

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**Evaluación de consumo de sustrato y toxicidad
microbiana de cobre (Cu (II)) y zinc (Zn (II)) en
bacterias sulfato-reductoras presentes en sedimentos
anaerobios**

Proyecto de Investigación

Diana Joella Calderón Carvajal

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

Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención
del título de Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 9 de diciembre de 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Evaluación de consumo de sustrato y toxicidad microbiana
de cobre (Cu (II)) y zinc (Zn (II)) en bacterias sulfato-
reductoras presentes en sedimentos anaerobios

Diana Joella Calderón Carvajal

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Valeria Ochoa-Herrera, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 9 de diciembre de 2016

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Diana Joella Calderón Carvajal

Código: 00107537

Cédula de Identidad: 171985349-9

Lugar y fecha: Quito, 9 de diciembre de 2016

Resumen

Ecuador constituye un país con excelentes recursos minerales y actualmente impulsa importantes proyectos mineros con el objetivo de aportar significativamente a la economía del país. Estrechamente relacionado con esta actividad se encuentra la generación de drenajes ácidos de mina (DAM), caracterizados por su elevada acidez, alto contenido de metales pesados disueltos y altas concentraciones de iones sulfatos. El uso de bacterias sulfato-reductoras ha sido ampliamente estudiado y es considerada como una técnica de remediación altamente eficiente y accesible para el tratamiento de este tipo de descargas ácidas. En este proyecto de investigación se evaluó el consumo de sustrato y los efectos de cobre (Cu (II)) y zinc (Zn (II)) en el metabolismo de las BSR presentes en los sedimentos de una laguna artificial con el objetivo de determinar bajo qué parámetros se promueve su crecimiento y proliferación, además de conocer los rangos de concentración de metales que pueden tolerar estos microorganismos sin alterar considerablemente su metabolismo. En la primera etapa del estudio se monitoreó el funcionamiento del sistema de remediación compuesto por un biorreactor sulfato-reductor y una pre-columna de piedra caliza para la remoción de (Cu (II)) alimentado con 2500 mg DQO-acetato L⁻¹ y 2000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ durante dos fases de operación. El biorreactor generó alrededor de 75 mg L⁻¹ de sulfuro biogénico y presentó porcentajes de reducción de sulfato, reducción de cobre disponible en solución y reducción de materia orgánica del 37, 91 y 65%, respectivamente. En la segunda fase de esta investigación se evaluó la actividad máxima específica de consumo de sulfato y producción de sulfuro de los microorganismos presentes en los sedimentos anaerobios de la laguna artificial. El tratamiento con una relación DQO-acetato/sulfato de 0.75 fue el más eficiente, registrando una actividad máxima específica de consumo de sulfato y de producción de sulfuro de 10664.21 mg SO₄²⁻ kg⁻¹ SSV d⁻¹ y 1481.73 mg S²⁻ kg⁻¹ SSV d⁻¹, respectivamente. En la última etapa se evaluó el efecto de Cu (II) y Zn (II) en el metabolismo sulfato-reductor de estos microorganismos. La concentración de Cu (II) que produjo un 20% de inhibición (IC₂₀) fue 10.25 mg L⁻¹, mientras que para Zn (II) fue 9.33 mg L⁻¹, el IC₅₀ para Cu (II) fue de 39.73 mg L⁻¹ y en el caso del Zn (II) fue de 28.26 mg L⁻¹. No se determinaron valores para IC₈₀ bajo las condiciones evaluadas. Por otra parte, la presencia de 15 mg L⁻¹ de Cu (II) y 15 mg L⁻¹ de Zn (II), generó un efecto antagónico para el consorcio microbiano, ya que redujo la actividad máxima específica de reducción de sulfato a 64.5%. Las BSR constituyen microorganismos versátiles, capaces de producir sulfuro y consumir sulfato bajo diversas condiciones de operación, lo que demuestra que este tipo de tratamiento puede ser aplicado exitosamente en la remediación de los DAM.

Palabras clave: drenaje ácido de mina, bacterias sulfato reductoras, sulfato, sulfuro, cobre, zinc, consumo sustrato, toxicidad.

Abstract

Ecuador is a country with excellent mineral resources, and nowadays, it is promoting important mining projects with the aim of contributing to the economy significantly. Closely related to this activity is the generation of acid mine drainage (AMD), which are characterized by their high acidity, high content of dissolved heavy metals and high concentrations of sulfate ions. The use of sulfate-reducing bacteria has been widely studied and is considered as a highly efficient and accessible alternative for remediation of this type of acid discharge. In this research project, the substrate consumption and the effects of copper (Cu (II)) and zinc (Zn (II)) on the metabolism of sulfate-reducing bacteria present in the sediments of an artificial lagoon were evaluated with the aim of determine under which parameters microbial growth and proliferation were promoted; and also determine the metal concentration ranges where these microorganisms can tolerate without changing considerably their sulfate-reductor metabolism. The first stage consisted in monitoring the operation of a sulfate-reducing bioreactor remediation system with a limestone pre-column for the removal of copper fed with 2500 mg COD-acetate L⁻¹ and 2000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ throughout two operational phases. The bioreactor produced about 75 mg L⁻¹ of biogenic sulfide; it also presented percentages of sulfate reduction (37%), reduction of copper available in solution (91%), and organic matter reduction (65%). In the second phase of this research, the maximum specific activity of sulfate consumption, and the sulfide production of the microorganisms present in anaerobic sediments with 1.25, 1.0 and 0.75 COD-acetate / sulfate ratios were evaluated. The treatment with a COD-acetate / sulfate ratio of 0.75 was the most efficient because it had a maximum sulfate consumption and sulfide production activity of 10664.21 mg SO₄²⁻ kg⁻¹ VSS d⁻¹ and 1481.73 mg S²⁻ kg⁻¹ VSS d⁻¹ respectively. The last stage of this research involved the evaluation of the effect of copper (Cu (II)) and zinc (Zn (II)) on the metabolism of the sulfate-reducing bacteria. The Cu (II) concentration which produced 20% inhibition (IC₂₀) was 10.25 mg L⁻¹, while for Zn (II) was 9.33 mg L⁻¹, the IC₅₀ value for Cu (II) was 39.73 mg L⁻¹, while in the case of Zn (II), was 28.26 mg L⁻¹. No IC₈₀ values were determined under the conditions evaluated in this research. Moreover, the presence of 15 mg Cu L⁻¹ and 15 mg Zn L⁻¹ represented an antagonistic effect for the microbial consortium, since it reduced the maximum specific activity of sulfate reduction to 64.5 %. The sulfate-reducing bacteria are versatile microorganisms, capable of produce sulfide and consume sulfate under many operating conditions, which demonstrate that this type of treatment can be successfully applied in the remediation of AMD.

Keywords: acid mine drainage, sulfate-reducing bacteria, sulfate, sulfide, copper, zinc, substrate consumption, toxicity.

Tabla de contenido

1. Introducción.....	10
2. Justificación.....	14
3. Objetivos.....	15
2.1 Objetivo General	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
4. Área de Trabajo	15
5. Materiales	16
5.1 Consorcio microbiano	16
5.2 Equipos comunes.....	16
5.3 Medición de conductividad	16
5.4 Demanda química de oxígeno (DQO).....	16
5.5 Medición de pH.....	17
5.6 Medición de sulfato.....	17
5.6.1 Método gravimétrico	17
5.6.2 Método colorimétrico 1	18
5.6.3 Método colorimétrico 2	18
5.7 Medición de sulfuro	18
5.8 Espectroscopía de absorción atómica.....	19
5.9 Medio basal mineral	19
5.9.1 Reactivos complementarios al MBM	20
5.10 Ensayos de toxicidad microbiana	21
5.11 Materiales adicionales	21
6. Métodos	21
6.1 Consorcio microbiano	21
6.2 Medición de conductividad	21
6.3 Demanda química de oxígeno (DQO).....	22
6.4 Medición de pH.....	23
6.5 Medición de sulfato.....	23
6.5.1 Método gravimétrico	23
6.5.2 Método colorimétrico 1	24

6.5.3 Método colorimétrico 2	24
6.6 Medición de sulfuro	25
6.7 Espectroscopía de absorción atómica: Cu (II) y Zn (II).....	26
6.8 Medio basal mineral	27
6.9 Bioensayos de actividad máxima específica de consumo de sustrato y producción de sulfuro.....	28
6.10 Bioensayos de toxicidad microbiana.....	28
7. Resultados.....	29
Etapa I: Monitoreo del sistema de remediación compuesto por un biorreactor sulfato-reductor y una pre-columna de piedra caliza para la remoción de cobre (Cu (II))	29
Etapa II: Consumo de sustrato por bacterias sulfato-reductoras	31
Etapa III: Ensayos de toxicidad microbiana de Cu (II) y Zn (II)	31
8. Discusión	33
Etapa I: Monitoreo del sistema de remediación compuesto por un biorreactor sulfato-reductor y una pre-columna de piedra caliza para la remoción de Cu (II).....	33
Etapa II: Análisis de consumo de sustrato por bacterias sulfato-reductoras	35
Etapa III: Ensayos de toxicidad microbiana.....	36
9. Conclusiones.....	39
10. Recomendaciones	40
11. Bibliografía	41
12. Anexos	45
12.1 Tablas	45
12.2 Figuras.....	50

Índice de Tablas

Tabla 1. Valores promedio del funcionamiento del sistema de remediación compuesto por un biorreactor sulfato-reductor y una pre-columna de piedra caliza para la remoción de cobre (Cu (II)) durante un periodo de 135 días incubado a 30°C.	45
Tabla 2. Balance de azufre en el reactor biológico empacado con bacterias sulfato-reductoras. La alimentación de sulfato en el afluente fue de 2000 mgL ⁻¹	45
Tabla 3. Producción final acumulada de sulfuro, porcentaje de reducción de sulfato, actividades máximas específicas de producción de sulfuro y consumo de sulfato en los ensayos batch de consumo de sustrato con diferentes relaciones DQO-acetato/sulfato con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C.	46
Tabla 4. Producción final acumulada de sulfuro, porcentaje de reducción de sulfato, actividad máxima específica de producción de sulfuro y consumo de sulfato en los ensayos batch de toxicidad microbiana con diferentes concentraciones de iones de Cu (II) y Zn (II), con una relación DQO-acetato/ sulfato de 1.25 con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C.....	47
Tabla 5. Efecto inhibitorio de Cu (II) y Zn (II) sobre las bacterias sulfato-reductoras de sedimentos anaerobios.....	47
Tabla 6. Variación de la concentración de cobre y zinc en diferentes etapas de monitoreo de los ensayos batch de toxicidad microbiana con una relación DQO-acetato/sulfato de 1.25 con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C.....	48
Tabla 7. Producción final acumulada de sulfuro, porcentaje de reducción de sulfato, actividades máximas específicas de producción de sulfuro y consumo de sulfato en los ensayos batch de toxicidad microbiana de Cu (II) y Zn (II), con una relación DQO-acetato/sulfato de 1.25 con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C.....	49

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema del proceso de la reducción desasimilatoria de sulfato catalizada por bacterias sulfato reductoras.	50
Figura 2. Variación de la concentración de sulfato (mgL^{-1}) (eje primario) y sulfuro (mgL^{-1}) (eje secundario) con respecto al tiempo en los ensayos batch de consumo de sustrato con diferentes relaciones DQO-acetato/sulfato con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C	51
Figura 3. Variación de la concentración de sulfato (mgL^{-1}) (eje primario) y sulfuro (mgL^{-1}) (eje secundario) con respecto al tiempo en los ensayos batch de toxicidad microbiana con diferentes concentraciones de iones de Zn (II), con una relación DQO-acetato/sulfato de 1.25 y con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C	52
Figura 4. Porcentajes de inhibición de Cu (II) y Zn (II) con respecto a su concentración obtenidos de los ensayos de toxicidad microbiana con una relación DQO-acetato/sulfato de 1.25 y con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C	53
Figura 5. Variación de la concentración de sulfato (mgL^{-1}) (eje primario) y sulfuro (mgL^{-1}) (eje secundario) con respecto al tiempo en los ensayos batch de toxicidad microbiana con 15 mgL^{-1} de Cu (II) y Zn (II), con una relación DQO-acetato/sulfato de 1.25 y con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C	54

1. Introducción

El sector minero es considerado el eje del desarrollo económico. Los países que apostaron por esta actividad han visto como se ha dinamizado el empleo, la inversión extranjera, las exportaciones, los ingresos fiscales, entre otros [1]. Sin embargo, esta actividad económica puede ser la causa de daños del medio ambiente, ecosistema, contaminación del agua y aire, afectación a la salud y estructura de la población, como se manifiesta en los estudios realizados por el grupo Banco Mundial en abril de 2013 [1, 2].

