

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Evaluación del Potencial de Generación de Sulfuro por la Acción de las
Bacterias Sulfato Reductoras y sus Posibles Aplicaciones en el Tratamiento
de los Drenajes Ácidos de Mina**

Virginia Andrade

Tesis de grado presentada como requisito para
la obtención del título de pregrado en Ingeniería Química

Quito, 30 de abril del 2010

Universidad San Francisco de Quito

Colegio Politécnico

HOJA DE APROBACION DE TESIS

Evaluación del Potencial de Generación de Sulfuro por la Acción de las Bacterias Sulfato Reductoras y sus Posibles Aplicaciones en el Tratamiento de los Drenajes Ácidos de Mina

Virginia Andrade

Valeria Ochoa-Herrera, Ph.D.
Directora de la Tesis

Gustavo Muñoz, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

César Zambrano, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

Fernando Romo, M.Sc.
Decano del Colegio Politécnico

Quito, 30 de abril de 2010

© Derechos de autor

Virginia Salomé Andrade Tovar

2010

Dedicatoria

Deseo dedicar este trabajo a quien con el amor más infinito me ha sostenido en su mano durante toda mi vida, a Dios, que ha sido mi sustento y mi guía, la fortaleza de mis días, el amigo fiel y la luz en mi camino. A Dios, que en los momentos más difíciles fue mi esperanza y mi salvación, mi gozo y el motivo de mi alegría. Quiero entregarle este esfuerzo en agradecimiento porque es Él la razón por la que vivo, por la que ahora estoy aquí.

Agradecimientos

A Valeria Ochoa, la directora de tesis, por su constante esfuerzo y dedicación a este trabajo, por su disposición para transmitir su conocimiento y experiencia, por el tiempo invertido en esta tesis, por su incesante búsqueda de todo el material y los recursos necesarios para que el proyecto se desarrolle con éxito.

A César Zambrano y Gustavo Muñoz, miembros del tribunal de tesis, por su colaboración en todo momento, por sus sugerencias valiosas, por su amistad, su tiempo y apoyo en la consecución de mis metas.

Al Departamento de Química e Ingeniería Química y a todos sus profesores, por abrirme las puertas, por transmitir sus conocimientos entregando siempre lo mejor en la formación de todos los estudiantes, por su arduo trabajo y su constante disposición de colaborar en el desarrollo profesional y personal de todos los que formamos parte del departamento.

A mis padres y mi hermana, mi familia querida, por su apoyo incondicional, por su amor y por dedicar sus vidas a regalarme las alegrías más grandes, por ser una bendición sin igual en mi vida.

A Daniel Sáenz, por su amor incondicional, por sus palabras de ánimo en todo momento y por estar siempre ahí para mí.

A Nancy Tayango, por estar siempre dispuesta a ayudar con una sonrisa y un gesto amable, por su amistad y su cariño sincero.

A todos los compañeros y amigos que durante estos 5 años me permitieron compartir momentos muy agradables junto a ellos.

Resumen

La minería es una de las actividades económicas más importantes a nivel mundial. Sin embargo, los desechos generados en dicha actividad son nocivos para los ecosistemas cercanos a las zonas mineras. Los desechos líquidos tóxicos, conocidos como drenajes ácidos de mina (DAM) son uno de los problemas medioambientales actuales más serios. Los DAM se caracterizan por altos contenidos de metales pesados disueltos, iones sulfatos y pH ácido. En el Ecuador, la minería se concentra en el sur del país y se han reportado daños severos en los ecosistemas de las áreas aledañas ocasionados por este tipo de efluentes. El objetivo del presente trabajo de investigación fue desarrollar una tecnología basada en el uso de bacterias sulfato-reductoras (BSR) para la generación biogénica de sulfuro como una posible alternativa de remediación de los drenajes ácidos de mina por medio de la precipitación de los contaminantes en forma de sulfuros metálicos. En este estudio se evaluaron diferentes lodos y sedimentos provenientes de plantas de tratamiento, lagunas de estabilización, lagunas naturales y artificiales en el Ecuador, como inóculos microbianos durante la reducción biogénica de sulfatos a sulfuros. Los sedimentos de una laguna artificial ubicada en la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) demostraron ser el inóculo microbiano más apropiado para los fines propuestos. Así mismo, la eficiencia de los diferentes sustratos como donadores de electrones en la sulfato-reducción catalizada por las BSR fue evaluada en bioensayos *batch*. Entre los sustratos evaluados, acetato, lactato, etanol y peptona, el acetato (2.5 g DQO L^{-1}) resultó ser el donador de electrones más eficiente con los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ en presencia de 4000 mg L^{-1} de sulfato como aceptor de electrones. Se alcanzó una producción final acumulada de sulfuro de $463 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$, mientras que la actividad máxima específica de producción de sulfuro fue de $9 \text{ mg S}^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ acetato d}^{-1}$ y la actividad máxima específica de reducción de sulfato fue de $52 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ acetato d}^{-1}$. En base a estos resultados, se procedió al diseño, puesta en marcha y monitoreo de un bioreactor de flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con bacterias sulfato-reductoras provenientes de la laguna artificial. El bioreactor fue alimentado con una muestra sintética de $2.5 \text{ g DQO-acetato L}^{-1}$ como sustrato y $4000 \text{ mg sulfato L}^{-1}$ como aceptor de electrones. Después de 66 días de operación, se obtuvo una producción de sulfuro de $167 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$, junto con un porcentaje de remoción de la demanda química de oxígeno (DQO) constante de alrededor del 13%. La cantidad de las bacterias sulfato-reductoras presentes en el inóculo microbiano empleado en el bioreactor, fue determinada con el método del número más probable (NMP) y fue de 2.4×10^5 bacterias sulfato-reductoras g^{-1} . La tecnología pasiva de tratamiento de los DAM, exitosamente desarrollada en este estudio, presenta un gran potencial de aplicación en las zonas mineras del Ecuador como una alternativa eficiente de remediación ambiental con altos rendimientos y bajos costos de operación.

Abstract

The mining industry is one of the most important industries worldwide. However, the wastes generated by this activity are toxic to the ecosystems. Toxic mine effluents are known as acid mine drainage (AMD) and are considered, nowadays, one of the most serious environmental problems. AMD is characterized by high concentrations of heavy metals, sulfate ions and low pH values. Studies on the effect of mining activities in the southern part of Ecuador demonstrated that severe disturbances have occurred in the ecosystems nearby these mining areas. The objective of this research was to develop a treatment technology based on sulfate-reducing bacteria (SRB) for the biogenic sulfide generation as an alternative of AMD remediation through the precipitation of the contaminants as metal sulfides. In this study, different sludge and sediments from natural and artificial lagoons, stabilization lagoons, and sewage treatment plants were evaluated as microbial inoculi during the sulfidogenic reduction of sulfates to sulfides. The sediments of an artificial lagoon located at the Universidad San Francisco de Quito (USFQ) were found to be the most suitable inoculum for this study. Furthermore, the efficiency of different substrates as electron-donors in the sulfate reduction catalyzed by SRB was evaluated in batch bioassays. Among the tested substrates, acetate, lactate, ethanol and peptone; acetate (2.5 g COD L^{-1}) was the most efficient electron-donor with the sediments of the USFQ artificial lagoon in the presence of $4000 \text{ mg sulfate L}^{-1}$ as electron-acceptor. A sulfide cumulative final production of $463 \text{ mg S}^{-2}\text{L}^{-1}$, a maximum sulfide specific activity of $9 \text{ mg S}^{-2}\text{g}^{-1}\text{acetate day}^{-1}$, and a maximum sulfate reduction specific activity of $52 \text{ mg SO}_4^{2-}\text{g}^{-1}\text{acetate day}^{-1}$ were achieved. Based on these results, the design, start-up and monitoring of an up-flow continuous bioreactor packed with sulfate reducing bacteria from the artificial lagoon were carried out. The bioreactor was fed with a synthetic sample of $2.5 \text{ g COD-acetate L}^{-1}$ as substrate, and $4000 \text{ mg sulfate L}^{-1}$ as electron-acceptor. After 66 days of operation, the sulfide production obtained was $167 \text{ mg S}^{-2}\text{L}^{-1}$ with a constant chemical oxygen demand (COD) removal of 13%. Most probable number (MPN) assays were performed to estimate the presence of sulfate reducing bacteria in the microbial inoculum used in the bioreactor, and the cells counts were of 2.4×10^5 sulfate reducing bacteria g^{-1} . The passive remediation technology successfully developed in this study shows a great application potential for the treatment of AMD in the mining areas of Ecuador with high performance and low operation costs.

Tabla de Contenidos

Resumen		vi
Abstract		vii
Lista de Tablas		xi
Lista de Figuras		xii
1	Introducción	1
1.1	Drenajes Ácidos de Mina	3
1.1.1	Formación de los DAM	4
1.2	Monitoreo Ambiental de las Zonas Mineras en el Sur del Ecuador	6
1.2.1	Área de Ponce Enríquez	6
1.2.2	Área de Santa Rosa	7
1.2.3	Área de Portovelo-Zaruma	7
1.2.4	Área de Nambija	9
1.2.5	Impacto ambiental de las actividades mineras en el sur del Ecuador	9
1.3	Mecanismos de Remediación de los Drenajes Ácidos de Mina	17
1.3.1	Oxidación e hidrólisis	17
1.3.2	Reducción de sulfatos	19
1.3.3	Adición de piedra caliza	20
1.4	Tipos de Remediación de los Drenajes Ácidos de Mina	22
1.4.1	Tecnologías abióticas activas	24
1.4.2	Tecnologías abióticas pasivas	24
1.4.3	Tecnologías biológicas pasivas: humedales aeróbicos	25
1.4.4	Tecnologías biológicas pasivas: humedales anaeróbicos de compost	26
1.4.5	Tecnologías biológicas pasivas: barreras reactivas permeables y bioreactores	27
1.5	Referencias Bibliográficas	29
2	Efecto del Sustrato como Donador de Electrones durante la Sulfato-Reducción Microbiana y sus Posibles Aplicaciones en el Tratamiento Biológico de los Drenajes Ácidos de Mina	33
2.1	Resumen	33

2.2	Introducción	34
2.2.1	Bacterias sulfato-reductoras	34
2.2.2	Reducción de sulfatos a sulfuros catalizada por bacterias sulfato-reductoras...	39
2.2.3	Ecología de las bacterias sulfato-reductoras	43
2.2.4	Investigación sobre las bacterias sulfato-reductoras a nivel regional	46
2.3	Materiales y Métodos	47
2.3.1	Lodos y sedimentos	47
2.3.2	Medio de cultivo	47
2.3.3	Reactivos	48
2.3.4	Métodos analíticos	48
2.3.5	Actividad sulfato-reductora	53
2.3.6	Actividad metanogénica	53
2.4	Resultados y Discusión	55
2.5	Conclusiones	79
2.6	Referencias Bibliográficas	80
3	Puesta en Marcha y Monitoreo de un Bioreactor de Flujo Ascendente Empacado con Bacterias Sulfato-reductoras para la Generación Biogénica de Sulfuro y sus Posibles Aplicaciones en la Remediación de los Drenajes Ácidos de Mina	85
3.1	Resumen	83
3.2	Introducción	85
3.2.1	Tratamientos pasivos	85
3.2.2	Bioreactores	86
3.2.3	Barreras reactivas permeables	93
3.2.4	Aplicación de tratamientos pasivos de drenaje ácido de mina a nivel regional.....	98
3.3	Materiales y Métodos	100
3.3.1	Inóculo microbiano	100
3.3.2	Puesta en marcha del bioreactor 1	100
3.3.3	Afluente del bioreactor	105

3.3.4	Diseño del sistema de tratamiento biológico de los DAM utilizando reactores en serie	105
3.3.5	Reactivos	108
3.3.6	Métodos analíticos	108
3.3.7	Actividad sulfato-reductora	110
3.4	Resultados y Discusión	111
3.5	Conclusiones	126
3.6	Referencias Bibliográficas	127
4	Conclusiones	131

Lista de Tablas

Tabla 1.1	Nivel de contaminación de diferentes elementos (As, Cd, Cu, Pb, Sb, Hg) y del cianuro (CN ⁻) en los cursos de agua de los 4 distritos mineros del sur del Ecuador: Ponce Enríquez, Santa Rosa, Portovelo-Zaruma y Nambija	14
Tabla 2.1	Compuestos azufrados con sus respectivos estados de oxidación y compuestos donadores de electrones utilizados por las bacterias sulfato-reductoras (BSR)	35
Tabla 2.2	Características de varias bacterias sulfato-reductoras aisladas en diferentes hábitats	38
Tabla 2.3	Formación natural de sulfuro por la acción de bacterias sulfato-reductoras en diversas zonas	45
Tabla 2.4	Producción final acumulada de sulfuro y actividades máximas específicas de producción de sulfuro y reducción de sulfatos en presencia de 4000 mg SO ₄ ²⁻ L ⁻¹ con 2.5 g DQO L ⁻¹ y 25 g DQO L ⁻¹ de cada sustrato para los diferentes lodos y sedimentos anaeróbicos evaluados en los bioensayos <i>batch</i> . Las tasas de producción de sulfuro fueron obtenidas con las pendientes de las curvas en una región determinada.....	76
Tabla 2.5	Producción de metano y actividades máximas específicas metanogénicas con 2.5 g DQO-acetato L ⁻¹ para los diferentes lodos y sedimentos anaeróbicos	78
Tabla 3.1	Constantes de producto de solubilidad, K _{sp} a 25°C para varios hidróxidos y sulfuros metálicos	88
Tabla 3.2	Características de bioreactores pasivos reportados en la literatura	91
Tabla 3.3	Producción final acumulada de sulfuro en 40 días de tratamiento y actividades máximas específicas de producción de sulfuro y reducción de sulfatos en presencia de 4000 mg SO ₄ ²⁻ L ⁻¹ con 2.5 g DQO L ⁻¹ de cada sustrato para los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ evaluados en los bioensayos <i>batch</i>	114

Lista de Figuras

Figura 1.1	Ubicación de las áreas mineras en el sur del Ecuador: Ponce Enríquez, Santa Rosa, Portovelo-Zaruma y Nambija.	8
Figura 1.2	Presencia de los drenajes ácidos de mina en un túneles de extracción minera (a) en el área de Ponce Enríquez en el Distrito Minero Bella Rica y (b) en el área de Portovelo-Zaruma. Fotografías tomadas en junio del 2009 durante una visita de campo a los distritos mineros en cuestión	12
Figura 1.3	Clasificación de los sistemas de remediación de los drenaje ácido de mina	23
Figura 2.1	Esquema de la reducción desasimilatoria (a) y asimilatoria (b) de sulfato durante la sulfato reducción	40
Figura 2.2	Estructura del trifosfato de adenosina (ATP), fosfosulfato de adenosina (APS) y fosfosulfato de fosfoadenosina (PAPS)	42
Figura 2.3	Ilustración esquemática de la medición de metano por el método volumétrico de desplazamiento de hidróxido de sodio	52
Figura 2.4	Producción de sulfuro con respecto al tiempo con 2.5 g acetato-DQO L ⁻¹ y 4000 mg L ⁻¹ de sulfato utilizando 10% v/v del lodo anaeróbico de la laguna facultativa de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba - ETAPA en Cuenca (L ₁). Leyenda: (●) control abiótico (acetato + sulfato); (■) tratamiento completo (acetato + sulfato + microorganismos). Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por duplicado.....	57
Figura 2.5	Producción de sulfuro con respecto al tiempo con 2.5 g acetato-DQO L ⁻¹ y 4000 mg L ⁻¹ de sulfato utilizando 10% v/v de inóculo microbiano proveniente de varias fuentes en los tratamientos completos (acetato + sulfato + microorganismos). Leyenda: (o) sedimentos de la laguna facultativa de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba - ETAPA en Cuenca (L ₁); (Δ) lodo del hidrociclón de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L ₂); (■) lodo de la descarga de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L ₃); (●)	

- sedimentos de la laguna artificial de la USFQ (L_4). Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por duplicado. 60
- Figura 2.6 Producción de sulfuro con respecto al tiempo con 2.5 g lactato-DQO L^{-1} y 4000 mg L^{-1} de sulfato utilizando 10% v/v de inóculo microbiano proveniente de varias fuentes en los tratamientos completos (lactato + sulfato + microorganismos). Leyenda: (o) sedimentos de la laguna facultativa de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba - ETAPA en Cuenca (L_1); (Δ) lodo del hidrociclón de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L_2); (\blacksquare) lodo de la descarga de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L_3); (\bullet) sedimentos de la laguna artificial de la USFQ (L_4); (\square) sedimentos de una laguna natural en la provincia de Orellana (L_5). Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por duplicado..... 63
- Figura 2.7 Producción de sulfuro con respecto al tiempo con 2.5 g etanol-DQO L^{-1} y 4000 mg L^{-1} de sulfato utilizando 10% v/v de inóculo microbiano proveniente de varias fuentes en los tratamientos completos (etanol + sulfato + microorganismos). Leyenda: (o) sedimentos de la laguna facultativa de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba - ETAPA en Cuenca (L_1); (Δ) lodo del hidrociclón de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L_2); (\blacksquare) lodo de la descarga de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L_3); (\bullet) sedimentos de la laguna artificial de la USFQ (L_4). Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por duplicado. 66
- Figura 2.8 Producción de sulfuro con respecto al tiempo con 2.5 g peptona-DQO L^{-1} y 4000 mg L^{-1} de sulfato utilizando 10% v/v de inóculo microbiano proveniente de varias fuentes en los tratamientos completos (peptona + sulfato + microorganismos). Leyenda: (o) sedimentos de la laguna facultativa de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba en Cuenca (L_1); (Δ) lodo del hidrociclón de una planta de

	tratamiento de aguas residuales, Quito (L ₂); (■) lodo de la descarga de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L ₃); (●) sedimentos de la laguna artificial de la USFQ (L ₄). Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por duplicado.....	69
Figura 2.9	Producción de sulfuro con respecto al tiempo con 25 g etanol-DQO L ⁻¹ y 4000 mg L ⁻¹ de sulfato utilizando 10% v/v de inóculo microbiano proveniente de varias fuentes en los tratamientos completos (etanol + sulfato + microorganismos). Leyenda: (o) sedimentos de la laguna facultativa de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba en Cuenca (L ₁); (Δ) lodo del hidrociclón de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L ₂); (■) lodo de la descarga de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L ₃); (●) sedimentos de la laguna artificial de la USFQ (L ₄). Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por duplicado	71
Figura 3.1	Esquema del funcionamiento de una barrera reactiva permeable para el tratamiento de agua contaminada	95
Figura 3.2	Esquema del bioreactor empleado en la generación biogénica de sulfuro ...	102
Figura 3.3	Diagrama de bloques (a) y esquema del bioreactor empleado durante la sulfato-reducción microbiana. El bioreactor fue alimentado con una muestra sintética formada por acetato (2.5 g DQO L ⁻¹), sulfato (4000 mg L ⁻¹) y el medio basal, y empacado con 15 g VSS L ⁻¹ de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ soportados en arena en un modo de operación continuo con un flujo ascendente (b)	103
Figura 3.4	Foto del bioreactor empleado durante la sulfato-reducción microbiana. El bioreactor fue alimentado con una muestra sintética formada por acetato (2.5 g DQO L ⁻¹), sulfato (4000 mg L ⁻¹) y el medio basal, y empacado con 15 g VSS L ⁻¹ de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ soportados en arena en un modo de operación continuo con un flujo ascendente.....	104

Figura 3.5	Diagrama de bloques (a) y esquema del diseño del sistema de tratamiento de los drenajes ácidos de mina utilizando dos reactores en serie, un bioreactor y un reactor químico-biológico (b)	107
Figura 3.6	Producción de sulfuro con respecto al tiempo con 2.5 g DQO L ⁻¹ de diferentes sustratos en presencia de 4000 mg L ⁻¹ de sulfato utilizando 10% v/v de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ en los tratamientos completos (sustrato + sulfato + microorganismos) Leyenda: (●) 2.5 g DQO-peptona L ⁻¹ ; (■) 2.5 g DQO-lactato L ⁻¹ ; (Δ) 2.5 g DQO-etanol L ⁻¹ y (o) 2.5 g DQO-acetato L ⁻¹ . Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por duplicado	113
Figura 3.7	Producción de sulfuro con respecto al tiempo en el bioreactor de flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con 15 g SVS L ⁻¹ de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO L ⁻¹ de acetato y 4000 mg L ⁻¹ de sulfato. Las barras de error representan desviaciones estándar de mediciones realizadas por triplicado	116
Figura 3.8	Variación de la demanda química de oxígeno (DQO) con respecto al tiempo del afluente y efluente del bioreactor de flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con 15 g SVS L ⁻¹ de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO L ⁻¹ de acetato y 4000 mg L ⁻¹ de sulfato. Leyenda: (□) afluente del bioreactor y (■) efluente del bioreactor. Las barras de error representan desviaciones estándar de mediciones realizadas por triplicado	119
Figura 3.9	Porcentaje de remoción de la demanda química de oxígeno (DQO) con respecto al tiempo en el bioreactor con flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con 15 g VSS L ⁻¹ de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO L ⁻¹ de acetato y 4000 mg L ⁻¹ de sulfato	120
Figura 3.10	Variación del pH con respecto tiempo en el afluente y efluente del bioreactor con flujo ascendente en modo de operación continuo empacado	

con 15 g VSS L⁻¹ de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO L⁻¹ de acetato y 4000 mg L⁻¹ de sulfato. Leyenda: (□) afluente del bioreactor y (■) efluente del bioreactor 122

Figura 3.11 Variación del flujo con respecto tiempo en el bioreactor con flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con 15 g VSS L⁻¹ de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO L⁻¹ de acetato y 4000 mg L⁻¹ de sulfato ... 123

Capítulo I

Introducción

La minería constituye una actividad económica muy importante alrededor del mundo. En el 2005, la inversión en el sector minero a nivel mundial fue de 44 billones de dólares (USD), de los cuales, el 32% correspondió a la inversión hecha en América Latina, tendencia que se mantuvo por un periodo de 5 años, entre el 2002 y el 2007 [1]. Datos del Ministerio de Recursos Naturales no Renovables del Ecuador muestran que el aporte de la minería al producto interno bruto (PIB) en el país es en promedio de 0.35% [2]. La generación de empleo es también un aporte importante de la minería al desarrollo del país. En el 2004 alrededor de 4,871 plazas de trabajo fueron generadas por la minería a gran escala en el Ecuador, mientras que en el 2006, se reportaron 84,280 plazas de trabajo proporcionadas por la minería a pequeña escala [2, 3].

La minería en el país tiene un gran potencial. Cisneros, investigador de la Flacso, menciona que los concesionarios al Estado muestran que el potencial minero en el Ecuador equivaldría aproximadamente al 70% del valor corriente de las reservas de petróleo, con un valor de 1.4 billones de dólares (USD), provenientes en su mayoría de las extracciones de cobre [2, 3].

A pesar de la importancia económica y social que la minería representa en el Ecuador y a nivel mundial, las repercusiones medioambientales relacionadas con esta actividad son un problema serio. Durante las extracciones mineras se generan residuos sólidos, emisiones gaseosas y ciertos desechos tóxicos líquidos conocidos como drenajes ácidos de mina. Los drenajes ácidos de mina son efluentes que contienen concentraciones elevadas de metales pesados

disueltos y de sulfatos y pH ácidos que son generalmente descargados a los cuerpos de agua superficiales sin un tratamiento previo [4].

Las actividades mineras están generalmente relacionada con la explotación descontrolada de recursos no renovables, la contaminación de ríos, lagos y mares, la destrucción de ecosistemas, entre otras [5]. La idea de una minería responsable con la sociedad y con el medio ambiente, en la actualidad se ha convertido en el eje de legislaciones alrededor del mundo. En el Ecuador, la Ley de Minería, en su artículo 16 menciona:

La exploración y explotación de los recursos mineros estará basada en una estrategia de sostenibilidad ambiental pública que priorizará la fiscalización, contraloría, regulación y prevención de la contaminación y remediación ambiental, así como el fomento de la participación social y la veeduría ciudadana [6].

Las técnicas de remediación de desechos mineros tóxicos se vuelven prioritarias en este contexto, no sólo por la legislación y políticas vigentes, sino también por la fiscalización y el control que se intensificaron con la aprobación de la Ley de Minería en el país en el 2009 [6]. Por otro lado, con la aprobación de esta ley, se espera que las actividades mineras se intensifiquen, y si éstas no son acompañadas de políticas de remediación de los desechos generados, los daños causados al medio ambiente y las repercusiones sociales podrían volverse innumerables.

Los drenajes ácidos de mina constituyen uno de los principales problemas medioambientales relacionados con las actividades mineras. Por lo tanto, el desarrollo de tecnologías económicamente viables y amigables al medio ambiente, encaminadas a la remediación de este tipo de desechos, es de gran importancia.

1.1 Drenajes Ácidos de Mina

Los drenajes ácidos de mina (DAM) se genera a través de una combinación de procesos químicos y biológicos por medio de los cuales, los sulfuros metálicos provenientes de las actividades mineras, tales como la pirita o marcasita (FeS_2), la arsenopirita (FeAsS), la calcopirita (CuFeS_2) y la esfalerita (ZnS) son oxidados y generan lixiviados con altas concentraciones de metales pesados disueltos, ciertos elementos tóxicos, iones sulfatos y acidez [7, 8].

Los drenajes ácidos de mina resultan de efluentes ácidos de minas abandonadas y desechos mineros, y ocurren en ambientes que contienen una abundancia de sulfuros metálicos y actividad microbiana. Las principales fuentes de los drenajes ácidos de mina son: 1) rocas de desecho y relaves, 2) minas subterráneas y de cielo abierto y 3) aglomerados de mineral. Por otro lado, los principales requerimientos para la generación de los DAM son: 1) sulfuros metálicos, 2) agua o atmósfera húmeda, 3) presencia de un oxidante (generalmente oxígeno en fase gaseosa o en fase acuosa), 4) $\text{pH} < 7$, 5) actividad química de iones férricos, 6) área superficial expuesta de los sulfuros metálicos, 7) sobrepasar la energía de activación química requerida para iniciar la generación ácida y 8) actividad biológica (bacterias oxidantes de hierro y sulfuro) [4, 5].

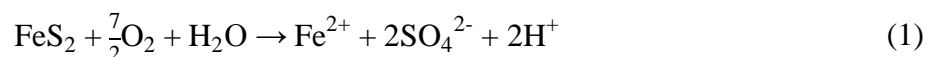
Además de la oxidación natural de los sulfuros metálicos típicos de las actividades mineras, que son los responsables de la formación de los DAM, el proceso de generación de los drenajes ácidos de mina es acelerado por la presencia de bacterias que catalizan la oxidación de los sulfuros. Natarajan y Zagury *et al.* mencionan que varias especies de bacterias son responsables de la generación de ácido a través de la oxidación de sulfuros metálicos, entre

ellas se encuentran varias especies *acidithiobacillus ferrooxidans*, *leptospirillum ferrooxidans*, *acidithiobacillus thiooxidans* y *thiobacillus thioparus*. La especie *acidithiobacillus ferrooxidans* es capaz de oxidar hierro y sulfuro y *leptospirillum ferrooxidans* es una especie oxidante de hierro. Así mismo, la especie *acidithiobacillus thiooxidans* es capaz de oxidar sulfuros pero no pirita y crece en el sulfuro descargado después de que el hierro se ha oxidado por completo. Los *thiobacillus thioparus* son especies neutrófilas oxidantes de sulfuro [5, 9].

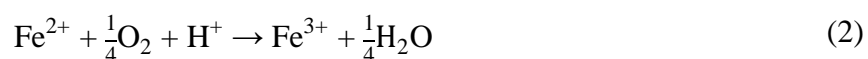
1.1.1 Formación de los DAM

Varias reacciones están involucradas en la formación de los drenajes ácidos de mina. Neculita *et al.* y Akcil *et al.* señalan las reacciones principales implicadas en la generación y formación de los DAM por la oxidación de la pirita, FeS_2 , que es uno de los sulfuros metálicos más comunes [4, 8].

El proceso comienza a un pH neutro con la oxidación del mineral sulfurado, en este caso, la pirita para liberar el ion ferroso (Fe^{2+}), sulfato e hidrógeno, de acuerdo a la siguiente reacción:

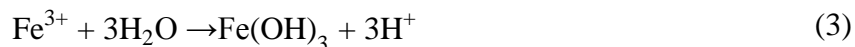


El Fe^{2+} , SO_4^{2-} y H^+ disueltos representan un incremento de la acidez que induce a la disminución del pH, por lo que a pH bajos (<4) ocurre el siguiente paso en el proceso de formación de los DAM:

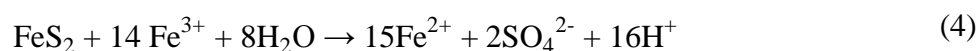


En este punto, las bacterias oxidantes de hierro pueden acelerar el proceso. Brown y colaboradores mencionan que en rangos de pH entre 2 y 4, la tasa de oxidación de Fe^{2+} puede incrementarse por un factor de 10^6 por la presencia de bacterias que oxidan el hierro [10].

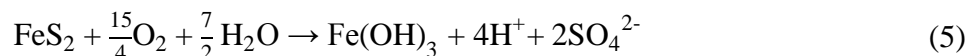
A valores de pH entre 2.3 y 3.5, el ion férrico (Fe^{3+}) precipita como hidróxido férrico ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), liberando iones hidronio (H^+) y generando mayor acidez:



El Fe^{3+} generado en la reacción (2), y que no precipita por medio de la reacción (3), es utilizado para oxidar la pirita, generando mayor acidez y hierro ferroso adicional, perpetuando de esta manera el ciclo de generación de los DAM:

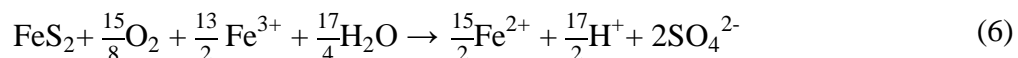


A partir de las reacciones (1) – (3), se obtiene la siguiente reacción global:



Cabe recalcar que la velocidad de oxidación de la pirita (FeS_2) con Fe^{3+} es mucho mayor que la de la oxidación de la misma con O_2 . Además, 1 mol de pirita oxidada con Fe^{3+} libera 16 moles de H^+ (reacción 4), comparadas con las 2 moles de H^+ generadas por la oxidación de FeS_2 con oxígeno (reacción 1). Adicionalmente, Singer y colaboradores, demostraron que la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} (reacción 2) es el paso determinante de la velocidad de formación de los drenajes ácidos de mina [11].

Por otro lado, la reacción global total tomando en cuenta la oxidación de la pirita con el hierro férrico (reacción 4), se obtiene a partir de las reacciones (1), (2) y (4):



Como se puede notar, estas reacciones incrementan progresivamente la acidez de las soluciones, lo que genera la movilización de los metales de los residuos mineros y por ende la formación de los drenajes ácidos de mina con valores de pH ácidos y elevadas concentraciones de metales y sulfatos disueltos.

1.2 Monitoreo Ambiental de las Zonas Mineras en el Sur del Ecuador

El Mandato Minero expedido el 18 de abril del 2008 [12] suspendió las actividades mineras en el Ecuador con el propósito de controlar que todas las empresas mineras en el país cumplan con la normativa legal propuesta por la Ley de Minería [6]. El cese de las actividades mineras ha permanecido durante los dos últimos años. En marzo del 2010, tres empresas recibieron la autorización para reiniciar sus actividades (Ecuacorrientes ECSA, Kinross Aurelian y Cóndor Gold), mientras que 12 empresas mineras auríferas y cupríferas más esperan recibir las autorizaciones del Ministerio de Recursos Naturales no Renovables del Ecuador para el reinicio de sus trabajos [13].

La minería en el Ecuador se concentra en la región sur del país. Las principales áreas mineras son Ponce-Enríquez, Santa Rosa, Portovelo-Zaruma y Nambija, con una producción minera basada en la extracción de oro [14]. La figura 1.1 muestra la ubicación de las áreas mineras en el sur del país junto con los principales cuerpos de agua de la zona.

