiosulfato.

**Tabla 10.** Condiciones para los ensayos de adaptación del cultivo FNN-9K desde ion ferroso a ion tetrionato.

**Tabla 11.** Biooxidación en discontinuo de tetrionato con la cepa FNN. Velocidad específica de biooxidación y tiempo de duplicación.

**Tabla 12.** Conductividad real y estimada en soluciones sintéticas. \*Politionatos son expresados como tetrionato.

**Tabla 13.** Pendientes de la relación lineal entre concentración y la conductividad para test de biooxidación iniciados con varias concentraciones iniciales de tetrionato.

**Tabla 14.** Pendientes calculadas de un punto inicial y de cada par de valores politionato-conductividad y el valor de test t para muestras emparejadas correspondientes.

**Tabla 15.** Comparación del método directo e indirecto para la determinación de la concentración de politionatos.

**Tabla 16.** Valores experimentales utilizados para el cálculo del  $Q_{10}$  junto con la temperatura media correspondiente. Las temperaturas vienen dadas en  $^{\circ}\text{C}$ ,  $\mu$  en  $\text{h}^{-1}$  y  $Q_{10}$  adimensional.

**Tabla 17.** Valores de los parámetros de ajuste (b y c), temperaturas máxima y mínima y desviación estándar.

**Tabla 18.** Resultados ensayos de detección de biopelícula en diferentes soportes

**Tabla 19.** Resultados de la DTR.

**Tabla 20.** Evolución de las concentraciones de tiosulfato y sulfito.

**Tabla 21.** Resultados después de 10 h de la reanudación de aire.

**Tabla 22.** Resultados después de 35 h de la reanudación de aire.

**Tabla 23.** Resultados del cultivos con tetrionato sintético, tapón roscado y  $\text{N}_2$ .  
\*=trazas, no cuantificado.

**Tabla 24.** Relación molar de cada producto con la cantidad de politionatos, teórica, experimental y % error.

**Figura 1a.** Estabilidad del tiosulfato en disolución acuosa.

**Figura 1b.** Estabilidad del tetrionato en disolución acuosa.

**Figura 1c.** Estabilidad del tritionato en disolución acuosa.

**Figura 2.** Diagrama de Pourbaix para el azufre.

**Figura 3.** Efecto del pH en la formación de distintas especies de Cu(II) en una disolución 0,001 M de tiosulfato.

**Figura 4.** Características de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

**Figura 5.** Esquema de un contactor biológico rotatorio

**Figura 6.** Esquema de reactores airlift.

**Figura 7.** Biorreactor de lecho fijo inundado.

**Figura 8.** Diagrama del transporte de oxígeno en biorreactores aerobios de película bacteriana soportada y perfil de concentraciones en función de la posición.

**Figura 9.** Dispositivo experimental para la adquisición de datos de conductividad en continuo en cultivos provistos de saturación de aire y a temperatura controlada.

**Figura 10.** Esquema del dispositivo experimental para operar en continuo

**Figura 11.** Reactor visto de frente (izquierda) y visto desde arriba (derecha).

**Figura 12.** Biorreactor 3. Escala piloto

**Figura 13.** Arena silíceo y espuma de poliuretano utilizada como soporte.

**Figura 14.** Esquema simplificado de las corrientes de agua de proceso recirculadas en la planta de concentración de minerales sulfuros polimetálicos en la que estaban localizados los puntos de muestreo DP1 y DPS.

**Figura 15.** Tests de actividad microbiológica sulfo-oxidante en muestras tomadas en las instalaciones industriales.

**Figura 16.** Evolución de la concentración de protones en el tiempo en la muestra DPS.

**Figura 17.** Evolución del pH en la primera resiembra de cultivos autóctonos obtenidos a partir de muestras tomadas en instalaciones industriales DPS (1).

**Figura 18.** Evolución del pH en tres resiembras consecutivas en test de actividad biológica de las aguas DPS.

**Figura 19.** Aspecto de los matraces usados en la adaptación a tiosales de la cepa FNN-9k.

**Figura 20.** Evolución del pH en los cultivos en los que la cepa FNN-9K toma por primera vez al tetrionato como sustrato energético en lugar del ión ferroso. (La leyenda atiende a la tabla 10).