Ecuador es un país que cuenta con excelentes recursos minerales, se encuentra ubicado dentro del cinturón metalogénico de la Cordillera de los Andes que comprende una gran reserva geológica de minerales metálicos y no metálicos [3]. Según el Banco Central del Ecuador, el aporte de estas dos industrias en el periodo 2007-2015 no superó el 0.3% del PIB [4]. No obstante, se observa que en el indicado periodo la producción de estos sectores se incrementó en más del 90%; lo que representa una interesante actividad para el desarrollo del país. Ante la falta de una legislación que fomente la industria minera a mediana y gran escala, el gobierno actual diseñó en agosto de 2016 el Plan Nacional de Desarrollo del Sector Minero [5], mismo que se articula con el Plan Nacional del Buen Vivir 2013-2017 [6], generando una línea estratégica del país a mediano y largo plazo. El Plan Minero en su objetivo estratégico 2 y el objetivo 7 del Plan Nacional del Buen Vivir contemplan el cuidado del medio ambiente y garantizan los derechos de la naturaleza y promueve la sostenibilidad ambiental, territorial y global.

El desarrollo actual de la minería en Ecuador incluye las fases de prospección, exploración, explotación, beneficio, fundición, refinación y comercialización de minerales metálicos [7]. Mirador es el proyecto que inaugura la producción de cobre a gran escala;

Loma Larga, San Carlos Panantza, Río Blanco y Fruta del Norte constituyen proyectos estratégicos destinados a la explotación de oro, plata y cobre [8]. No obstante, las zonas destinadas a la actividad minera en el país presentan características sumamente sensibles por su biodiversidad, fallas tectónicas, territorios indígenas, tierras agrícolas y campesinas densamente pobladas, zonas costeras, zonas con alta pluviosidad, lugares de importancia arqueológica y su cercanía a cuerpos de agua [5, 3].

Es importante recalcar que la actividad minera genera drenajes ácidos de mina que constituye la causa de mayor impacto de contaminación en aguas superficiales y subterráneas; este tipo de efluentes se produce debido al contacto de la lluvia o aire con las rocas que han sido expuestas a la superficie, originando la oxidación de minerales sulfurados. El agua, al circular por este medio, transporta a la superficie una corriente acidificada; los niveles de contaminación de este medio ácido causan daños irreversibles a la fauna y flora aledaña a la zona [2]. Formalmente, los “Drenajes Ácidos de Mina” (DAM) se caracterizan por su elevada acidez, alto contenido de metales pesados disueltos y altas concentraciones de iones sulfatos; siendo los cuerpos de agua los más afectados, lo que genera un desequilibrio del ciclo del azufre. Al intervenir el hombre en los procesos de extracción de minerales, se acelera la exposición de los sulfuros metálicos, contaminantes del medio [9, 10].

Frente a estos antecedentes, es claro que la actividad minera que se practica en el país no es sostenible y no cumple con lo expuesto en la ley, por lo que es importante brindar soluciones que minimicen considerablemente el impacto ambiental de esta actividad y que brinden seguridad jurídica a las empresas mineras que invierten en el país. En este caso, la Biotecnología no puede aportar al ámbito jurídico y legal de la actividad minera, no

obstante, en cuanto al tratamiento de los drenajes ácidos de mina tiene mucho que contribuir.

Ente los métodos convencionales de remediación de los DAM, se han mencionado varias medidas de tratamiento activos y pasivos. Las tecnologías de tratamiento activo son métodos físico-químicos industriales que incluyen procesos de aireación, neutralización y precipitación de metales, sedimentación y procesos de membrana e intercambio iónico [11]. Por otra parte, el tratamiento pasivo es aquel en el que la mejora de la calidad de agua se consigue utilizando procedimientos naturales en sistemas que no requieren una intervención humana regular ni consumo de energía, tan solo requieren un mantenimiento infrecuente para la retirada de precipitados y la adición ocasional de reactivos; en este tipo de tratamientos es común la utilización de distintos tipos de residuos orgánicos (restos de plantas, estiércol) e inorgánicos (escorias, suelos) para favorecer el crecimiento de vegetación o bacterias [12]. Un claro ejemplo de este tipo de tratamientos son los humedales naturales, capaces de eliminar metales procedentes de aguas ácidas utilizando procesos naturales que incluyen: adsorción e intercambio iónico, bioacumulación, oxidación bacteriana y abiótica, sedimentación, neutralización, etc. [11, 13].

Como una alternativa de remediación de este tipo de descarga ácida, se considera la utilización de las bacterias sulfato-reductoras debido a su capacidad de producir sulfuros que interactúan con diversos metales presentes en solución, formando precipitados insolubles y por su versatilidad al emplear varios tipos de materia orgánica como fuente de carbono y transformarlas en bicarbonato [12, 14]. De esta manera, se reduce la cantidad de sulfatos, se incrementa considerablemente el pH y se reduce la cantidad de metales disueltos, principales características de los DAM [14].

Esta tecnología ha sido monitoreada desde la década de los 90s y que en la actualidad se sigue desarrollando. Estos microorganismos son anaerobios estrictos y pueden encontrarse en numerosos ambientes terrestres y acuáticos en los que se ha agotado el oxígeno debido a la descomposición aeróbica de la materia orgánica [15, 16, 17]. Adicionalmente, son metabólicamente versátiles, lo que les permite desarrollarse en un amplio rango de condiciones ambientales [15].

En la Universidad San Francisco de Quito se han realizado varios proyectos de investigación enfocados en la remediación de los drenajes ácidos de mina en los que las BSR han sido protagonistas. Estudios como el de Andrade [12], Gallardo [18], Flor [19] y Méndez [14] se han concentrado en la búsqueda de consorcios microbianos, en la determinación de las condiciones óptimas que permitan el crecimiento y proliferación de estos microorganismos y, en la puesta en marcha de distintos biorreactores sulfato-reductores.

Este trabajo de titulación se desarrolla a partir de un sistema en serie desarrollado por Méndez en 2015 [14] que remedia drenaje ácido de mina sintético. Dicho sistema se compone de columnas de tratamiento físico químico con piedra caliza y de tratamiento biológico empacado con bacterias sulfato-reductoras, las cuales utilizan sulfato (SO_4^{-2}) como aceptor de electrones y acetato (CH_3CO_2^-) como fuente de materia orgánica y donador de electrones. Los resultados obtenidos por Méndez demuestran un funcionamiento estable y esperado del biorreactor; sin embargo, la remoción de materia orgánica no supera el 75%.

2. Justificación

Actualmente Ecuador impulsa importantes proyectos mineros industriales denominados estratégicos para promover la inversión privada y extranjera que conlleve a mejorar las condiciones de vida de la población. Los desafíos del gobierno son el cumplimiento del Plan Nacional de Desarrollo del Sector Minero de manera responsable que garantice que las técnicas de remediación de los drenajes ácidos de mina (DAM) cumplan los derechos del medio ambiente [5,6, 7].

Por esta razón, es importante continuar con la investigación relacionada con la remediación de efluentes mineros con elevadas concentraciones de metales pesados ya que en Ecuador la industria minera está en desarrollo y se espera que siga creciendo durante las siguientes tres décadas [20, 21].

El uso de las bacterias sulfato reductoras en la remediación de efluentes mineros constituye uno de los tratamientos más prometedores debido a su capacidad de producir sulfuros que interactúan con diversos metales presentes en solución, formando precipitados insolubles y por su versatilidad de emplear varios tipos de materia orgánica como fuente de carbono. De esta manera, se reduce la cantidad de sulfatos, se incrementa considerablemente el pH y se reduce la cantidad de metales disueltos, características principales de los DAM [12, 14, 19].

La importancia de este proyecto radica en que permitirá conocer, a escala laboratorio, el comportamiento de las bacterias sulfato-reductoras presentes en un inóculo microbiano anaerobio; se realizarán ensayos batch de consumo de sustrato variando la relación entre DOQ-acetato/sulfato y de toxicidad microbiana de Cu (II) y Zn (II) con el objetivo de determinar bajo qué parámetros se promueve el crecimiento y proliferación de dichos

microorganismos, además de conocer los rangos de concentración de metales que pueden tolerar los microorganismos sin alterar considerablemente su metabolismo.

3. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar el consumo de sustrato y los efectos de Cu (II) y Zn (II) en las actividades metabólicas de producción de sulfuro y consumo de sulfato de las bacterias sulfato-reductoras presentes en los sedimentos anaerobios de una laguna artificial.

2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el funcionamiento del sistema de remediación compuesto por un biorreactor sulfato-reductor y una pre-columna de piedra caliza para la remoción de cobre (Cu (II)).
- Evaluar la actividad máxima específica de consumo de sulfato, producción de sulfuro y consumo de sulfato de sedimentos anaerobios en presencia de diferentes relaciones de DQO-acetato/sulfato.
- Evaluar el efecto de iones de Cu (II) y Zn (II) en el metabolismo de las bacterias sulfato-reductoras presentes en sedimentos anaerobios.

4. Área de Trabajo

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Ingeniería Ambiental (LIA) y de Servicios Ambientales (LSA) de la Universidad San Francisco de Quito, en el campus Cumbayá.

Los inóculos microbianos anaerobios fueron tomados en la laguna artificial de la Universidad San Francisco de Quito en tres ocasiones: mayo, julio y septiembre de 2016.