1.2.1 Área de Ponce Enríquez

El área de Ponce Enríquez contiene yacimientos minerales con vetas de cuarzo con mineralizaciones ricas en sulfuros asociados con oro, cuyos minerales principales son la pirita (FeS_2), la calcopirita (CuFeS_2) y la arsenopirita (FeAsS). El área de Ponce Enríquez abarca 3 distritos mineros, el Distrito Minero Bella Rica, el Distrito Minero de San Gerardo y el Distrito Minero de Pijilí [14]. El Distrito Minero Bella Rica está ubicado en una montaña entre el Río Siete y el Río Tenguel. Cuenta con diferentes plantas de concentración que incluyen instalaciones para molienda, separación gravimétrica y lixiviación con cianuro que suman en

total 50 instalaciones [15]. Lundberg y Hoffner estiman que anualmente se extraen alrededor de 100,000 toneladas de mineral con una producción de 15 toneladas de oro, y que más de 1,500 personas son empleadas en las actividades mineras del Distrito Bella Rica [17].

El Distrito Minero San Gerardo está ubicado en la cabecera del Río Gala. Cuenta con 20 instalaciones para el tratamiento del mineral con plantas de métodos gravimétricos y plantas de lixiviación con cianuro [14]. El Proyecto de Desarrollo Minero y Control Ambiental (PRODEMINCA) estimó que entre 500 y 1,000 individuos trabajan en actividades mineras en el Distrito de San Gerardo [15]. Por último, el Distrito Minero de Pijilí se encuentra localizado en el valle del Río Pijilí. En 1995 la actividad minera cesó en este distrito [14].

1.2.2 Área de Santa Rosa

El área de Santa Rosa contiene yacimientos minerales similares a los del área de Ponce Enríquez. Contiene además yacimientos de placeres auríferos, cuya explotación se realiza en la cabecera del Río Birón. Los ríos cercanos al área de Santa Rosa incluyen el Río Caluguro y el Río Santa Rosa [14].

1.2.3 Área de Portovelo-Zaruma

El Distrito Minero Portovelo-Zaruma consta de yacimientos minerales en los que el oro está asociado con sulfuros en vetas de cuarzo. Durante los años 1904 – 1965, esta zona minera produjo unas 120 toneladas de oro provenientes de alrededor de 9 millones de toneladas mineral [14]. La minería en esta región es la principal actividad económica, contándose con varias plantas para el procesamiento del mineral, basadas en métodos gravimétricos, lixiviación con cianuro, flotación, entre otros. Las plantas encontradas en el área de Portovelo-

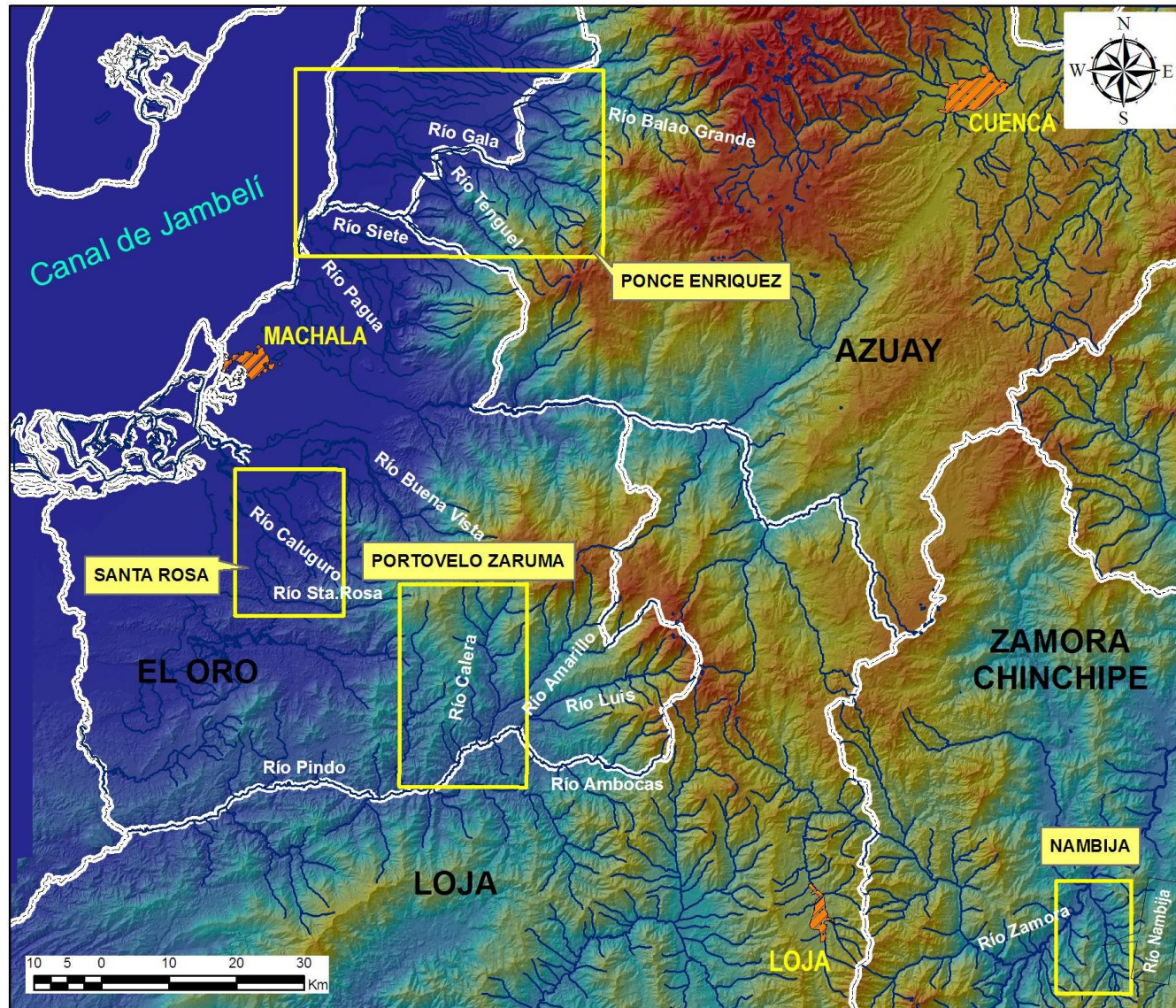


Figura 1.1: Ubicación de las áreas mineras en el sur del Ecuador: Ponce Enríquez, Santa Rosa, Portovelo-Zaruma y Nambija [16]

Zaruma son variadas, desde plantas bastante rudimentarias (minería artesanal) hasta plantas sofisticadas de procesamiento (minería industrial).

1.2.4 Área de Nambija

El Distrito Minero de Nambija consta de rocas volcano-sedimentarias con intrusiones de granodiorita con yacimientos irregulares de sulfuros en vetas de cuarzo. Este distrito minero fue la principal área productora de oro del país durante muchos años. El mineral es tratado con métodos gravimétricos en plantas en las que trabajan alrededor de 20,000 personas [14].

1.2.5 Impacto ambiental de las actividades mineras en el sur del Ecuador

El impacto ambiental causado por las actividades mineras en el sur del país se basa, entre otros factores menos importantes, en el potencial de generación de los drenajes ácidos de mina (DAM) ricos en metales pesados, iones sulfatos y elevada acidez, y su posible descarga en los cuerpos de agua de la zona.

Los DAM constituyen un problema medioambiental ya que son un riesgo para los organismos acuáticos de los cuerpos de agua afectados. Estudios conducidos por Soucek *et al.* en el sistema hídrico del Río Powell en Virginia (Estados Unidos) confirmaron la influencia negativa de los drenajes ácidos de mina en las comunidades acuáticas directamente afectadas por las aguas de bajos pH [18]. En dichos estudios, en las zonas más afectadas por la acidez de los DAM, la presencia de macroinvertebrados fue nula, mientras que en las áreas no afectadas del río, la abundancia total de organismos fue de entre 100 y 108. Así mismo, estudios conducidos en las almejas del lugar, demostraron la muerte del 50% de las mismas debida a los drenajes ácidos de mina descargados en el río. La abundancia de especies de insectos como

efemerópteros, plecópteros y tricópteros (índices de calidad del agua) en zonas no afectadas del Río Powell mostraron valores de alrededor de 12, mientras que las zonas afectadas por los DAM, mostraron valores tan bajos como 1 [18].

Por otro lado, en los drenajes ácidos de mina, los metales pesados se encuentran disueltos por el efecto del pH ácido, característico de los DAM. Wildeman *et al.* menciona que metales como Pb, Cu, Zn, Cd y Al son solubles a pH ácido, por lo que están biodisponibles y representan una importante fuente de toxicidad para los organismos acuáticos [19]. Prato *et al.* demostraron la toxicidad del cobre, cadmio y mercurio en cinco especies marinas de crustáceos [20]. Por otro lado, debido a la cadena trófica, la bioacumulación de los metales pesados en los organismos acuáticos representa un problema para la salud humana. Olayan y colaboradores demostraron la bioacumulación de metales pesados en peces salmonetes [21]. Los tejidos de los peces fueron estudiados para determinar los factores de bioacumulación (FBA). El plomo presentó el FBA más alto entre los estudiados, seguido de vanadio, hierro, cobre y níquel [21]. Así mismo, estudios conducidos por Pham *et al.* en organismos acuáticos, como peces, caracoles, mejillones y camarón, demostraron que la concentración de metales pesados como plomo, zinc, cobre, cromo y cadmio en los tejidos de las diferentes especies supera los límites permisibles para el consumo humano: Cd ($0.2 \mu\text{g g}^{-1}$), Cr ($2.3 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu ($73.3 \mu\text{g g}^{-1}$), Zn ($99.4 \mu\text{g g}^{-1}$) [22].

Por otro lado, cuando el agua de los ríos afectados por los drenajes ácidos de mina es usada para irrigación se genera un impacto negativo en la agricultura. Estudios conducidos por Prabu demostraron que los cultivos irrigados con agua proveniente del río Akaki (Etiopía), contaminada con metales pesados, generaron una presencia significativa de los mismos en el suelo y en los vegetales [23]. Acumulación de cromo y cadmio, superior a los límites

permisibles para el consumo humano, fue encontrada en vegetales como espinaca, papa, rábano, cebolla, zanahoria, entre otras, en el estudio mencionado [23].

Estudios realizados por PRODEMICA en asociación con el Consorcio Sueco *Swedish Environmental Systems* (SES) muestran que los minerales de las descargas mineras provenientes de los distritos mineros del sur del Ecuador tienen un potencial significativo para la formación de los drenajes ácidos de mina [14]. Es así que tanto los minerales de las colas de los molinos, como los residuos de la amalgamación y de la cianuración evaluados, muestran condiciones favorables para la formación de los DAM. Los estudios indicaron que se requieren 31.25 kg de CaCO_3 por cada unidad de porcentaje de azufre para que pueda ser neutralizado naturalmente. Sin embargo, el contenido de azufre de entre 1 y 15% presente en el mineral de las descargas, junto con potenciales de neutralización de entre 7 y 82 kg de $\text{CaCO}_3 \text{ ton}^{-1}$, muestran que en muy pocos casos existe una cantidad suficiente de agentes para neutralizar el ácido que se forma por la oxidación biológica y química de los sulfuros presentes en los minerales. De esta manera, la formación de los drenajes ácidos de mina es muy probable en la zona [14]. En la figura 1.2 se muestra la presencia de los drenajes ácidos de mina en el área de Ponce Enríquez y de Portovelo-Zaruma.

(a)



(b)



Figura 1.2: Presencia de los drenajes ácidos de mina en un túneles de extracción minera (a) en el área de Ponce Enríquez en el Distrito Minero Bella Rica y (b) en el área de Portovelo-Zaruma. Fotografías tomadas en junio del 2009 durante una visita de campo a los distritos mineros en cuestión.

Por otro lado, el monitoreo de los ríos de la zona muestra que existen concentraciones de metales pesados como As, Cd, Cu, Pb, Sn y Zn en concentraciones tóxicas para la vida acuática, que superan 100 veces o más el valor de fondo, es decir las condiciones ambientales imperantes antes de las perturbaciones causadas por las actividades humanas, en este caso, la minería [14]. Cabe recalcar, que en varios países, concentraciones que triplican el valor de fondo son consideradas perturbaciones evidentes, mientras que cuando el valor de fondo es superado 10 veces, representa una perturbación muy severa [14]. En la tabla 1.1 se presentan los resultados obtenidos en el estudio realizado por PRODEMINCA y SES entre los años 1996 y 1998, en cuanto a la severidad de la contaminación causada por la concentración de metales pesados en los cuerpos de agua cercanos a los distritos mineros del sur del Ecuador [14].

Se puede notar claramente que las áreas más afectadas son las de Ponce Enríquez, especialmente el Río Siete y el Estero Guanache del Distrito Minero Bella Rica, y el área de Portovelo-Zaruma, en el Río La Calera, el Río Puyango y el Río Pindo. Los elementos presentes con las concentraciones más elevadas son arsénico, cobre, cadmio, mercurio y plomo.

Tabla 1.1: Nivel de contaminación de diferentes elementos (As, Cd, Cu, Pb, Sb, Hg) y de cianuro (CN⁻) en los cursos de agua de los 4 distritos mineros del sur del Ecuador: Ponce Enríquez, Santa Rosa, Portovelo-Zaruma y Nambija. Leyenda: (■) contaminación muy elevada, (▲) contaminación elevada, (●) contaminación baja a moderada, (○) contaminación muy baja o ausente [14].

	CN ⁻	Hg	As	Cd	Cu	Pb	Sb	Zn
Área de Ponce Enríquez								
Río Balao Grande (tramos superiores)	○	○	○	○	▲	●	○	○
Río Balao Grande (tramos inferiores)	○	○	○	○	▲	●	○	○
Río Pijilí	○	○	○	○	○	○	○	○
Río Chico	●	▲	■	▲	▲	▲	▲	●
Río Gala (tramos superiores)	○	○	○	○	○	○	○	●
Río Gala (tramos inferiores)	○	○	●	○	○	○	○	○
Quebrada Caña Quemada	○	▲	▲	▲	■	▲	●	●
Río Tenguel	○	○	●	○	●	○	○	○
Río Siete	■	■	■	▲	■	■	▲	●
Río Siete, estuario	○	▲	■	▲	▲	▲	▲	●
Estero Guanache	▲	■	■	▲	■	■	▲	●
Río Fermín	●	○	○	○	○	○	○	○
Río Pagua	●	●	■	●	▲	▲	●	●
Río Bonito	○	○	○	○	○	○	○	○
Área de Santa Rosa								
Quebrada de los Ingleses	○	■	■	▲	▲	▲	▲	▲
Río Birón – Río Caluguro	○	○	▲	○	●	●	○	▲
Río Santa Rosa	○	○	●	○	○	○	○	●
Área Portovelo – Zaruma								
Río La Calera	■	■	■	■	■	■	●	■
Río Amarillo	○	▲	●	■	▲	▲	●	▲
Río Pindo – Río Puyango	▲	▲	▲	■	■	■	●	▲
Área de Nambija								
Quebrada Calixto	○	▲	●	■	▲	▲	○	▲
Quebrada Cambana	○	▲	●	▲	●	●	○	●
Río Nambija	○	▲	○	○	●	●	○	○

En el Río Siete, aproximadamente 10,000 toneladas de colas son descargadas anualmente, y transportadas a los tramos inferiores, llegando al estuario [14]. El principal metal/metaloide contaminante es el arsénico, junto con concentraciones de cobre, cadmio y plomo elevadas. La concentración de arsénico y cobre alcanza cantidades extremas de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, superando las concentraciones de fondo por factores de más de 100. Adicionalmente, las concentraciones de estos metales superan los criterios y parámetros ambientales establecidos en Ecuador, Suecia, Estados Unidos, así como los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportados por PRODEMİNCA [14].

En el caso del arsénico, para el agua potable el límite permisible es de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (Ecuador - 1989) y de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Organización Mundial de la Salud - 1993) [14]. En cuanto a la protección de la vida acuática, el límite de arsénico es de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Suecia). En lo que respecta al cobre, concentraciones superiores a $3.6 \mu\text{g L}^{-1}$ (USA - 1997) son tóxicas para la vida acuática [14].

El transporte anual de arsénico en el Río Siete es de 80 toneladas (92% en suspensión y 8% en solución) [14]. Aproximadamente 10 kg de mercurio son transportados en el río anualmente, mientras que el cianuro descargado por las plantas de cianuración en las colas, alcanza niveles que afectan la fauna local. Toda la macrofauna ha sido eliminada en el Río Siete por la descarga descontrolada de las colas en el cuerpo de agua, y en el estuario aguas abajo, muchos organismos estudiados contienen arsénico y mercurio [14]. En cuanto al sulfato, PRODEMİNCA registra concentraciones de $5\text{-}73 \text{ mg L}^{-1}$, comparadas con valores de fondo de 1 mg L^{-1} , es decir de 10 a 100 veces el valor de fondo [14].

El Río Puyango perteneciente a la zona de Portovelo-Zaruma es también uno de los más afectados debido a la producción minera [14]. La cuenca del Río Puyango, junto con sus ríos

tributarios, La Calera, Amarillo y Pindo, contiene concentraciones elevadas de metales y metaloides como arsénico, plomo, cobre, cadmio y mercurio. La concentración de cobre, plomo y cadmio en los cuerpos de agua contaminados alcanza valores 100 veces mayores a los valores de fondo. La concentración de mercurio encontrada durante el monitoreo de la región realizado entre los años 1996 y 1998 por PRODEMINCA y SES, fue de 1 a 5 mg kg⁻¹ alcanzando valores entre 20 y 90 veces mayores que el valor de fondo de 0.055 mg kg⁻¹. Aproximadamente 160 kg de mercurio provenientes de las colas mineras son transportadas anualmente en el Río La Calera [14].

Por estas razones, en extensos tramos de los cuerpos de agua del área minera de Portovelo-Zaruma, toda la vida superior ha sido erradicada y es imposible el uso del agua para el consumo humano o para irrigación. La concentración de sulfato, registrada por PRODEMINCA en ciertos tramos del Río Puyango, de alrededor de 308 mg L⁻¹, está por encima de los criterios ambientales para el agua de consumo humano de acuerdo a la OMS (250 mg L⁻¹) [14].

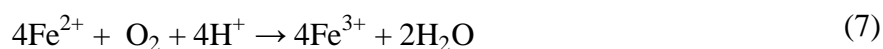
1.3 Mecanismos de Remediación de los Drenajes Ácidos de Mina

Diversos métodos de tratamiento han sido desarrollados para remediar los drenajes ácidos de mina generados en las actividades mineras. A continuación se detallan los principales procesos químicos, físicos y biológicos para la remoción de los contaminantes presentes en los efluentes mineros.

1.3.1 Oxidación e hidrólisis

Gazea y colaboradores describen a la oxidación e hidrólisis como el principal mecanismo de remoción de metales en los sistemas aeróbicos [24]. Las reacciones de oxidación e hidrólisis que eventualmente resultan en la precipitación de los metales disueltos son un proceso físico-químico importante en los sistemas de tratamiento de los DAM [24].

El hierro es uno de los contaminantes más significativos en los drenajes ácidos de mina provenientes de zonas con alto contenido de minerales sulfurados, y es el metal más susceptible a los procesos de oxidación. Generalmente el hierro es descargado en su forma reducida hierro ferroso (Fe^{2+}), que al ser reactivo, en presencia de oxígeno, eventualmente se oxida a hierro férrico (Fe^{3+}):



La oxidación del hierro ferroso ocurre tanto abióticamente como biológicamente catalizada por la acción de bacterias. En ambos casos, el mecanismo de oxidación es dependiente del pH. A $\text{pH} \geq 5$, Stumm y Morgan describen la cinética de la oxidación de Fe^{2+} de la siguiente manera [25]:

$$-\frac{d[\text{Fe}^{2+}]}{dt} = k_1 [\text{Fe}^{2+}] [\text{OH}^-]^2 P_{\text{O}_2} \quad (8)$$

donde, $k_1 = 8 \times 10^{13} \text{ min}^{-1} \text{ atm}^{-1} \text{ mol}^{-2} \text{ L}^2$.

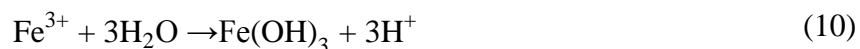
Por lo tanto, por cada unidad de incremento en el pH, la velocidad de reacción de la oxidación del Fe^{2+} sufre un incremento en un factor de 100. En estas condiciones, el rol más importante del diseño de un sistema de tratamiento de los efluentes mineros ricos en metales pesados, iones sulfato y pH ácidos es garantizar un tiempo de residencia suficiente para la oxidación del hierro disuelto y su posterior precipitación [24].

A valores de $\text{pH} < 3.5$, la cinética de la oxidación abiótica de hierro ferroso (Fe^{2+}) se describe por la ecuación a continuación propuesta por Stumm y Morgan [25]:

$$-\frac{d[\text{Fe}^{2+}]}{dt} = k_2 [\text{Fe}^{2+}] P_{\text{O}_2} \quad (9)$$

donde, $k_2 = 1.0 \times 10^{-7} \text{ min}^{-1} \text{ atm}^{-1}$.

En estas condiciones, la oxidación del Fe^{2+} es muy lenta y como menciona Kleinmann *et al.* se requiere la participación bacterias acidofílicas tales como *Thiobacillus* y *Ferrobacillus ferroxidans* como catalizadores biológicos de la oxidación [26]. A medida que el hierro ferroso es convertido en hierro férrico (reacción 7), este último, Fe^{3+} , es sometido a la hidrólisis que resulta en su precipitación en la forma de hidróxido de hierro (III), de acuerdo a la reacción (10), y tomando en consideración que a valores de pH mayores a 3, una cantidad despreciable de Fe^{3+} se encuentra disuelto [24] :



El producto final de la oxidación e hidrólisis es la formación de iones hidrógeno, por lo tanto, según Gazea *et al.*, las aguas resultantes de este mecanismo de remoción de metales tienen un pH ácido de entre 2 y 3 después de que todo el hierro es hidrolizado [24].

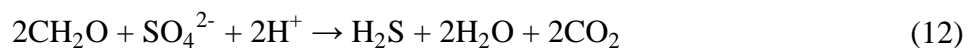
1.3.2 Reducción de sulfatos

La reducción biogénica de sulfato en ambientes anaeróbicos constituye uno de los mecanismos más importantes en la remoción de metales. En los sistemas biológicos de tratamiento de los DAM, las bacterias sulfato-reductoras (BSR) son las encargadas de llevar a cabo la reducción desasimilatoria de sulfatos a sulfuros, utilizando el sulfato (SO_4^{2-}) como aceptor de electrones para oxidar la materia orgánica y liberar bicarbonato y sulfuro de hidrógeno, de acuerdo a la siguientes reacciones propuestas por Gusek [27]:

A $\text{pH} > 7$:



A $\text{pH} < 7$:



donde CH_2O representa la materia orgánica.

Para obtener una reducción biogénica de sulfatos eficiente, se deben satisfacer ciertas condiciones ambientales durante la aplicación de este mecanismo de tratamiento de los DAM. Las bacterias sulfato-reductoras desempeñan adecuadamente sus actividades metabólicas entre pH mayores a 4 hasta pH ligeramente básicos, en presencia de una fuente de sulfato junto con concentraciones adecuadas de materia orgánica, y en la ausencia de agentes oxidantes como O_2 . Estas condiciones generalmente se pueden satisfacer en sistemas de remediación con ambientes anóxicos [24].

Bajo estas condiciones, el sulfuro de hidrógeno producido reacciona con los metales disueltos para formar sulfuros metálicos insolubles que precipitan de acuerdo a la reacción (13) [24]:

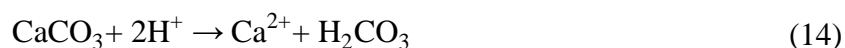


Gazea *et al.* menciona que la remoción de metales disueltos en forma de sulfuros depende del pH, del producto de solubilidad del sulfuro metálico específico y de la concentración de los reactivos [24]. El mecanismo de la reducción de sulfato catalizado por la acción de las bacterias sulfato-reductoras es muy importante en la remediación de los DAM a largo plazo. Los precipitados en forma de sulfuros metálicos virtualmente insolubles, son más densos y menos voluminosos que los formados en la oxidación e hidrólisis, además del consumo de la acidez en la reducción biogénica de sulfato comparada con la formación de la misma en la oxidación e hidrólisis [24].

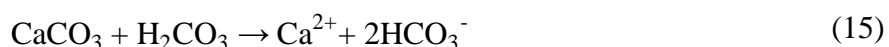
1.3.1 Adición de piedra caliza

Otro mecanismo para añadir alcalinidad a las aguas ácidas es a través de su contacto directo con piedra caliza. La piedra caliza al disolverse produce iones calcio y alcalinidad de bicarbonato, lo que conlleva a neutralizar la acidez y a amortiguar el pH. La solubilidad de la piedra caliza depende del pH, de la temperatura y de la concentración de CO_2 (ac) [24].

Cuando las aguas ácidas generadas durante las actividades mineras, con valores de pH menores a 6.4, entran en contacto con piedra caliza, ésta reacciona de acuerdo a la ecuación (14) propuesta por Nairn [28]:



El CO_2 disuelto, principalmente en la forma de ácido carbónico (H_2CO_3), es un ácido débil que sigue reaccionando con la piedra caliza, produciendo Ca^{2+} y la alcalinidad de bicarbonato necesarios para las reacciones de neutralización del ácido [24]:



Este proceso es eficiente siempre y cuando se mantenga un ambiente anóxico, debido a que de lo contrario, el hierro ferroso (Fe^{2+}) se oxida y precipita en forma de hidróxido ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) e impide la actividad de la piedra caliza, y por ende, la generación de alcalinidad.

1.4 Tipos de Remediación de los Drenajes Ácidos de Mina

En los últimos años, varias tecnologías de remediación de los DAM han sido desarrolladas con el objetivo de tratar, mitigar y controlar los efectos negativos provocados por los drenajes ácidos de mina en los cuerpos de agua y en los ecosistemas en general, afectados por las actividades mineras.

Johnson y Hallberg proponen una clasificación de las técnicas y estrategias de remediación de los DAM que se presenta en la figura 1.3. Algunas de estas tecnologías son consideradas activas porque requieren una alimentación continua de los recursos para sostener el proceso, mientras que las tecnologías pasivas, requieren poco o incluso un suministro nulo de los recursos una vez en operación, reduciendo considerablemente los costos de operación y mantenimiento [29].

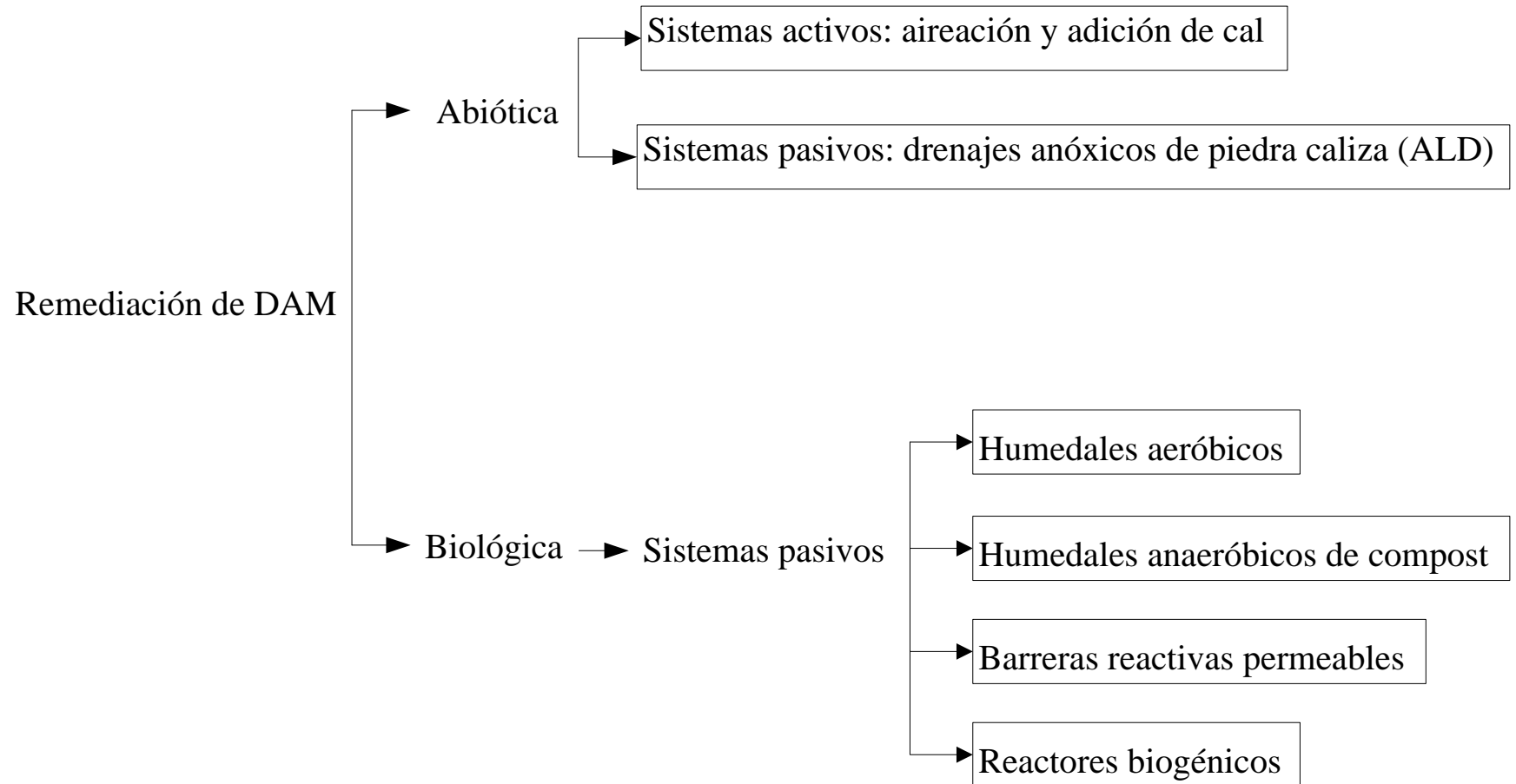


Figura 1.3: Clasificación de los sistemas de remediación de los drenajes ácidos de mina [29]

1.4.1 *Tecnologías abióticas activas*

Las tecnologías abióticas activas se basan en la adición de agentes químicos neutralizantes para mitigar los efluentes ácidos provenientes de las actividades mineras. La adición de materiales alcalinos a los drenajes ácidos de mina, incrementa el pH y acelera la velocidad de oxidación química del hierro ferroso, lo que causa la precipitación de muchos metales presentes en los DAM en forma de hidróxidos y carbonatos [29].

Existen varios materiales neutralizantes empleados en este tipo de tratamiento de los DAM. Johnson y Hallberg mencionan el uso de cal (óxido de calcio), carbonato de calcio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, óxido e hidróxido de magnesio, entre otros agentes neutralizantes que varían en costo y eficiencia [29]. Por ejemplo, el hidróxido de sodio es 1.5 veces más eficiente que la cal, pero nueve veces más costoso que la misma.

Como resultado de este proceso se obtiene un lodo voluminoso rico en hierro y otros metales. A pesar de que el tratamiento químico activo en base a materiales neutralizantes puede proporcionar una remediación eficiente de los drenajes ácidos de mina, el sistema presenta desventajas. Las principales limitaciones están relacionadas con los elevados costos de operación y de reactivos, y con la disposición final de lodo voluminoso producido durante el proceso [29].

1.4.2 *Tecnologías abióticas pasivas*

Una alternativa para la adición de alcalinidad a los DAM es el uso de drenajes anóxicos de piedra caliza (ALD, *anoxic limestone drains*, por sus siglas en inglés) [29]. El objetivo de estos sistemas anaeróbicos es añadir álcali a los drenajes ácidos de mina mientras se mantiene al hierro en su forma reducida (Fe^{2+}), evitando así su oxidación y su posterior precipitación

como hidróxido de hierro (III), que de otra manera, genera revestimiento del precipitado sobre la piedra caliza y reduce así la eficiencia de la misma [29]. Kleinmann *et al.* reportaron que la producción de alcalinidad en un ALD alcanza 275 mg L^{-1} comparados con $50 - 60 \text{ mg L}^{-1}$ producidos en un sistema abierto [30].