**Figura 21.** Evolución típica del pH en cultivo discontinuo de cepa FNN-tetrionato.

**Figura 22.** Evolución típica del pH en cultivo discontinuo de cepa FNN-tiosulfato.

**Figura 23.** Biooxidación en discontinuo de tetrionato. Cepa: FNN; concentración inicial de tetrionato 3,5 g/L. pH inicial 3; 2 y 1,5.

**Figura 24.** Biooxidación en discontinuo de tetrionato. Cepa: FNN; concentración inicial de tetrionato 3,5 g/L. pH inicial 3; 2 y 1,5.

**Figura 25.** Biooxidación en discontinuo de tetrionato. Cepa: FNN; pH inicial 3; concentración inicial de tetrionato 5; 3,5; 3 y 2 g/L.

**Figura 26.** Biooxidación en discontinuo de tetrionato. Cepa: FNN; pH inicial 3; concentración inicial de tetrionato 5; 3,5; 3 y 2 g/L.

**Figura 27.** Representación semilogarítmica para el cultivo de concentración inicial de tetrionato 3,5 g/L y pH 3.

**Figura 28.** Biooxidación de tiosulfato cuando la concentración inicial es 1,25 y el pH 3. Evolución de la concentración de tiosulfato, tetrionato y sulfito.

**Figura 29.** Biooxidación de tiosulfato. Concentración inicial constante de 0,25 g/L y pH inicial 3, 2 y 1.5.

**Figura 30.** Biooxidación de tiosulfato. Concentración inicial constante de 0,25 g/L y pH inicial 3, 2 y 1.5.

**Figura 31.** Biooxidación de tiosulfato. pH inicial constante de 3 y concentración inicial de tiosulfato 0,25 ; 0,75 y 1,25 g/L.

**Figura 32.** Biooxidación de tiosulfato. pH inicial constante de 3 y concentración inicial de tiosulfato 0,25; 0,75 y 1,25 g/L.

**Figura 33.** Biooxidación de tiosulfato con la cepa DPS a concentración inicial constante de 0,25 g/L a pH 3; 2 y 1,5.

**Figura 34.** Biooxidación de tiosulfato con la cepa DPS a concentración inicial constante de 0,25 g/L a pH 3; 2 y 1,5.

**Figura 35.** Biooxidación de tiosulfato con la cepa DPS a pH inicial constante de 3 y concentración inicial 1,25; 0,75 y 0,25 g/L.

**Figura 36.** Biooxidación de tiosulfato con la cepa DPS a pH inicial constante de 3 y concentración inicial 1,25; 0,75 y 0,25 g/L.

**Figura 37.** Relación conductividad -  $[H^+]$  en disoluciones de ácido sulfúrico.

**Figure 38.** Relación entre conductividad y concentración de tetrionato.

**Figura 39.** Concentración de politionatos frente a conductividad en un reactor de 6 L conteniendo efluente real. Inóculo 20% (v/v); temperatura 30°C y 400 rpm de

velocidad de agitación. La concentración de politionatos es expresada como g/L de tetracionato.

**Figura 40.** Comparación del método directo e indirecto para medir la concentración de politionatos en los resultados que cumplen con la prueba t de student para muestras emparejadas.

**Figura 41.** Comparación del método directo y el método indirecto en la medida de concentración de politionatos para los datos que presentan un test t negativo.

**Figura 42.** Biooxidación de tetracionato en cultivos a 20,0; 15,0; 10,0 y 5,0 °C de izquierda a derecha.

**Figura 43.** Biooxidación de tetracionato en cultivos a 35,5; 32,5; 30,0; 25,0 y 17,5 °C, de izquierda a derecha.

**Figura 44.** Velocidad específica de bio-oxidación a diferentes temperaturas.

**Figura 45.**  $\ln \mu$  frente a  $1/T$  (°K). Los valores de temperatura representados corresponden a las temperaturas comprendidas entre 5,0-32,5 °C.

**Figura 46.**  $Q_{10}$  frente a la temperatura media.

**Figura 47.** Raíz cuadrada de la velocidad específica de biooxidación frente a la T en °C. La línea discontinua corresponde a la ecuación Ratkowsky que mejor se ajusta a la experimentación y los círculos azules corresponden a los datos experimentales.