5. Materiales

5.1 Consorcio microbiano

- Botellas plásticas (1.5 L)
- Inóculo microbiano (laguna artificial USFQ)

5.2 Equipos comunes

- Balanza de precisión Mettler-Toledo, modelo MS204S (International Inc., USA)
- Multiparámetro portátil Thermo Scientific Orion 5-Star (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA)
- Pipeta BioPette 100-1000 μ L y 1-5mL (Labnet International Inc., USA)
- Agitador magnético Fisher Scientific, modelo 11-100-49S (Hampton, New Hampshire, USA)
- Centrifugadora Spectrafuge 24D (Labnet International Inc., USA)
- Centrifugadora High Speed digital centrifuge, modelo SCEN-206 (MRC Laboratory, Hampstead, London, UK)

5.3 Medición de conductividad

- Electrodo de conductividad Thermo Specific Orion 4-Electrode Conductivity Cells (Beverly, MA 01915, USA)
- Estándares de conductividad (1413 μ S/cm y 12,9 mS/cm) (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA)

5.4 Demanda química de oxígeno (DQO)

- Espectrofotómetro Spectronic 20D+ (Thermo Fischer Scientific INC. Waltham, MA, USA)
- Vortex Denville 59A (Denville Scientific Inc., USA)

- Solución estándar de $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$ compuesta por:
 - Ftalato ácido de potasio (KHP) (Fisher Scientific, New Jersey, USA)
- Solución de digestión de alto rango compuesta por:
 - Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (Reactivos H.V.O, Quito, Ecuador)
 - Ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado 95-97% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Solución de ácido sulfúrico compuesta por:
 - Ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado 95-97% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
 - Nitrato de plata (AgNO_3) (Representaciones Vamarth, Quito, Ecuador)

5.5 Medición de pH

- Potenciómetro Microprocessor pH meter, modelo PH211 (Hanna Instruments, Michigan, USA)
- Buffers de calibración (pH 4, 7, 10) (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA)

5.6 Medición de sulfato

5.6.1 Método gravimétrico

- Horno 40 GC Lab Oven (Chicago, Illinois, USA)
- Filtros de microfibra de vidrio 934-AH (Whatman, Piscataway, NJ, USA)
- Bomba de vacío Thermo Scientific Vacuum Pressure Pump, modelo No 420-1901-00FK (Thermo Fischer Scientific INC. Waltham, MA, USA)
- Equipo de filtración: Filtro y Kitasato (Glassco Laboratory, Beckenham, UK)
- Cloruro dihidratado de bario ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Reactivos H.V.O, Ecuador y Panreac AppliChem, Barcelona, España)

- Pesa muestras de aluminio (Laboratorio de Ingeniería Ambiental USFQ)

5.6.2 Método colorimétrico 1

- Colorímetro digital LaMotte Smart 2, modelo LM1919 (Chestertown, Maryland, USA)
- Kit de medición de sulfatos LaMotte (Chestertown, Maryland, USA)
- Solución estándar de $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$ compuesta por:
 - o Sulfato de sodio (Na_2SO_4) (Reactivos H.V.O, Quito, Ecuador)

5.6.3 Método colorimétrico 2

- Colorímetro digital LaMotte Smart 3, modelo LM1910 (Chestertown, Maryland, USA)
- Solución buffer compuesta por:
 - o Cloruro de magnesio (MgCl_2) (Loba Chemie, Wodehouse, India)
 - o Acetato trihidratado de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Representaciones Vamarth, Quito, Ecuador y Fisher Scientific, New Jersey, USA)
 - o Nitrato de potasio (KNO_3) (Reactivos H.V.O, Quito, Ecuador)
 - o Ácido acético (CH_3COOH) (J.T Baker, New Jersey, USA)
 - o Cloruro dihidratado de bario ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Reactivos H.V.O, Ecuador y Panreac AppliChem, Barcelona, España)
- Solución estándar de $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$ compuesta por:
 - o Sulfato de sodio (Na_2SO_4) (Reactivos H.V.O, Quito, Ecuador)

5.7 Medición de sulfuro

- Espectrofotómetro Spectronic 20D+ (Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA)

- Cloruro de Zinc (ZnCl_2) (Loba Chemie, Wodehouse, India)
- Ácido acético (CH_3COOH) (J.T Baker, New Jersey, USA)
- DMP (oxalate de N,N-dimetil-p-fenildiamina) (Acros Organics, Geel, Bélgica)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado 95-97% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Sulfato de amonio y hierro ($\text{NaNH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$) (Aldrich Chemistry, Missouri, USA)
- Solución estándar de $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ S}^-$ compuesta por:
 - o Sulfuro nonahidratado de sodio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (Reactivos H.V.O, Quito, Ecuador y Fisher Scientific, New Jersey, USA)
- Parafilm (American National Can Company, Chicago, USA)

5.8 Espectroscopía de absorción atómica

- Espectrómetro de Absorción Atómica, modelo 210VGP, junto con lámparas de cátodo hueco de cobre (Cu) y zinc (Zn) (Buck Scientific, Norwalk, USA)
- Estándar de $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu}$ (AccuStandard, New Haven, USA)
- Estándar de $1001 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}$ (Inorganic Ventures, Christianburg, Virginia, USA)
- Ácido nítrico (HNO_3) 2% (Reactivos H.V.O, Quito, Ecuador)

5.9 Medio basal mineral

- Cloruro de amonio (NH_4Cl) (Reactivos H.V.O, Quito, Ecuador)
- Fosfato de potasio (KH_2PO_4) (Judex Laboratory Reagent, Middlesex, England)
- Sulfato de magnesio (MgSO_4) (Reactivos H.V.O, Quito, Ecuador)
- Cloruro de Calcio (CaCl_2) (Reactivos H.V.O, Quito, Ecuador)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) (Representaciones Vamarth, Quito, Ecuador)
- Extracto de levadura (Becton Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France)
- Elementos traza compuestos por:
 - o Ácido Bórico (H_3BO_3) (Reactivos H.V.O, Quito, Ecuador)

- Cloruro tetrahidratado de Hierro ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Aldrich Chemistry, Missouri, USA)
- Cloruro de Zinc (ZnCl_2) (Loba Chemie, Wodehouse, India)
- Cloruro de Manganese (MnCl_2) (Reactivos H.V.O, Quito, Ecuador)
- Molibdato tetrahidratado de amonio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Panreac AppliChem, Barcelona, España)
- Cloruro hexahidratado de aluminio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Loba Chemie, Wodehouse, India)
- Cloruro hexahidratado de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Aldrich Chemistry, Missouri, USA)
- Cloruro hexahidratado de níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Reactivos H.V.O, Quito, Ecuador)
- Sulfato pentahidratado de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Reactivos H.V.O, Quito, Ecuador)
- Selenito pentahidratado de sodio ($\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Reactivos H.V.O, Quito, Ecuador)
- EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) (Loba Chemie, Wodehouse, India)
- Resarzurina ($\text{C}_{12}\text{H}_7\text{NO}_4$) (Aldrich Chemistry, Missouri, USA)
- Ácido Clorhídrico (HCl) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)

5.9.1 Reactivos complementarios al MBM

- Sulfato de sodio (Na_2SO_4) (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- Acetato trihidratado de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Representaciones Vamarth, Quito, Ecuador y Fisher Scientific, New Jersey, USA)

- Ácido Clorhídrico (HCl) concentrado 97% (Reactivos H.V.O, Ecuador)
- Cloruro dihidratado de cobre ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Aldrich Chemistry, Missouri, USA)
- Cloruro de Zinc (ZnCl_2) (Loba Chemie, Wodehouse, India)

5.10 Ensayos de toxicidad microbiana

- Botellas de vidrio 160 ml (Laboratorio de Ingeniería Ambiental, USFQ)
- Tapones de caucho (Laboratorio de Ingeniería Ambiental, USFQ)
- Tapas de aluminio (Laboratorio de Ingeniería Ambiental, USFQ)
- Gas nitrógeno (N_2) (Linde, Guayaquil, Ecuador)

5.11 Materiales adicionales

- Refrigeradora Global, modelo RG-15 NF** (Laboratorio de Ingeniería Ambiental USFQ)
- Incubadora (Laboratorio de Ingeniería Ambiental USFQ)

6. Métodos

6.1 Consorcio microbiano

Los lodos anaerobios fueron colectados en la laguna artificial de la Universidad San Francisco de Quito, los mismos fueron almacenados en botellas de plástico y refrigerados a 4°C hasta el momento de su uso.

6.2 Medición de conductividad

La medición de conductividad se realizó utilizando como referencia el método SM 2510 B. Un volumen de muestra de 15 mL fue analizado mediante el uso del multiparámetro portátil Thermo Scientific Orion 5-Star que fue calibrado con los estándares de 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y 12.9 mS/cm.

6.3 Demanda química de oxígeno (DQO)

Este parámetro se determinó tomando como referencia el método colorimétrico SM 5220 B. Para la curva de calibración se preparó una solución estándar de 1000 mg L^{-1} de KHP, a partir de la cual se realizaron diluciones en cascada en concentraciones de 0, 25, 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 mg L^{-1} .

Durante el proceso de digestión se colocó 2.5 mL estándar, 1.5 mL de solución de digestión de alto rango compuesta de (en 250 mL): 2.554 g de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y 41.75 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4); y 3.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) con nitrato de plata en una relación de 6g AgNO_3 por kg H_2SO_4 en tubos para medición de DQO; todos los componentes fueron mezclados vigorosamente empleando el Vortex Denville 59A. Los tubos fueron colocados en el horno 40 GC Lab Oven a una temperatura de 150°C por dos horas. A continuación, las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de cada estándar empleando el espectrofotómetro Spectronic 20D+ a una longitud de onda de 600 nm. Los estándares fueron almacenados en refrigeración y analizados cada vez que se realizó una medición.

Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron en función de la concentración de los estándares de KHP y a partir de los datos generados se estableció una recta con un coeficiente R^2 superior a 0.99.

En el caso de las muestras, todas fueron diluidas por un factor de 1:10 y fueron digeridas de la misma forma que los estándares. La DQO en mg L^{-1} de cada muestra fue calculada en base a la ecuación de la recta y a los valores de absorbancia obtenidos. Finalmente, dichas concentraciones fueron multiplicadas por el factor de dilución. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

6.4 Medición de pH

La medición de este parámetro se realizó usando como referencia el método SM4500- H^+B . Se determinó el potencial de hidrógeno de las muestras (15 mL aproximadamente) empleando el potenciómetro Microprocessor pH meter, modelo PH211 que fue previamente calibrado usando soluciones buffer con valores de pH de 4.01, 7.01 y 10.03.

6.5 Medición de sulfato

6.5.1 Método gravimétrico

Este parámetro se analizó tomando como referencia el método SM 4500 D. Todas las muestras fueron centrifugadas en el equipo High speed digital centrifuge, modelo SCEN-206 a una velocidad de 60000 rpm por 5 minutos previo análisis.

5 mL de una solución 0.1 M de cloruro de bario ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) fueron añadidos a cada muestra y a continuación se dejó reposar por aproximadamente 15 minutos con el objetivo de que el sulfato presente en las muestras precipite como sulfato de bario ($BaSO_4$). Posteriormente, se realizó una filtración al vacío de cada muestra utilizando el equipo de filtración (Kitasato y filtro), la bomba de vacío Thermo Scientific Vacuum Pressure Pump, modelo No 420-1901-00FK y filtros de microfibra de vidrio 934-AH con un diámetro de 45.5 mm y tamaño de poro de 1.2 μm . Las muestras filtradas fueron colocadas en pesa muestras y secadas a 105°C en el horno 40 GC-Series Lab Oven durante 8 horas.

La cantidad de sulfato de bario formada se determinó por diferencia de peso entre el filtro y el peso del filtro con la muestra seca. Finalmente, utilizando conversiones se pudo determinar la cantidad de sulfato presente. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

6.5.2 Método colorimétrico 1

La concentración de sulfato también fue determinada por el colorímetro digital LaMotte Smart 2 modelo LM1919. Todas las muestras fueron centrifugadas en el equipo Spectrafuge 24D a una velocidad de 10000 rpm por 10 minutos previo análisis. Se realizó una dilución de cada muestra en un factor 1:25.