En los drenajes anóxicos de piedra caliza, los DAM pasan a través de una cama de grava de piedra caliza sostenida en un drenaje impermeable al aire, con dimensiones que varían de diámetros angostos ($0.6 - 1.0 \text{ m}$) a anchos ($10 - 20 \text{ m}$) con profundidades típicas de 1.5 m y longitudes de 30 m [29].

Este tipo de tecnología es considerada pasiva y representa bajos costos de operación. Los ALD son eficientes para el tratamiento de drenajes ácidos de mina que no tengan un contenido elevado de hierro férrico o aluminio, debido a la potencial formación de precipitados que gradualmente disminuyen la permeabilidad del drenaje [29]. Los drenajes anóxicos de piedra caliza son generalmente utilizados como un componente (pretratamiento) de sistemas pasivos de tratamiento de los DAM en asociación con humedales o *wetlands* aeróbicos y/o de compost [29].

1.4.3 Tecnologías biológicas pasivas: humedales aeróbicos

Los humedales o *wetlands* consisten en estanques con una amplia área superficial con un flujo superficial horizontal. Los humedales aeróbicos son generalmente construidos para tratar los drenajes de mina alcalinos [24]. Esto se debe a que emplean los mecanismos de la oxidación e hidrólisis previamente descritos (ecuaciones 7 - 10), que genera acidez neta. Si la alcalinidad del agua de mina no es suficiente para prevenir la caída del pH, se recomienda añadir un sistema de drenaje anóxico con piedra caliza (ALD) previo al tratamiento en los humedales

aeróbicos; se deben mantener condiciones aeróbicas, por lo que este tipo de tecnología opera con flujos superficiales [29].

Generalmente se plantan macrófitas con fines estéticos para regular el flujo del agua y para filtrar y estabilizar la acumulación de los precipitados férricos. Así mismo, estas plantas no sólo proveen área superficial adicional para la precipitación de hierro férrico en fase sólida, sino que también permiten el flujo de oxígeno desde las partes aéreas hasta sus raíces, lo que acelera la oxidación del hierro ferroso (Fe^{2+}) [29]. Los humedales o *wetlands* aeróbicos son eficientes sistemas pasivos de tratamiento de los drenaje ácido de mina con un contenido significativo de hierro ferroso en condiciones netamente aeróbicas.

1.4.4 Tecnologías biológicas pasivas: humedales anaeróbicos de compost

Contrariamente a los humedales o *wetlands* aeróbicos, las reacciones claves en los humedales anaeróbicos de compost utilizados para el tratamiento pasivo de los drenajes ácidos de mina requieren de condiciones anaeróbicas. El mecanismo de remoción de contaminantes en este tipo de tecnología pasiva de tratamiento de los DAM es el de la reducción biogénica de sulfato descrita previamente (ecuaciones 11 – 13) con la precipitación de los contaminantes en forma de sulfuros metálicos.

Los humedales anaeróbicos de compost son eficientes en el tratamiento de las aguas de mina ácidas y con contenidos elevados de metales disueltos. Las reacciones de reducción son llevadas a cabo por las bacterias sulfato-reductoras que usan diferentes donadores de electrones derivados de una matriz orgánica o del compost en sí [29].

1.4.5 Tecnologías biológicas pasivas: barreras reactivas permeables y bioreactores

Las barreras reactivas permeables y los bioreactores basados en las actividades metabólicas de las bacterias sulfato-reductoras utilizan el mismo principio de remediación de los DAM descritos en la reducción biogénica de sulfato de los humedales anaeróbicos [29]. Una barrera reactiva permeable consiste en la instalación en el acuífero de un material reactivo apropiado que sea capaz de inducir procesos físico-químicos y biológicos para la remediación de las aguas contaminadas que fluyen a través de la misma. El agua contaminada pasa a través de una pared que contiene el material reactivo y el efluente tratado sale por el otro lado de la barrera con condiciones adecuadas para ser descargado a los cuerpos de agua [31].

Los bioreactores pasivos emplean los principios de la sulfato reducción para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina. Las bacterias sulfato-reductoras son empacadas en los bioreactores y son las encargadas de la reducción desasimilatoria de sulfatos a sulfuros cuando son provistas de una fuente de carbono adecuada [8]. La oxidación del sustrato, que actúa como donador de electrones, está ligada a la reducción del sulfato, que actúa como aceptor terminal de electrones. La remoción de los metales pesados se genera por la precipitación de los mismos en forma de sulfuros metálicos [8, 32].

Las barreras reactivas permeables y los bioreactores son una tecnología pasiva moderna con costos de operación y mantenimiento bajos, que deben ser operados en condiciones anaeróbicas. En el Ecuador no existe evidencia de la instalación o diseño de ningún tipo de remediación pasivo de los drenajes ácidos de mina. El objetivo de este proyecto de investigación es desarrollar una tecnología de remediación pasiva de los DAM basada en la utilización de bacterias sulfato-reductoras. Este tipo de proyecto es novedoso e inexistente en

el país. Además, se presenta como una alternativa promisorio, por su eficiencia y viabilidad económica.

1.5 Referencias Bibliográficas

1. Sánchez, “Panorama de la minería latinoamericana, Proyecto UNCTAD/CEPAL: Taller para autoridades locales mineras”. En CEPAL, Ed. Lima, 2004.
2. MEM, “El ABC de la minería en el Ecuador”. En Ministerio de Energía y Minas del Ecuador - Ministerio de Recursos Naturales no Renovables del Ecuador: Quito, 2007.
3. Cisneros, El diálogo minero en el Ecuador: ¿Señales de una nueva relación entre comunidades, empresas extractivas y Estado?. En *Documento de trabajo No 012*, Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales. Observatorio Socio Ambiental: Quito, 2008.
4. Akcil and Koldas, Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies *Journal of Cleaner Production* 2006, 14, 1139 - 1145.
5. Natarajan, Microbial aspects of acid mine drainage and its bioremediation. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 2008, 18, 1352 - 1360.
6. Ley de Minería. En Presidencia de la República del Ecuador, Secretaría Nacional de Comunicación, Sistema de Información para la Gobernabilidad (SIGOB): Quito, 2010. <http://www.sigob.gov.ec/decretos/>. Registro oficial # 517 del 28 de enero del 2009.
7. Sierra - Alvarez, Karri, Freeman, and Field, Biological Treatment of Heavy Metals in Acid Mine Drainage using Sulfate Reducing Bioreactors. *Water Science and Technology* 2006, 54, 179 - 185.
8. Neculita, Zagury, and Bussiere, Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria: critical review and research needs. *Journal of Environmental Quality* 2007, 36, 1-13.
9. Zagury, Narasiah, and Ballivy, Neutralization of acid mine tailings by addition of alkaline sludges from pulp and paper industry *Environmental Science and Technology* 1997, 18, 959 - 973.
10. Brown, Barley, and Wood, Mine water treatment. *Pub. Alliance House* 2002, 1 - 31.

11. Singer, Stumm, Acid Mine Drainage: The Rate-Determining Step. *Division of engineering and Applied Physics* 1970, 1121 - 1123.
12. Mandato Minero. En Presidencia de la República del Ecuador, Secretaría Nacional de Comunicación, Sistema de Información para la Gobernabilidad (SIGOB): Quito, 2010. <http://www.sigob.gov.ec/decretos/>.
13. "Noticias". En Ministerio de Recursos Naturales no Renovables del Ecuador: Quito, 2010.
14. Prodeminca, *Monitoreo Ambiental de las Áreas Mineras en el Sur del Ecuador 1996 - 1998*. UCP Prodeminca: Quito, 1998; p 212.
15. CENDA *Memoria técnica de los trabajos ejecutados por Fundación CENDA en la región de Ponce Enríquez y Pijilí*; Gobierno Nacional del Ecuador: 1996.
16. Andrade. En 2010. Comunicación Personal.
17. Lundberg and Hoffner. *Estudio de prefactibilidad referente al confinamiento de los desechos mineros en el Distrito de Ponce Enríquez* 1997. En Prodeminca, *Monitoreo Ambiental de las Áreas Mineras en el Sur del Ecuador 1996 - 1998*. UCP Prodeminca: Quito, 1998; p 212.
18. Soucek, Cherry, and Zipper, Impacts of mine drainage and other nonpoint source pollutants on aquatic biota in the upper Powell River system, Virginia. *Human and Ecological Risk Assessment* 2003, 9, 1059 - 1073.
19. Wildeman, Smith, and Ranville, A simple scheme to determine potential aquatic metal toxicity from mining wastes. *Environmental Forensics* 2007, 8, 119 - 128.
20. Prato, Biandolino, and Scardicchio, Test for acute toxicity of copper, cadmium, and mercury in five marine species. *Turk J Zool* 2006, 30, 285 - 290.
21. Olayan and Thomas, Toxicity and bioaccumulation of heavy metals in mullet fish *Liza klunzingeri* (Mugilidae: Perciformes). *Chemistry and Ecology* 2005, 21, 191 - 197.

22. Pham and Buckney, Assessment of heavy metals in sediments and aquatic organisms in West Lake (Ho Tay), Hanoi, Vietnam. *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 2007, 12, 285 - 294.
23. Prabu, Impact of heavy metals contamination of Akaki River of Ethiopia on soil and metal toxicity on cultivated vegetable crops. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 2009, 8, 819 - 827.
24. Gazea, Adam, and Kontopoulos, A review of passive systems for the treatment of acid mine drainage. *Minerals Engineering* 1996, 9, 23-42.
25. Stumm and Morgan, *Aquatic Chemistry*. 2nd ed.; New York, 1981.
26. Kleinmann, Hedin, and Nairn, *Thiobacillus ferrooxidans* and the formation of acidity in simulated coal mine environments. *Geomicrobiology Journal* 1979, 1, 373 - 388.
27. Gusek and Wildeman, New developments in passive treatment of acid rock drainage. In *Proc. of the Engineering Foundation Conference on Technological Solutions for Pollution Prevention in the Mining and Mineral Processing Industries*, Palm Coast, Florida, 1995.
28. Nairn, Hedin, and Watzlaf. *En Generation of alkalinity in an anoxic limestone drain* Proc. of the 9th Annual National Meeting of the American Society for Surface Mining and Reclamation, Duluth, Minnesota, 1992; Duluth, Minnesota, 1992.
29. Johnson and Hallberg, Acid mine drainage remediation options: a review. *Science of the Total Environment* 2005, 338, 3 - 14.
30. Kleinmann, Hedin, and Nairn, Treatment of mine drainage by anoxic limestone drains and constructed wetlands. *Springer* 1998, 303 - 319.
31. Gibert, Pablo, Cortina, and Ayora, Treatment of acid mine drainage by sulphate-reducing bacteria using permeable reactive barriers: A review from laboratory to full-scale experiments *Environmental Science and Technology* 2002, 1, 327 - 333.

32. Alexander, *Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur- reducing bacteria* John Wiley and Sons: 1988.

Capítulo II

Efecto del Sustrato como Donador de Electrones durante la Sulfato-Reducción Microbiana y sus Posibles Aplicaciones en el Tratamiento Biológico de los Drenajes Ácidos de Mina

2.1 Resumen

La descarga no controlada de los drenajes ácidos de mina (DAM) caracterizados por elevadas concentraciones de metales disueltos y pH ácido, amenaza la calidad de los cuerpos de agua cercanos a las zonas mineras alrededor del mundo. Las tecnologías basadas en la precipitación de los metales en forma de sulfuros metálicos, catalizada por las bacterias sulfato-reductoras encargadas de la producción desasimilatoria de sulfuros, constituyen un importante método de remediación de los DAM. En este trabajo de investigación se realizaron experimentos *batch* para evaluar la eficiencia de diferentes sustratos (acetato, lactato, etanol y peptona) como donadores de electrones para la biosulfato-reducción en diferentes inóculos microbianos, y sus posibles aplicaciones en el tratamiento biológico de los DAM. De todos los sustratos evaluados en este estudio, la mayor eficiencia de reducción de sulfato catalizada por las bacterias sulfato-reductoras fue alcanzada empleando 2.5 g DQO-acetato L⁻¹ como sustrato donador de electrones y los sedimentos de una laguna artificial como inóculo bacteriano en presencia de 4000 mg L⁻¹ de sulfato como aceptor de electrones. La producción final acumulada de sulfuro fue de 463 mg S²⁻ L⁻¹, mientras que la actividad máxima específica de producción de sulfuro fue de 9 mg S²⁻ g⁻¹ acetato d⁻¹ y la actividad máxima específica de reducción de sulfato fue de 52 mg SO₄²⁻ g⁻¹ acetato d⁻¹.

2.2 Introducción

La minería es sin lugar a dudas una de las actividades económicas más importantes a nivel mundial; sin embargo, ciertos efluentes provenientes de las actividades mineras están caracterizados por pH bajo y altas concentraciones de sulfatos y metales pesados disueltos. Los drenajes ácidos de mina (DAM) crean un problema medioambiental serio que afecta gravemente los ecosistemas de las zonas mineras y sus alrededores. Los sistemas de tratamiento de los DAM basados en el uso de bacterias sulfato-reductoras (BSR) constituyen un área importante de investigación en la actualidad. La participación de estas bacterias (BSR) en la generación biogénica de sulfuros que permiten la precipitación de los contaminantes en forma de sulfuros metálicos, constituye una tecnología prometedora en el tratamiento biológico de los efluentes mineros.

2.2.1 *Bacterias sulfato-reductoras*

Las bacterias sulfato-reductoras (BSR) constituyen un grupo diverso de procariotas que contribuyen con varias funciones esenciales en ambientes anaeróbicos. Además de su importancia en el ciclo del azufre, las bacterias sulfato-reductoras cumplen con importantes tareas en la remediación medioambiental de los drenajes ácidos de mina [1] y en la biodegradación de contaminantes aromáticos clorinados en sedimentos y suelos anaeróbicos [2].

Las bacterias reductoras de sulfato son un conjunto heterogéneo de microorganismos anaeróbicos estrictos, que utilizan compuestos inorgánicos azufrados (en especial sulfato) como aceptores de electrones durante la respiración anaeróbica y que emplean ácidos orgánicos, ácidos grasos, alcoholes y H_2 como donadores de electrones [3]. La tabla 2.1 resume los compuestos azufrados y los donadores de electrones utilizados por las bacterias sulfato-reductoras.

Tabla 2.1: Compuestos azufrados con sus respectivos estados de oxidación y compuestos donadores de electrones utilizados por las bacterias sulfato-reductoras (BSR)

Estados de oxidación de los compuestos azufrados	
Compuesto	Estado de oxidación
S orgánico (R-SH)	-2
Sulfuro (H ₂ S)	-2
Azufre elemental (S ⁰)	0
Tiosulfato (S ₂ O ₃ ²⁻)	+2
Tetrationato (S ₄ O ₆ ²⁻)	+2.5
Dióxido de azufre (SO ₂)	+4
Sulfito (SO ₃ ²⁻)	+4
Trióxido de azufre (SO ₃)	+6
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	+6
Donadores de electrones	
H ₂	Acetato
Lactato	Propionato
Piruvato	Butirato
Etanol y otros alcoholes	Ácidos grasos de cadena larga
Fumarato	Benzoato
Malato	Indol
Colina	Hexadecano

Las bacterias reductoras de sulfato son un grupo fisiológico unificado de microorganismos, en el que se pueden reconocer actualmente alrededor de 18 géneros de bacterias que llevan a cabo la reducción desasimilatoria de sulfato [3]. Las bacterias sulfato-reductoras se pueden dividir en dos grandes grupos: bacterias sulfato-reductoras no oxidantes de acetato (grupo I) y bacterias sulfato-reductoras oxidantes de acetato (grupo II). El grupo I está formado por bacterias capaces de usar lactato, piruvato, etanol y ciertos ácidos grasos como fuentes de carbono en la reducción de sulfato a sulfuro de hidrógeno. Dentro de este grupo se encuentran géneros como *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum* y *Desulfobulbus*. El grupo II está formado por bacterias capaces de oxidar acetato en la reducción de sulfato a sulfuro. Dentro de este grupo se encuentran géneros como *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* y *Desulfonema* [3].

Varios estudios sobre las bacterias sulfato-reductoras (BSR) se han realizado a nivel mundial con el objetivo de caracterizarlas y evaluar su aplicación en el tratamiento de drenajes ácidos de mina. Varias especies han sido aisladas y se ha trabajado con diferentes sustratos obteniendo en cada caso diversos productos de fermentación. La tabla 2.2 muestra algunos ejemplos de bacterias reductoras de sulfato aisladas de diversas fuentes junto con su modo de nutrición y sus productos de fermentación.

Estudios sobre las bacterias sulfato-reductoras que usan acetato como sustrato fueron conducidos por Karnachuk *et al.* en los sedimentos de un área minera en Norilsk (Norte de Siberia) [4]. En dicho estudio se utilizó acetato como donador de electrones y se lo suministró en concentraciones de 7.6 mM (0.5 g DQO L⁻¹). La eficiencia del uso de acetato como sustrato para la sulfato-reducción llevada a cabo por las bacterias sulfato-reductoras se demostró por las velocidades de reducción de sulfato, las mismas que oscilaron entre 0.05 y 30 nmol SO₄²⁻ cm⁻³ d⁻¹, es decir 0.0048 y 2.88 mg SO₄²⁻ L⁻¹ d⁻¹. Adicionalmente, en

el estudio se empleó la técnica del número más probable para el conteo de las bacterias sulfato-reductoras presentes. Se encontraron alrededor de 10^7 células mL^{-1} [4].

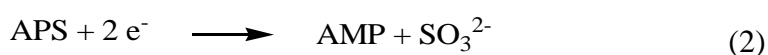
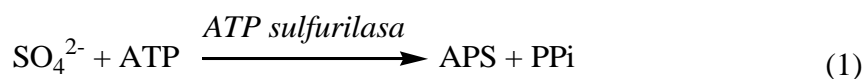
Tabla 2.2: Características de varias bacterias sulfato-reductoras aisladas en diferentes hábitats [5]

Organismo	Modo de nutrición óptimo	Productos de fermentación	Hábitat
<i>Desulfotomaculum Geothermicum</i>	Lactato, etanol, fructosa, ácidos grasos saturados, H ₂ , CO ₂ , sulfato, sulfito	Acetato, H ₂ S	Agua subterránea geotermal
<i>Desulfotomaculum Kuznetsovii</i>	Formato, acetato, propionato, alcoholes varios, sulfato, sulfito, tiosulfato	CO ₂ , H ₂ S	Aguas termales minerales en el depósito de SukhunsK
<i>Desulfotomaculum Nigrificans</i>	Lactato, piruvato, sulfato	H ₂ S	Suelos, aguas termales, digestores anaeróbicos, depósitos de compost
<i>Desulfotomaculum Thermoacetoxidans</i>	Lactato, piruvato, etanol, H ₂ + CO ₂ , sulfato, tiosulfato, S ⁰	Acetato, H ₂ S	Bioreactor anaeróbico
<i>Desulfurella acetivorans</i>	Acetato, S ⁰	H ₂ S, CO ₂	Aguas termales en Kamchatka
<i>Desulfurovibrio thermophilus</i>	Piruvato, formato + acetato, lactato, sulfato	H ₂ S	Muestras de agua de una napa petrolera
<i>Thermodesulfotobacterium commune</i>	Piruvato, lactato, H ₂ , sulfato, tiosulfato	Acetato, H ₂ , CO ₂ , H ₂ S	Área hidrotermal en Yellowstone
<i>Thermotoga marítima</i>	Glucosa, azúcares, sulfuro, cisteína	Lactato, acetato, CO ₂ , H ₂ , H ₂ S	Fondos marinos de elevadas temperaturas en Italia y los Azores
<i>Thermosipho africanus</i>	Extracto de levadura, peptona, triptona, CO ₂ , cisteína, S ⁰	H ₂ S	Área hidrotermal marina en OBrock, África
<i>Thermotoga neapolitana</i>	Variedad de carbohidratos, S ⁰	H ₂ S	Sedimentos marinos, Italia

2.2.2 Reducción de sulfatos a sulfuros catalizada por bacterias sulfato-reductoras

Las bacterias sulfato-reductoras llevan a cabo la reducción de sulfatos, usando el sulfato (SO_4^{2-}) como aceptor terminal de electrones durante la respiración anaeróbica. La sulfato-reducción puede seguir un proceso desasimilatorio o asimilatorio [3]. En la reducción desasimilatoria, el sulfuro de hidrógeno (H_2S) formado por la reducción del sulfato, es excretado o liberado al ambiente; mientras que en la reducción asimilatoria de sulfato, el H_2S formado se convierte inmediatamente en azufre orgánico que pasa a formar parte de aminoácidos como la cisteína o la metionina. La figura 2.1 representa la reducción desasimilatoria y asimilatoria de sulfato a sulfuro durante la sulfato-reducción catalizada por las bacterias sulfato-reductoras [3].

La reducción de sulfato a sulfuro de hidrógeno es una reducción de ocho electrones que sigue un mecanismo de varios pasos. Tanto en la reducción desasimilatoria como en la asimilatoria, el proceso inicia con la reacción del sulfato con el trifosfato de adenosina (ATP) para formar el fosfosulfato de adenosina (APS) y el pirofosfato (PPi) como se muestra en la ecuación (1). La enzima *ATP sulfurilasa* cataliza la unión del sulfato a un fosfato del ATP. En la ecuación (2) se muestra el siguiente paso en la reducción desasimilatoria, consistente en la reducción de la porción sulfato del APS a sulfito (SO_3^{2-}), generando monofosfato de adenosina (AMP) como producto. Finalmente el sulfito se reduce a H_2S como se observa en la ecuación (3) [3, 6].



La figura 2.1a) indica la reducción desasimilatoria descrita previamente.

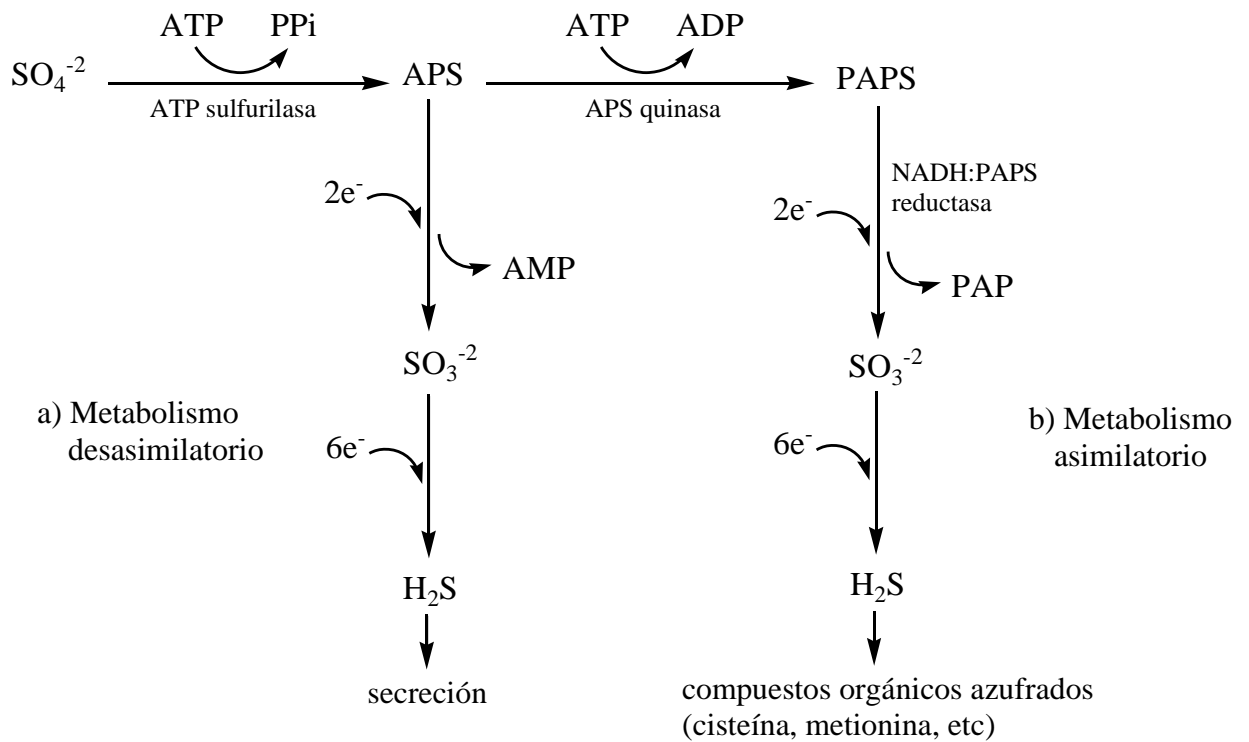
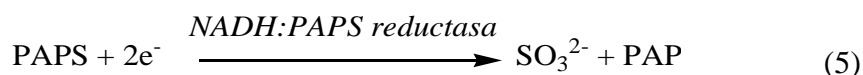
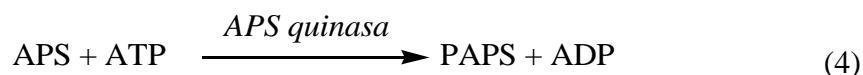
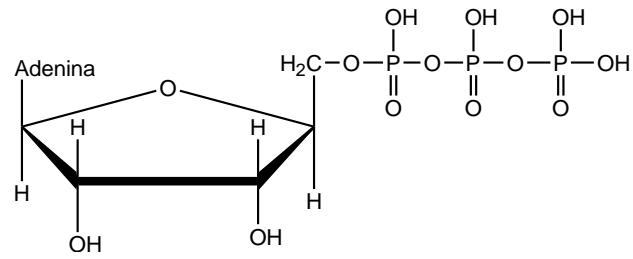


Figura 2.1: Esquema de la reducción desasimilatoria (a) y asimilatoria (b) de sulfato durante la sulfato reducción

En la reducción asimilatoria, después de la formación del APS se da una reacción entre el ATP y el APS formado, produciéndose el fosfosulfato de fosfoadenosina (PAPS) y el ADP como se indica en la ecuación (4). La enzima *APS quinasa* cataliza el paso del APS al PAPS. La ecuación (5) muestra el siguiente paso consistente en la reducción del sulfato del PAPS a sulfito, produciéndose el difosfato de adenosina (PAP). El paso final de sulfito a sulfuro procede de la misma manera que en el caso de la reducción desasimilatoria de sulfato como se indica en la ecuación (3). La figura 2.1b) muestra la reducción asimilatoria de sulfato a sulfuro de hidrógeno descrita. Las estructuras químicas del trifosfato de adenosina (ATP), fosfosulfato de adenosina (APS) y fosfosulfato de fosfoadenosina (PAPS) están representadas en la figura 2.2.

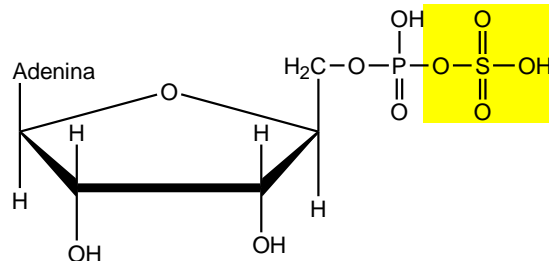


El proceso descrito para la reducción de sulfatos biogénica es llevado a cabo por las bacterias sulfato-reductoras a través del transporte de electrones basado en citocromos. Las BSR transfieren electrones desde la fuente de energía al ión sulfato en el APS y al sulfito, a través del citocromo c_3 que se encuentra en las mismas. El citocromo c_3 es un citocromo muy electronegativo que no se encuentra en organismos que usan otros aceptores de electrones [3].



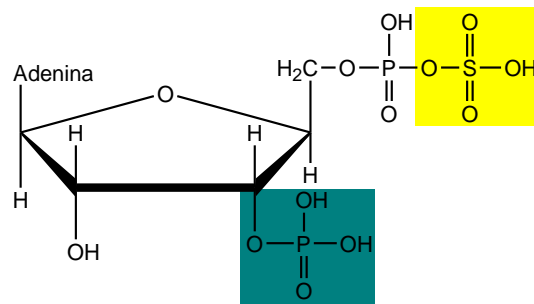
ATP

Metabolismo
desasimilatorio



APS

Metabolismo
asimilatorio



PAPS

Figura 2.2: Estructura del trifosfato de adenosina (ATP), fosfosulfato de adenosina (APS) y fosfosulfato de fosfoadenosina (PAPS).

2.2.3 Ecología de las bacterias sulfato-reductoras

Existen muchas áreas en el planeta en las que se generan sulfuros naturalmente a través de la bioreducción de sulfatos. Las bacterias sulfato-reductoras, encargadas de la reducción microbiana del sulfato, crecen en un rango de pH amplio, siendo los pH neutros o ligeramente básicos los preferidos por estos microorganismos [7]. Las bacterias reductoras de sulfatos están muy esparcidas en ambientes anaeróbicos acuáticos y terrestres [3]. Se conoce que el crecimiento de estos microorganismos en ambientes naturales se da principalmente en el agua de mar con determinadas concentraciones salinas debido a que el sulfato es el segundo anión más abundante en las aguas marinas [6]. Estas bacterias también crecen en ciertas aguas subterráneas con baja mineralización; en suelos encharcados con materia orgánica abundante y suficiente cantidad de sulfato; en sedimentos de lagos y lagunas, en manantiales cercanos a zonas volcánicas, entre otros [7]. Un ejemplo de la biosulfato-reducción catalizada por bacterias presentes en sedimentos ocurre en el lago Ain-ez-Zania en Libia, en el que se encuentran $20 \text{ mg H}_2\text{S L}^{-1}$ en la superficie del lago, mientras que en el fondo del lago se determinaron concentraciones de hasta $108 \text{ mg H}_2\text{S L}^{-1}$ [8].

Manoues y colaboradores realizaron estudios en los sedimentos del lago Devils en la región noreste de Dakota del Norte (Estados Unidos) [9]. En el estudio se encontraron concentraciones de sulfatos en el lago de entre 3.1 y 31 mM (300 y 3000 mg L^{-1}) y actividades máximas específicas de sulfato-reducción entre 11 y $88 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, es decir 1.1 y $8.5 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. También se realizaron experimentos *batch* utilizando diferentes concentraciones de sulfato, desde 11 hasta 30 mM SO_4^{2-} (1056 y $2880 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$). Adicionalmente, en uno de los ensayos, se utilizó acetato ($30 \text{ mM} - 1.92 \text{ g DQO L}^{-1}$) para demostrar la importancia de un donador de electrones adecuado en la actividad de las bacterias sulfato-reductoras en sedimentos. Los resultados obtenidos demostraron la

eficiencia del uso de acetato como donador de electrones en la reducción de sulfatos, ya que las actividades máximas específicas de sulfato-reducción con el uso de acetato fueron hasta 6 veces mayores que sin el uso del mismo; mientras que, el incremento de la concentración de sulfato no afectó las tasas de reducción de sulfatos [9].

Otro ejemplo de la presencia de bacterias sulfato reductoras en sedimentos de lagos fue documentado por Vladár *et al.* en los sedimentos del lago Velencei ubicado al suroeste de Budapest (Hungría) [10]. En dicho estudio se utilizó lactato como donador de electrones y se empleó la técnica del número más probable (NMP) para el conteo de las BSR presentes en los sedimentos. Se encontraron alrededor de 5.4×10^5 bacterias sulfato-reductoras g^{-1} en los sedimentos. Alrededor de 47 culturas de bacterias sulfato reductoras fueron caracterizadas a través de métodos moleculares. Adicionalmente, se probaron diferentes donadores de electrones para obtener información acerca de la capacidad de utilización del sustrato de las especies aisladas de los sedimentos. Se demostró que las especies formaban parte del grupo I de las bacterias sulfato-reductoras no oxidantes de acetato. Las especies lograron usar lactato, piruvato, etanol y malato como donadores de electrones en la reducción desasimilatoria de sulfato, mientras que ninguna fue capaz de utilizar acetato como donador de electrones [10]. En la tabla 2.3 se presentan algunos ejemplos de biosulfato-reducción en ambientes naturales.