**Figura 48.** Velocidad específica de biooxidación frente a la T en °C. La línea discontinua corresponde a la ecuación modificada de Ratkowsky que mejor se ajusta a la experimentación y los círculos azules corresponden a los datos experimentales.

**Figura 49.** Curva patrón para análisis de polisacáridos.

**Figura 50.** Biorreactor 1. Campaña 1. Velocidad de biooxidación (mg/h) y flujo másico de tiosales frente al tiempo (h).

**Figura 51.** Biorreactor 1. Influencia de la adición súbita de 100 ppm  $S_2O_3^{2-}$  en la alimentación.

**Figura 52.** Evolución de sulfito, tiosulfato y tetrionato en mezclas tetrionato/tiosulfato de 3,5 y 1 g/l en el cultivo FNN a pH inicial de 2.

**Figura 53.** Evolución de sulfito, tiosulfato y tetrionato en mezclas tetrionato/tiosulfato 3,5 y 1 g/l en el cultivo FNN a pH inicial de 1,75.

**Figura 54.** Evolución de sulfito, tiosulfato y tetrionato en mezclas tetrionato/tiosulfato 3,5 y 1 g/l en el cultivo FNN a pH inicial de 1,5.

**Figura 55.** Evolución del pH en el cultivo FNN con 3,5 g/L de tetrionato, 1 g/L de tiosulfato y a pH 2; 1,75 y 1,5.

**Figura 56.** Comparación de las cinéticas de consumo de tetrionato en presencia (FNN-3,5-1-2) y en ausencia (FNN-3,5-2) de tiosulfato en concentración de 1 g/L por el cultivo FNN-tetrionato.

**Figura 57.** Comparación de las cinéticas de consumo de tetrionato en presencia (FNN-3,5-1-1,5) y en ausencia (FNN-3,5-1,5) de tiosulfato en concentración de 1 g/L por el cultivo FNN-tetrionato.

**Figura 58.** Biooxidación de 3,5 g/L de tetrionato, 0,25 g/L de tiosulfato a pH inicial de 3 usando como inóculo la cepa FNN.

**Figura 59.** Biooxidación de 3,5 g/L de tetrionato, 0,25 g/L de tiosulfato a pH inicial de 3 usando como inóculo la cepa FNN.

**Figura 60.** Biooxidación de tetrionato en ausencia y en presencia de 0,25 g/L de tiosulfato, usando la cepa FNN, siendo la concentración inicial de tetrionato 3,5 g/L y el inicial pH 3.



**Figura 61.** Cromatogramas obtenidos a los 5 minutos de la reacción de tetraionato con sulfito en proporción 3:1. Sulfato (1,2 minutos) y tiosulfato (1,6 minutos).

**Figuras 62.** Cromatogramas obtenidos a los 5 minutos de la reacción de tetracionato con sulfito en proporción 3:1. Tritionato (6 minutos) y tetracionato (11,5 minutos).

**Figura 63:** Influencia del pH en la eliminación de tiosulfato de una solución de 1g/L con 20 mg/L de Cu (II).

**Figura 64:** Influencia del pH en la eliminación de tiosulfato de una solución de 1g/L con 15 mg/L de Cu (II).

**Figura 65:** Influencia del pH en la eliminación de tiosulfato de una solución de 1g/L con 10 mg/L de Cu (II).

**Figura 66.** Influencia del pH en la eliminación de tiosulfato de una solución de 1g/L sin Cu(II).

**Figura 67.** Influencia de la concentración de Cu (II) en la eliminación de tiosulfato de una solución de 1g/L a pH 2,5.

**Figura 68:** Influencia de la concentración de Cu (II) en la eliminación de tiosulfato de una solución de 1g/L a pH 2.

**Figura 69:** Influencia de la concentración de Cu (II) en la eliminación de tiosulfato de una solución de 1g/L a pH 1,5.

**Figura 70:** Influencia de la concentración de Cu (II) en la eliminación de tiosulfato de una solución de 1g/L a pH 1,25.