Por otra parte, se realizaron estándares de sulfato (SO_4^{2-}) de 25, 50, 75 y 100 mg L^{-1} utilizando una solución madre de 100 mg L^{-1} como sulfato de sodio (Na_2SO_4). Los estándares siempre fueron analizados junto con las muestras.

10 ml de muestra fueron colocados en la celda y se añadió 0.1 g del Kit de medición de sulfatos LaMotte; la muestra fue agitada por un minuto y se dejó reposar durante cuatro minutos; posteriormente, se determinó la concentración de sulfato en mg L^{-1} . El resultado final fue multiplicado por el factor de dilución empleado.

6.5.3 Método colorimétrico 2

Este método se basó en el descrito en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater N 4500 E. Todas las muestras fueron centrifugadas en el equipo Spectrafuge 24D a una velocidad de 10000 rpm por 10 minutos previo análisis.

Se realizaron estándares de sulfato (SO_4^{2-}) de 5, 10, 20, 25, 30 y 35 mg L^{-1} utilizando una solución madre de 100 mg L^{-1} de sulfato como sulfato de sodio (Na_2SO_4) seco.

Se colocaron 25 mL de solución estándar diluida, 5 mL de solución buffer compuesta de (en mg L^{-1}): (30 000) cloruro de magnesio (MgCl_2), (5000) acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), (1000) nitrato de potasio (KNO_3) y 1 mL L^{-1} de ácido acético (CH_3COOH); y 0.1 g de cloruro de bario ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en tubos Falcon de 50 mL; todos los componentes fueron mezclados vigorosamente durante un minuto. A continuación, se colocó 10 mL de la muestra agitada en una celda de vidrio y se dejó reposar durante 5

minutos. Transcurrido el tiempo de espera se midió la absorbancia de cada estándar empleando el colorímetro digital LaMotte Smart 3, modelo LM1910 a una longitud de onda de 420 nm.

Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron en función de la concentración los estándares de SO_4^{2-} y se determinó la ecuación de la recta con un coeficiente R^2 superior a 0.99.

Las muestras fueron analizadas de la misma forma que los estándares. La cantidad de sulfato presente en cada muestra fue calculada en base a la ecuación de la recta y a los valores de absorbancia obtenidos; dichas concentraciones fueron multiplicadas por el factor de dilución respectivo.

6.6 Medición de sulfuro

El sulfuro total en solución se determinó usando como referencia el método SM 4500S²⁻D. El método consiste en colocar en un balón volumétrico de 25 mL, 5 mL de solución de cloruro de zinc (ZnCl_2) al 2% compuesta por (en 500 mL): 7.4318 g de cloruro de zinc (ZnCl_2) y 1 ml de ácido acético (CH_3COOH); 2.5 ml de solución de DMP compuesta por (en 250 mL): 0.5 g de DMP y 50 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado; y 0.125 mL de solución filtrada de sulfato de amonio y hierro compuesta por (en 100 mL): 10 g de sulfato de amonio y hierro ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$) y 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. A continuación, se añadieron 100 μL de la muestra de interés, se aforó con agua destilada, se cubrió rápidamente la boca del balón con parafilm para evitar que el sulfuro presente en la muestra se volatilice y se agitaron suavemente los balones para homogenizar los componentes.

Los estándares fueron analizados de la misma forma que las muestras y se construyó una curva de calibración a partir de una solución estándar de 10 mg L^{-1} de S^{2-} como sulfuro de

sodio ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$). Las soluciones estándares fueron: 0.125, 0.250, 0.625, 1, 1.25, 1.875 y 2.50 que corresponden a las siguientes concentraciones de sulfuro (en mg L^{-1}): 0.05, 0.1, 0.25, 0.4, 0.5, 0.75 y 1.

A continuación, se determinó los valores de absorbancia de cada estándar y posteriormente, la de cada muestra empleando el espectrofotómetro Spectronic 20D+ a una longitud de onda de 670 nm. Los estándares fueron almacenados en refrigeración.

Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron en función de la concentración de sulfuro preparadas y se determinó la ecuación de la recta con un coeficiente R^2 superior a 0.99.

La cantidad de sulfuro presente en solución en mg L^{-1} de cada muestra fue calculada en base a la ecuación de la recta y a los valores de absorbancia obtenidos. Finalmente, dichas concentraciones fueron multiplicadas por el factor de dilución respectivo. Los análisis se realizaron por triplicado en la primera fase de esta investigación y por duplicado en las tres restantes.

6.7 Espectroscopía de absorción atómica: Cu (II) y Zn (II).

Este parámetro se determinó en base a lo descrito en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater N 3111 B. La cantidad de Cu (II) y Zn (II) presente en solución fue analizada al inicio, a la mitad y al final del experimento. Se utilizó como matriz una solución de ácido nítrico (HNO_3) al 2%.

Para el análisis de Cu (II) se preparó una curva de calibración a partir de una solución madre de 100 mg L^{-1} , se prepararon estándares de 0.3, 0.5, 1.5, 3.5 y 5 mg L^{-1} y como control interno, una solución de 2.5 mg L^{-1} . Las muestras fueron diluidas por un factor de 1:10.

En el caso de Zn (II), se preparó una curva de calibración con estándares de 0.01, 0.1, 0.5, 1.5 y 2 mg L⁻¹ a partir de una solución madre de 100 mg L⁻¹, adicionalmente, se preparó una solución de 1 mg L⁻¹ como control interno. Las muestras fueron diluidas por un factor de 1:25.

A continuación, se determinó la absorbancia de los estándares y de cada muestra empleando el espectrómetro de absorción atómica, modelo 210 VG a una longitud de onda de 324.8 para Cu y 213 para Zn. Los estándares fueron preparados el día de la medición. Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron en función de la concentración del metal analizado y se determinó la ecuación de la recta con un coeficiente R² superior a 0.99. Se realizaron 3 lecturas de absorbancia por muestra y cada 30 lecturas se encendió el equipo.

La cantidad de metales presente en solución en mg L⁻¹ de cada muestra fue calculada en base a la ecuación de la recta y a los valores de absorbancia obtenidos. Finalmente, dichas concentraciones fueron multiplicadas por el factor de dilución respectivo.

6.8 Medio basal mineral

La composición del medio basal mineral fue la siguiente (en mg L⁻¹): (280) cloruro de amonio (NH₄Cl); (195) fosfato de potasio (KH₂PO₄); (49) sulfato de magnesio (MgSO₄); (10) cloruro de calcio (CaCl₂); (3000) bicarbonato de sodio (NaHCO₃); (10) extracto de levadura y 1mL L⁻¹ de solución de elementos traza ajustado a un pH 7.1-7.3.

La solución de elementos traza se compone (en mg L⁻¹) de: (50) ácido bórico (H₃BO₃), (2000) cloruro tetrahidratado de hierro (FeCl₂.4H₂O), (50) cloruro de zinc (ZnCl₂), (32) cloruro de magnesio (MnCl₂), (50) molibdato tetrahidratado de amonio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O), (50) cloruro hexahidratado de aluminio (AlCl₃.6H₂O), (2000) cloruro hexahidratado de cobalto (CoCl₂.6H₂O), (50) cloruro hexahidratado de níquel (NiCl₂.6H₂O), (44) sulfato pentahidratado de cobre (CuSO₄.5H₂O), (100) selenito

pentahidratado de sodio ($\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), (1000) EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$), (200) rezarzurina ($\text{C}_{12}\text{H}_7\text{NO}_4$) y 1 mL L^{-1} de HCl 36%.

6.9 Bioensayos de actividad máxima específica de consumo de sustrato y producción de sulfuro

Para el análisis de consumo de sustrato y producción de sulfuro se montaron cuatro tipos diferentes de ensayos: un control abiótico y tres tratamientos con relaciones de DQO-acetato/sulfato de 1.25, 1.0 y 0.75, correspondientes a los tratamientos T-1, T-2 y T-3 respectivamente.

El método consistió en colocar MBM, sulfato, diferentes concentraciones de acetato y el inóculo microbiano en una relación (10% v/v) en los tratamientos; mientras que el control abiótico, a diferencia de los tratamientos, no contó con el consorcio microbiano. Se utilizaron botellas de vidrio de 150 mL selladas con tapones de caucho y tapas de aluminio; adicionalmente se realizó una purga con gas N_2 (Linde, Guayaquil, Ecuador) con el fin de asegurar condiciones anaeróbicas. Los bioensayos fueron montados por triplicado e incubados a $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

6.10 Bioensayos de toxicidad microbiana

Para el análisis de los efectos de iones metálicos como Cu (II) y Zn (II) en el metabolismo de las BSR se realizaron dos tipos de análisis: por separado y juntos.

En el primer análisis se montaron por duplicado seis tipos diferentes de ensayos: un control biótico y cinco tratamientos con concentraciones ascendentes de los iones metálicos: 5, 10, 15, 25 y 50 mg L^{-1} correspondiente a los tratamientos T1M, T2M, T3M, T4M y T5M respectivamente. Para el segundo análisis se montaron por triplicado cuatro tipos de ensayos: un control biótico y tres tratamientos con 15 mg L^{-1} de iones metálicos: el

primero con Cu (II), el segundo con Zn (II) y el tercero con Cu (II) y Zn (II) juntos correspondientes a los tratamientos T1C, T2C y T3C respectivamente.

El método consistió en colocar MBM, sulfato, acetato, diferentes concentraciones de iones metálicos y el inóculo microbiano en una relación (10% v/v) en los tratamientos; mientras que el control biótico, a diferencia de los tratamientos, no contó con la presencia de metales. Se utilizaron botellas de vidrio de 150 mL selladas con tapones de caucho y tapas de aluminio; adicionalmente se realizó una purga con gas N₂ (Linde, Guayaquil, Ecuador) con el fin de asegurar condiciones anaeróbicas. Los bioensayos fueron incubados a 30°C ± 2°C.

7. Resultados

En este proyecto de investigación se evaluó el consumo de sustrato y los efectos de cobre (Cu (II)) y zinc (Zn (II)) en la actividad máxima específica de producción de sulfuro de las BSR presentes en los sedimentos anaerobios de una laguna artificial. Este trabajo de investigación se desarrolló en tres etapas.

Etapa I: Monitoreo del sistema de remediación compuesto por un biorreactor sulfato-reductor y una pre-columna de piedra caliza para la remoción de cobre (Cu (II))

En esta etapa se analizó el funcionamiento del sistema de remediación compuesto por una columna de piedra caliza acoplada a un reactor biológico empacado con BSR para la remoción de Cu (II) alimentado con 2500 mg DQO-acetato L⁻¹ y 2000 mg SO₄²⁻ L⁻¹.

El biorreactor se ha mantenido en operación constante a lo largo de seis fases de monitoreo; durante los primeros 70 días de funcionamiento del sistema, la columna empacada con BSR operó como sistema único y, a partir del día 71, se acopló la pre-columna de piedra caliza. Con excepción de la primera fase, en cada periodo se colocaron

concentraciones crecientes de Cu (II): 10-40 mg L⁻¹ en el agua residual sintética que alimentó al sistema [14].

Este estudio inició el monitoreo del sistema a partir del día 223 de operación y finalizó en el día 358, tiempo correspondiente a una primera fase en la que se colocaron 40 mg Cu L⁻¹ en el afluente y una segunda fase con 15 mg Cu L⁻¹. La reducción de sulfato, producción de sulfuro, remoción de Cu (II), remoción de DQO e incremento de pH y conductividad fueron monitoreados continuamente para determinar la eficiencia del sistema.