Tabla 2.3: Formación natural de sulfuro por la acción de bacterias sulfato-reductoras en diversas zonas [8]

Lugar	Concentración H₂S (mg L⁻¹)	Tasa de síntesis (mg H₂S L⁻¹ día⁻¹)
Copahue, Territorio del Neuquén, Argentina	28	
Aguas subterráneas, Depósitos tortonianos, Rusia		0.01 – 2.0
Reservorio del Volga, Rusia		0.09 – 13.1
Mar Caspio	629	
Sedimentos Lago Solenoe, Rusia		1.4
Mar Negro	100	
Manantiales minerales del Cáucaso , Rusia		20

2.2.4 *Investigación sobre las bacterias sulfato-reductoras a nivel regional*

En Latinoamérica, los estudios publicados sobre bacterias sulfato-reductoras se basan principalmente en investigaciones sobre la corrosión generada por este tipo de bacterias. En Argentina, Torrado *et al.* demostraron el efecto inhibitorio de sales de molibdato y nitrato de sodio en las bacterias sulfato-reductoras, obteniendo disminuciones del sulfuro de 100% y 80% respectivamente [11]. En estudios conducidos en Venezuela por Figueroa y colaboradores se determinó la responsabilidad de las bacterias sulfato-reductoras en la corrosión de acero inoxidable austenítico 316L [12]. Se obtuvieron picaduras y corrosión intergranular tanto en el material base como en las soldaduras del acero en estudio cuando fue expuesto a la acción de las bacterias sulfato-reductoras [12].

El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar la capacidad de utilización de diferentes sustratos como donadores de electrones por las bacterias sulfato-reductoras y sus posibles aplicaciones en el tratamiento biológico de los drenajes ácidos de mina. Diferentes sustratos, tales como, acetato, lactato, etanol y peptona fueron evaluados en este estudio. Los inóculos microbianos anaeróbicos estudiados incluyeron tanto lodos como sedimentos, provenientes de plantas de tratamiento, lagunas artificiales y naturales, y lagunas de estabilización en el Ecuador.

2.3 Materiales y Métodos

2.3.1 Lodos y sedimentos

Cinco diferentes lodos anaeróbicos fueron evaluados en el presente estudio, tres de ellos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales y dos de ellos, sedimentos de lagunas. Se obtuvo un lodo anaeróbico de la laguna facultativa de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba - ETAPA en Cuenca (L₁). También se emplearon como inóculos microbianos lodos de una planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Quito: lodos del hidrociclón (L₂) y del tanque de sedimentación o lodos de descarga (L₃). Adicionalmente, se recogieron los sedimentos de una laguna artificial de la Universidad San Francisco de Quito (L₄) y de una laguna natural ubicada en la provincia de Orellana (L₅), en la región amazónica. El contenido de sólidos totales en suspensión (STS) y de sólidos volátiles en suspensión (SVS) en los lodos y sedimentos fue (STS, SVS): L₁ (13.94%, 3.56%); L₂ (8.94 g L⁻¹, 5.92 g L⁻¹); L₃ (2.88 g L⁻¹, 2.00 g L⁻¹); L₄ (14.90%, 6.28%) y L₅ (20.64%, 2.69%). Los lodos y sedimentos fueron conservados en refrigeración a 4°C en botellas plásticas.

2.3.2 Medio de cultivo

La composición del medio basal mineral (pH 7.1-7.3) usado en los bioensayos de la actividad metanogénica y de la actividad sulfato-reductora fue (en mg L⁻¹): NH₄Cl (280); KH₂PO₄ (195); MgSO₄ (49); CaCl₂ (10); NaHCO₃ (3000); extracto de levadura (10) y 1 mL L⁻¹ de solución de elementos traza. La solución de elementos traza estaba formada por (en mg L⁻¹): H₃BO₃ (50), FeCl₂·4H₂O (2,000), ZnCl₂ (50), MnCl₂ (32), (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (50), AlCl₃ (50), CoCl₂·6H₂O (2,000), NiCl₂·6H₂O (50),

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (44), $\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (100), EDTA (1,000), resazurina (200) y 1 mL L^{-1} de HCl 36% [13].

2.3.3 *Reactivos*

El sulfato de sodio (100%, pureza) fue obtenido de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). El sulfato de amonio y hierro (III), el acetato de sodio y el etanol (96%) fueron obtenidos de Laboratorios Químicos H.V.O. (Quito, Ecuador). El ácido sulfúrico (95.0 - 97 %) y la peptona fueron obtenidos de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). El DMP (oxalato de N,N-dimetil-p-fenildiamina) (> 99%) fue obtenido de Acros Organics (Geel, Bélgica). El cloruro de zinc (97.1%) fue obtenido de J. T. Baker (Zedelgem, Bélgica). El ácido láctico (88 - 92%) fue obtenido de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania). El N_2 gas fue entregado por AGA Ecuador (Guayaquil, Ecuador). Todos los reactivos fueron utilizados en el estado en el que fueron recibidos.

2.3.4 *Métodos analíticos*

Determinación de sólidos totales en suspensión (STS) y de sólidos volátiles en suspensión (SVS)

La determinación de los sólidos totales en suspensión y sólidos volátiles en suspensión se realizó de acuerdo al protocolo descrito en Métodos Normalizados para el Análisis de Agua Potable y Agua Residual [14]. Los ensayos se realizaron por triplicado mediante el método de crisoles, evaporación a 105°C en un horno y calcinación de la materia orgánica en una mufla a 550°C , respectivamente. Se determinó el peso de los crisoles vacíos previamente colocados en una mufla a 550°C por una hora para asegurarse de que cualquier residuo sólido del crisol se calcine por completo. En el caso de lodos líquidos, se

colocó aproximadamente 25 mL de lodo en cada crisol, mientras que para lodos más sólidos se colocaron aproximadamente 5 g de lodo en cada crisol y se determinó el peso del crisol más el lodo húmedo. Posteriormente se dejaron los crisoles en un horno a 105°C durante una noche (12 horas aproximadamente) y se obtuvo el peso del crisol más el lodo seco. Después de una precalcificación para remover todo el azufre formado por la combustión de la materia orgánica, se procedió a la calcinación en una mufla a 550°C durante 3 horas, obteniéndose el peso del crisol más las cenizas.

Se determinó la masa del lodo seco (m_{ls}), del lodo húmedo (m_{lh}) y de las cenizas (m_c) para el cálculo de la cantidad de sólidos totales en suspensión (STS) y de sólidos volátiles en suspensión (SVS) en los lodos sólidos:

$$\%STS = \frac{m_{ls}}{m_{lh}} \times 100$$

$$\%SVS = \frac{m_{ls} - m_c}{m_{lh}} \times 100$$

De la misma manera, se determinó la masa del lodo seco (m_{ls}), de las cenizas (m_c) y el volumen del lodo húmedo (V_{lh}) para el cálculo de la cantidad de sólidos totales en suspensión (STS) y de sólidos volátiles en suspensión (SVS) en los lodos líquidos:

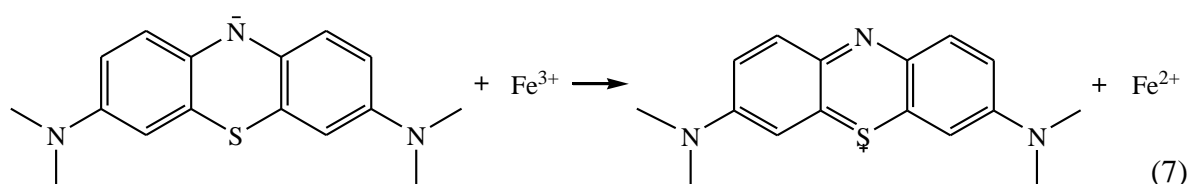
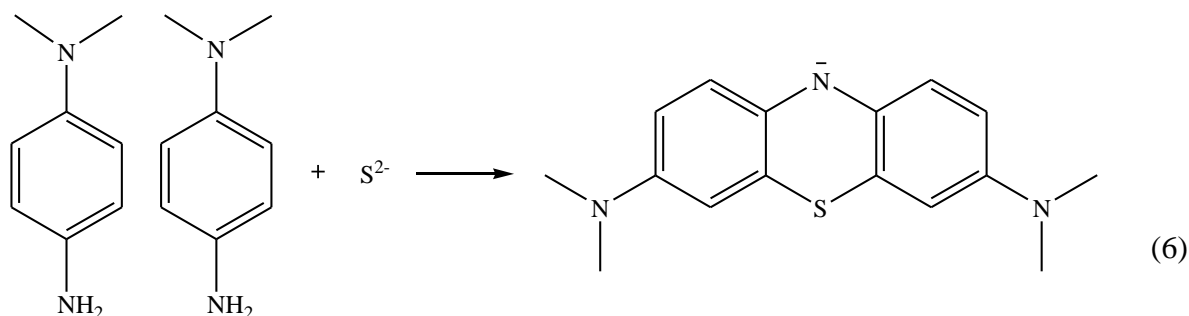
$$STS \text{ (g/L)} = \frac{m_{ls}}{V_{lh}}$$

$$SVS \text{ (g/L)} = \frac{m_{ls} - m_c}{V_{lh}}$$

Medición de sulfuros

El sulfuro disuelto total fue determinado espectrofotométricamente por el método del azul de metileno a una longitud de onda de 670 nm [15, 16]. En este método se monitorea colorimétricamente la formación del azul de metileno que resulta de la reacción entre el

sulfuro y el reactivo colorimétrico, DMP (oxalato de N,N-dimetil-p-fenildiamina) en medio ácido:



La medición de sulfuro disuelto se realizó de la siguiente manera. En un balón volumétrico de 25 mL, se colocaron 5 mL de solución de cloruro de zinc (2%), 2.5 mL de solución de DMP (2 g L^{-1}) con 20% de ácido sulfúrico concentrado, 0.125 mL de solución de sulfato de amonio y hierro (III) (100 g L^{-1}) y el volumen de muestra adecuado de acuerdo a la cantidad de sulfuro (S^{2-}) esperada, tomando en cuenta que la concentración máxima de sulfuro en el balón debía ser 1 mg L^{-1} . Pevio a la medición de las muestras, se realizaron curvas de calibración entre 0 y $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ S}^{2-}$.

Medición de metano

El volumen del gas metano generado durante los bioensayos anaeróbicos se determinó mediante un método de desplazamiento de líquido utilizando botellas de suero [17]. El reactor *batch* anaeróbico (botella de suero de 160 mL), se conectó mediante una manguera a una botella de suero (160 mL colocada de forma inversa) como se muestra en la figura 2.3, suministrada con la solución de NaOH (2%) previamente sellada con un tapón de caucho y una tapa de aluminio. El biogás formado en los bioensayos anaeróbicos está

compuesto de dióxido de carbono y metano. A medida que el dióxido de carbono (CO_2) pasa a través de la solución de hidróxido de sodio, este es convertido en bicarbonato y es absorbido; mientras que el metano generado desplaza a dicha solución. El volumen de la solución de hidróxido de sodio desplazado, equivalente al gas metano formado, se recolectó en un recipiente vacío a través de una aguja acoplada a la botella de NaOH. Finalmente, se determinó el metano generado expresado como actividad metanogénica máxima específica en $\text{mg CH}_4\text{-DQO g}^{-1} \text{SVS d}^{-1}$.

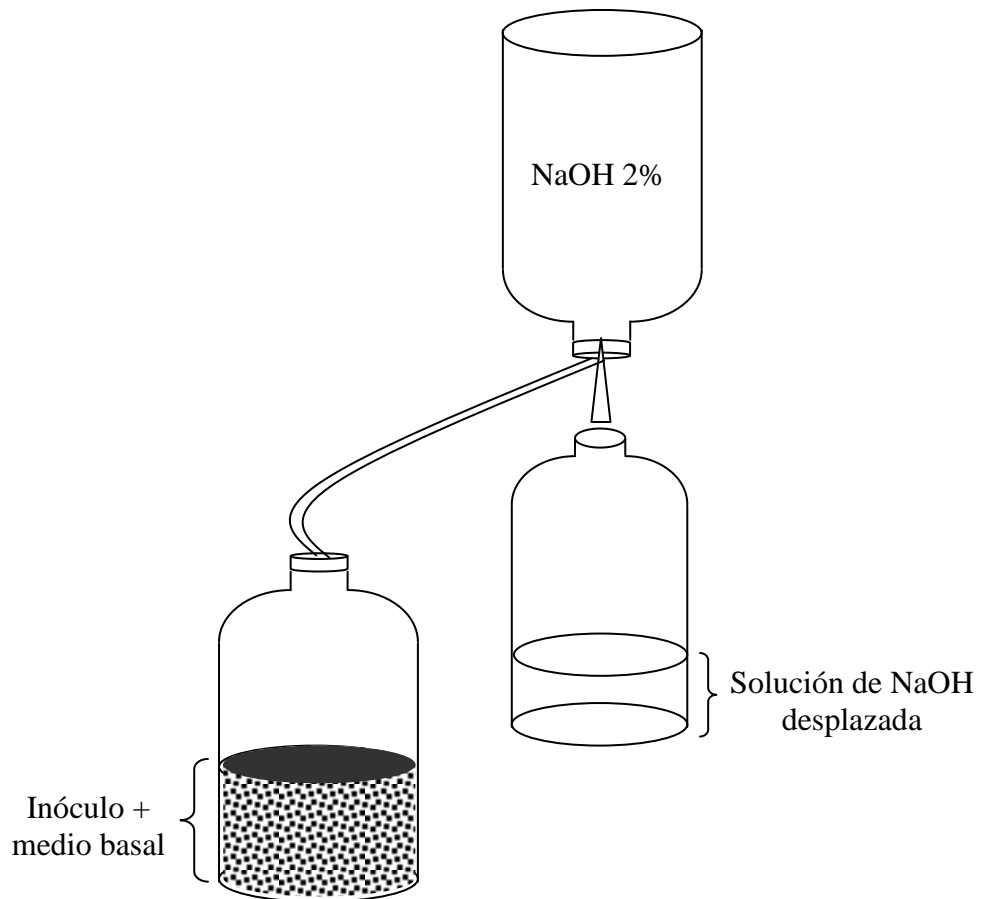
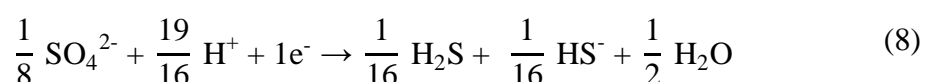


Figura 2.3: Ilustración esquemática de la medición de metano por el método volumétrico de desplazamiento de la solución de hidróxido de sodio.

2.3.5 Actividad sulfato-reductora

La determinación de la actividad máxima específica sulfato-reductora fue realizada por duplicado en botellas de vidrio de 150 mL selladas con tapones de caucho y tapas de aluminio. En cada botella se colocó el medio basal mineral (100 mL), sulfato de sodio (4000 mg L⁻¹), el sustrato y el inóculo microbiano (10% v/v). Los sustratos empleados fueron acetato (2.5 g DQO L⁻¹), lactato (2.5 g DQO L⁻¹ y 25 g DQO L⁻¹), etanol (2.5 g DQO L⁻¹ y 25 g DQO L⁻¹) y peptona (2.5 g L⁻¹ y 25 g L⁻¹). En cada bioensayo se realizó una purga con N₂ para asegurar condiciones anaeróbicas. Los controles, montados por duplicado, se basaron en ensayos en los que no se colocó inóculo. Las botellas se mantuvieron en una incubadora con la temperatura controlada a 30 ± 2 °C. Se monitoreó periódicamente la reducción de sulfato a sulfuro midiendo la concentración de S²⁻ de acuerdo al método de medición de sulfuro descrito previamente. Las actividades máximas específicas sulfato-reductoras y actividades máximas específicas de generación de sulfuro se expresaron en mg SO₄²⁻ g⁻¹ sustrato d⁻¹ y en mg S²⁻ g⁻¹ sustrato d⁻¹, respectivamente. Se relacionó la cantidad de sulfato reducida con la cantidad de sulfuro generada en forma de H₂S, de acuerdo a la siguiente ecuación [18]:



2.3.6 Actividad metanogénica

La determinación de la actividad máxima específica metanogénica fue realizada en botellas de vidrio de 160 mL selladas con tapones de caucho y tapas de aluminio. En cada botella se colocó el medio basal (50 mL), el sustrato donador de electrones (acetato de sodio, 2.14 g DQO L⁻¹) y el inóculo microbiano (10% v/v). En cada bioensayo se realizó una purga con N₂ para asegurar condiciones anaeróbicas. Las botellas se mantuvieron en una incubadora con la temperatura controlada a 30 ± 2 °C. Se monitoreó la generación de

metano durante cinco días de acuerdo al método de medición de metano descrito previamente. La actividad máxima específica de generación de metano se expresó en $\text{mg CH}_4\text{-DQO g}^{-1} \text{SVS d}^{-1}$.

2.4 Resultados y Discusión

En el presente estudio se evaluaron en experimentos batch diferentes sustratos como donadores de electrones durante la reducción de sulfato a sulfuro por un cultivo mixto de bacterias sulfato-reductoras presentes en lodos anaeróbicos de diversas fuentes. La figura 2.4 representa un ejemplo ilustrativo de la producción de sulfuro con respecto al tiempo utilizando acetato como sustrato (2.5 g DQO L^{-1}) en presencia de 4000 mg L^{-1} de sulfato en un control abiótico (ausencia de microorganismos) y en el tratamiento completo con el lodo de la laguna facultativa de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de Ucubamba - ETAPA en la ciudad de Cuenca como inóculo microbiano. La producción de sulfuro en el control fue prácticamente nula, mientras que en el tratamiento la producción de S^{2-} aumentó conforme avanzaba la reacción, y fue significativamente mayor que en el control. En el tratamiento se obtuvieron un máximo de 35.96 mg L^{-1} de S^{2-} después de 45 días de reacción, mientras que en el control la concentración de S^{2-} obtenida en el mismo periodo de tiempo fue de 0.43 mg L^{-1} . En cada uno de los inóculos microbianos y los sustratos evaluados en este estudio se observó la misma tendencia, la concentración de sulfuro aumentaba con respecto al tiempo en los tratamientos, mientras que en el control abiótico se mantenía constante y era despreciable. Estos resultados indican que las bacterias sulfato-reductoras presentes en los lodos utilizaron los sustratos (acetato, lactato, etanol y peptona) como donadores de electrones en mayor o menor grado para la reducción del sulfato, los detalles de estos bioensayos se los explicarán a continuación.

El ácido sulfhídrico se caracteriza por ser un ácido débil cuyos valores de la constantes de disociación K_{a1} y K_{a2} son 9.6×10^{-8} y 9.3×10^{-14} , respectivamente [19]:



El pH de los bioensayos realizados en el presente estudio fue de 7. En base a los valores de pKa del ácido sulfhídrico se estableció que al pH de trabajo existe una concentración de 0.96 mol L^{-1} de HS^- por mol $\text{H}_2\text{S L}^{-1}$. Por lo tanto, las especies predominantes en los experimentos batch a pH igual a 7 son el HS^- y el H_2S en una relación prácticamente de 1:1. Estos resultados son consistentes con la reducción de sulfato propuesta por Eddy [18], representada en la ecuación (8), la cual indica que existe una relación equimolar entre la cantidad de H_2S y HS^- formados durante la sulfato-reducción microbiana.

Adicionalmente, con la constante de Henry para el H_2S a 25°C ($1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1} \text{ atm}^{-1}$) [20], se conoce que la relación entre la concentración de H_2S (ac) y H_2S (g) es de 2.45, es decir que, por cada mol de H_2S en estado gaseoso se encuentran 2.45 mol de H_2S en estado acuoso. Por lo tanto, se puede presumir que aproximadamente el 70% del sulfuro presente en los bioensayos se encuentra en estado acuoso. El sulfuro total generado como HS^- y H_2S se monitoreó en estado acuoso de acuerdo al protocolo descrito en la sección 2.3 de Materiales y Métodos.

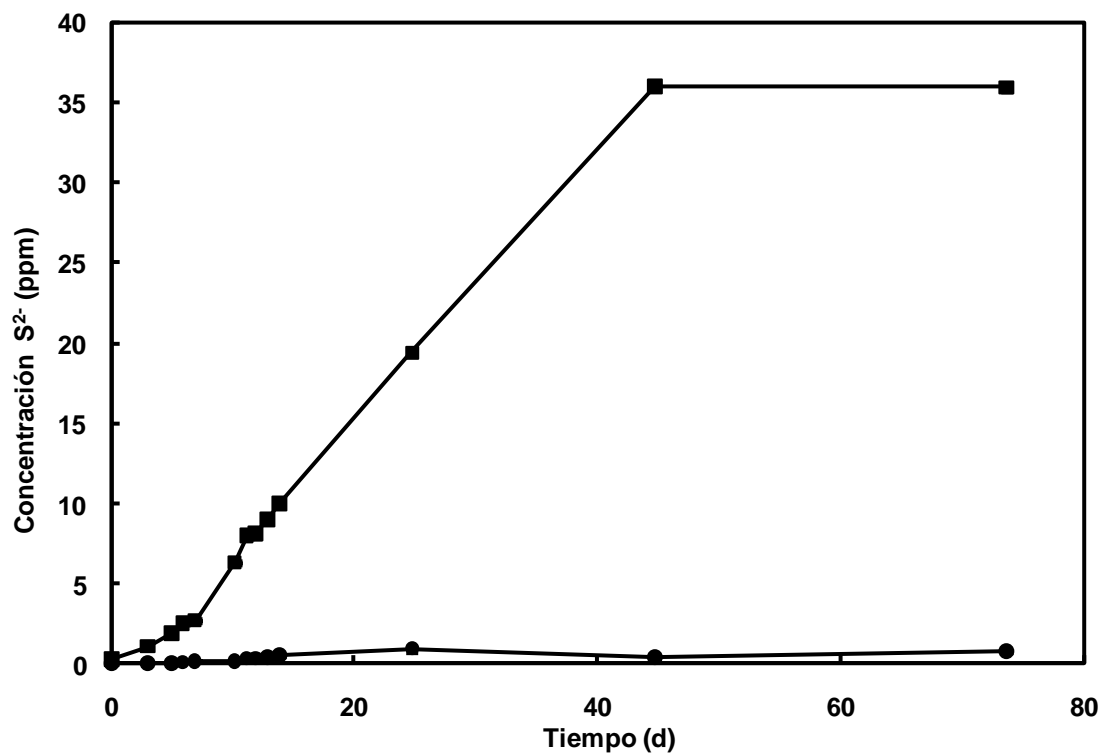


Figura 2.4: Producción de sulfuro con respecto al tiempo con $2.5 \text{ g acetato-DQO L}^{-1}$ y 4000 mg L^{-1} de sulfato utilizando 10% v/v del lodo anaeróbico de la laguna facultativa de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba - ETAPA en Cuenca (L_1). Leyenda: (●) control abiótico (acetato + sulfato); (■) tratamiento completo (acetato + sulfato + microorganismos). Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por duplicado.

La figura 2.5 muestra la producción de sulfuro con respecto al tiempo empleando 2.5 g DQO-acetato L⁻¹ y 4000 mg L⁻¹ de sulfato para los diferentes lodos y sedimentos evaluados en este estudio. Se puede notar que de los inóculos estudiados, el que muestra la mayor producción de sulfuro es el sedimento anaeróbico de la laguna artificial de la USFQ con una producción de 463.25 mg S²⁻ L⁻¹ después de 56 días de tratamiento. Los sedimentos de la laguna facultativa de la PTAR de Ucubamba - ETAPA en Cuenca y el lodo del hidrociclón proveniente de una PTAR en Quito registran una producción de sulfuro significativamente menor a la de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ para el mismo período de tiempo (56 días), alrededor de 36 mg S²⁻ L⁻¹ en el caso del lodo de la laguna facultativa y de 26 mg S²⁻ L⁻¹ para el lodo del hidrociclón de la PTAR de Quito. El lodo de la descarga de esta última planta, presenta la menor concentración de sulfuro entre los inóculos microbianos evaluados, de aproximadamente 12 mg S²⁻ L⁻¹.

La producción final acumulada de sulfuro, así como las actividades máximas específicas de producción de sulfuro y de reducción de sulfato para los diferentes lodos y sedimentos anaeróbicos empleados se presentan en la tabla 2.4 (pág. 76). Las actividades máximas específicas de generación de sulfuro y de sulfato-reducción utilizando acetato como sustrato varían entre 0.48 y 8.74 mg S²⁻ g⁻¹ sustrato d⁻¹, y 1.51 y 52.43 mg SO₄²⁻ g⁻¹ sustrato d⁻¹, respectivamente. En base a estos resultados se puede establecer que la actividad máxima específica de generación de sulfuro o reducción de sulfato de los sedimentos de la laguna artificial es 18 veces mayor que la de los lodos de la laguna facultativa de Cuenca, 15 veces mayor que la de los lodos del hidrociclón de la PTAR de Quito y 35 veces mayor que la de los lodos de la descarga de la PTAR de Quito.

Los resultados obtenidos con el uso de acetato como donador de electrones en la sulfato-reducción en el presente trabajo de investigación son comparables con estudios previos publicados. Manoues *et al.* encontraron actividades máximas específicas de sulfato-

reducción de hasta $8.5 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, utilizando acetato como sustrato ($1.92 \text{ g DQO L}^{-1}$) y sulfato como aceptor de electrones (3000 mg L^{-1}) en los sedimentos del lago Devils en Dakota del Norte [9]. En el caso de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ, el mejor inóculo microbiano oxidante de acetato entre los evaluados en este estudio, se obtuvo una actividad máxima específica sulfato-reductora de $278.5 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($52.427 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ sustrato d}^{-1}$) utilizando 2.5 g DQO L^{-1} de acetato y $4000 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$. Se puede notar una actividad máxima específica sulfato-reductora 33 veces mayor comparada con la obtenida en el estudio de Manoues bajo condiciones similares. En base a estos resultados, se puede concluir que la reducción de sulfato y por ende la producción de sulfuro con el uso de acetato, utilizando los sedimentos de la laguna de la USFQ como inóculo microbiano fue bastante eficiente.

El empleo de acetato durante la generación de sulfuro catalizada por las bacterias sulfato-reductoras presentes en los sedimentos de la laguna artificial son excelentes candidatos para el tratamiento biológico de los drenajes ácidos de mina en sistemas continuos. El sulfuro generado por las BSR en presencia de acetato y sulfato promueve la precipitación de los metales pesados. Mediante este tratamiento se remueven tanto los metales pesados como los sulfatos de los efluentes mineros, reduciendo significativamente el impacto tanto a la salud humana como a los ecosistemas.

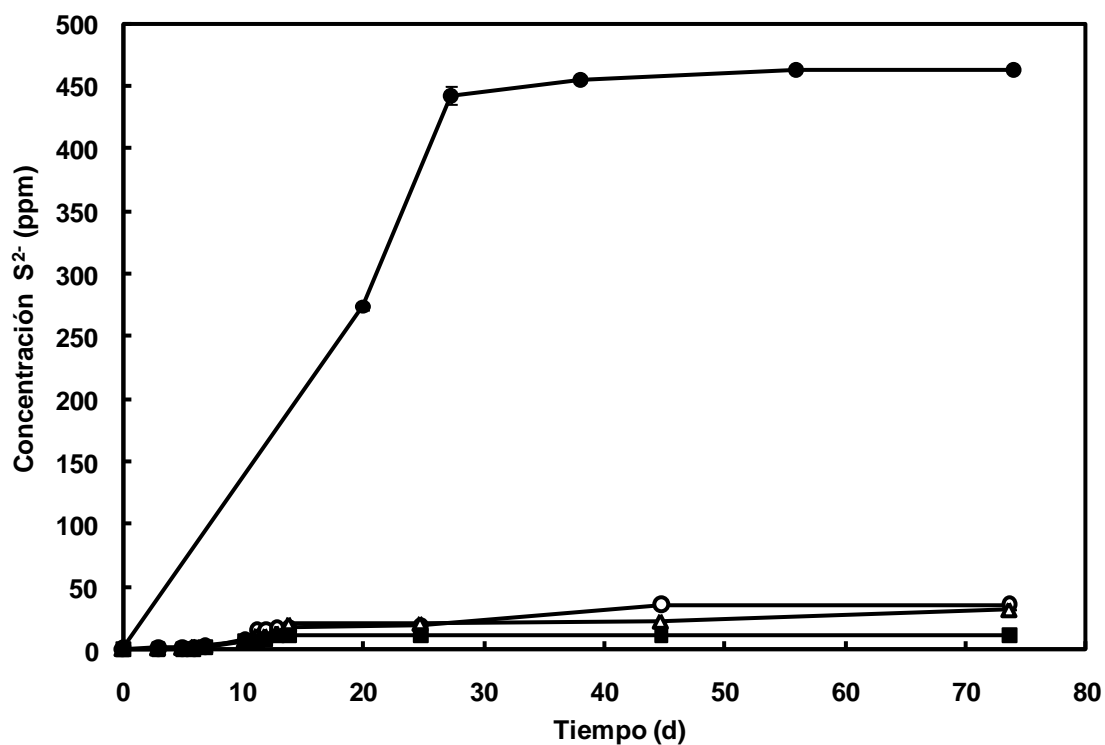


Figura 2.5: Producción de sulfuro con respecto al tiempo con 2.5 g acetato-DQO L⁻¹ y 4000 mg L⁻¹ de sulfato utilizando 10% v/v de inóculo microbiano proveniente de varias fuentes en los tratamientos completos (acetato + sulfato + microorganismos). Leyenda: (o) sedimentos de la laguna facultativa de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba - ETAPA en Cuenca (L₁); (Δ) lodo del hidrociclón de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L₂); (■) lodo de la descarga de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L₃); (●) sedimentos de la laguna artificial de la USFQ (L₄). Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por duplicado.

La producción de sulfuro con respecto al tiempo utilizando lactato (2.5 g DQO L^{-1}) como sustrato para los diferentes lodos y sedimentos anaeróbicos evaluados en este estudio se describe en la figura 2.6. En el caso de este sustrato, el lodo de la laguna de la provincia de Orellana (L5) presenta la mayor producción de sulfuro, $197 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ en 27 días, comparados con 122 mg L^{-1} de sulfuro generados por el segundo mejor inóculo, lodos del hidrociclón de la PTAR de Quito, en el mismo periodo de tiempo. En los 27 días de tratamiento, el lodo de la laguna facultativa y los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ presentaron producciones de sulfuro similares de $78 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ y $66 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$, respectivamente; mientras que los lodos de la descarga de la PTAR de Quito presentan la menor generación de sulfuro de alrededor de $19 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ en el periodo de tiempo mencionado.

Las actividades máximas específicas de generación de sulfuro y sulfato-reductora utilizando lactato como donador de electrones están registradas en la tabla 2.4 (pág. 76). La mayor actividad sulfato-reductora máxima específica fue obtenida con el lodo de la laguna natural de la provincia de Orellana. Prácticamente todos los demás inóculos evaluados (con excepción del lodo de la descarga de la PTAR de Quito), presentan actividades máximas de generación de sulfuro o reducción de sulfato equivalentes a la mitad del valor obtenido con los sedimentos de la laguna natural. Si bien es cierto que $4,16 \text{ mg S}^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ sustrato d}^{-1}$ y $24,97 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ sustrato d}^{-1}$ fueron las mayores actividades obtenidas con los sedimentos de la laguna natural, dichas actividades constituyen apenas el 50% de la actividad máxima específica de generación de sulfuro de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ en presencia de acetato.

En estudios recientes, Oyekola y colaboradores demostraron la eficiencia del uso de lactato como sustrato para la reducción biológica de sulfato [21]. Se utilizaron concentraciones de sulfato de entre $1000 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ y $10,000 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ y concentraciones de lactato de

25 g DQO-lactato L^{-1} . La actividad máxima específica sulfato-reductora obtenida fue de 864 mg $SO_4^{2-} L^{-1} d^{-1}$ [21]. Estudios conducidos por Celis *et al.* evaluaron el uso de lactato como sustrato en la reducción de sulfato biogénica [22]. La concentración de sulfato empleada fue de 1500 mg $SO_4^{2-} L^{-1}$, mientras que el lactato fue suministrado en concentraciones de 1 g DQO L^{-1} . Se obtuvo una actividad máxima específica de reducción de sulfatos de 830 mg $SO_4^{2-} L^{-1} d^{-1}$ [22]. La actividad de reducción de sulfato máxima específica reportada por los dos estudios mencionados, muestra un orden de magnitud más que la obtenida en los bioensayos realizados en este trabajo de investigación (65 mg $SO_4^{2-} L^{-1} d^{-1}$ o 24.968 mg $SO_4^{2-} g^{-1}$ sustrato d^{-1}) con los sedimentos de la laguna natural, empleando el mismo sustrato y trabajando bajo condiciones similares. Esta diferencia probablemente se deba a que el consorcio microbiano presente en los sedimentos de la laguna natural de la provincia de Orellana no presenta una actividad microbiana oxidante de lactato tan marcada como en el caso del estudio mencionado.