**Figura 71.** Evolución de la concentración de tiosulfato y sulfito a pH 1,5 con 20 mg/L de Cu (II) en una solución sintética de 1g/L de tiosulfato.

**Figura 72.** Influencia del pH en la eliminación de tiosulfato de una mezcla sintética de 4 g/L de tetracionato y 1g/L de tiosulfato con 20 mg/L de Cu (II).

**Figura 73.** Influencia del pH en la eliminación de tiosulfato de una mezcla sintética de 4 g/L de tetrionato y 1g/L de tiosulfato con 15 mg/L de Cu (II).

**Figura 74.** Influencia del pH en la eliminación de tiosulfato de una mezcla sintética de 4 g/L de tetrionato y 1g/L de tiosulfato con 10 mg/L de Cu (II).

**Figura 75.** Influencia del pH en la eliminación de tiosulfato de una mezcla sintética de 4 g/L de tetrionato y 1g/L de tiosulfato con 5 mg/L de Cu (II).

**Figura 76.** Influencia del pH en la eliminación de tiosulfato de una mezcla sintética de 4 g/L de tetrionato y 1g/L de tiosulfato sin Cu (II).

**Figura 77.** Influencia de la concentración de Cu (II) en la eliminación de tiosulfato de una mezcla sintética de 4 g/L de tetrionato y 1g/L de tiosulfato a pH 2.

**Figura 78.** Influencia de la concentración de Cu (II) en la eliminación de tiosulfato de una mezcla sintética de 4 g/L de tetrionato y 1g/L de tiosulfato a pH 1,5.

**Figura 79.** Influencia de la concentración de Cu (II) en la eliminación de tiosulfato de una mezcla sintética de 4 g/L de tetrionato y 1g/L de tiosulfato a pH 1,25.

**Figura 80.** Evolución de la concentración de tiosulfato y sulfito a pH 1,25 con 20 mg/L de Cu (II) de una mezcla sintética de 4 g/L de tetrionato y 1g/L de tiosulfato.

**Figura 81.** Influencia del pH en la eliminación de tiosulfato del licor DP1 con 20 mg/L de Cu (II).

**Figura 82.** Influencia del pH en la eliminación de tiosulfato del licor DP1 con 15 mg/L de Cu (II).

**Figura 83.** Influencia del pH en la eliminación de tiosulfato del licor DP1 con 10 mg/L de Cu (II).

**Figura 84.** Influencia del pH en la eliminación de tiosulfato del licor DP1 con 5 mg/L de Cu (II).

**Figura 85.** Influencia del pH en la eliminación de tiosulfato del licor DP1 sin Cu (II).

**Figura 86.** Influencia de la concentración de Cu (II) en la eliminación de tiosulfato del licor DP1 a pH 2.

**Figura 87.** Influencia de la concentración de Cu (II) en la eliminación de tiosulfato del licor DP1 a pH 1,5.

**Figura 88.** Influencia de la concentración de Cu (II) en la eliminación de tiosulfato del licor DP1 a pH 1,25.

**Figura 89.** Evolución de la concentración de tiosulfato y sulfito a pH 1,5 con 20 mg/L Cu (II) en licor DP1.

**Figura 90.** Evolución de la concentración de tiosulfato y sulfito a pH 1,25 con 20 mg/L de Cu (II) en licor DP1.

**Figura 91.** Biorreactor con espuma de poliuretano.

**Figura 92.** Biorreactor 2. Poliuretano con precarga externa.

**Figura 93.** Biorreactor primer día en continuo.

**Figura 94.** Biorreactor sexto día en continuo.

**Figura 95.** Biorreactor noveno día en continuo.

**Figura 96.** Operación en continuo con TK20.

**Figura 97.** Operación en continuo con DPS

**Figura 98.** Biorreactor 3 en continuo con DP1 después de limpieza y recuperación del biorreactor.

**Figura 99.** Aspecto del biorreactor después del corte de aire en el reactor.

**Figura 100.** Operación en continuo con DPS

**Figura 101.** Biorreactor 3 en continuo con DP1 después de limpieza y recuperación del biorreactor.

**Figura 102.** Representación  $X/A_0$  frente al tiempo en horas.

**Figura 103.** Representación logarítmica de la degradación de tetrionato.