Durante la primera fase de monitoreo se evidenció que en el día 242 de funcionamiento de sistema se registraron los valores máximos de producción de sulfuro y reducción de sulfato: 109 mg S²⁻ L⁻¹ y 35%, respectivamente. En la segunda fase, dichos valores llegaron el día 293 de operación y fueron de 185 mg S²⁻ L⁻¹ y 31%, respectivamente. En la Tabla 1 se observan los valores promedio obtenidos del monitoreo de este sistema de remediación. Adicionalmente, en la Tabla 2 se observa el balance de azufre en el biorreactor empacado con BSR donde se midió la concentración de sulfato en el afluente, la concentración de sulfato en el efluente y la concentración de sulfuro disuelto en el efluente, resultando 751.90, 479.37 y 76.01 mgS²⁻ L⁻¹, respectivamente.

La producción de sulfuro se estabilizó en el día 358 de operación en 43 mg S²⁻ L⁻¹, correspondiente a una reducción de sulfato del 46%. En cuanto al consumo de sustrato, durante la finalización de la primera fase, se evidenció una reducción del 60%, mientras que en la segunda fase, la remoción de DQO en el efluente fue del 70%. Los valores de pH en el efluente se mantuvieron constantes durante las dos etapas, al igual que los valores de conductividad obtenidos.

Con respecto a la remoción de Cu (II) soluble, el sistema demostró ser altamente eficiente. Los porcentajes de remoción estuvieron en el rango entre 89 y 93%. Se debe señalar que cerca del 87% de la remoción total de Cu (II) ocurre en la pre-columna de piedra caliza, debido a la formación de compuestos organometálicos y 4% en el reactor biológico.

Etapa II: Consumo de sustrato por bacterias sulfato-reductoras

En esta etapa del estudio se evaluó la actividad máxima específica de consumo de sulfato y producción de sulfuro de los microorganismos presentes en sedimentos anaerobios con diferentes relaciones de DQO-acetato/sulfato: 1.25, 1.0 y 0.75, que corresponden a los bioensayos T1, T2 y T3, respectivamente. En esta fase se monitoreó la producción de sulfuro y la reducción de sulfato por BSR en condiciones batch.

La Figura 2 muestra la reducción de sulfato y la producción de sulfuro de los tres tratamientos evaluados, en los cuales se observó que la cinética microbiana se estabiliza a partir del día 30. No se registró consumo de sulfato ni producción de sulfuro en los controles abióticos.

La actividad máxima específica de consumo de sulfato y producción de sulfuro fueron determinadas a partir de las pendientes de las curvas mostradas en la Figura 2 y se expresaron en $\text{mg SO}_4^{2-} \text{ kg}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$ y $\text{mg S}^{2-} \text{ kg}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$, respectivamente; adicional a esto, se determinó la producción acumulada de sulfuro y el porcentaje de reducción de sulfato. Todos estos valores se muestran en la Tabla 3.

Etapa III: Ensayos de toxicidad microbiana de Cu (II) y Zn (II)

En esta etapa del estudio se evaluó, individualmente y en conjunto, el efecto de los iones de Cu (II) y Zn (II) en las actividades máximas específicas de producción de sulfuro y reducción de sulfato de las bacterias sulfato-reductoras presentes en sedimentos anaerobios.

La reducción de sulfato y la producción de sulfuro en ausencia de metales (control biótico) y en presencia de diferentes concentraciones de iones metálicos: 5, 10, 15, 25 y 50 mg L⁻¹, correspondientes a los bioensayos T1M, T2M, T3M, T4M y T5M fueron monitoreadas periódicamente.

La Figura 3 evidencia la producción de sulfuro y el consumo de sulfato de las BSR en presencia de diferentes concentraciones de Zn (II) durante un periodo de 24 días de monitoreo. En los dos casos, el control biótico constituyó el ensayo en el que se determinó una mayor producción final acumulada de sulfuro (mg L⁻¹), al igual que un mayor porcentaje de remoción de sulfato (%): 185.34 y 84.84 en el caso de Cu (II), mientras que para Zn (II) los valores fueron de 217.59 y 84.00, respectivamente (Tabla 4).

De igual forma, en la Tabla 4 se muestra la actividad máxima específica de consumo de sulfato y producción de sulfuro, expresadas en mgSO₄²⁻ kg⁻¹ VSS d⁻¹ y mg S²⁻ kg⁻¹ VSS d⁻¹, valores determinados para cada tratamiento a partir de las pendientes de las curvas de producción de sulfuro y consumo de sulfato que, en el caso del Zn (II), se mostró en la Figura 3; todos los valores fueron normalizados con respecto al control biótico. Adicionalmente, se determinó el porcentaje de actividad máxima específica de reducción de sulfato de cada uno de los tratamientos, asumiendo que los resultados del control biótico correspondían a una actividad del 100%.

A partir de estos resultados se determinaron los valores IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀, correspondientes a las concentraciones de los metales que producen inhibiciones del 20, 50 y 80% en el metabolismo microbiano sulfato-reductor (Tabla 5); dichos valores se obtuvieron al restar la actividad máxima específica de reducción de sulfato de cada tratamiento de la actividad máxima específica de reducción de sulfato del control biótico.

Por otra parte, en la Tabla 7 se observa la reducción en la concentración de metales solubles en diferentes etapas de monitoreo de los ensayos batch de toxicidad.

Adicionalmente, en esta fase del estudio se analizó si éstos metales presentaban un efecto antagónico o sinérgico, por lo que se monitoreó el consumo de sulfato y la producción de sulfuro en bioensayos sin presencia de metales (control biótico) y en presencia de 15 mg L^{-1} de Cu (II), 15 mg L^{-1} de Zn (II) y en la combinación de ambos, correspondiendo a los tratamientos T1C, T2C y T3C, respectivamente.

En la Figura 5 se evidencia el consumo de sulfato y producción de sulfuro durante 28 días de monitoreo. La Tabla 6 indica que la producción final acumulada de sulfuro del control biótico fue de 195.59 mg L^{-1} , seguido por los tratamientos T1C, T2C y T3C donde se registraron valores de 113.60 , 102.29 y $60.25 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$, respectivamente. En cuanto a porcentajes de reducción de sulfato, el control biótico removió 98.09% del sulfato disponible, mientras que en el tratamiento 3, correspondiente a la combinación de Cu (II) y Zn (II) se evidenció una reducción de sulfato del 36.53% . Con respecto a la actividad máxima específica de consumo de sulfato y producción de sulfuro, se obtuvieron valores de 50.08 , 45.58 y 33.26% correspondientes a los tratamientos T1C, T2C y T3C respectivamente.

8. Discusión

Etapa I: Monitoreo del sistema de remediación compuesto por un biorreactor sulfato-reductor y una pre-columna de piedra caliza para la remoción de Cu (II)

En esta etapa se monitoreó periódicamente el funcionamiento de un biorreactor sulfato-reductor alimentado con 40 mg L^{-1} de Cu (II) en la primera fase y 15 mg L^{-1} de Cu (II), en la segunda (Tabla 1). Como se mencionó anteriormente, esta etapa del estudio inició

cuando el reactor se encontraba en la fase IV (223 días de operación), en la que ocurría la proliferación de BSR [14].

Durante el monitoreo del sistema, con el ingreso de 40 mg Cu L^{-1} en su afluente se obtuvo una producción de sulfuro de 84.64 mg L^{-1} , una remoción de la materia orgánica del 60.26% y un porcentaje de reducción de sulfato del 36%, resultados similares a los obtenidos por Méndez [14] durante su periodo de monitoreo del sistema de remediación bajo las mismas condiciones de operación.

El hecho que la materia orgánica no se haya reducido en un porcentaje mayor al 70% indica que la sulfato-reducción no ha alcanzado su máximo rendimiento; probablemente, los microorganismos empacados en el biorreactor no están utilizando todo el sustrato disponible. Estos resultados son comparables con otros estudios en la literatura referentes al funcionamiento de biorreactores empacados con BSR. El estudio realizado por Sierra-Álvarez en 2007 en el que se evaluó la factibilidad de la configuración de un sistema que combinó un reactor sulfato-reductor y un reactor de cristalización de lecho fluido que operó en una relación DQO/sulfato de 0.60 para la remoción de cobre y contaminantes orgánicos, demostró que al usar etanol como donador de electrones se evidenció una remoción de materia orgánica completa, mientras que, al utilizar agua residual sintética, el acetato fue el único componente que fue detectado en el efluente del sistema, lo que se tradujo en una remoción promedio de materia orgánica del 67% [22]. De igual forma, en el estudio de Bharati en 2012, en el que se evaluó el potencial de diferentes compuestos químicos como sustrato para BSR en una relación 1.5 DQO/sulfato, se evidenció que, en el caso del acetato, existió un 55% en la reducción de la materia orgánica [24].

Por otra parte, los valores de 7.58 para el pH, así como el 89% para la remoción de Cu (II) soluble en el efluente se deben a la presencia de la pre-columna de piedra caliza en este

sistema de remediación. En el caso del pH, el drenaje sintético ingresó al reactor con valores cercanos a 2.7, la piedra caliza neutralizó su acidez y lo incrementó a valores de 6.8-7.0; el bicarbonato, producto de la degradación del acetato, generó un incremento adicional del pH hasta alcanzar valores de 7.5, lo que se respaldó en el aumento del valor de la conductividad analizada al inicio y al final del sistema. En cuanto a la remoción de Cu (II), la piedra caliza retuvo alrededor del 87% del metal que ingresó al sistema al transformarse en compuestos organometálicos [18, 19], mientras que el sulfuro biogénico producido por las BSR precipitó el 2% adicional.

Cuando el biorreactor se estabilizó en una producción de sulfuro de 89 mg L^{-1} , se redujo la concentración de Cu (II) a 15 mg L^{-1} , dando inicio a la segunda fase. Bajo estas condiciones de operación se obtuvo una remoción de DQO del 70.16% y una precipitación de metales del 92.96%; no obstante, la cantidad de sulfuro producido fue de 67.38 mg L^{-1} , inferior a lo obtenido en la primera fase; lo que pudo deberse a ciertas alteraciones a las condiciones de operación que sufrió el reactor durante esta fase de monitoreo. Los sistemas biológicos son extremadamente sensibles y cualquier alteración puede afectar significativamente su desempeño [18].

Etapa II: Análisis de consumo de sustrato por bacterias sulfato-reductoras

En la Figura 2 se muestra que la producción de sulfuro y la reducción de sulfato ocurren únicamente en los tratamientos y no en los controles abióticos, lo que indica que la reducción de sulfato estuvo catalizada por las BSR presentes en el inóculo microbiano utilizado.

La relación DQO/acetato de 1.25 obtuvo una tasa máxima específica de reducción de sulfato de $9733.75 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ kg}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$; similar al obtenido por Méndez [14]: $7821.6 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ kg}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$; no obstante, el tratamiento T3, correspondiente a una relación DQO-

acetato/sulfato de 0.75 registró la actividad máxima específica de consumo de sulfato más alta: $10664.21 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ kg}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$ (Tabla 3). En cuanto a las tasas máximas específicas de producción de sulfuro, a una relación de 1.25, se reportó $1141.61 \text{ mg S}^{2-} \text{ kg}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$, mientras que para una relación de 0.75, se reportó $1481.73 \text{ mg S}^{2-} \text{ kg}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$. Al comparar las tasas de consumo de sustrato, el valor reportado para el tratamiento T3 fue de $173.64 \text{ mg DQO-acetato g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$, a diferencia de 158.49 y 160.95 $\text{mg DQO-acetato g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$ reportados para los tratamientos T1 y T2, respectivamente.