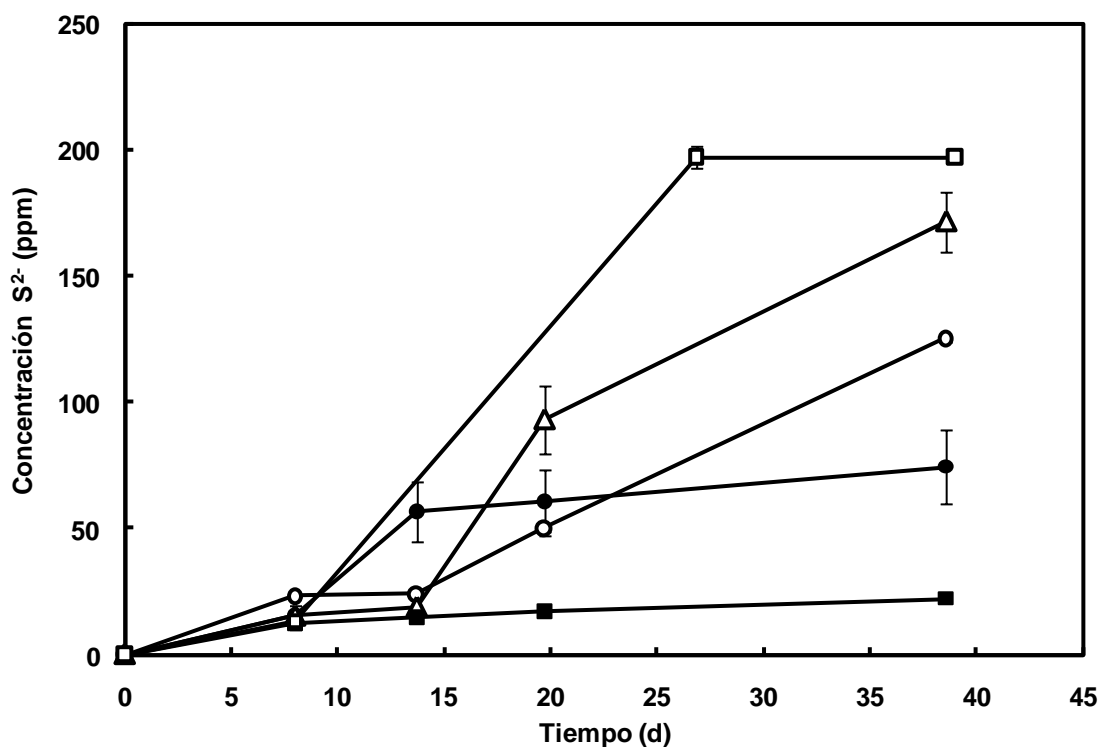


Figura 2.6: Producción de sulfuro con respecto al tiempo con $2.5 \text{ g lactato-DQO L}^{-1}$ y 4000 mg L^{-1} de sulfato utilizando 10% v/v de inóculo microbiano proveniente de varias fuentes en los tratamientos completos (lactato + sulfato + microorganismos). Leyenda: (o) sedimentos de la laguna facultativa de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba - ETAPA en Cuenca (L_1); (Δ) lodo del hidrociclón de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L_2); (\blacksquare) lodo de la descarga de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L_3); (\bullet) sedimentos de la laguna artificial de la USFQ (L_4); (\square) sedimentos de una laguna natural en la provincia de Orellana (L_5). Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por duplicado.

La figura 2.7 representa la generación de sulfuro con respecto al tiempo utilizando etanol (2.5 g DQO L^{-1}) como donador de electrones durante la sulfato-reducción catalizada por cultivos mixtos presentes en los diferentes lodos y sedimentos anaeróbicos evaluados. Al igual que en presencia de acetato, los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ presenta la mayor producción de sulfuro, seguido por el lodo del hidrociclón, los sedimentos de la laguna facultativa y finalmente los lodos de la descarga de la PTAR de Quito. En un periodo de tiempo de 21 días, la producción de sulfuro para los diferentes inóculos fue de 22.39, 13.93, 10.40 y $1.20 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$, respectivamente.

La tabla 2.4 (pág. 76) resume las actividades máximas específicas de generación de sulfuro y sulfato-reductora utilizando etanol como donador de electrones. Las mayores actividades máximas específicas de reducción de sulfatos y de generación de sulfuros fueron de $5.28 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ sustrato d}^{-1}$ y $0.881 \text{ mg S}^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ sustrato d}^{-1}$, respectivamente, y se obtuvieron con los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ. Tanto en el caso de los sedimentos de la laguna facultativa de Cuenca, como en el lodo del hidrociclón de la PTAR de Quito, las actividades máximas específicas de sulfato-reducción o generación de sulfuro, son entre 3 y 4 veces menores que aquellas obtenidas con los sedimentos de la laguna artificial. Por el contrario, el lodo de la descarga de la PTAR de Quito, presenta una actividad máxima específica 6 veces menor que la mayor actividad alcanzada. La mayor actividad máxima específica de generación de sulfuro de los sedimentos provenientes de la laguna artificial de la USFQ en presencia de etanol es un orden de magnitud más pequeña que aquella obtenida utilizando el mismo inóculo microbiano con acetato.

Estudios previos conducidos por Sierra-Álvarez *et al.* reportaron resultados positivos en la remoción de metales pesados con el uso de etanol como sustrato en el influente de bioreactores con bacterias sulfato-reductoras [23]. En dicho estudio se utilizaron concentraciones de etanol y de sulfato de 0.9 g DQO L^{-1} y $700 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$,

respectivamente. La actividad biogénica máxima alcanzada fue de $409 \text{ mg S}^{2-} \text{ g SVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ junto con remociones de los metales pesados mayores a 99.2% [23]. Sierra-Álvarez y colaboradores demostraron la eficiencia del etanol como sustrato donador de electrones para la sulfato reducción llevada a cabo por las bacterias sulfato reductoras. En el presente trabajo de investigación, utilizando etanol como sustrato con en el mejor inóculo evaluado (sedimentos de la laguna artificial de la USFQ), se alcanzaron actividades biogénicas máximas de $0.175 \text{ mg S}^{2-} \text{ g SVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($0.881 \text{ mg S}^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ sustrato d}^{-1}$). La producción de sulfuro alcanzada en el presente trabajo científico fue considerablemente menor que aquella reportada por Sierra-Álvarez y colaboradores, por lo tanto se puede concluir que el etanol no fue un sustrato eficiente para las bacterias sulfato-reductoras presentes en los sedimentos de laguna artificial.

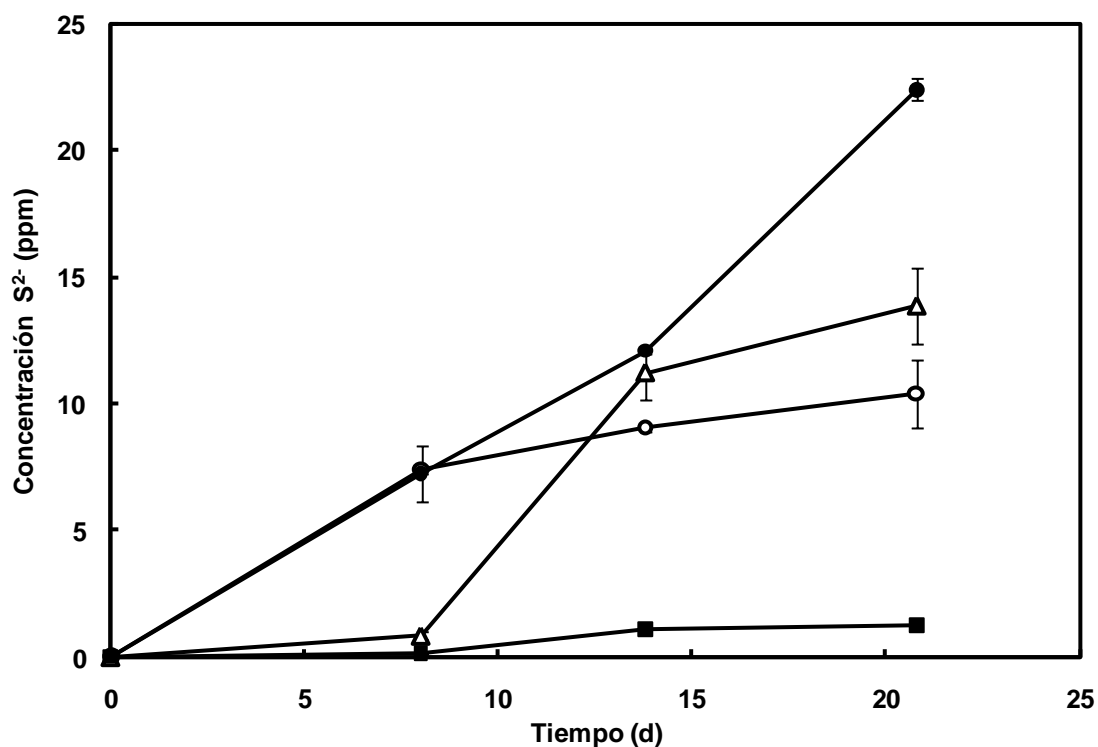


Figura 2.7: Producción de sulfuro con respecto al tiempo con 2.5 g etanol-DQO L⁻¹ y 4000 mg L⁻¹ de sulfato utilizando 10% v/v de inóculo microbiano proveniente de varias fuentes en los tratamientos completos (etanol + sulfato + microorganismos). Leyenda: (o) sedimentos de la laguna facultativa de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba - ETAPA en Cuenca (L₁); (Δ) lodo del hidrociclón de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L₂); (■) lodo de la descarga de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L₃); (●) sedimentos de la laguna artificial de la USFQ (L₄). Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por duplicado.

El uso de peptona (2.5 g DQO L^{-1}) como sustrato durante la sulfato-reducción microbiana también se evaluó en este estudio empleando lodos y sedimentos anaeróbicos provenientes de varias fuentes. En la figura 2.8 se puede apreciar que la generación de sulfuro varía entre 5 y $77 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ en un periodo de tiempo de 21 días, presentando los sedimentos de la laguna facultativa de la PTAR de Ucubamba - ETAPA en Cuenca la mayor población de bacterias sulfato-reductoras para este sustrato en particular. Los sedimentos obtenidos de la laguna artificial de la USFQ ocupan el segundo lugar en la producción de sulfuro con una concentración de $27.12 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$, seguidos de los lodos del hidrociclón y de la descarga de la PTAR de Quito con una producción de 15.66 y 4.93 mg L^{-1} de sulfuro, respectivamente.

En la tabla 2.4 (pág. 76) se resumen las actividades máximas específicas de generación de sulfuro y reducción de sulfato para los diferentes lodos y sedimentos evaluados utilizando peptona como donador de electrones. La mayor actividad máxima específica de generación de sulfuro obtenida utilizando peptona como sustrato fue de $1.45 \text{ mg S}^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ sustrato d}^{-1}$ con los sedimentos de la laguna facultativa de la PTAR de Ucubamba - ETAPA en Cuenca. Para los demás inóculos microbianos, las actividades máximas específicas son muy similares y están en un rango de 0.2 y $0.3 \text{ mg S}^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ sustrato d}^{-1}$, siendo éstas alrededor de 6 veces menores que la obtenida con los sedimentos de la laguna facultativa.

La mayor actividad máxima específica de generación de sulfuro en presencia de peptona es 3 veces más baja que aquella en la que se utiliza acetato como donador de electrones para el mismo inóculo, demostrando una vez más la eficiencia superior del acetato como sustrato. Miyazato y colaboradores demostraron la existencia de bacterias sulfato-reductoras en un lodo activado cultivado con peptona [24]. La concentración de sustrato empleada en el estudio fue de 200 mg L^{-1} de peptona. La actividad sulfato-reductora máxima específica encontrada varía en un rango de 7.2 a $19.2 \text{ mg SO}_4^{-2} \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y es

comparable con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación [24]. La mayor actividad sulfato-reductora máxima específica obtenida con los sedimentos de la laguna facultativa de la PTAR de Ucubamba - ETAPA en Cuenca fue de $8.71 \text{ mg SO}_4^{-2} \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, y está dentro del rango de actividad biogénica reportada por Miyazato *et al.*

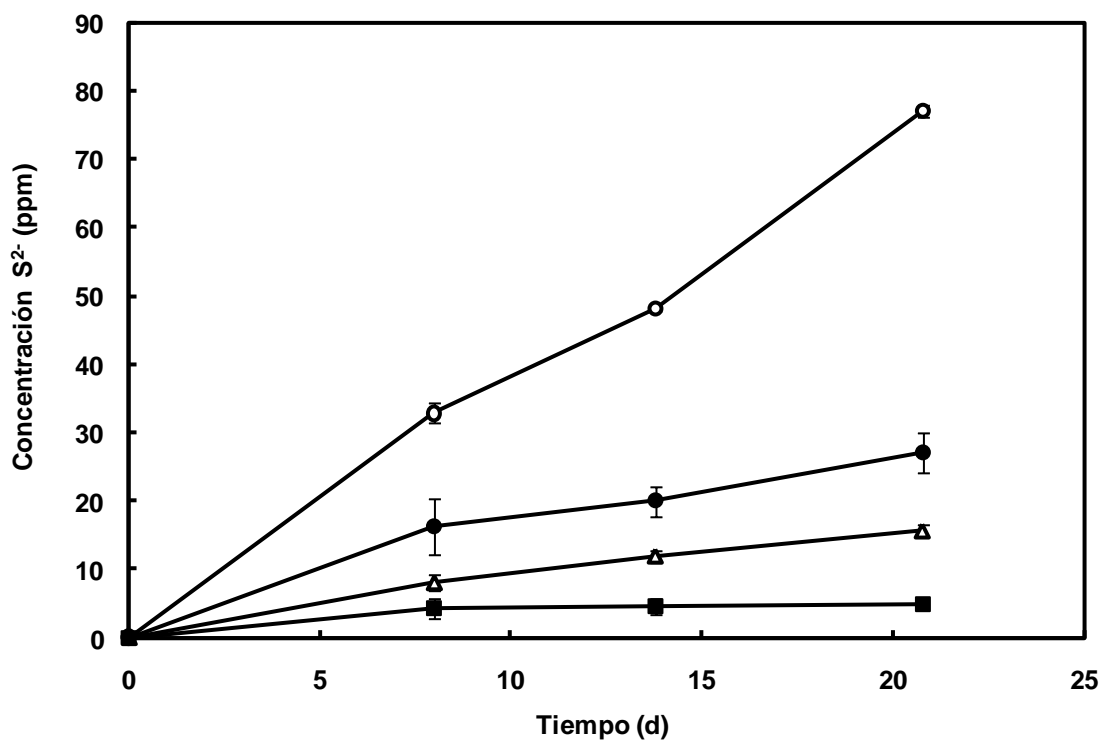


Figura 2.8: Producción de sulfuro con respecto al tiempo con 2.5 g peptona-DQO L^{-1} y 4000 mg L^{-1} de sulfato utilizando 10% v/v de inóculo microbiano proveniente de varias fuentes en los tratamientos completos (peptona + sulfato + microorganismos). Leyenda: (o) sedimentos de la laguna facultativa de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba en Cuenca (L_1); (Δ) lodo del hidrociclón de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L_2); (\blacksquare) lodo de la descarga de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L_3); (\bullet) sedimentos de la laguna artificial de la USFQ (L_4). Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por duplicado.

El efecto de la concentración de sustrato durante la sulfato-reducción microbiana también fue evaluado en esta investigación. Concentraciones de lactato, peptona y etanol, 10 veces mayores a los 2.5 g DQO-sustrato L⁻¹ empleados previamente se estudiaron bajo las mismas condiciones experimentales. La figura 2.9 representa una gráfica de la generación de sulfuro con respecto al tiempo en presencia de 25 g DQO-etanol L⁻¹. Los resultados de la utilización de 25 g DQO-sustrato L⁻¹ en el caso de lactato y peptona son muy similares a dicha gráfica en términos de monitoreo de generación de sulfuro empleando los diversos inóculos microbianos (gráficas no presentadas). Las actividades máximas específicas de generación de sulfuro y reducción de sulfato empleando los diversos inóculos se encuentran resumidas en la Tabla 2.4 (pág. 76).

Cabe recalcar que, en prácticamente todos los casos, las actividades máximas específicas de producción sulfuro y reducción de sulfato, junto con la producción final acumulada de sulfuros es mayor cuando se usa una concentración menor de sustrato (2.5 g DQO L⁻¹) que cuando se emplea un exceso del mismo (25 g DQO L⁻¹). Por ejemplo, en el caso del lodo del hidrociclón de la PTAR de Quito, la tasa de producción de sulfuro es dos órdenes de magnitud mayor con el uso de 2.5 g etanol-DQO L⁻¹ que empleando 25 g etanol-DQO L⁻¹. Esto se debe a la inhibición que se presenta cuando el sustrato es suministrado en exceso.

Adicionalmente, se puede notar que los sedimentos de lagunas con los diferentes sustratos ensayados registran actividades biogénicas mayores comparados con los lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales. Una posible explicación a este fenómeno puede ser que durante el tratamiento de aguas residuales se estimula el crecimiento de bacterias metanogénicas, debilitando a las BSR, mientras que en las lagunas ocurren procesos naturales en los que existe el dominio de las bacterias sulfato-reductora, ya que son las especies más fuertes.

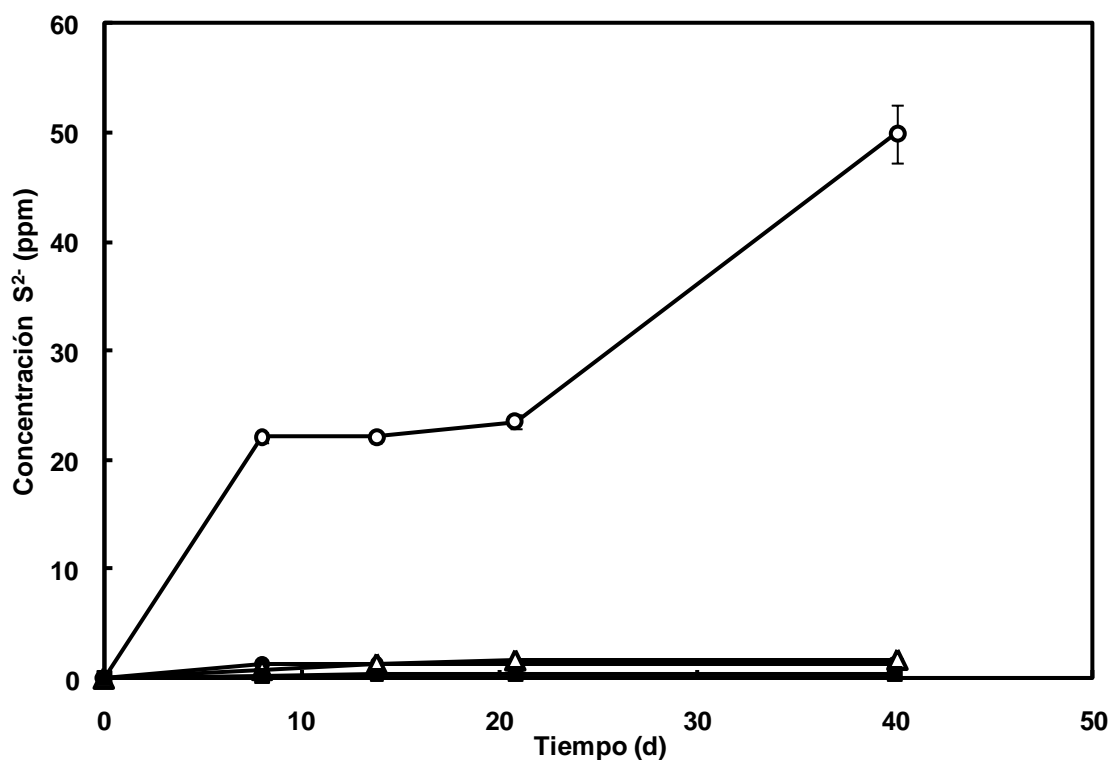


Figura 2.9: Producción de sulfuro con respecto al tiempo con 25 g etanol-DQO L^{-1} y 4000 $mg L^{-1}$ de sulfato utilizando 10% v/v de inóculo microbiano proveniente de varias fuentes en los tratamientos completos (etanol + sulfato + microorganismos). Leyenda: (o) sedimentos de la laguna facultativa de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba en Cuenca (L_1); (Δ) lodo del hidrociclón de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L_2); (\blacksquare) lodo de la descarga de una planta de tratamiento de aguas residuales, Quito (L_3); (\bullet) sedimentos de la laguna artificial de la USFQ (L_4). Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por duplicado.

De todos los sustratos evaluados en este estudio, el acetato es el mejor donador de electrones para la sulfato-reducción microbiana con 4000 mg $\text{SO}_4^{2-} \text{L}^{-1}$. En presencia de 2.5 g DQO L^{-1} de acetato, las bacterias sulfato-reductoras existentes en los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ registran la mayor producción acumulada de sulfuro, 463.35 mg $\text{S}^{2-} \text{L}^{-1}$. De igual manera, se obtuvieron las actividades máximas específicas de generación de sulfuro y reducción de sulfato más elevadas, 8,74 mg $\text{S}^{2-} \text{g}^{-1}$ sustrato día⁻¹ y 52.43 mg $\text{SO}_4^{2-} \text{g}^{-1}$ sustrato día⁻¹, respectivamente, con el uso de dicho sustrato en el inóculo microbiano mencionado. Dichas actividades son dos veces mayores que la actividad máxima específica más representativa usando como inóculo los sedimentos de la laguna ubicada en la región amazónica con 2.5 g lactato-DQO L^{-1} . Estos datos sugieren que las bacterias sulfato reductoras predominantes en los sedimentos de la laguna artificial son las oxidantes de acetato, grupo II, y pertenecen a los géneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* y *Desulfonema* [3].

A partir de la ecuación (8), se puede establecer que la cantidad teórica de sulfuro esperada con los 4000 mg $\text{SO}_4^{2-} \text{L}^{-1}$ y 2.5 g DQO-acetato L^{-1} es de 666.7 mg $\text{S}^{2-} \text{L}^{-1}$. La cantidad máxima obtenida experimentalmente es de 463,3 mg $\text{S}^{2-} \text{L}^{-1}$ con los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ. Se presume que los 203,4 mg $\text{S}^{2-} \text{L}^{-1}$ restantes se encuentran en forma gaseosa. Por lo tanto, aproximadamente el 70 % del sulfuro total fue detectado en solución acuosa, con el método colorimétrico del azul de metileno descrito en la sección 2.3 de Materiales y Métodos. Cabe recalcar que la diferencia en la cantidad de días en los que la generación de sulfuro fue monitoreada en los diferentes bioensayos batch previamente descritos, se debe a limitaciones en cuanto a la disponibilidad del reactivo colorimétrico DMP necesario para el análisis de la cantidad de sulfuro.

Teniendo en consideración la presencia de varios consorcios bacterianos en los inóculos microbianos anaeróbicos evaluados en este estudio; además de la determinación de las

actividades metabólicas de las bacterias sulfato-reductoras, se evaluó la presencia de bacterias metanogénicas y la posible competencia que puede existir entre ellas por el sustrato. La determinación de las bacterias metanogénicas se evaluó a través de las actividades máximas específicas de generación de metano de acuerdo al protocolo descrito en la sección 2.3 de Materiales y Métodos.

En la tabla 2.5 se detallan las actividades metanogénicas de los lodos y sedimentos empleados en este estudio. Se puede notar una tendencia contraria a la de la producción de sulfuro, es decir, los sedimentos de la laguna artificial que presentan la mayor actividad específica de generación de sulfuro, registran la menor actividad máxima específica de generación de metano entre los inóculos microbianos evaluados con 2.5 g DQO-acetato L⁻¹. Mientras que, en los lodos de la descarga de la PTAR ocurre lo opuesto. La actividad máxima específica de generación de metano y la actividad máxima específica de generación de sulfuro, de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ son de 48,85 mg CH₄-DQO g⁻¹ SVS d⁻¹ y 8.739 mg S²⁻ g⁻¹ sustrato d⁻¹, respectivamente; mientras que los lodos de la descarga presentan una actividad máxima específica de generación de metano y una actividad máxima específica de generación de sulfuro de 373.53 mg CH₄-DQO g⁻¹ SVS d⁻¹ y 0.251 mg S²⁻ g⁻¹ sustrato d⁻¹, respectivamente. Es decir, la actividad máxima específica de generación de sulfuro de los sedimentos de la laguna artificial es 35 veces mayor que la de los lodos de descarga de la PTAR. Mientras que la actividad máxima específica de generación de metano de los lodos de la descarga es 8 veces mayor que aquella de los sedimentos de la laguna artificial. Estos resultados sugieren que existe competencia por el sustrato entre las bacterias sulfato-reductoras y las metanogénicas, es decir, que en presencia de acetato y sulfato se estimula el crecimiento de BSR existiendo inhibición de la metanogénesis.

En el caso de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ, se podría presumir que la presencia de metanógenos es mínima con respecto a las bacterias sulfato-reductoras presentes en el consorcio microbiano de los sedimentos; mientras que en el caso del lodo anaeróbico de la descarga de la PTAR de Quito, los metanógenos estarían presentes en una cantidad considerablemente mayor que en los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ.

Kristjansson y colaboradores demostraron una competencia cinética entre los organismos metanógenos y sulfurógenos que se explica por una mayor afinidad de las bacterias sulfato-reductoras hacia el acetato, cuando el sustrato no es añadido en exceso [25]. En el trabajo científico de Kristjansson *et al.*, se obtuvo la constante de velocidad media de la ecuación de Monod (K_s), es decir, la concentración de sustrato con la mitad de la velocidad máxima específica de utilización del sustrato [18]. Los valores de K_s obtenidos en el estudio, para las bacterias sulfato-reductoras en general, son menores que para el caso de los microorganismos metanogénicos, mostrando una mayor afinidad de los primeros hacia el acetato como sustrato [25].

En el caso de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ, se podría presumir que las bacterias sulfato-reductoras que forman parte del consorcio microbiano de los sedimentos presentan una afinidad significativa hacia el acetato, lo que permite una actividad sulfato-reductora importante. Más aún, Lowe *et al.* señala que en los ecosistemas de sedimentos, la adición de acetato inhibe la metanogénesis [5]. En el estudio realizado en sedimentos de turba en Minnesota (Estados Unidos), se obtuvo una disminución significativa de la producción de metano cuando se añadió acetato, concluyendo que los precursores dominantes del metano en ese ecosistema eran el dióxido de carbono (CO_2) y el hidrógeno, mas no el acetato [5].

Probablemente, tanto las bacterias sulfato-reductoras como las metanogénicas están presentes en los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ; sin embargo, los metanógenos están inhibidos por la presencia de acetato, evitando así, que las bacterias encargadas de la reducción de sulfato (BSR) tengan que competir por el sustrato. Es posible que en este caso, el uso de acetato como donador de electrones favorezca la actividad sulfato-reductora por medio de la inhibición la actividad metanogénica.

Tabla 2.4: Producción final acumulada de sulfuro y actividades máximas específicas de producción de sulfuro y reducción de sulfatos en presencia de $4000 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ con 2.5 g DQO L^{-1} y 25 g DQO L^{-1} de cada sustrato para los diferentes lodos y sedimentos anaeróbicos evaluados en los bioensayos *batch*. Las tasas de producción de sulfuro fueron obtenidas con las pendientes de las curvas en una región determinada.

Sustrato	Concentración	Lodos o sedimentos anaeróbicos	Producción	Tasa de producción	Tasa de reducción
			final de S^{2-} $\text{mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$	de sulfuro $\text{mg S}^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ sustrato}$ día^{-1}	de sulfatos mg SO_4^{2-} $\text{g}^{-1} \text{ sustrato día}^{-1}$
Acetato	2.5 g DQO L^{-1}	L1: Sedimentos de la laguna facultativa de una PTAR en Cuenca	35.960	0.480	2.879
		L2: Lodo del hidrociclón de una PTAR en Quito	31.986	0.597	3.582
		L3: Lodo de la descarga de una PTAR en Quito	11.641	0.251	1.509
		L4: Sedimentos de la laguna artificial de la USFQ	463.254	8.738	52.427
Lactato	2.5 g DQO L^{-1}	L1: Sedimentos de la laguna facultativa de una PTAR en Cuenca	125.334	1.732	10.394
		L2: Lodo del hidrociclón de una PTAR en Quito	171.500	2.419	14.513
		L3: Lodo de la descarga de una PTAR en Quito	22.149	0.136	0.814
		L4: Sedimentos de la laguna artificial de la USFQ	74.403	1.629	9.777
		L5: Lodo de una laguna natural en la provincia de Orellana	197.054	4.161	24.968
	25 g DQO L^{-1}	L1: Sedimentos de la laguna facultativa de una PTAR en Cuenca	20.613	0.228	1.370
		L2: Lodo del hidrociclón de una PTAR en Quito	184.206	3.333	19.999
		L3: Lodo de la descarga de una PTAR en Quito	21.778	0.431	2.588
		L4: Sedimentos de la laguna artificial de la USFQ	96.110	2.891	17.347
L5: Lodo de una laguna natural en la provincia de Orellana		44.876	0.993	5.960	

Tabla 2.4 *Continuación*: Producción final acumulada de sulfuro y actividades máximas específicas de producción de sulfuro y reducción de sulfatos en presencia de 4000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ con 2.5 g DQO L⁻¹ y 25 g DQO L⁻¹ de cada sustrato para los diferentes lodos y sedimentos anaeróbicos evaluados en los bioensayos batch. Las tasas de producción de sulfuro fueron obtenidas con las pendientes de las curvas en una región determinada.

Sustrato	Concentración	Lodos o sedimentos anaeróbicos	Producción final de S ²⁻	Tasa de producción de sulfuro	Tasa de reducción de sulfatos
			mg S ²⁻ L ⁻¹	mg S ²⁻ g ⁻¹ sustrato día ⁻¹	mg SO ₄ ²⁻ g ⁻¹ sustrato día ⁻¹
Peptona	2.5 g DQO L ⁻¹	L1: Sedimentos de la laguna facultativa de una PTAR en Cuenca	77.044	1.452	8.710
		L2: Lodo del hidrociclón de una PTAR en Quito	15.660	0.237	1.421
		L3: Lodo de la descarga de una PTAR en Quito	4.931	0.212	1.272
		L4: Sedimentos de la laguna artificial de la USFQ	27.126	0.343	2.059
	25 g DQO L ⁻¹	L1: Sedimentos de la laguna facultativa de una PTAR en Cuenca	6.426	0.013	0.077
		L2: Lodo del hidrociclón de una PTAR en Quito	15.723	0.023	0.136
		L3: Lodo de la descarga de una PTAR en Quito	19.187	0.036	0.216
		L4: Sedimentos de la laguna artificial de la USFQ	12.544	0.024	0.146
Etanol	2.5 g DQO L ⁻¹	L1: Sedimentos de la laguna facultativa de una PTAR en Cuenca	16.780	0.244	1.463
		L2: Lodo del hidrociclón de una PTAR en Quito	20.476	0.292	1.753
		L3: Lodo de la descarga de una PTAR en Quito	1.204	0.139	0.836
		L4: Sedimentos de la laguna artificial de la USFQ	22.399	0.881	5.284
	25 g DQO L ⁻¹	L1: Sedimentos de la laguna facultativa de una PTAR en Cuenca	49.944	0.048	0.288
		L2: Lodo del hidrociclón de una PTAR en Quito	1.702	0.003	0.020
		L3: Lodo de la descarga de una PTAR en Quito	0.362	0.001	0.004
		L4: Sedimentos de la laguna artificial de la USFQ	1.341	0.007	0.042

Tabla 2.5: Producción de metano y actividades máximas específicas metanogénicas con 2.5 g DQO-acetato L⁻¹ para los diferentes lodos y sedimentos anaeróbicos

Lodo	mmol CH₄ · L⁻¹	mg CH₄-DQO g⁻¹ SVS d⁻¹
L1: Sedimentos de la laguna facultativa de una PTAR en Cuenca	6,786	270,483
L2: Lodo del hidrociclón de una PTAR en Quito	4,991	208,227
L3: Lodo de la descarga de una PTAR en Quito	9,174	373,526
L4: Sedimentos de la laguna artificial de la USFQ	2,187	48,852

2.5 Conclusiones

La mayor eficiencia de producción de sulfuro por medio de la reducción de sulfato catalizada por las bacterias sulfato-reductoras de todos los sustratos evaluados en este estudio se obtuvo utilizando acetato (2.5 g DQO L^{-1}) con los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ como inóculo microbiano. La utilización de acetato con los sedimentos de la laguna artificial presenta un gran potencial para ser empleados en el tratamiento biológico de los drenajes ácidos de mina que se caracterizan por su elevado contenido de sulfato, metales pesados y pH ácido.

El uso de lactato (2.5 g DQO L^{-1}) resultó en la segunda producción de sulfuro más significativa del estudio. Sin embargo, la actividad máxima específica de producción de sulfuro o reducción de sulfato con el uso de este sustrato, alcanza apenas el 50% de la actividad biogénica obtenida con el uso de acetato como donador de electrones. El uso de etanol y peptona como sustrato en los inóculos evaluados, no presenta una eficiencia significativa comparada con la obtenida empleando acetato o lactato durante la sulfato-reducción microbiana. En lo que concierne a la concentración del sustrato, el incremento de la misma no muestra una mayor eficiencia en cuanto a la producción de sulfuro o a la reducción de sulfato.

Tomando en cuenta la competencia entre las bacterias sulfato-reductoras y las metanogénicas por el sustrato, las actividades máximas específicas de reducción de sulfatos son consistentes con las actividades máximas específicas de producción de metano. En los inóculos evaluados utilizando acetato como sustrato, la tendencia de actividades metabólicas de los diferentes inóculos evaluados es evidente, mientras mayor es la reducción de sulfato, menor es la producción de metano.

2.6 Referencias Bibliográficas

1. Jonhson, Dziurla, Kolmert, and Hallberg, The microbiology of acid mine drainage: genesis and biotreatment. *South African Journal of Science* 2002, 98, 249-255.
2. Castro, Williams, and Ogram, Phylogeny of Sulfate-reducing Bacteria. *Microbiology Ecology* 1999, 31, 1-9.
3. Madigan, Martinko, and Parker, *Brock Biología de los Microorganismos*. Octava Edición; Madrid, 1999.
4. Karnachuk, Pimenov, Yusupov, Frank, Kaksonen, Puhakka, Ivanov, Lindstrom, Tuovinen, and Tuovinen, Sulfate Reduction Potential in Sediments in the Norilsk Mining Area, Northern Siberia. *Geomicrobiology Journal* 2005, 22, 11-25.
5. Lowe, Jain, and Zeikus, Biology, Ecology, and Biotechnological Applications of Anaerobic Bacteria Adapted to Environmental Stresses in Temperature, pH, Salinity, or Substrates. *Microbiological Reviews* 1993, 57, 451 - 509.
6. Atlas and Bartha, *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Madrid, 2002.
7. Bass-Becking, Kaplan, and Moore, Limits of the Natural Environment in term of pH and Oxidation-Reduction Potentials. *Journal of Geology* 1960, 68, 243-284.
8. Zajic, *Microbial Biogeochemistry* London, 1969.
9. Manous, Gantzer, and Stefan, Spatial variation of sediment sulfate reduction rates in saline lake. *Journal of Environmental Engineering* 2007, 12, 1106 - 1116.
10. Vladár, Ruzsnyák, Márialigeti, and Borsodi, Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria Inhabiting the Rhizosphere of *Phragmites australis* in Lake Velencei (Hungary) Revealed by a Combined Cultivation-based and Molecular approach. *Microbiology Ecology* 2007, 56, 64 - 75.
11. Torrado-Rincón, Calixto-Gómez, Sarmiento y Panqueva, Evaluación del molibdato y nitrato sobre bacterias sulfato-reductoras asociadas a procesos de corrosión de sistemas industriales. *Revista Argentina de Microbiología* 2008, 40.

12. Figueroa, Camero, Prin y Réquiz, Evaluación de la corrosión inducida por bacterias sulfato reductoras en un acero inoxidable 316L. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 2008, 28.
13. Ochoa-Herrera, Banihani, León, Khatri, Field, and Sierra-Alvarez, Toxicity of fluoride to microorganisms in biological wastewater treatment systems. *Water Research* 2009, 43, 3177 - 3186.
14. APHA, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th ed.; American Public Health Association: Washington DC., 1998.
15. Cline, Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography* 1969, 14, 454-458.
16. Trüper and Schlege, Sulphur Metabolism in Thiorhodaceae I. Quantitative Measurements on Growing Cells of Chromatium okenii. *Antonie Leeuwenhoek* 1964, 30, 225 - 238.
17. Field, Parameters Measurements. *Wageningen Agricultural University* 1987.
18. Eddy and Metcalf, *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*. Fourth Edition; 2003; Vol. Fourth Edition.
19. Skoog, West, Holler y Crouch, *Fundamentos de Química Analítica*. Madrid, 2004.
20. Lide and Frederikse, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 76th Edition; Boca Raton, FL, 1995.
21. Oluwaseun, Oyekola, van Hille, and Harrison, Study of Anaerobic Lactate Metabolism under Biosulfidogenic Conditions *Water Research* 2009, 43, 3345 - 3354.
22. Celis, Villa-Gómez, Alpuche-Solís, Ortega-Morales, and Razo-Flores, Characterization of sulfate-reducing bacteria dominated surface communities during start-up of a down-flow fluidized bed reactor. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2009, 36, 111 -121.

23. Sierra - Alvarez, Karri, Freeman, and Field, Biological Treatment of Heavy Metals in Acid Mine Drainage using Sulfate Reducing Bioreactors. *Water Science and Technology* 2006, 54, 179 - 185.
24. Miyazato, Yamamoto-Ikemoto, and Takamatsuand, Microbial community change of sulfate reduction and sulfur oxidation bacteria in the activated sludge cultivated with acetate and peptone. *Water Science & Technology* 2006, 54, 111 – 119.
25. Kristjansson and Schönheit, Why do Sulfate-reducing Bacteria Outcompete Methanogenic Bacteria for Substrates? *Oecologia* 1983, 60, 264-266.

Capítulo III

Puesta en Marcha y Monitoreo de un Bioreactor de Flujo Ascendente Empacado con Bacterias Sulfato-reductoras para la Generación Biogénica de Sulfuro y sus Posibles Aplicaciones en la Remediación de los Drenajes Ácidos de Mina

3.1 Resumen

Las actividades mineras alrededor del mundo generan drenajes ácidos de mina (DAM) con altas concentraciones de metales disueltos y una acidez elevada. El impacto negativo sobre los ecosistemas causado por los DAM es un problema grave que requiere del desarrollo de tecnologías que promuevan la remediación de las zonas afectadas con bajos costos de operación y mantenimiento. Las tecnologías pasivas de tratamiento, como las barreras reactivas permeables y los bioreactores *in situ* son una alternativa novedosa y promisoría en el tratamiento de los drenajes ácidos de mina. En el presente trabajo de investigación se diseñó, puso en marcha y monitoreó un bioreactor de flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con bacterias sulfato-reductoras provenientes de una laguna artificial. La eficiencia de generación de sulfuro fue evaluada alimentado al bioreactor con una muestra sintética de 2.5 g DQO-acetato L⁻¹ como sustrato y 4000 mg sulfato L⁻¹ como aceptor de electrones. Una producción de 167 mg S²⁻ L⁻¹ en 66 días de operación, junto con un porcentaje de remoción de la demanda química de oxígeno (DQO) constante de alrededor de 13% se registraron en el bioreactor. El conteo de las bacterias sulfato-reductoras presentes en el inóculo microbiano empleado en el bioreactor, fue determinado con el método del número más probable (NMP) y fue de 2.4 x 10⁵ bacterias sulfato-

reductoras g^{-1} . El reactor biogénico presenta un gran potencial de aplicación en el tratamiento biológico de los drenajes ácidos de mina. El sulfuro producido por las bacterias sulfato-reductoras podría precipitar con los metales pesados en forma de sulfuros metálicos y de esta manera remediar uno de los problemas ambientales más serios como es el tratamiento de los efluentes contaminados generados durante las actividades mineras.

3.2 Introducción

Los desechos generados en las actividades mineras a nivel mundial son un riesgo para el medio ambiente, especialmente por la generación de los drenajes ácidos de mina (DAM) con acidez elevada y altas concentraciones de metales pesados disueltos y de sulfatos. Numerosos esfuerzos se han llevado a cabo para reducir la formación de los drenajes ácidos de mina y para tratar, controlar y mitigar sus efectos. En los últimos años, se han desarrollado varias tecnologías con el fin de tratar los drenajes ácidos de mina con la mayor eficiencia posible y manteniendo bajos costos de operación y mantenimiento.

3.2.1 *Tratamientos pasivos*

Los esquemas de remediación de los drenajes ácidos de mina tradicionales se basan en la neutralización de las aguas contaminadas con el uso de químicos alcalinos como piedra caliza, hidróxido de sodio, carbonato de sodio, entre otros [1]. En este tipo de tratamientos se requieren plantas completas con reactores agitados, precipitadores, clarificadores, entre otros, cuyos costos de reactivos, mantenimiento y operación son elevados. Los sistemas de tratamiento pasivo aprovechan la geoquímica natural de las zonas mineras así como los procesos biológicos para mejorar la calidad de los drenajes ácidos de mina antes de ser descargados a los cuerpos de agua, manteniendo los requerimientos de operación en valores mínimos. [1].

Las primeras aplicaciones de los tratamientos pasivos de los DAM fueron documentadas a principios de 1980, cuando Huntsman y colaboradores encontraron que la exposición de los drenajes ácidos de mina a humedales naturales de musgos de turbera de la especie *Sphagnum* resultaba en el mejoramiento de la calidad de las aguas residuales de las minas [1, 2]. Esfuerzos posteriores fueron realizados para construir humedales o *wetlands*

artificiales con el uso de diferentes especies de plantas como totoras de la especie *Typha latifolia* [1, 3]. En las últimas décadas, se han desarrollado sistemas de tratamiento pasivo tanto a escala laboratorio como en aplicaciones de campo. En la región de los montes Apalaches al este de los Estados Unidos, han sido instaladas y están en operación más de 200 humedales artificiales o *wetlands* para el tratamiento de los drenajes ácidos de las minas de carbón de la zona [1].

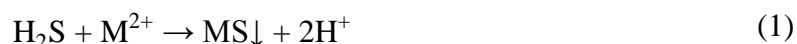
Neculita *et al.* clasifican las tecnologías pasivas de remediación de los drenajes ácidos de mina como sistemas químicos o biológicos. El primer grupo incluye canales abiertos con piedra caliza, sumideros anóxicos de piedra caliza y barreras reactivas permeables con materiales reactivos químicos; mientras que los bioreactores, las barreras reactivas permeables con microorganismos como material reactivo y los humedales artificiales o *wetlands* construidos forman parte de los sistemas biológicos pasivos [4].

Los esquemas de tratamiento pasivo modernos de los DAM se enfocan en métodos biológicos debido a las ventajas ofrecidas por este tipo de sistemas. Producen un alto nivel de remoción de metales pesados a pH relativamente bajos (3 a 6), generan residuos sólidos (lodos) más densos, menos voluminosos y más estables comparados con los sistemas de tratamiento químicos y por último, permiten manejar bajos costos de operación y mantenimiento junto con consumos energéticos mínimos [4]. Hedin *et al.* menciona que los costos de los esquemas pasivos de tratamiento son generalmente medidos en función de los requerimientos de espacio o terreno, ya que se trata de procesos de remoción de contaminantes lentos con tiempos de retención elevados [5].

3.2.2 *Bioreactores*

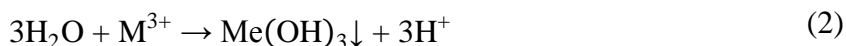
Los bioreactores pasivos emplean los principios de la sulfato reducción para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina. Las bacterias sulfato-reductoras son las encargadas de la

reducción desasimilatoria de sulfatos a sulfuros cuando son provistas de una fuente de carbono adecuada [6]. La oxidación del sustrato, que actúa como donador de electrones, está ligada a la reducción del sulfato, que actúa como aceptor terminal de electrones [4, 7]. La remoción de los metales pesados se genera por la precipitación de los mismos en forma de sulfuros metálicos de acuerdo a la siguiente reacción;



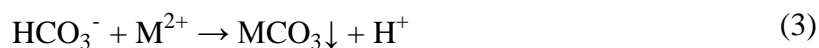
donde M es un metal catiónico como Cd, Fe, Ni, Cu o Zn [4].

Otro mecanismo para la remoción de metales es a través de su precipitación en forma de hidróxidos según la siguiente reacción:

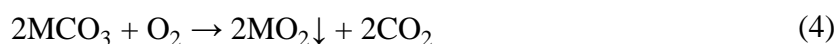


donde M es un metal como Fe, Cr o Al [1, 4].

De la misma manera, es posible una precipitación de los metales pesados en la forma de carbonatos de acuerdo a la siguiente reacción:



que en presencia de oxígeno puede generar el óxido metálico (ecuación 4):



donde M es un metal como Fe o Mn [1, 4].

Los productos de solubilidad (K_{ps}) de los hidróxidos metálicos son en general mayores que aquellos de los sulfuros metálicos, por lo que la remoción y estabilización de metales en forma de sulfuros es preferida como técnica de remediación en sistemas pasivos como los bioreactores [1]. En la tabla 3.1 se presentan algunos valores de K_{ps} para hidróxidos y sulfuros metálicos.

Tabla 3.1: Constantes de producto de solubilidad, K_{sp} a 25°C para varios hidróxidos y sulfuros metálicos [8]

Hidróxidos metálicos	
Compuesto	K_{sp}
Fe(OH) ₂	4.1×10^{-15}
Fe(OH) ₃	2×10^{-39}
Cu(OH) ₂	4.8×10^{-20}
Zn(OH) ₂	3×10^{-16}
Mn(OH) ₂	2×10^{-13}
Al(OH) ₃	3×10^{-34}
Ni(OH) ₂	6×10^{-16}
Cd(OH) ₂	4.5×10^{-15}
Sulfuros metálicos	
Compuesto	K_{sp}
FeS	8×10^{-19}
CuS	8×10^{-37}
ZnS ₂ α	2×10^{-25}
ZnS ₂ β	3×10^{-23}
MnS verde	3×10^{-14}
MnS rosa	3×10^{-11}
NiS α	4×10^{-20}
NiS β	1.3×10^{-25}
CdS	1×10^{-27}

Los compuestos usados como fuente de carbono para el crecimiento microbiano de las bacterias sulfato-reductoras en los bioreactores son variados. El reto está en escoger sustratos orgánicos adecuados que sean eficientes y económicamente viables. Dentro de los sustratos escogidos para las aplicaciones en bioreactores están los compuestos orgánicos simples de entre 2 y 4 carbonos como metanol, etanol, lactato, acetato, entre otros [4].

Icgen y colaboradores demostraron, a través de métodos moleculares, tales como la hibridación fluorescente, la presencia de varias especies de bacterias sulfato-reductoras que utilizan acetato como fuente de carbono y donador de electrones en un bioreactor anaeróbico continuo. La temperatura de operación del reactor fue de 35°C, con un pH de trabajo de 7.8 y un tiempo de residencia de 2.5 días. El reactor fue alimentado con 2.5 kg m⁻³ de sulfato (2500 mg SO₄²⁻ L⁻¹) y 2.3 kg m⁻³ de acetato (2.5 g DQO L⁻¹) [9].

Por otro lado, el uso de fuentes de carbono complejas como una alternativa económica de sustrato es común en las aplicaciones de bioreactores *in situ*. Dentro de este tipo de sustratos se encuentran una gran variedad de desechos de la industria agrícola y alimenticia que se resumen en la tabla 3.2 [4]. Los desechos usados como sustratos en los sistemas pasivos de remediación de DAM, se pueden clasificar como desechos celulósicos o desechos orgánicos. Dentro de los desechos celulósicos se encuentra el aserrín, heno, alfalfa y viruta. El segundo grupo está constituido por estiércol de ganado, estiércol vacuno, estiércol de caballo, estiércol de aves de corral, estiércol de ovejas, estiércol de conejos, lodo granular, turba, celulosa, melaza y compost [4]. Waybrant *et al.* demostraron que en general, las mezclas de fuentes de carbono orgánicas generan actividades sulfato-reductoras más eficientes que el uso de un sustrato único [10]. En dicho estudio se realizaron experimentos en los que se simulaban las condiciones de campo, para determinar las mezclas reactivas más favorables de entre ocho fuentes de carbono orgánico evaluadas, para la remediación de drenajes ácidos de mina en sistemas pasivos [10].

En cuanto a la eficiencia de los sistemas a largo plazo, la longevidad de los sustratos puede ser mejorada con la adición de fuentes de carbono alternativas a una matriz empobrecida. Tsukamoto *et al.* demostraron que la adición de sustratos simples como metanol, etanol, lactato o acetato a una matriz desgastada compuesta, como una mezcla de desechos orgánicos (estiércol), puede extender el tiempo de vida útil de los bioreactores pasivos [11]. En dicho estudio se alcanzaron eficiencias de reducción de sulfato mayores al 93% tras la adición de etanol y metanol a una matriz desgastada, permitiendo de esta manera la prolongación significativa del tiempo de vida útil del reactor [11]. Neculita *et al.* documentaron la bioactivación del consorcio microbiano con la adición de una fuente de carbono sencilla como el lactato y el posterior reemplazo de la misma por sustratos menos costosos, como otra posible solución para mantener una eficiencia adecuada a largo plazo [4].

Algunos factores como el pH, la temperatura y la relación entre la demanda química de oxígeno y el sulfato afectan el desempeño de los bioreactores pasivos basados en bacterias sulfato-reductoras.

En cuanto al pH se refiere, se requiere un rango de pH entre 5 y 8 para un desempeño óptimo [4]. Varios estudios han sido desarrollados en relación a la eficiencia de los bioreactores de tratamiento pasivo en pH ácidos. Tsukamoto *et al.* y Elliott *et al.* demostraron la eficiencia de las bacterias sulfato-reductoras durante la reducción microbiana de sulfato en rangos de pH tan bajos como 2.5 y 3 [11, 12].

Tabla 3.2: Características de bioreactores pasivos reportados en la literatura [4]

Escala del reactor	Volumen total (L)	Sustrato – fuente de carbono	pH		SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	
			afluente	Efluente	afluente	efluente
Bioreactor de campo	765 600	mezcla de aserrín, heno y estiércol de ganado	4 - 5.5	5 – 6	175 - 250	200 – 275
Bioreactor de campo	92 000 – 108 000	mezcla de estiércol de vaca y paja	3.3 – 7.5	6.5 – 7.5	70 - 229	no reportado
Bioreactor escala piloto	20 000	estiércol de ganado, aserrín, heno y alfalfa	3.5 – 7.5	6.5 – 7.5	<60	<40
Bioreactor escala piloto	200 – 4500	compost de restos de hongos (mezcla de estiércol, heno, paja, mazorcas de maíz, viruta)	3.2 – 6.2	6.4 – 7.1	1002 – 2997	831 – 2387
Bioreactor escala piloto	3900	Metanol	2.9 – 3.2	6.9	1900 - 2100	832
Bioreactor escala piloto	570	tallos de arroz, estiércol de ganado y piedra caliza	3.6	6.2	no reportado	no reportado
Bioreactor escala <i>bench</i>	200	mezcla de viruta, aserrín, alfalfa, heno, estiércol de ganado	3 – 3.5	5.5 – 7	3000 - 3500	2500 – 4500
Bioreactor de laboratorio	45	mezcla de estiércol de ganado, aserrín y suero	2.5 – 3.5	6.5	<1000	<300
Bioreactor de laboratorio	25 – 29	estiércol de ganado	2.7 – 6.2	6.3 – 7.1	1000	922 - 970
Bioreactor de laboratorio	17	alfalfa, heno, miga de cereal	3.5	6.5	1010	420 - 960
Bioreactor de laboratorio	4.8	Lactato	4.52	7.2	2280 - 2315	<400
Columna	9	mezcla de viruta, compost de hojas, estiércol de aves de corral	3.8 – 4	7	1500	1220
Columna	4.7 – 7.8	estiércol residual revitalizado com metanol o etanol	2.5 - 4.2	5.4 - 7.3	900	400 – 500
Columna	0.25	Compost de restos de hongos, viruta de roble, restos de roble, lodo	6.8	7 – 8.5	2580	200 -650
Batch	31	Heno	3.0 – 4.4	3.5 – 6.0	857 - 936	715 – 5390
Batch	0.5 – 1	mezcla de lodo, viruta, estiércol bovino, aserrín, celulosa	2.5 – 6	6.5 – 7	1200 – 4800	<35

La temperatura de operación en bioreactores pasivos afecta el crecimiento bacteriano de las BSR, la cinética de la descomposición del sustrato orgánico y la solubilidad del sulfuro de hidrogeno generado [4]. La tolerancia de las bacterias sulfato-reductoras a temperaturas desde -5 a 75°C fue demostrada por Lowe *et al.* [13]; mientras que Tsukamoto y colaboradores demostraron que a pesar de que las temperaturas bajas afectan a las bacterias sulfato-reductoras especialmente en el proceso de adaptación, una vez aclimatadas, las temperaturas bajas no afectan su desempeño [11]. El efecto de la temperatura en la sulfato-reducción está relacionada con los tiempos de residencia en los bioreactores pasivos. Estudios llevados a cabo por William y colaboradores demuestran que para alcanzar un 50% de actividad sulfato-reductora, los tiempos de retención de los bioreactores varían de 8 días a 17°C a 41 días a 1°C [14].

En cuanto a la relación de la demanda química de oxígeno (DQO) y los sulfatos (SO_4^{2-}), existen resultados variados. Al-Ani *et al.* encontraron que cuando se emplea lodo como fuente de carbono, el mejor desempeño se obtuvo con relaciones DQO/ SO_4^{2-} de 5/1 [15], mientras que en los estudios conducidos por Prasad *et al.*, con el uso de sustratos naturales o sintéticos como fuentes de carbono, las relaciones DQO/ SO_4^{2-} predominantes fueron menores a 1.7/1. Para fuentes de carbono orgánicas complejas, las relaciones óptimas DQO/ SO_4^{2-} fueron mayores a 1.7/1 debido a que no todo el carbono presente fue utilizado por las bacterias sulfato-reductoras [16].

Durante el diseño de bioreactores pasivos se requiere que el pH de operación sea cercano a 7, una fuente de carbono orgánica, condiciones de reducción, un soporte para la fijación y crecimiento de las bacterias sulfato-reductoras y una forma para la retención física de los sulfuros metálicos precipitados [4]. Neculita *et al.* reportaron la existencia de varias configuraciones de bioreactores pasivos, entre las que se pueden encontrar los bioreactores de flujo vertical, los bioreactores de flujo horizontal y los bioreactores de tres etapas [4].

Los bioreactores de flujo vertical pueden ser ascendentes o descendentes. En los de flujo ascendente, el afluente es alimentado por la parte inferior del reactor y el efluente abandona el reactor por la parte superior; mientras que los de flujo descendente, la entrada del afluente es por la parte superior del reactor y la salida se da por el fondo del mismo. Los bioreactores de tres etapas tienen la unidad donde se realiza la actividad de las bacterias sulfato-reductoras separada de la unidad de precipitación de metales y del sistema de control de pH [4].

3.2.3 Barreras reactivas permeables

Las barreras reactivas permeables (BRP) constituyen una de las más recientes técnicas de bioremediación *in situ* de los drenajes ácidos de mina. Una barrera reactiva permeable consiste en la instalación en el acuífero de una pared vertical que contiene un material reactivo apropiado, de tal manera que la pluma de agua contaminada pasa a través del mismo, y las aguas tratadas salen por el lado opuesto de la barrera. Cuando el agua contaminada pasa a través del material reactivo, se generan reacciones físico-químicas y biológicas que la transforman en un cuerpo de agua menos tóxico y dañino. Las barreras reactivas permeables son un sistema de tratamiento pasivo de los DAM que necesita de mantenimiento y costos de operación mínimos [17, 18]. En la figura 3.1 se muestra un esquema del funcionamiento de las BRP.

Las barreras reactivas permeables son diseñadas para tratar flujos subsuperficiales provenientes de aguas subterráneas o de efluentes de escombreras o zonas mineras contaminados [19]. Las barreras reactivas permeables constituyen una técnica pasiva *in situ* muy útil cuando los contaminantes son persistentes por largo tiempo en la zona afectada [17].

Una gran cantidad de materiales reactivos han sido estudiados para el tratamiento pasivo de los drenajes ácidos de mina con el uso de barreras reactivas permeables. Batty y Younger mencionan que los requerimientos que los materiales reactivos en las BRP deben satisfacer para garantizar la eficiencia de este tipo de sistema pasivo de tratamiento de DAM son los siguientes [19]:

- Reactividad
- Permeabilidad / conductividad hidráulica
- Compatibilidad medioambiental
- Disponibilidad y costo
- Estabilidad

Un material reactivo basado en compost es la opción más usual para la aplicación en las BRPs durante el tratamiento pasivo de los drenajes ácidos de mina. Sin embargo, es necesario maximizar y mantener la permeabilidad de la barrera, por lo que usualmente se utilizan mezclas de materiales [19]. Mezclas reactivas de materiales orgánicos se utilizan comúnmente para fortalecer la actividad metabólica de las BSR, incrementar el pH y generar sulfuros metálicos insolubles. A este respecto, es muy importante considerar la disponibilidad y costo del material con el fin de garantizar el buen funcionamiento a largo plazo de la barrera reactiva permeable [19].

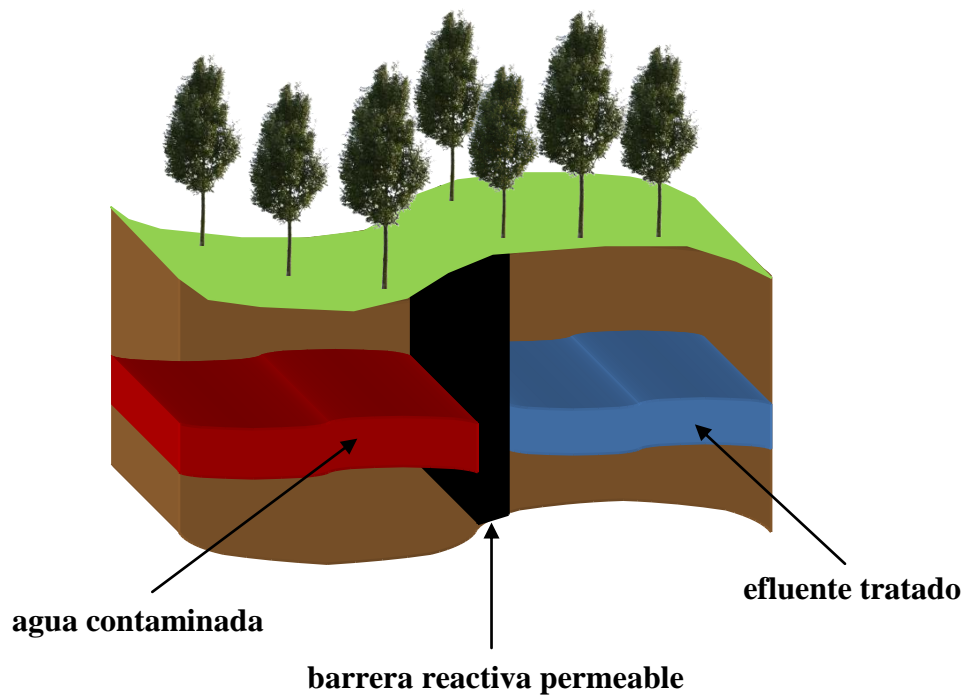


Figura 3.1: Esquema del funcionamiento de una barrera reactiva permeable para el tratamiento de agua contaminada.

En cuanto al diseño de barreras reactivas permeables, Gibert y colaboradores sugieren controlar parámetros de operación tales como el flujo o tiempo de residencia en la aplicación de los tratamientos basados en bacterias sulfato-reductoras en las barreras reactivas permeables de flujo continuo [18]. Por ejemplo, tiempos de residencia demasiado cortos no permiten que las bacterias generen una cantidad suficiente de sulfuro para la precipitación de los metales, ni suficiente alcalinidad para neutralizar la acidez. Los estudios conducidos por Dvorak *et al.* demostraron que un incremento del flujo del doble de su valor produce una reducción de la concentración de sulfuro generado por la actividad de las BSR del 99% [20].

Para obtener las mayores actividades máximas específicas de generación de sulfuro de las bacterias sulfato-reductoras se deben proporcionar las condiciones adecuadas de tratamiento. En el caso del tiempo de residencia, las alternativas son incrementarlo con la disminución del flujo o con el incremento del grosor del material de soporte de la barrera reactiva permeable [18]. Sin embargo, como señala Gibert *et al.*, si se considera la aplicación en las BRP, estas alternativas no son posibles. El caudal o flujo es fijado por el acuífero o cuerpo de agua, mientras que aumentar las dimensiones de la barrera reactiva permeable significa costos elevados por la cantidad de material requerido [18]. Hammack y colaboradores sugieren la estimulación y aceleración de la actividad bacteriana como una alternativa viable en tratamientos con tiempos de residencia cortos [21]. Sus estudios demostraron que la adición de lactato incrementó la actividad sulfato-reductora, obteniendo remociones de sulfato del 70% y remociones de níquel del 95%, comparadas con remociones muy bajas sin el uso de lactato [21].

Existe evidencia sobre la instalación de barreras reactivas permeables en aplicaciones de campo a partir de 1995. Benner *et al.* realizaron la instalación en 1995 de una barrera reactiva permeable a gran escala basada en la generación biogénica de sulfuro para

remediar los drenajes ácidos de mina en la zona minera de Nickel Rim cerca de Sudbury, Ontario (Canadá) [22]. El DAM de Nickel Rim contenía entre 2000 – 4000 mg L⁻¹ de sulfato, 200 – 1200 mg L⁻¹ de Fe y un pH de 6. El material reactivo usado en la barrera consistió de grava (50%) y una mezcla reactiva (50%) formada por: compost municipal (40%), abono orgánico de hojas (40%), viruta (18%) y piedra caliza (2%). Las dimensiones de la barrera reactiva permeable fueron de 3.6 m de profundidad, 15 m de largo y 4 m de ancho, con un tiempo de residencia promedio de 90 días. La barrera reactiva permeable de Nickel Rim permaneció en funcionamiento por 3 años con un desempeño notorio, demostrando la eficiencia a largo plazo de este tipo de sistemas pasivos de tratamiento de los drenajes ácidos de mina [22].

En el 2000, Carrera y colaboradores instalaron una aplicación de BRP en Aznalcóllar (España) para tratar aguas contaminadas con un contenido de 1000 mg L⁻¹ de sulfatos, 30 mg L⁻¹ de zinc, 30 mg L⁻¹ de cobre y valores de pH entre 3 y 4 [23]. Las dimensiones de la barrera construida fueron de 4.5 m de profundidad, 110 m de largo y 1.4 m de ancho y estaba dividida en tres módulos, cada uno de 30 m de largo. El primer módulo de la barrera reactiva permeable, con un contenido de 50% de piedra caliza, 30% de compost municipal y 20% de lodo proveniente de plantas de tratamiento de aguas residuales, no presentó la permeabilidad necesaria para permitir el flujo normal del agua de la pluma contaminada. El módulo 2, con un contenido de 50% de piedra caliza, 50% de compost y pequeñas cantidades de hierro de valencia cero, junto con el módulo 3, con un contenido de 66% de piedra caliza y 33% de compost, presentaron correcciones del pH a valores cercanos a 7 y una remoción de los metales mayor al 90%, sin embargo no presentaron una reducción del sulfato significativa. Los autores atribuyen que los metales precipitaron debido a la formación de hidróxidos de hierro y aluminio por el incremento del pH mas no por la generación de sulfuro por la acción de las BSR [23].