Al comparar todos los tratamientos analizados, se determinó que la relación DQO-acetato/sulfato de 0.75 fue la mejor de todas, comparable a los estudios de Bharati [24] y Sierra-Álvarez [22] que indican que la relación óptima de DQO-acetato/sulfato corresponde a 0.67. No obstante, los resultados obtenidos de esta investigación demuestran que la cantidad de sustrato no representa una variable determinante en el proceso de sulfato-reducción, ya que todos los tratamientos siguen una misma tendencia (Figura 2) y que sus diferencias no son significativas. Probablemente, la poca eficiencia de las BSR de remover todo el acetato disponible se deba a que sean incapaces de completar su oxidación, incluso con concentraciones en exceso de sulfato [24, 29]

Etapa III: Ensayos de toxicidad microbiana

En los bioensayos de toxicidad se evaluó el efecto de diversas concentraciones de Cu (II) y Zn (II) en las actividades máximas específicas de producción de sulfuro y reducción de sulfato de las BSR.

Según la caracterización fisico-química realizada por Andrade en 2010 [12] y por Méndez en 2015 [14] de algunos ríos aledaños a las zonas mineras del sur del país, se evidenció que el Cu (II) se encuentra en concentraciones cercanas a $34.4 \pm 1.4 \text{ mg L}^{-1}$, muy superior a 1 mg L^{-1} , que constituye la concentración límite establecida por el TULSMA

[23], mientras que el Zn (II) se encuentra en concentraciones de $4.2 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$, ligeramente inferior a 5 mg L^{-1} , límite establecidos por el mismo ente regulador, debido a la importancia de las actividades mineras en el Ecuador, estos metales en particular forman parte de este estudio.

La Figura 3 indica el efecto de Zn (II) en la producción de sulfuro y en la reducción de sulfato de las bacterias sulfato reductoras durante 24 días de monitoreo. En líneas generales es evidente que en el control biótico, carente de metales, la producción final acumulada de sulfuro fue de 185.34 mg L^{-1} para los ensayos de Cu (II) y de 217.59 mg L^{-1} para los de Zn (II). En cuanto al porcentaje de consumo de sulfato, el control biótico presenta porcentajes de remoción de 84% para los dos casos. La presencia de metales en los bioensayos genera un impacto considerable en el inóculo microbiano sulfato-reductor (Tabla 4); con concentraciones de 25 mg L^{-1} de metales, la producción acumulada de sulfuro se reduce en un 51% en el caso del Cu (II) y en un 59.5% en el caso del Zn (II), de igual manera, el consumo de sulfato se reduce en un 51.9 y 55.89% para Cu (II) y Zn (II), respectivamente. Es importante destacar que, aunque los organismos necesitan de una concentración de metales traza para alcanzar un crecimiento óptimo; en este caso, se evidenció un efecto inhibitorio en el metabolismo sulfato-reductor microbiano; la mayoría de metales producen una reducción significativa en la eficiencia del tratamiento y en la actividad de los microorganismos al estar presente, incluso, en bajas concentraciones [27].

En la Tabla 5 se presentan las concentraciones de cada metal que generan un 20, 50 y 80% de inhibición en la actividad máxima específica de consumo de sulfato. El valor IC_{20} para Cu (II) fue 10.3 mg L^{-1} , mientras que para Zn (II) fue de 9.3 mg L^{-1} . Se determinó además que el valor de IC_{50} para Cu (II) fue de 39.7 mg L^{-1} , mientras que en el caso de Zn (II) fue de 28.3 mg L^{-1} . Con respecto a los bioensayos de Cu (II), el valor IC_{20} obtenido en

este estudio es similar a los 13 mg L^{-1} reportado por Gallardo en 2011 [18]; en ese estudio se determinó además que una concentración de 50 mg Cu L^{-1} no fue suficiente para inhibir en un 50% el metabolismo sulfato-reductor de estos microorganismos, lo que discrepa con los 39.73 mg L^{-1} reportados en esta investigación. No obstante, el estudio realizado por Karri y colaboradores en 2006 [25] en el que se evaluó el efecto que produce el Cu (II) en BSR determinó valores para IC_{20} e IC_{50} de 11 y $32.3 \text{ mg Cu L}^{-1}$, respectivamente; lo que es comparable a lo obtenido en esta investigación.

Al igual que el estudio realizado por Gallardo [18] no se pudo determinar las concentraciones de Cu (II) y Zn (II) que inhiban el 80% de la actividad metabólica sulfato-reductora, lo que permite considerar a estos microorganismos como tolerantes a la presencia de metales, debido a su capacidad de cumplir exitosamente la reducción desasimilatoria de sulfato bajo las condiciones evaluadas en este estudio (Figura 1) [15, 28].

En cuanto a los bioensayos en los que se evaluó el efecto antagónico o sinérgico del Cu (II) y del Zn (II) se pudo observar que la actividad máxima específica de reducción de sulfato fue del 50.08% en el tratamiento T1C que solo contuvo Cu (II), éste valor se redujo a 45.58% en el tratamiento T2C que solo contuvo Zn (II) y decayó a 33.26% en el tratamiento T3C que contuvo la combinación de los dos metales. Todos estos resultados indican que la presencia de metales como cobre y zinc constituye un efecto inhibitorio en el metabolismo de las BSR, además, corroboran los resultados obtenidos durante la fase III de este estudio: la toxicidad ocasionada por el cobre en el metabolismo microbiano es menor que la ocasionada por zinc. Sin duda, la exposición de este consorcio microbiano a la combinación de los dos metales constituye un efecto antagónico, ya que la reducción de la actividad máxima específica de reducción de sulfato fue de 64.5%, 1.24 y 1.14 veces menor

que la ocasionada por la exposición individual de dichos metales a las BSR; no obstante, la concentración de metales monitoreada en el tratamiento T3C que contiene 15 mg L^{-1} de Cu (II) y Zn (II) no generó una inhibición del metabolismo microbiano superior al 80%. En el estudio realizado por Utgikar en 2003 [26] se evaluó el efecto inhibitorio de estos dos metales en cultivos mixtos de BSR y se determinó que las constantes de inhibición para Cu (II) y Zn (II) fueron de 17.9 ± 2.5 y $25.2 \pm 1 \text{ mM}^{-1}$, respectivamente, concluyendo que el Zn (II) al estar disuelto representó un efecto más inhibitorio que el generado por Cu (II), lo que respalda los resultados obtenidos en esta investigación.

Finalmente, las concentraciones de metales obtenidas después del análisis de espectroscopía atómica al inicio, mitad y final de los bioensayos, mostradas en la Tabla 7, son considerablemente pequeñas. Este hecho podría atribuirse a una remoción considerable de metales a lo largo del experimento, producto de la precipitación con el sulfuro biogénico formado. Debido a que las concentraciones iniciales no son comparables entre los dos metales, no fue posible determinar un porcentaje de remoción que permita identificar cuál de los dos metales tiende a precipitar en mayor o menor cantidad por acción de este proceso de remoción microbiana.

9. Conclusiones

La minería en Ecuador se encuentra en expansión; la puesta en marcha de varios proyectos estratégicos destinados a la explotación de oro, plata y cobre es inminente. Dado que las zonas destinadas a esta actividad se encuentran cerca de cuerpos de agua dulce, se requiere con urgencia el desarrollo de técnicas eficientes que remedien este tipo de efluentes. El uso de bacterias sulfato-reductoras en la que se aprovecha la reducción desasimilatoria de sulfatos constituye una tecnología pasiva accesible y altamente atractiva.

A lo largo de este estudio se evidenció la versatilidad de estos microorganismos al producir sulfuro biogénico y reducir sulfato bajo diferentes condiciones de operación: variando la concentración de sustrato y de metales como Cu (II) y Zn (II) a la que fueron expuestos.

En cuanto a los ensayos de consumo de sustrato, se determinó que la cantidad de sustrato disponible no representa una variable determinante en la sulfato-reducción. No obstante, la relación de 0.75 de DQO-acetato/sulfato fue la que mayor producción acumulada de sulfuro produjo y la que mayor cantidad de sustrato removió.

Por otra parte, a lo largo del monitoreo de los ensayos de toxicidad se evidenció que la presencia de Cu (II) y Zn (II) inhibe la actividad microbiana sulfato-reductora, es decir, los metales analizados durante este estudio generan toxicidad. En base a los resultados obtenidos en esta etapa se determinó que el Zn (II) constituye un elemento más tóxico que el Cu (II) y que el exponer este consorcio microbiano a la combinación Cu (II) + Zn (II) genera una mayor reducción en el metabolismo sulfato-reductor de estos microorganismos, lo que se traduce en un efecto antagónico para este consorcio.

10.Recomendaciones

Se recomienda continuar con el estudio referente a la remediación de drenajes ácidos de mina a partir del uso de bacterias sulfato-reductoras.

Para estudios posteriores se recomienda caracterizar, mediante técnicas moleculares, el consorcio microbiano presente en el biorreactor que actualmente se encuentra mejor adaptado a condiciones sulfato-reductoras que la primera vez que se realizó dicha caracterización. Se recomienda además evaluar el funcionamiento del biorreactor al añadir Cu (II) y Zn (II) en el afluente sintético.

Los drenajes ácidos de mina se caracterizan por contener grandes cantidades de metales pesados disueltos en agua, por lo que sería interesante evaluar la actividad máxima específica de producción de sulfuro y consumo de sulfato del consorcio microbiano presente en los sedimentos de la laguna artificial de la Universidad San Francisco de Quito frente a metales como hierro (Fe), plomo (Pb), magnesio (Mg), manganeso (Mn), etc. que se encuentran en cantidades mayores a las establecidas en el anexo I del libro VI del texto unificado de legislación secundaria del ministerio del ambiente ecuatoriano [23] en diferentes cuerpos de agua del sur del país, según los estudios de Andrade [12] y Méndez [14].

11. Bibliografía

- [1] World Bank Group. (2013). *Mining: sector results profile*. Obtenido el 19 de noviembre de 2016 de <http://www.worldbank.org/en/results/2013/04/14/mining-results-profile>
- [2] Sacher, W. (2013). *Revisión crítica del estudio ambiental (EIA) del proyecto Mirador de la empresa Ecuacorriente, Ecuador*. Protectecuador.org, p.13-20.
- [3] Castillo, V. (2014). *Modelo de reglamento de seguridad en el trabajo para el ámbito minero*. Universidad San Francisco de Quito, p. 22-25.
- [4] Banco Central del Ecuador. (2015). *Cuentas nacionales- publicación No. 28 2007-2015p*. Obtenido el 19 de noviembre de 2016 de <http://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/CuentasNacionales/Anuales/Dolares/indicecn1.htm>
- [5] Ministerio de Minería. (2016). *Plan Nacional de Desarrollo del Sector Minero*, p.157-159.

- [6] Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo. (2013). *Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017*, p. 221-245.
- [7] Ministerio del Ambiente. (2009). *Ley de Minería*, p.15-16
- [8] El Universo. (2015). *Ecuador inaugura minería a gran escala. Proyecto Mirador*.
Obtenido el 15 de noviembre de 2016 de
<http://www.eluniverso.com/noticias/2015/12/21/nota/5311143/ecuador-inaugura-mineria-gran-escala-proyecto-mirador>
- [9] Utgikar, V., Harmon, S., Chaudhary, N., Tabak, H., Govind, R. y Haines, J. (2002). *Inhibition of sulfate-reducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage*. Wiley Periodicals, Inc, p. 40-41.
- [10] Walters, R. (2013). *Sulfate reducing bioreactor dependence on organic substrates for long-term remediation of acid mine drainage*. Southern Illinois University Carbondale, p.1-6.
- [11] American Public Health Association. (2012) *Standard methods for the examination of water and wastewater*.
- [12] Andrade, V. (2010). *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*. Universidad San Francisco de Quito.
- [13] Ordóñez, M. (1999). *Sistemas de tratamiento pasivo para aguas ácidas de mina. Experiencias de laboratorio, diseño y ejecución*. Universidad de Oviedo, p. 40-45.
- [14] Méndez, G. (2015). *Removal of copper in a sulfate reducing bioreactor with a limestone pre-column system*. Universidad San Francisco de Quito.
- [15] Bradley, A., Leavitt, W. y Johnston, D. (2011). *Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway*. *Geobiology*, p. 446-454.

- [16] Sievert, S., Kiene, R., & Schulz, H. (2007). *The sulfur cycle*. Oceanography.
- [17] Davidian, J. y Kopriva, S. (2010). *Regulation of sulfate uptake and assimilation- the same or not the same?* Molecular Plant.
- [18] Gallardo, L. (2011). *Evaluación del funcionamiento de un sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina a escala laboratorio*. Universidad San Francisco de Quito.
- [19] Flor, D. (2012). *Estudio de factibilidad del diseño de un sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento de drenajes ácidos de mina a escala laboratorio*. Universidad San Francisco de Quito.
- [20] El Telégrafo. (2016). *En 2016, las inversiones mineras podrían alcanzar los \$ 600 millones*. Obtenido el 22 de noviembre de 2016 de <http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/8/en-2016-las-inversiones-mineras-podrian-alcanzar-los-usd-600-millones>.
- [21] Ministerio de Minería. (2016). *Ecuador quiere captar 600 millones de dólares en inversión de explotación minera*. Obtenido el 22 de noviembre de 2016 de <http://www.mineria.gob.ec/ecuador-quiere-captar-600-millones-dolares-en-inversion-de-exploracion-minera/>
- [22] Sierra-Álvarez, R., Hollingsworth, J. y Zhou, M. (2007). *Removal of copper in an integrated sulfate reducing bioreactor- crystallization reactor system*. Environmental Science and Technology, p. 1427-1430.
- [23] Ministerio del Ambiente. (2003). *Texto Unificado Legislación Secundaria*, p. 211-226.
- [24] Bharati, B. y Kumar, P. (2012). *A study on efficiency of five different carbon sources on sulfate reduction*, p. 416-420.

- [25] Karri, S., Sierra-Álvarez, R. y Field, J. (2006). *Toxicity of copper to acetoclastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge*. Chemosphere, p. 121-127.
- [26] Utgikar, V., Tabak, H., Haines, J. y Govind, R. (2003). *Quantification of toxic and inhibitory impact of copper and zinc on mixed cultures of sulfate-reducing bacteria*. Wiley Periodicals, p. 310-311.
- [27] Coello, M., Márquez, D. y Quiroga, J. (2002). *Efectos tóxicos de los metales sobre la actividad microbiana del sistema de lodos activos*. Ingeniería del agua, p. 309-310.
- [28] Rückert, C. (2016). *Sulfate reduction in microorganisms- recent advances and biotechnological applications*. Elsevier, p. 3-4.
- [29] Lens, P., Vallero, M., Esposito, G. y Zandvoort, M. (2002). *Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology*. Kluwer Academic Publishers, p.315-317.

12. Anexos

12.1 Tablas

Tabla 1. Valores promedio del funcionamiento del sistema de remediación compuesto por un biorreactor sulfato-reductor y una pre-columna de piedra caliza para la remoción de cobre (Cu (II)) durante un periodo de 135 días incubado a 30°C.

Periodo	Cu (mg L ⁻¹)	Sulfuro (mg/L)	pH	Reducción de Sulfato (%)	Remoción DQO (%)	Remoción Cu (II) soluble (%)
I	40	84.64	7.58	36	60	89
II	15	67.38	7.56	37	70	93

Tabla 2. Balance de azufre en el reactor biológico empacado con bacterias sulfato-reductoras. La alimentación de sulfato en el afluente fue de 2000 mg L⁻¹.

	Sulfato en Afluente (mg L ⁻¹)	Sulfato en Efluente (mg L ⁻¹)	Sulfuro disuelto en Efluente (mg L ⁻¹)
	2252.52	1436.10	76.01
Azufre (mg L⁻¹)	751.90	479.37	76.01

Tabla 3. Producción final acumulada de sulfuro, porcentaje de reducción de sulfato, actividades máximas específicas de producción de sulfuro y consumo de sulfato en los ensayos batch de consumo de sustrato con diferentes relaciones DQO-acetato/sulfato con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C.

Ensayo	Relación DQO-acetato/sulfato	Sulfato reducción (%)	Sulfuro (mg L⁻¹)	Actividad máxima específica de producción de sulfuro mg S²⁻ kg⁻¹ VSS d⁻¹	Actividad máxima específica de reducción de sulfato mg SO₄²⁻ kg⁻¹ VSS d⁻¹	Actividad máxima específica de consumo de acetato mg DQO-acetato g⁻¹ VSS d⁻¹
Control abiótico	1.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T1	1.25	87.17	189.33	1141.61	9733.75	158.49
T2	1	82.38	228.37	1334.33	9884.47	160.95
T3	0.75	86.78	260.91	1481.73	10664.21	173.64

Tabla 4. Producción final acumulada de sulfuro, porcentaje de reducción de sulfato, actividad máxima específica de producción de sulfuro y consumo de sulfato en los ensayos batch de toxicidad microbiana con diferentes concentraciones de iones de Cu (II) y Zn (II), con una relación DQO-acetato/ sulfato de 1.25 con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C.

Ensayo	Concentración de metales (mg L ⁻¹)	Sulfato reducción (%)		Sulfuro (mg L ⁻¹)		Actividad máxima específica de producción de sulfuro		Actividad máxima específica de reducción de sulfato		Actividad máxima específica de reducción de sulfato (%)	
		Cu	Zn	Cu	Zn	mg S ²⁻ .kg ⁻¹ VSS d ⁻¹		mg SO ₄ ²⁻ .kg ⁻¹ VSS.d ⁻¹		Cu	Zn
						Cu	Zn	Cu	Zn		
Control biótico	0	84.84	84.00	185.34	217.59	1095.05	1599.64	14221.83	13519.38	100.00	100.00
T1M	5	84.67	78.00	185.05	211.04	882.72	1480.59	12391.14	11991.23	87.13	88.70
T2M	10	72.63	63.40	158.25	165.81	842.23	1261.08	11459.05	10632.65	80.57	78.65
T3M	15	60.94	51.95	115.38	117.91	756.66	898.32	9764.64	8589.10	68.66	63.53
T4M	25	40.80	37.05	90.09	88.12	700.10	746.07	9194.38	6862.40	64.65	50.76
T5M	50	13.84	30.67	21.89	49.14	132.94	412.80	6008.14	6073.60	42.25	44.93

Tabla 5. Efecto inhibitorio de Cu (II) y Zn (II) sobre las bacterias sulfato-reductoras de sedimentos anaerobios.

Sustancia Inhibitoria	Concentración (mg L ⁻¹)		
	IC ₂₀	IC ₅₀	IC ₈₀
Cu (II)	10.25	39.73	>50 ^a
Zn (II)	9.33	28.26	>50 ^a

^a No tóxico a la mayor concentración evaluada: 50 mg L⁻¹

Tabla 6. Producción final acumulada de sulfuro, porcentaje de reducción de sulfato, actividades máximas específicas de producción de sulfuro y consumo de sulfato en los ensayos batch de toxicidad microbiana de Cu (II) y Zn (II), con una relación DQO-acetato/ sulfato de 1.25 con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C.

Ensayo	Tipo de elemento metálico	Sulfato reducción (%)	Sulfuro (mg L⁻¹)	Actividad máxima específica de producción de sulfuro mg S²⁻.kg⁻¹ VSS.d⁻¹	Actividad máxima específica de reducción de sulfato mg SO₄²⁻.kg⁻¹ VSS.d⁻¹	Actividad máxima específica de reducción de sulfato (%)
Control biótico	-	98.09	195.59	1399.83	12804.02	100
T1C	Cu	49.40	113.60	776.00	6412.77	50.08
T2C	Zn	55.07	102.29	709.02	5835.42	45.58
T3C	Cu + Zn	36.53	60.95	407.94	4258.52	33.26

Tabla 7. Variación de la concentración de cobre y zinc en diferentes etapas de monitoreo de los ensayos batch de toxicidad microbiana con una relación DQO-acetato/sulfato de 1.25 con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C.

Ensayo	Concentración de metales (mg L ⁻¹)	Fase I:		Fase II:		Fase III:	
		Inicio del experimento		Mitad del experimento		Fin del experimento	
		Cu	Zn	Cu	Zn	Cu	Zn
		mg L ⁻¹		mg L ⁻¹		mg L ⁻¹	
Control biótico	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T1M	5	1.24	1.23	0.32	0.66	0.38	0.00
T2M	10	2.74	2.08	0.78	1.19	0.65	0.66
T3M	15	3.32	2.82	1.07	0.68	0.83	0.25
T4M	25	4.24	2.72	1.42	1.45	1.06	0.26
T5M	50	6.28	2.83	1.86	1.22	1.51	0.82

12.2 Figuras

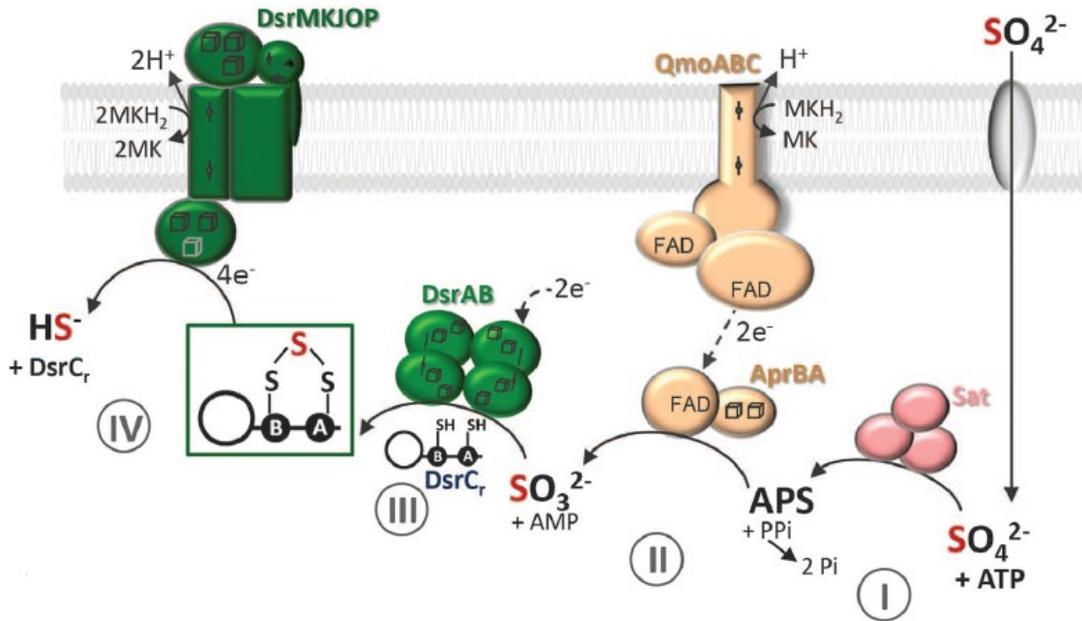


Figura 1. Esquema y ecuación del proceso de la reducción desasimilatoria de sulfato catalizada por bacterias sulfato reductoras.