En el 2002, Ludwig *et al.* reportaron la instalación de una barrera reactiva permeable basada en compost para el tratamiento de una pluma contaminada en Vancouver (Canadá) [24]. El cuerpo de agua contaminado contenía un pH promedio de 6.39 y concentraciones de metales de 3.63 mg L^{-1} de cobre y 0.005 mg L^{-1} de cobalto. Las dimensiones de la barrera reactiva permeable fueron de 6.5 m de profundidad, 10 m de largo y 2.5 m de ancho. La mezcla reactiva usada en la barrera consistió de 15% de compost de hojas, 84% de grava y 1% de piedra caliza. Después de 21 meses de operación, el pH del efluente contaminado se mantuvo en 6.86, mientras que la remoción de metales (mayor al 80%) fue alcanzada por la precipitación de los mismos en forma de sulfuros metálicos por la generación biogénica de sulfuros [24].

3.2.4 Aplicación de tratamientos pasivos de drenaje ácido de mina a nivel regional

En América Latina, no existe documentación sobre la instalación de sistemas de tratamiento pasivo de drenajes ácidos de mina en aplicaciones de campo. Los estudios publicados sobre la utilización de bacterias sulfato-reductoras en la remediación de DAM a nivel regional son mínimos. Existe un proyecto de tesis realizado en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en Perú, en el que se trabajó en la evaluación de métodos químicos y biogénicos para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina a escala de laboratorio [25].

En dicho estudio, se emplearon bacterias sulfato-reductoras aisladas de lugares aledaños a los puntos de descarga en los Pantanos de Villa de la Unidad de Producción Cerro de Pasco perteneciente a la compañía minera Volcan en Perú. Los estiércoles de aves de corral, oveja y vaca se emplearon como donadores de electrones y fuente de carbono y de energía para el crecimiento de las BSR tanto para los drenajes ácidos de mina sintéticos como reales. Se realizaron experimentos batch y se instaló un reactor continuo en dos etapas con

el objetivo de tratar drenaje ácido de mina con el uso de bacterias sulfato-reductoras. Con el tratamiento biogénico se alcanzaron remociones de cobre (99.99%), hierro (99.99%), plomo (96.67%) y zinc (99.94%). Así mismo la remoción de sulfatos alcanzada fue del 97.55% [25].

El objetivo del presente trabajo de investigación fue poner en marcha y monitorear un bioreactor de flujo ascendente empacado con bacterias sulfato-reductoras provenientes de los sedimentos de una laguna artificial. El acetato se utilizó como donador de electrones para la sulfato-reducción en presencia de una alimentación continua de sulfato de 4000 mg $\text{SO}_4^{2-} \text{L}^{-1}$. La eficiencia en la generación biogénica de sulfuros en modo continuo fue evaluada como una posible aplicación de esta tecnología en sistemas de tratamiento pasivo como bioreactores *in situ* o barreras reactivas permeables para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 *Inóculo microbiano*

El inóculo microbiano empleado en este estudio fueron los sedimentos de una laguna artificial de la Universidad San Francisco de Quito. El contenido de sólidos totales en suspensión (STS) y de sólidos volátiles en suspensión (SVS) en los sedimentos fue de 14.90 y 6.28%, respectivamente. El bioreactor fue empacado con 15 g SVS L⁻¹ de los sedimentos de la laguna, lo que equivale a 115 g de dichos sedimentos.

3.3.2 *Puesta en marcha del bioreactor 1*

El bioreactor de vidrio, que consta de 2 puertos para muestreo y medición de pH así como de olivas en la entrada y salida del afluente y efluente líquidos, respectivamente, fue operado en modo continuo. El bioreactor de 5.5 cm de diámetro y 46 cm de largo fue alimentado con un flujo ascendente de 0.21-0.24 mL min⁻¹ en promedio, proporcionado por una bomba peristáltica (Peri-Star Pro Peristaltic Pump, Florida, Estados Unidos) (figura 3.2). Las conexiones se realizaron con sondas naso-gástricas de marca Medex N° 8 y 10. El bioreactor con un volumen de operación de 480 mL fue empacado con 376.8 g de arena de densidad 1.668 g mL⁻¹ y 115 g de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ. La arena fue previamente tamizada con un grosor de malla 8 (≥ 2.36 mm) y funcionó como soporte para las bacterias sulfato-reductoras presentes en los sedimentos. El bioreactor fue alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO-acetato L⁻¹ y 4000 mg sulfato L⁻¹ disueltos en el medio basal mineral. La temperatura de operación del bioreactor fue de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. El control de temperatura se realizó con un controlador universal y un relé de estado sólido. Tanto el bioreactor como las mangueras para el transporte del líquido

fueron cubiertas con papel aluminio durante el transcurso del proyecto con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias fotolitotróficas [6].

Las figuras 3.2 y 3.3 muestran el esquema del bioreactor, el diagrama de bloques y el esquema del proceso biológico de generación de sulfuro, respectivamente, llevados a cabo en esta investigación. .

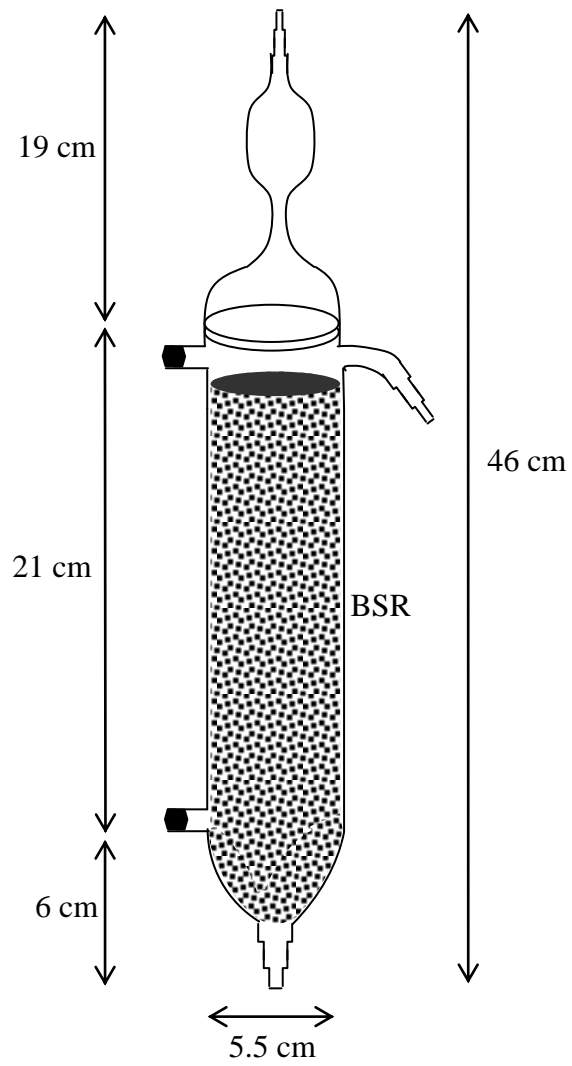
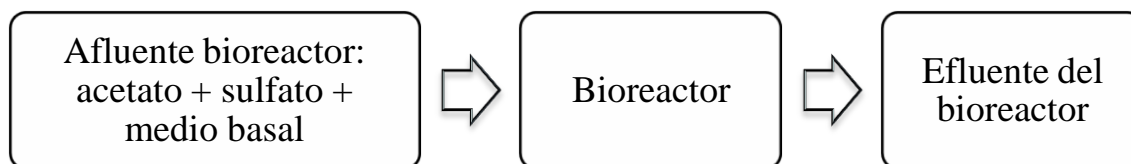


Figura 3.2: Esquema del bioreactor empleado en la generación biogénica de sulfuro

a)



b)

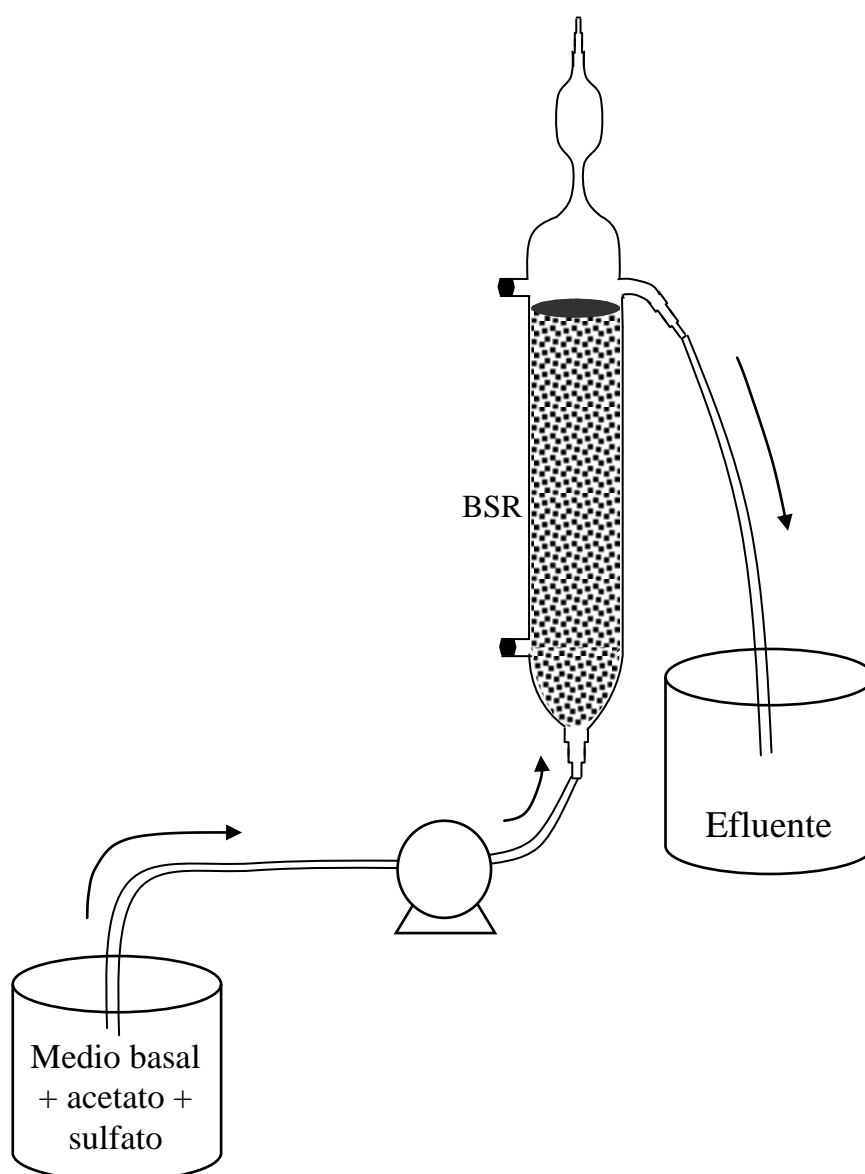


Figura 3.3: Diagrama de bloques (a) y esquema del bioreactor empleado durante la sulfato-reducción microbiana. El bioreactor fue alimentado con una muestra sintética formada por acetato (2.5 g DQO L^{-1}), sulfato (4000 mg L^{-1}) y el medio basal, y empacado con 15 g SVS L^{-1} de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ soportados en arena en un modo de operación continuo con un flujo ascendente (b).



Figura 3.4: Foto del bioreactor empleado durante la sulfato-reducción microbiana. El bioreactor fue alimentado con una muestra sintética formada por acetato (2.5 g DQO L^{-1}), sulfato (4000 mg L^{-1}) y el medio basal, y empacado con 15 g SVS L^{-1} de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ soportados en arena en un modo de operación continuo con un flujo ascendente.

3.3.3 *Afluente del bioreactor*

El bioreactor fue alimentado con un afluente sintético compuesto por el medio basal mineral como medio de cultivo, acetato como sustrato donador de electrones y sulfato como aceptor terminal de electrones durante la sulfato-reducción microbiana. La composición del medio basal mineral (pH 7.1-7.3) usado en el afluente del bioreactor fue (en mg L⁻¹): NH₄Cl (280); KH₂PO₄ (195); MgSO₄ (49); CaCl₂ (10); NaHCO₃ (3000); extracto de levadura (10) y 1 mL L⁻¹ de solución de elementos traza. La solución de elementos traza estaba formada por (en mg L⁻¹): H₃BO₃ (50), FeCl₂·4H₂O (2,000), ZnCl₂ (50), MnCl₂ (32), (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (50), AlCl₃ (50), CoCl₂·6H₂O (2,000), NiCl₂·6H₂O (50), CuSO₄·5H₂O (44), NaSeO₃·5H₂O (100), EDTA (1,000), resazurina (200) y 1 mL L⁻¹ de HCl 36%). El acetato como acetato de sodio (CH₃COONa·3H₂O) fue alimentado al bioreactor en una concentración de 2.5 g DQO-acetato L⁻¹, mientras que la concentración de sulfato como sulfato de sodio (Na₂SO₄) alimentada fue de 4000 mg L⁻¹.

3.3.4 *Diseño del sistema de tratamiento biológico de los DAM utilizando reactores en serie*

Además de la puesta en marcha del bioreactor como se describe previamente, se diseñó el sistema de tratamiento biológico de los DAM utilizando dos reactores en serie, el bioreactor y un reactor químico-biológico. El reactor químico-biológico, de 5 cm de diámetro y 28 cm de largo se conectaría en serie al bioreactor. En el bioreactor se llevaría a cabo la generación de sulfuro catalizada por la acción de las bacterias sulfato-reductoras, y en el reactor químico-biológico el sulfuro generado reaccionaría con el drenaje ácido de mina sintético produciendo la precipitación de los sulfuros metálicos. El efluente del bioreactor sería alimentado al reactor químico-biológico, que a su vez tendría un segundo puerto de alimentación por donde ingresaría el DAM sintético. En la figura 3.5 se presenta

un esquema del diseño del sistema de tratamiento biológico de los DAM utilizando un bioreactor y un reactor químico-biológico conectados en serie. Trabajos de investigación futuros deberían ser realizados para evaluar el tratamiento de los drenajes ácidos de mina con el sistema propuesto.

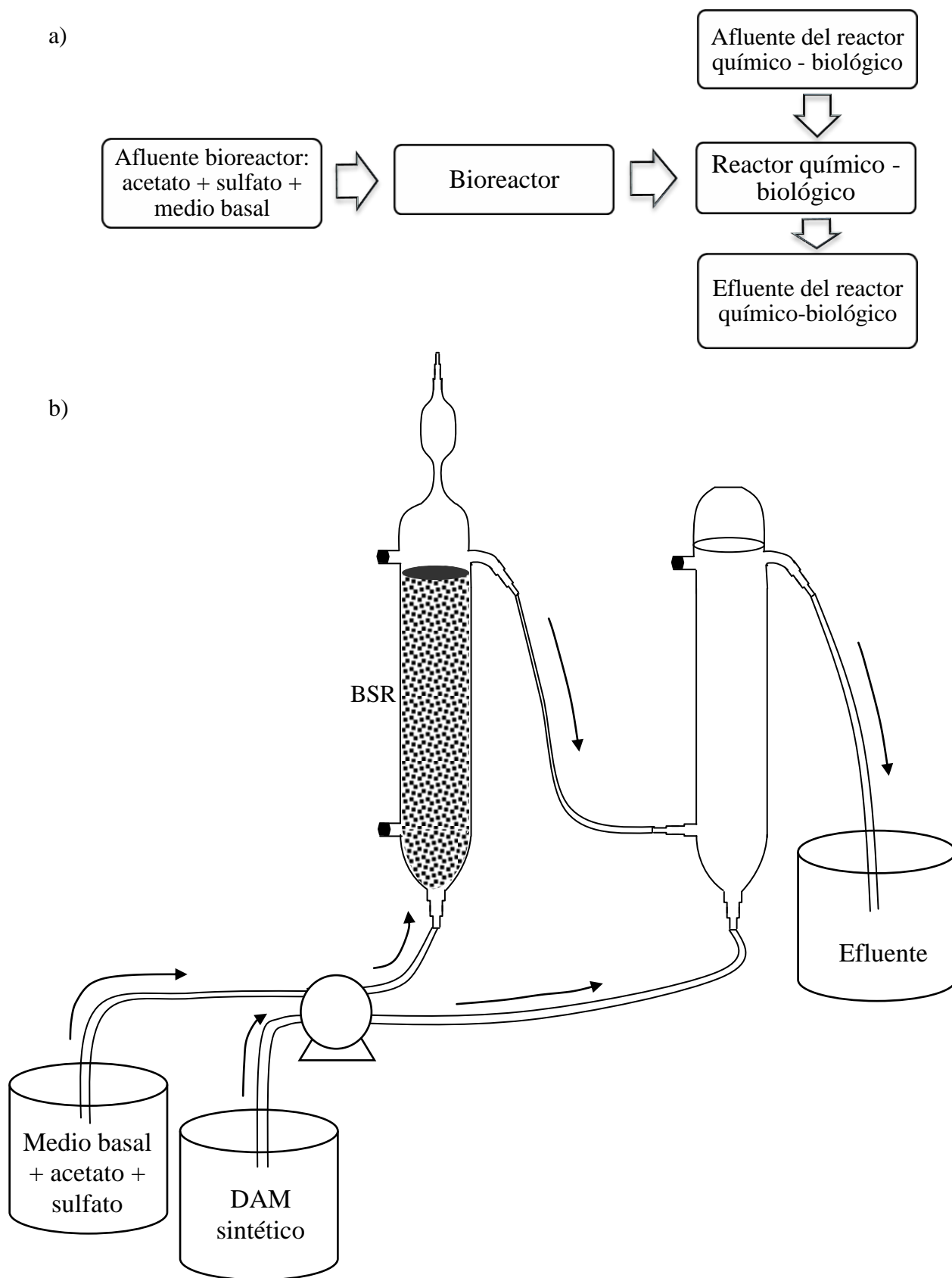


Figura 3.5: Diagrama de bloques (a) y esquema del diseño del sistema de tratamiento de los drenajes ácidos de mina utilizando dos reactores en serie, un bioreactor y un reactor químico-biológico (b).

3.3.5 Reactivos

El sulfato de sodio (100%, pureza) fue obtenido de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). El sulfato de amonio y hierro (III), el acetato de sodio (98%) fueron obtenidos de Laboratorios Químicos H.V.O. (Quito, Pichincha, Ecuador). El ácido sulfúrico (95.0 - 97 %) fue obtenido de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). El DMP (oxalato de N,N-dimetil-p-fenildiamina) (> 99%) fue obtenido de Acros Organics (Geel, Bélgica). El cloruro de zinc (97.1%) fue obtenido de J. T. Baker (Zedelgem, Bélgica). Todos los reactivos fueron utilizados en el estado en el que fueron recibidos.

3.3.6 Métodos analíticos

Determinación de la demanda química de oxígeno

La demanda química de oxígeno (DQO) fue determinada por un método espectrofotométrico a una longitud de onda de 600 nm de acuerdo al protocolo descrito en Métodos Normalizados para el Análisis de Agua Potable y Agua Residual [26]. Para la determinación de la demanda química de oxígeno se empleó una solución de digestión de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) con ácido sulfúrico concentrado, 10.22 g L^{-1} y una solución de ácido sulfúrico concentrado con nitrato de plata en una relación de 6 g $AgNO_3$ por kg H_2SO_4 . Después de centrifugar las muestras, en un tubo de ensayo se añadió 2.5 mL de la muestra, 1.5 mL de la solución de digestión y 3.5 mL de la solución de ácido sulfúrico concentrado. La digestión de las muestras se realizó en un horno a $150^\circ C$ por 2 horas. Se realizaron curvas de calibración previas a cada medición con estándares de KHP de 50, 100, 250, 500 y $750 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$.

Conteo de bacterias sulfato-reductoras mediante el método del número más probable

La presencia de bacterias sulfato-reductoras en los sedimentos de la laguna de la USFQ fue determinada cuantitativamente por el método del número más probable (Most Probable Number, NMP, por sus siglas en inglés) [27]. El método de NMP se basa en la enumeración de bacterias sulfato-reductoras a través de clavos de hierro. Si se produce sulfuro, la formación de un precipitado de sulfuro ferroso negro en los clavos, provee un sistema de detección sensitivo de la presencia de bacterias sulfato-reductoras. La composición del medio empleado (medio de Buthn) (pH 7.5) fue (en g L⁻¹): NH₄Cl (1); K₂HPO₄ (0.5); Na₂SO₄ (2); CaCl₂ · 2H₂O (0.067); MgSO₄ · 7H₂O (1); FeSO₄ · 7H₂O (0.004); extracto de levadura (1); resazurina (0.01) y 2.5 mL L⁻¹ de lactato de sodio (60% m/v). Después de agitar 2 g de los sedimentos con 20 mL de agua destilada por dos horas y de lavar los clavos en un solvente orgánico, en este caso etanol, se realizó una dilución 1:10 (1 mL de muestra en 9 mL de medio de Buthn) en una botella anaerobia de vidrio de 160 mL sellada con tapón de caucho y tapa de aluminio. Se realizaron diluciones sucesivas hasta obtener una dilución 1:10⁶. Cada botella fue suministrada con dos clavos de hierro y se realizó una purga con nitrógeno con el fin de generar un ambiente anaeróbico en cada botella. Se mantuvieron las botellas a temperatura ambiente (20-25°C) por un periodo de 28 días. Todo el material fue esterilizado a 121°C por 20 minutos antes de realizar el procedimiento descrito.

Medición de sulfuros

El sulfuro disuelto total fue determinado espectrofotométricamente por el método del azul de metileno a una longitud de onda de 670 nm [28, 29]. En este método se monitorea colorimétricamente la formación del azul de metileno que resulta de la reacción entre el sulfuro y el reactivo colorimétrico, DMP (oxalato de N,N-dimetil-p-fenildiamina) en

medio ácido. La medición de sulfuro disuelto se realizó de la siguiente manera. En un balón volumétrico de 25 mL, se colocaron 5 mL de solución de cloruro de zinc (2%), 2.5 mL de solución de DMP (2 g L⁻¹) con 20% de ácido sulfúrico concentrado, 0.125 mL de solución de sulfato de amonio y hierro (III) (100 g L⁻¹) y el volumen de muestra adecuado de acuerdo a la cantidad de sulfuro (S²⁻) esperada, tomando en cuenta que la concentración máxima de sulfuro en el balón debía ser 1 mg L⁻¹. Previo a la medición de las muestras, se realizaron curvas de calibración entre 0 y 1 mg L⁻¹ S²⁻.

3.3.7 Actividad sulfato-reductora

La determinación de la actividad máxima específica sulfato-reductora fue realizada por duplicado en botellas de vidrio de 160 mL selladas con tapones de caucho y tapas de aluminio. En cada botella se colocó el medio basal mineral (100 mL), sulfato de sodio (4000 mg L⁻¹), el sustrato aceptor de electrones y el inóculo microbiano (10% v/v). Los sustratos empleados fueron 2.5 g DQO L⁻¹ acetato, lactato, etanol y peptona. En cada bioensayo se realizó una purga con N₂ para asegurar condiciones anaeróbicas. Los controles, montados por duplicado, se basaron en ensayos en los que no se colocó inóculo. Las botellas se mantuvieron en una incubadora con la temperatura controlada a 30 ± 2 °C. Se monitoreó periódicamente la reducción de sulfato a sulfuro midiendo la concentración de S²⁻ de acuerdo al método de medición de sulfuro descrito previamente. Las actividades máximas específicas sulfato-reductoras y actividades máximas específicas de generación de sulfuro se expresaron en mg SO₄²⁻ g⁻¹ sustrato d⁻¹ y en mg S²⁻ g⁻¹ sustrato d⁻¹, respectivamente. Se relacionó la cantidad de sulfato reducida con la cantidad de sulfuro generada en forma de H₂S, de acuerdo a la siguiente ecuación [30]:



3.4 Resultados y Discusión

En el presente estudio se evaluó la eficiencia de generación de sulfuro en un bioreactor de flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con un cultivo mixto de bacterias sulfato-reductoras presentes en los sedimentos de una laguna artificial. El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar el potencial de aplicación del reactor biogénico en la remediación de los drenajes ácidos generados durante las actividades mineras.

La eficiencia de estos sedimentos como inóculo microbiano durante la sulfato-reducción fue evaluada en experimentos batch utilizando diferentes sustratos (capítulo 2). La figura 3.6 describe la producción de sulfuro con respecto al tiempo en presencia de diferentes sustratos utilizando los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ. Como se resume en la tabla 3.3, la mayor producción de sulfuro acumulada después de 40 días de tratamiento, fue alcanzada utilizando acetato como donador de electrones ($455 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$), mientras que empleando lactato como sustrato, la producción de sulfuro, en el mismo periodo de tiempo fue de $74 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$. La generación de sulfuro con el uso tanto de peptona como de etanol fue mínima y muy similar registrando valores de 27 y $23 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$, respectivamente.

La producción final acumulada de sulfuro, así como las actividades máximas específicas de producción de sulfuro y de reducción de sulfato para los diferentes sustratos estudiados se presentan en la tabla 3.3. Las actividades máximas específicas de generación de sulfuro y de sulfato-reducción utilizando los sedimentos de la laguna artificial como inóculo microbiano, varían entre 0.34 y $8.74 \text{ mg S}^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ sustrato d}^{-1}$, y entre 2.06 y $52.43 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ sustrato d}^{-1}$, respectivamente. Por lo tanto, la actividad máxima específica de generación de sulfuro o reducción de sulfato de los sedimentos de la laguna artificial con el uso de

acetato es 5 veces mayor que con el uso de lactato, 10 veces mayor que empleando etanol y 26 veces mayor que con peptona como sustrato.

En base a estos resultados, se procedió a la instalación y puesta en marcha del bioreactor bajo las mismas condiciones de operación evaluadas en los experimentos batch. El bioreactor fue alimentado continuamente con una mezcla sintética de acetato (2.5 g DQO L⁻¹) como sustrato y sulfato como aceptor terminal de electrones en una concentración de 4000 mg SO₄²⁻ L⁻¹. El bioreactor permaneció en operación por un periodo de 66 días y el tiempo de residencia fue de 1.5 días en promedio. Una vez que el reactor fue puesto en marcha se procedió a monitorear su desempeño en función de la generación de sulfuro, el pH del afluente como del influente, el flujo y la remoción de la demanda química de oxígeno.

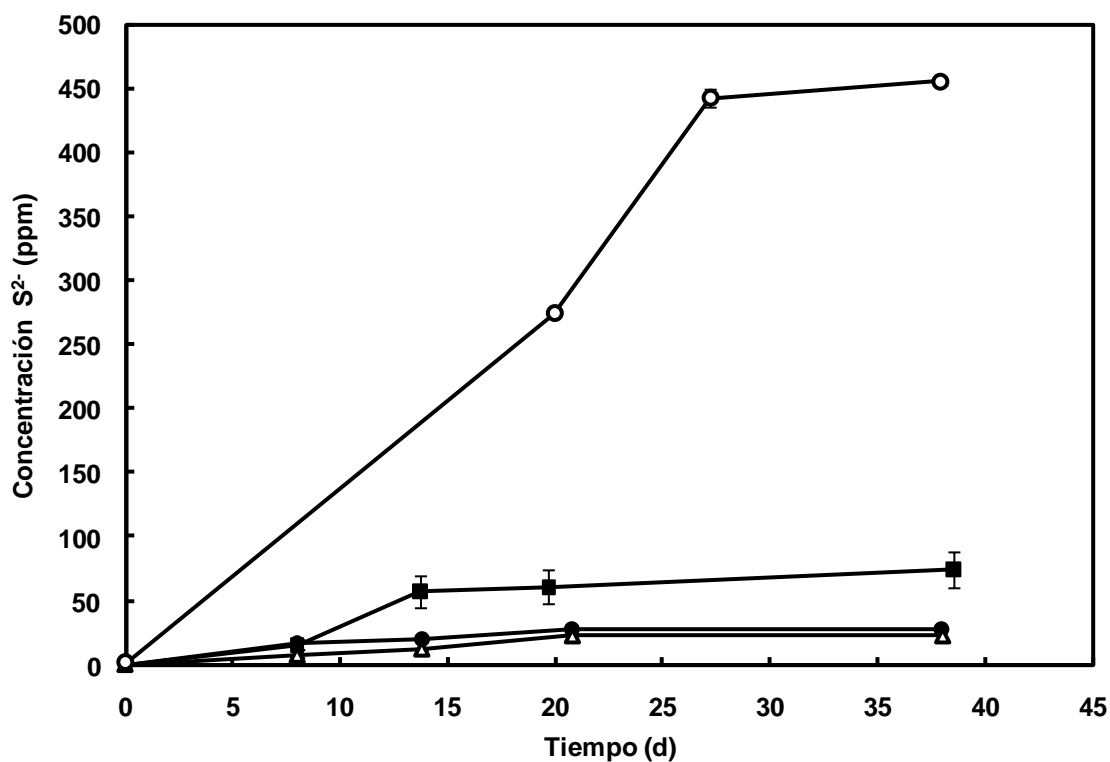


Figura 3.6: Producción de sulfuro con respecto al tiempo con 2.5 g DQO L⁻¹ de diferentes sustratos en presencia de 4000 mg L⁻¹ de sulfato utilizando 10% v/v de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ en los tratamientos completos (sustrato + sulfato + microorganismos) Leyenda: (●) 2.5 g DQO-peptona L⁻¹; (■) 2.5 g DQO-lactato L⁻¹; (Δ) 2.5 g DQO-etanol L⁻¹ y (○) 2.5 g DQO-acetato L⁻¹. Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por duplicado.

Tabla 3.3: Producción final acumulada de sulfuro en 40 días de tratamiento y actividades máximas específicas de producción de sulfuro y reducción de sulfatos en presencia de 4000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ con 2.5 g DQO L⁻¹ de cada sustrato para los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ evaluados en los bioensayos *batch*.

Sustrato	Producción final de S²⁻ mg S ²⁻ L ⁻¹	Actividad máxima específica de producción de sulfuro mg S ²⁻ g ⁻¹ sustrato día ⁻¹	Actividad máxima específica de reducción de sulfatos mg SO ₄ ²⁻ g ⁻¹ sustrato día ⁻¹
Acetato	455.3312	8.738	52.427
Lactato	74.4032	1.692	9.777
Peptona	27.1261	0.343	2.059
Etanol	22.3986	0.881	5.284

La figura 3.7 presenta la producción de sulfuro con respecto al tiempo medida en el efluente del bioreactor. Durante los primeros 20 a 30 días de operación, las bacterias sulfato reductoras empacadas con arena en el bioreactor se encontraban en una fase de adaptación, a partir del día 30 se puede observar un incremento gradual en la cantidad de sulfuro generada, alcanzándose una producción máxima acumulada de $166.64 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ después de 66 días de operación. Las BSR se encontraban en una fase de crecimiento exponencial hasta los 55 días de operación, a partir de los cuales se alcanzó una producción máxima.

Los resultados obtenidos en esta investigación son comparables con estudios previos conducidos por Celis *et al.* en los que se alcanzó una producción de sulfuro de alrededor de $80 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ en un periodo de aproximadamente 55 días. En el caso de este estudio en particular [31] se instaló un bioreactor en modo de operación continuo con una alimentación de 0.5 g DQO L^{-1} de lactato y etanol. El bioreactor permaneció en operación durante 125 días, alcanzándose una producción máxima de sulfuro de aproximadamente $290 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ a los 113 días de operación [31]. De igual manera, Mendoza demostró una producción de sulfuro de alrededor de $50 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ en un periodo de tiempo de 50 días en un bioreactor empacado con compost, piedra caliza, arena y 15 g SVS L^{-1} de un lodo anaeróbico granular. El bioreactor permaneció en operación continua durante 450 días y se alcanzó una generación máxima de sulfuro aproximadamente de $60 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ a los 60 días de operación [32]. En el presente trabajo de investigación, en un periodo de tiempo comparable (55 días) se alcanzó una producción de sulfuro entre 2 y 3 veces mayor a la obtenida en los trabajos científicos previamente descritos.

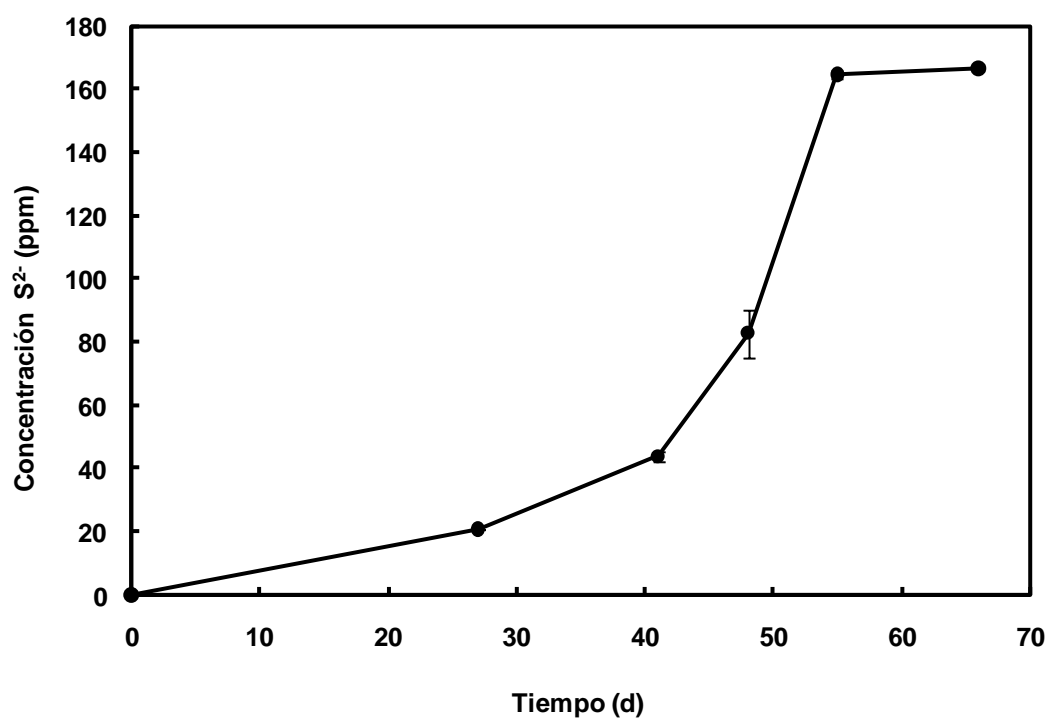


Figura 3.7: Producción de sulfuro con respecto al tiempo en el bioreactor de flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con 15 g SVS L^{-1} de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO L^{-1} de acetato y 4000 mg L^{-1} de sulfato. Las barras de error representan desviaciones estándar de mediciones realizadas por triplicado.

Por otro lado, la producción de sulfuro obtenida en 66 días de funcionamiento del bioreactor, de $166.64 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ ($5.2 \times 10^{-3} \text{ M}$), es comparable con las concentraciones de sulfuro calculadas y demostradas como suficientes para la precipitación de metales en estudios documentados en la literatura. Estudios conducidos por Mendoza demostraron que con una generación máxima de sulfuro de $60 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ aproximadamente, se obtuvieron remociones de Cu^{2+} mayores al 90%, cuando el afluente del bioreactor fue alimentado con concentraciones de cobre de entre 10 y $50 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$ [32]. Trabajos de investigación deberían ser realizados para evaluar la aplicación del sistema desarrollado en este estudio en la remoción de contaminantes en forma de sulfuros metálicos para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina.

En cuanto a la generación de sulfuro en el bioreactor en modo de operación continuo, comparada con la producción de sulfuro en modo de operación batch, se puede notar que en el mismo periodo de tiempo, en el experimento batch se alcanzó una producción de sulfuro acumulada 3 veces mayor que la obtenida en el bioreactor con un modo de operación continuo, con valores de $167 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ y $460 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$, respectivamente (figuras 3.6 y 3.7). Probablemente, esta diferencia se deba al tiempo de adaptación que necesitan las bacterias sulfato-reductoras cuando se trabaja en modo continuo de operación. Waybrant *et al.* reportaron periodos de aclimatación de 20 a 65 días en experimentos realizados en bioreactores de operación continua empacados con diferentes mezclas reactivas para evaluar su eficiencia en la aplicación de sistemas pasivos de tratamiento de drenajes ácidos de mina [10]. Más aún, estudios realizados por Costa y colaboradores, en columnas de operación continua empacadas con lodos anaeróbicos utilizando etanol como donador de electrones, mostraron tiempos de adaptación de hasta 30 días [33]. En el caso del bioreactor instalado en este estudio, se presume que la producción de sulfuro obtenida puede seguir aumentando pasados los 66 días de operación,

ya que una vez superado el periodo de adaptación o aclimatación de las bacterias sulfato-reductoras, sería posible alcanzar concentraciones de sulfuro similares o dentro el rango de aquellas obtenidas en los experimentos batch.

Adicionalmente a la generación de sulfuro, también se monitoreó la variación de la demanda química de oxígeno (DQO) en el afluente y efluente del bioreactor. La figura 3.8 muestra la demanda química de oxígeno con respecto al tiempo monitoreada durante la sulfato-reducción microbiana en modo de operación continuo. En el caso del afluente se observan concentraciones entre 1115 y 2467 mg DQO L⁻¹, mientras que para el efluente varían entre 955 y 2157 mg DQO L⁻¹. El porcentaje de remoción del DQO en el bioreactor con respecto al tiempo de operación se encuentra ilustrado en la figura 3.9. La máxima remoción alcanzada fue de 14% en el día de operación 27, manteniéndose prácticamente constante durante el periodo de operación del bioreactor de 42 días.

Los resultados obtenidos en esta investigación son comparables con estudios realizados por Celis y colaboradores [31]. En un bioreactor en modo de operación continuo con una alimentación de 0.5 g DQO L⁻¹ de lactato y etanol y empacado con lodos anaeróbicos, en un periodo de tiempo de 50 días, el porcentaje de remoción de DQO fue de alrededor de 18 %, alcanzándose a partir de los 60 días de operación porcentajes de remoción de DQO de hasta 60% [31]. Por otro lado, Manous *et al.* reportaron remociones de DQO de hasta 53% en 67 días de operación con el uso de acetato (1.92 g DQO L⁻¹) como sustrato y los sedimentos del lago Devils (Dakota del Norte) como inóculo microbiano [34]. Como se puede ver, la remoción de DQO obtenida en este estudio está en el mismo orden de magnitud que aquellas registradas en los trabajos científicos previamente descritos.

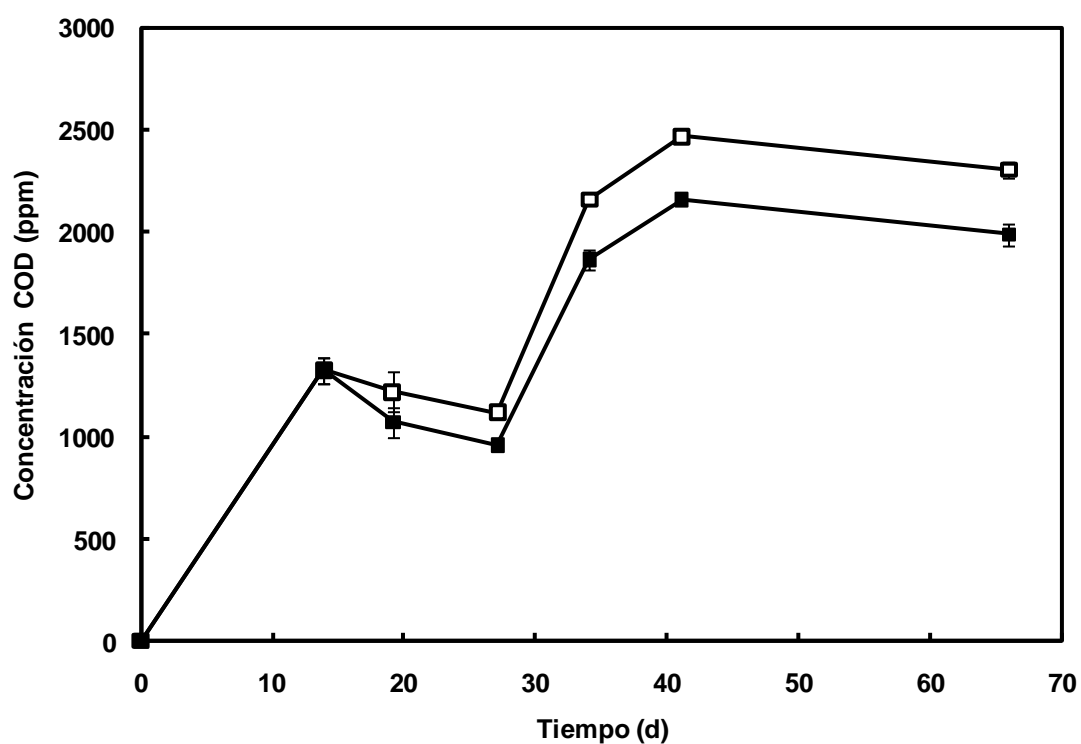


Figura 3.8: Variación de la demanda química de oxígeno (DQO) con respecto al tiempo del afluente y efluente del bioreactor de flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con 15 g SVS L^{-1} de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO L^{-1} de acetato y 4000 mg L^{-1} de sulfato. Leyenda: (□) afluente del bioreactor y (■) efluente del bioreactor. Las barras de error representan desviaciones estándar de mediciones realizadas por triplicado.

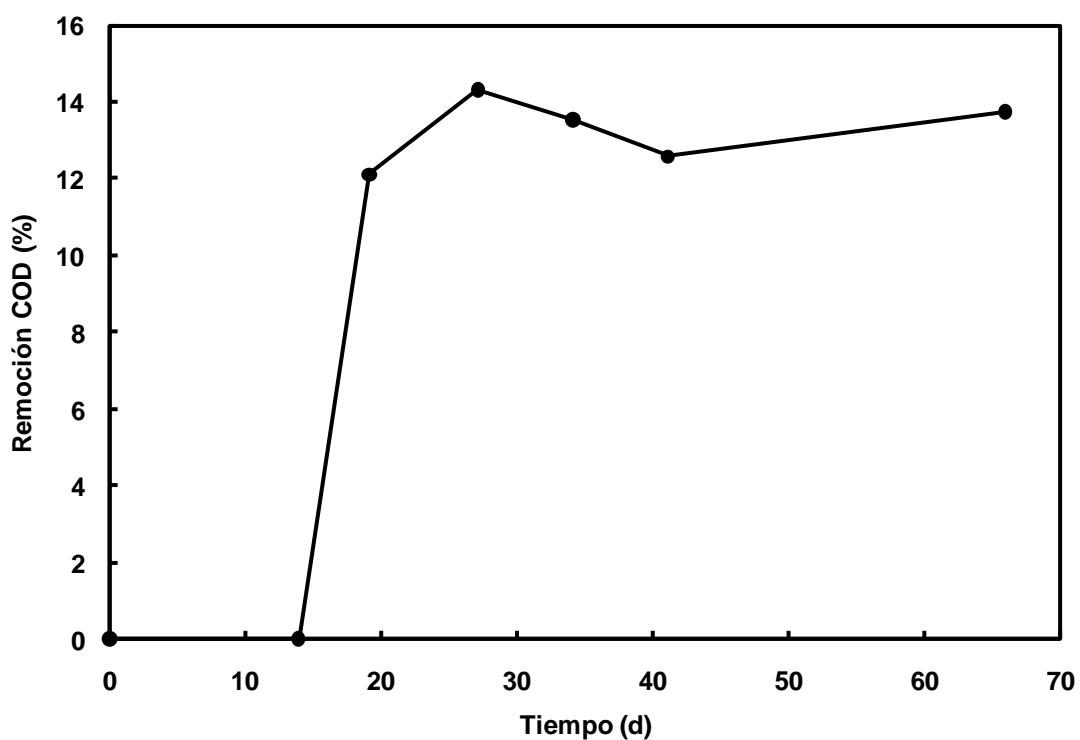


Figura 3.9: Porcentaje de remoción de la demanda química de oxígeno (DQO) con respecto al tiempo en el bioreactor de flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con 15 g SVS L^{-1} de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO L^{-1} de acetato y 4000 mg L^{-1} de sulfato.

La figura 3.10 presenta la variación del pH del afluente y del efluente del reactor biogénico a través del tiempo. Como era de esperarse, el pH del afluente se mantuvo constante alrededor de 7.2, mientras que el del efluente presentó valores entre 8.10 y 8.92. Este incremento en el pH se puede atribuir al aumento de la alcalinidad, Eddy y colaboradores demostraron que durante reducción biogénica de sulfuros, las bacterias sulfato reductoras utilizan el acetato como donador de electrones y producen bicarbonatos [30]. Dichos bicarbonatos contribuyen a un aumento de la alcalinidad y por ende se registra un aumento en el pH del efluente comparado con el del efluente del bioreactor.

De igual manera, el flujo proporcionado por la bomba peristáltica fue monitoreado y se mantuvo en un rango de 0.21 a 0.24 mL min⁻¹. Los valores del flujo están representados en la figura 3.11. En base al flujo y al volumen de trabajo del reactor se puede establecer que el tiempo de residencia promedio fue de 1.5 días.

Sierra-Álvarez y colaboradores, en sus estudios conducidos en bioreactores continuos basados en el uso de bacterias sulfato reductoras para el tratamiento biológico de metales pesados presentes en drenajes ácidos de mina, utilizaron tiempos de residencia de 24 horas, alcanzando remociones de cobre mayores al 99.2% [35]. Así mismo, Celis *et al.* utilizaron tiempos de residencia de 2 días en un bioreactor continuo que alcanzó una producción de sulfuro de alrededor de 290 mg S²⁻ L⁻¹ [31]. El tiempo de residencia del bioreactor instalado en este trabajo de investigación está dentro del rango empleado por los estudios previamente descritos.

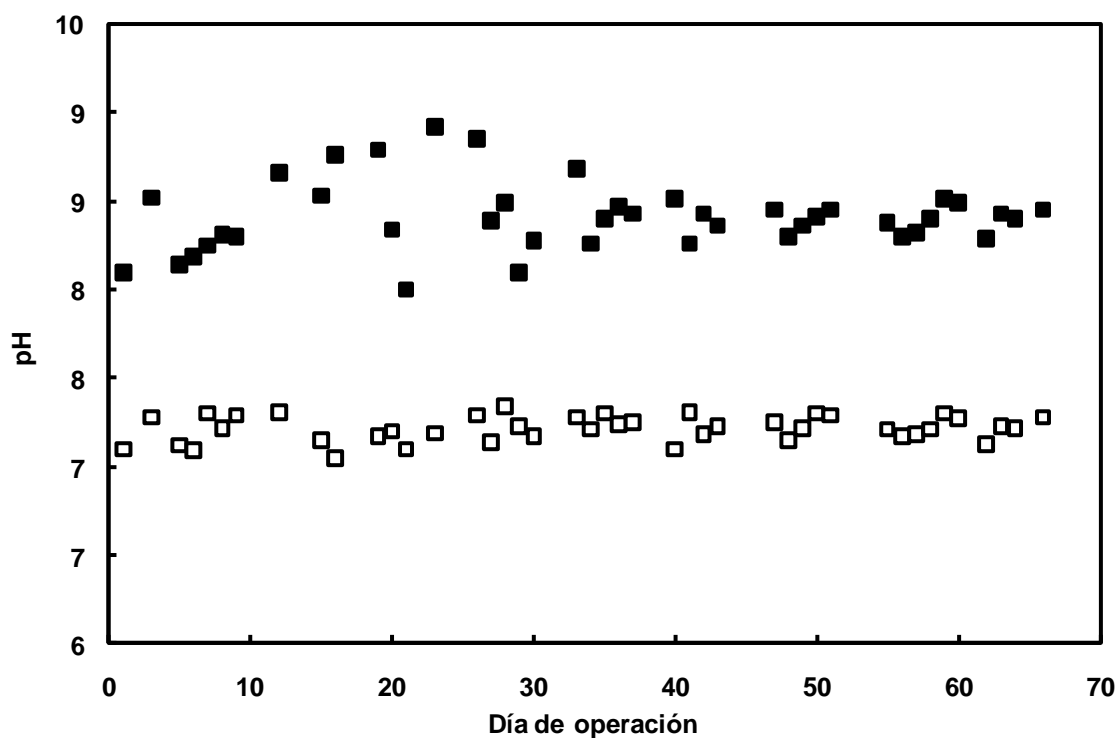


Figura 3.10: Variación del pH con respecto tiempo en el afluente y efluente del bioreactor de flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con 15 g SVS L^{-1} de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO L^{-1} de acetato y 4000 mg L^{-1} de sulfato. Leyenda: (□) afluente del bioreactor y (■) efluente del bioreactor

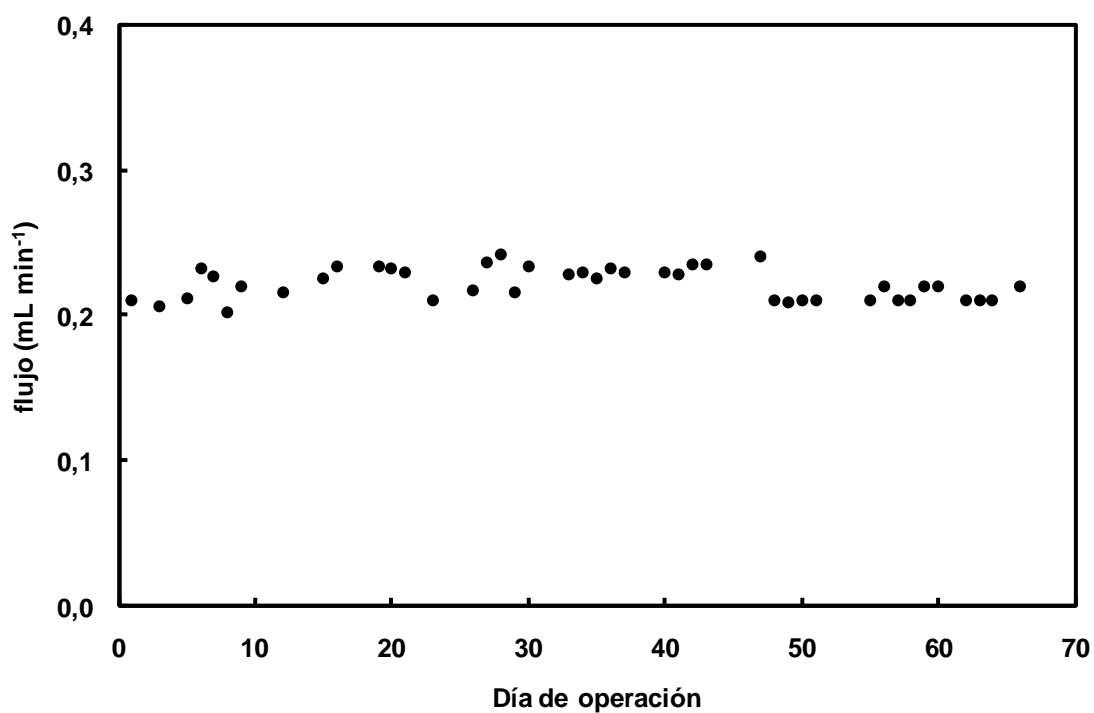


Figura 3.11: Variación del flujo con respecto tiempo en el bioreactor de flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con 15 g SVS L⁻¹ de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO L⁻¹ de acetato y 4000 mg L⁻¹ de sulfato.

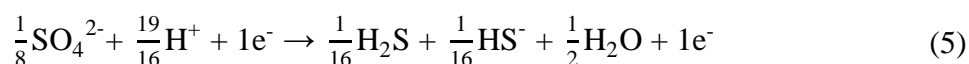
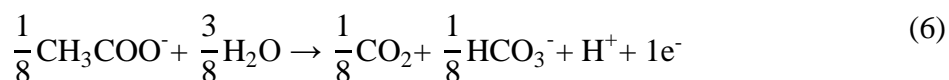
Como sustento a los resultados obtenidos, se realizó un conteo de las bacterias sulfato-reductoras presentes en los sedimentos de la laguna artificial, usados como inóculo microbiano en el bioreactor instalado, empleando el método descrito en la sección de Materiales y Métodos para el conteo de las BSR.

Durante el conteo microbiano de bacterias sulfato-reductoras, se pudo apreciar claramente la formación de precipitados negros en los clavos de hierro evaluados. Esto demuestra la presencia y actividad de las bacterias sulfato-reductoras, ya que generaron el sulfuro necesario para la formación del precipitado de sulfuro de hierro de color negro. Los resultados obtenidos indican que existen 2.4×10^5 bacterias sulfato-reductoras g^{-1} .

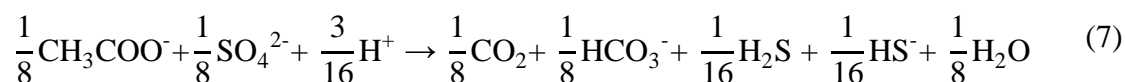
Los resultados registrados por Vladár *et al.* en estudios realizados en los sedimentos del lago Velencei ubicado al suroeste de Budapest (Hungría), con la utilización de lactato como donador de electrones, muestran la existencia de 5.4×10^5 BSR g^{-1} cuantificadas empleando la técnica del número más probable (NMP) [36]. El conteo de las bacterias sulfato-reductoras de este estudio muestra resultados coherentes con los encontrados por Vladár [36]. El conteo de BSR en este trabajo de investigación está en el mismo orden de magnitud que el encontrado en el estudio previamente descrito.

Cabe recalcar que la presencia evaluada de bacterias sulfato-reductoras en los sedimentos de la laguna artificial, es coherente con la producción de sulfuro obtenida durante la fase de adaptación, la cual fue de alrededor de $20 \text{ mg S}_2 \text{ L}^{-1}$. Por lo tanto, la cantidad de sulfuro generada durante los primeros 20 a 30 días de operación del reactor biogénico se pueden atribuir a la actividad de una población de BSR de $2.4 \times 10^5 \text{ g}^{-1}$ existente en los sedimentos anaeróbicos. Teniendo en consideración que la producción acumulada de sulfuro en el bioreactor después de 66 días de operación es de $166.64 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$, se presume que la concentración de bacterias sulfato reductoras en el bioreactor debe ser significativamente mayor que la obtenida en el conteo original de los microorganismos.

La relación entre la cantidad de sulfuro generada en el bioreactor y la remoción de DQO obtenida experimentalmente, se puede comparar con la remoción teórica esperada a través de las siguientes ecuaciones, propuestas por Eddy [30]:



A partir de las ecuaciones 5 y 6, se obtiene la siguiente expresión, que representa la oxidación del acetato y la reducción del sulfato:



Con la producción de sulfuro alcanzada en el bioreactor (166.64 mg S²⁻ L⁻¹), empleando la ecuación 7, y considerando que por cada mol de acetato se requieren 64 g DQO para la oxidación de acetato a CO₂, se determinó que la cantidad de DQO teórica esperada es de 657.48 mg DQO L⁻¹. Es decir, se esperaba un porcentaje de remoción de DQO teórico calculado de 74%. En el transcurso de este trabajo de investigación, el porcentaje de remoción alcanzado fue de 13% en promedio (figura 3.8). Probablemente esta diferencia se deba al exceso de sulfato utilizado en la alimentación del bioreactor (4000 mg SO₄²⁻ L⁻¹) con respecto a la cantidad de acetato alimentada de acuerdo a la ecuación (9). Se esperaba que con concentraciones más elevadas de sulfuro, la remoción de DQO alcance valores cercanos al porcentaje de remoción teórico calculado.

3.5 Conclusiones

La generación de sulfuro por parte de las bacterias sulfato-reductoras fue exitosamente demostrada en un bioreactor empacado con sedimentos de una laguna artificial durante periodos relativamente cortos de operación. La presencia de BSR en dichos sedimentos fue demostrada a través del conteo de las mismas con el método del número más probable (NMP).

El acetato junto con los sedimentos de la laguna artificial presentan un excelente potencial para el tratamiento biológico de los efluentes mineros. La tecnología desarrollada en este estudio representa una alternativa eficiente en el tratamiento biológico pasivo con el uso de bacterias sulfato-reductoras en aplicaciones como los biorreactores *in situ* o las barreras reactivas permeables para el remediación de drenajes ácidos de mina por precipitación de los contaminantes en forma de sulfuros metálicos. A pesar de que se puede esperar concentraciones más elevadas de sulfuros con periodos de tiempo más largos, la generación de sulfuro en el los 66 días de operación del bioreactor, podría resultar suficiente para la remoción de metales pesados.

3.6 Referencias Bibliográficas

1. Gazea, Adam, and Kontopoulos, A review of passive systems for the treatment of acid mine drainage. *Minerals Engineering* 1996, 9, 23-42.
2. Huntsman, Solch, and Porter, Utilization of Sphagnum species dominated bog for coal acid mine drainage abatement. *Geological Society of America* 1978, 322.
3. Girts, Kleinmann, and Erickson, Performance data on *Typha* and *Sphagnum* wetlands constructed to treat coal mine drainage. *Proc. of the 8th Annual Surface Mine Drainage Task Force Symp.* 1987.
4. Neculita, Zagury, and Bussiere, Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria: critical review and research needs. *Journal of Environmental Quality* 2007, 36, 1-13.
5. Hedin, Naim, and Kleinmann, Passive treatment of coal mine drainage. *USBM Information Circular 9389, US Bureau of Mines* 1994, 35.
6. Pruden, Messner, Pereyra, Hanson, Hiibel, and Reardon, The effect of inoculum on the performance of sulfate-reducing columns treating heavy metal contaminated water. *Water Research* 2007, 41, 904 - 914.
7. Alexander, *Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur- reducing bacteria* Jonh Wiley and Sons: 1988.
8. Skoog, West, Holler y Crouch, *Fundamentos de Química Analítica*. Madrid, 2004.
9. Icgen, Moosa, and Harrison, A Study of the Relative Dominance of Selected Anaerobic Sulfate-Reducing Bacteria in a Continuous Bioreactor by Fluorescence in Situ Hybridization. *Microbial Ecology* 2007, 53, 43 - 52.
10. Waybrant, Blowes, and Ptacek, Selection of reactive mixtures for use in permeable reactive walls for treatment of acid mine drainage. *Environmental Science and Technology* 1998, 32, 1972 - 1979.

11. Tsukamoto, Killion, and Miller, Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low temperature, low pH and matrix investigations *Water Research* 2004, 33, 1365 - 1370.
12. Elliott, Ragusa, and Catcheside, Growth of sulfate reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. *Water Research* 1998, 32, 3724 - 3730.
13. Lowe, Jain, and Zeikus, Biology, Ecology, and Biotechnological Applications of Anaerobic Bacteria Adapted to Environmental Stresses in Temperature, pH, Salinity, or Substrates. *Microbiological Reviews* 1993, 57, 451 - 509.
14. William, Modeling of sulfate reduction in anaerobic solid substrate bioreactors for mine drainage treatment. *Mine Water and the Environment. International Mine Water Association* 2006, 19 - 29.
15. Al-Ani, Effect of DQO/SO_4^{2-} ratio on sulfate reduction in anaerobic digestion. University of Toronto, Toronto, 1994.
16. Prasad, Wai, Bérubé, and Henry, Evaluating substrates in the biological treatment of acid mine drainage *Environmental Science and Technology* 1999, 20, 449 - 458.
17. Lapointe, Fytas, and McConchie, Using permeable reactive barriers for the treatment of acid rock drainage *International Journal of Surface Mining, Reclamation and Environment* 2005, 19, 57 - 65.
18. Gibert, Pablo, Cortina, and Ayora, Treatment of acid mine drainage by sulphate-reducing bacteria using permeable reactive barriers: A review from laboratory to full-scale experiments *Environmental Science and Technology* 2002, 1, 327 - 333.
19. Batty and Younger, The use of waste materials in the passive remediation of mine water pollution. *Surveys in Geophysics* 2004, 25, 55 - 67.
20. Dvorak, Hedin, Edenborn, and McIntire, Treatment of metal contaminated water using bacterial sulfate reduction: results from pilot-scale reactors *Biotechnology and Bioengineering* 1992, 40, 609 - 616.
21. Hammack and Edenborn, The removal of nickel from mine waters using bacterial sulfate reduction. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992, 37, (674 - 678).

22. Benner, Blowes, Ptacek, and Mayer, Rates of sulfate reduction and metal sulfide precipitation in a permeable reactive barrier *Applied Geochemistry* 2002, 17, 301 - 320.
23. Carrera, Alcolea, Bolzicco, Knudby, and Ayora, An experimental geochemical barrier at Aznalcóllar. *Proceedings of the 3rd International Conference on Groundwater Quality* 2001, 407 - 409.
24. Ludwig, McGregor, Blowes, Benner, and Mountjoy, A permeable reactive barrier for treatment of heavy metals *Groundwater* 2002, 40, 59 - 66.
25. Chambe, Evaluación de los métodos químicos y biogénico para el tratamiento de drenaje ácido de mina a escala de laboratorio. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2008.
26. APHA, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th ed.; American Public Health Association: Washington DC., 1998.
27. Fedorak, Semple, and Westlake, A statistical comparison of two culturing methods for enumerating sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 1987, 7, 19 - 27.
28. Trüper and Schlege, Sulphur Metabolism in Thiorhodaceae I. Quantitative Measurements on Growing Cells of *Chromatium okenii*. *Antonie Leeuwenhoek* 1964, 30, 225 - 238.
29. Cline, Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography* 1969, 14, 454-458.
30. Eddy and Metcalf, *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*. Fourth Edition ed.; 2003; Vol. Fourth Edition.
31. Celis, Villa-Gómez, Alpuche-Solís, Ortega-Morales, and Razo-Flores, Characterization of sulfate-reducing bacteria dominated surface communities during start-up of a down-flow fluidized bed reactor. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2009, 36, 111 -121.

32. Mendoza, Remediation of acid rock drainage with permeable reactive barriers packed with compost-zero valent iron-limestones (C-Z-L mixtures). The University of Arizona, Tucson, 2008.
33. Costa, Martins, Jesus, and Duarte, Treatment of acid mine drainage by sulphate-reducing bacteria using low cost matrices. *Water Air Soil Pollution* 2008, 189, 149 - 162.
34. Manous, Gantzer, and Stefan, Spatial variation of sediment sulfate reduction rates in saline lake. *Journal of Environmental Engineering* 2007, 12, 1106 - 1116.
35. Sierra - Alvarez, Karri, Freeman, and Field, Biological Treatment of Heavy Metals in Acid Mine Drainage using Sulfate Reducing Bioreactors. *Water Science and Technology* 2006, 54, 179 - 185.
36. Vladár, Rusznyák, Márialigeti, and Borsodi, Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria Inhabiting the Rhizosphere of *Phragmites australis* in Lake Velencei (Hungary) Revealed by a Combined Cultivation-based and Molecular approach. *Microbiology Ecology* 2007, 56, 64 - 75.

Capítulo IV

Conclusiones

Los drenajes ácidos de mina (DAM) constituyen uno de los problemas medioambientales más serios relacionados con las actividades mineras. Los DAM, caracterizados por altos contenidos de metales pesados disueltos, sulfatos y elevada acidez, requieren del desarrollo urgente de tecnologías de remediación ambiental. En este contexto, los sistemas pasivos de tratamiento basados en la reducción biogénica de sulfatos ofrecen una alternativa promisoriosa de remoción de los contaminantes. En el Ecuador no existe evidencia de la instalación de ningún sistema de tratamiento pasivo de los DAM. De igual manera, no existen estudios sobre el uso de bacterias sulfato-reductoras para la remediación de los drenajes ácidos de mina.

En este trabajo de investigación se evaluó un sistema de generación biogénica de sulfuro empleando bacterias sulfato reductoras (BSR), las cuales reducen el sulfato a sulfuro, promoviendo de esta manera la precipitación de los contaminantes en forma de sulfuros metálicos. Los bioensayos *batch* demostraron que los sedimentos de una laguna artificial ubicada en la Universidad San Francisco de Quito, fueron el mejor inóculo microbiano para la reducción de sulfato catalizada por las bacterias sulfato-reductoras. Así mismo, los sustratos evaluados en dichos experimentos, mostraron una eficiencia superior del acetato como donador de electrones para la reducción desasimilatoria de sulfatos, sobre otros como el lactato, el etanol y la peptona.

El bioreactor instalado en este estudio mostró una generación eficiente de sulfuro por parte de las bacterias sulfato-reductoras durante periodos relativamente cortos de operación. El

bioreactor fue empacado con los sedimentos de la laguna artificial, y la presencia de BSR en dichos sedimentos fue demostrada a través del conteo de las mismas con el método del número más probable (NMP). La tecnología desarrollada en este trabajo científico es una alternativa interesante y novedosa de tratamiento de los drenajes ácidos de mina, que debe ser explorada detenidamente para su aplicación en las zonas mineras al sur del Ecuador.