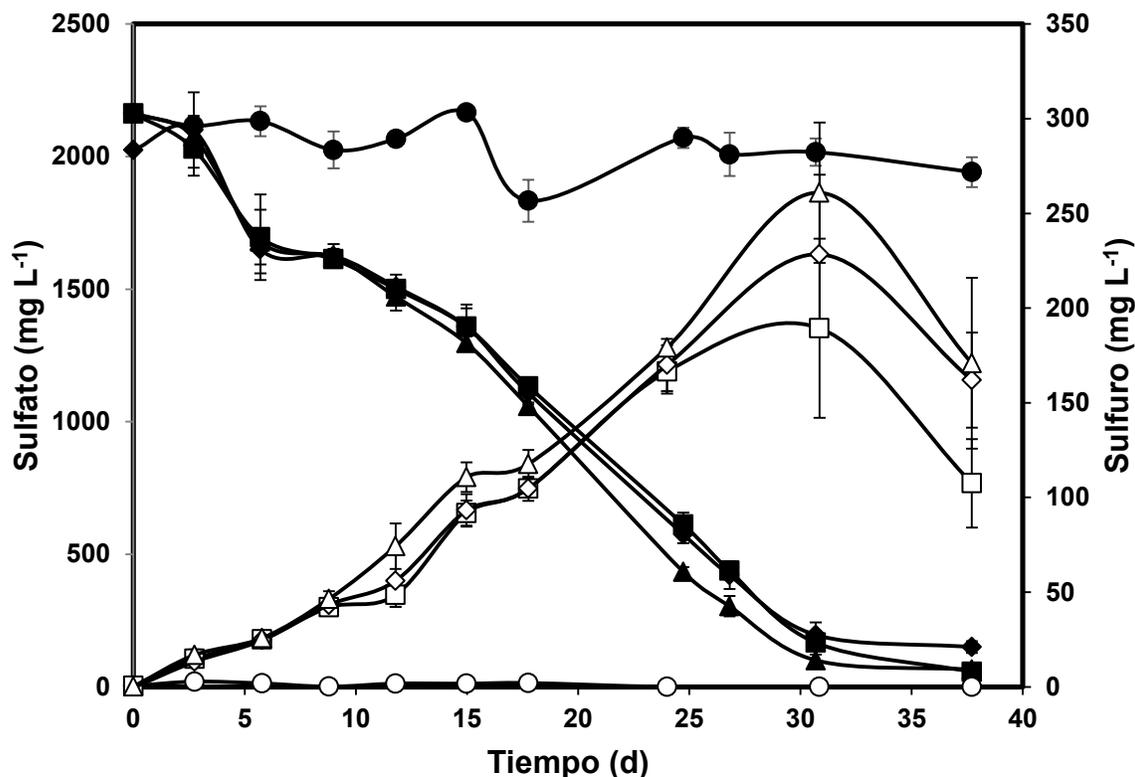


Figura 2. Variación de la concentración de sulfato (mg L^{-1}) (eje primario) y sulfuro (mg L^{-1}) (eje secundario) con respecto al tiempo en los ensayos batch de consumo de sustrato con diferentes relaciones DQO-acetato/sulfato con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C . **Leyenda:** sulfato (●) y sulfuro (○) en el control abiótico, sulfato (■) y sulfuro (□) en T1: 1.25 DQO-acetato/sulfato, sulfato (◆) y sulfuro (◇) en T2: 1.0 DQO-acetato/sulfato y sulfato (▲) y sulfuro (△) en T3: 0.75 DQO-acetato/sulfato. Las barras de error representan las desviaciones estándar de ensayos realizados por triplicado.

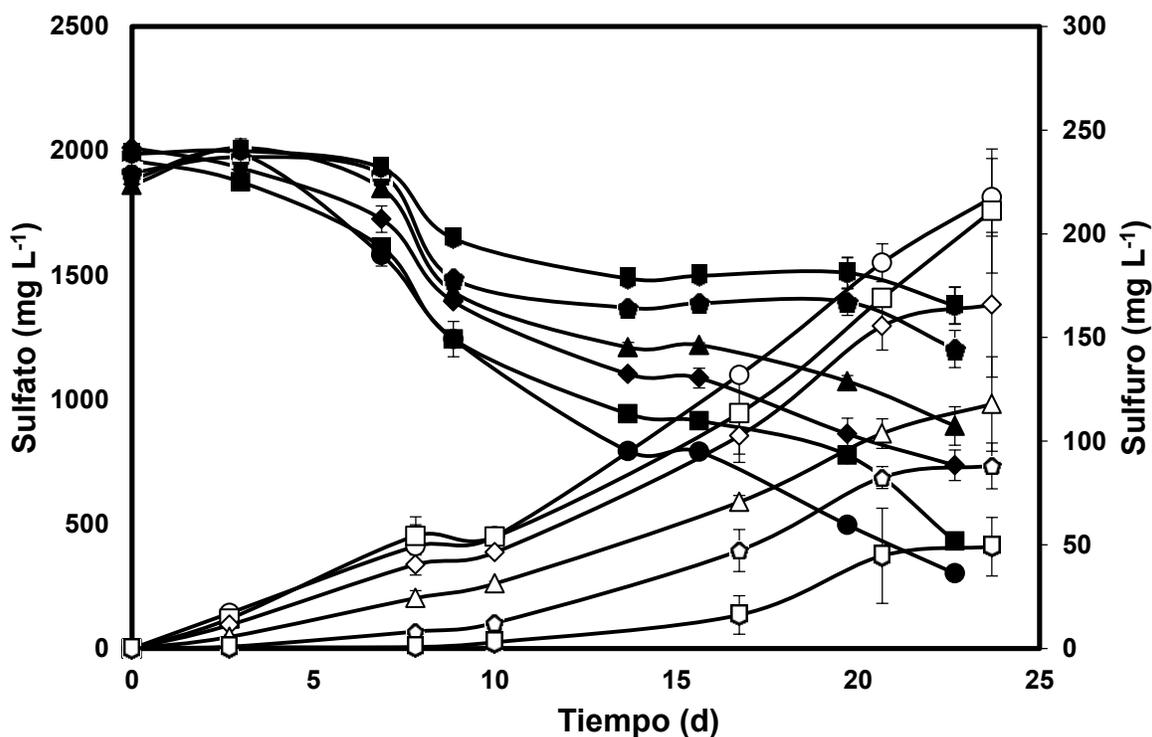


Figura 3. Variación de la concentración de sulfato (mg L^{-1}) (eje primario) y sulfuro (mg L^{-1}) (eje secundario) con respecto al tiempo en los ensayos batch de toxicidad microbiana con diferentes concentraciones de iones de Zn (II), con una relación DQO-acetato/sulfato de 1.25 y con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C . **Leyenda:** sulfato (●) y sulfuro (○) en el control biótico: ausencia de metales, sulfato (■) y sulfuro (□) en T1: 5 mg L^{-1} de Zn, sulfato (◆) y sulfuro (◇) en T2: 10 mg L^{-1} de Zn, sulfato (▲) y sulfuro (△) en T3: 15 mg L^{-1} de Zn, sulfato (◆) y sulfuro (◇) en T4: 25 mg L^{-1} de Zn y sulfato (■) y sulfuro (□) en T5: 50 mg L^{-1} de Zn. Las barras de error representan las desviaciones estándar de ensayos realizados por duplicado.

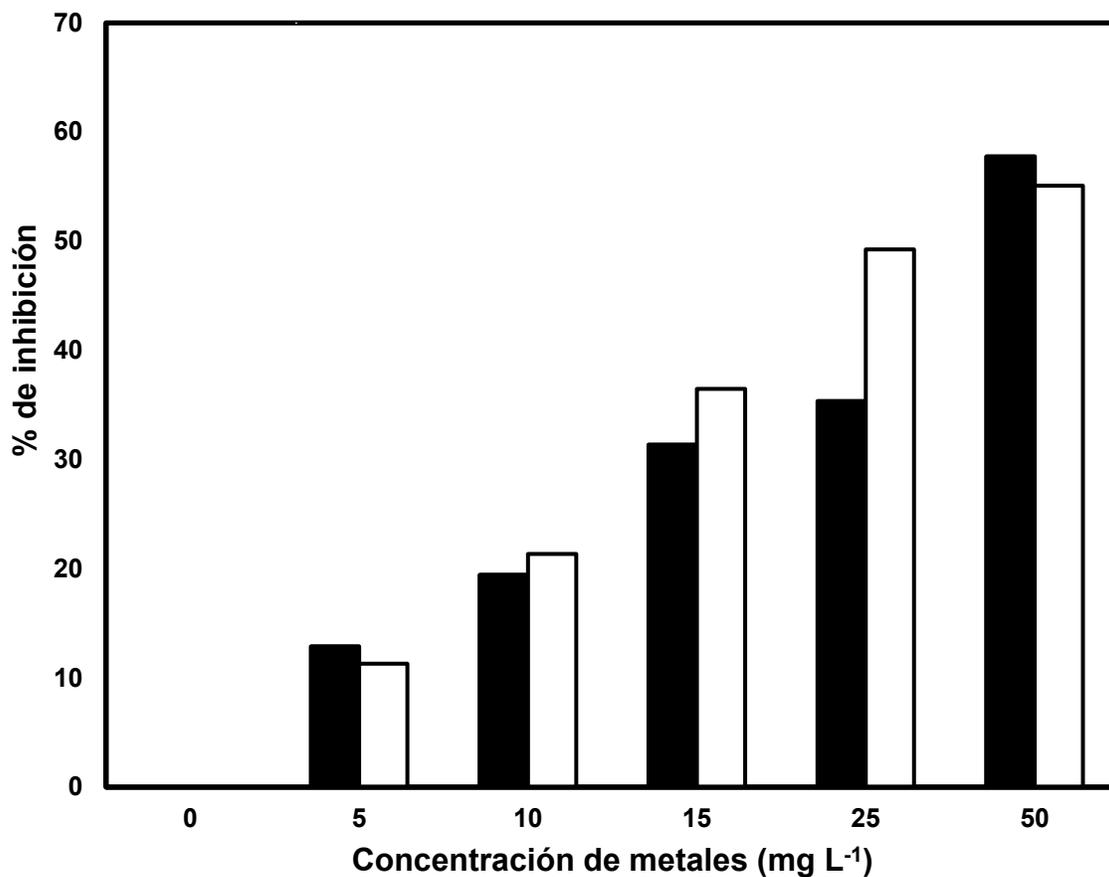


Figura 4. Porcentajes de inhibición de Cu (II) y Zn (II) con respecto a su concentración obtenidos de los ensayos de toxicidad microbiana con una relación DQO-acetato/sulfato de 1.25 y con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C. **Leyenda:** porcentaje de inhibición por Cu (II) (columnas negras) y porcentaje de inhibición por Zn (II) (columnas blancas).

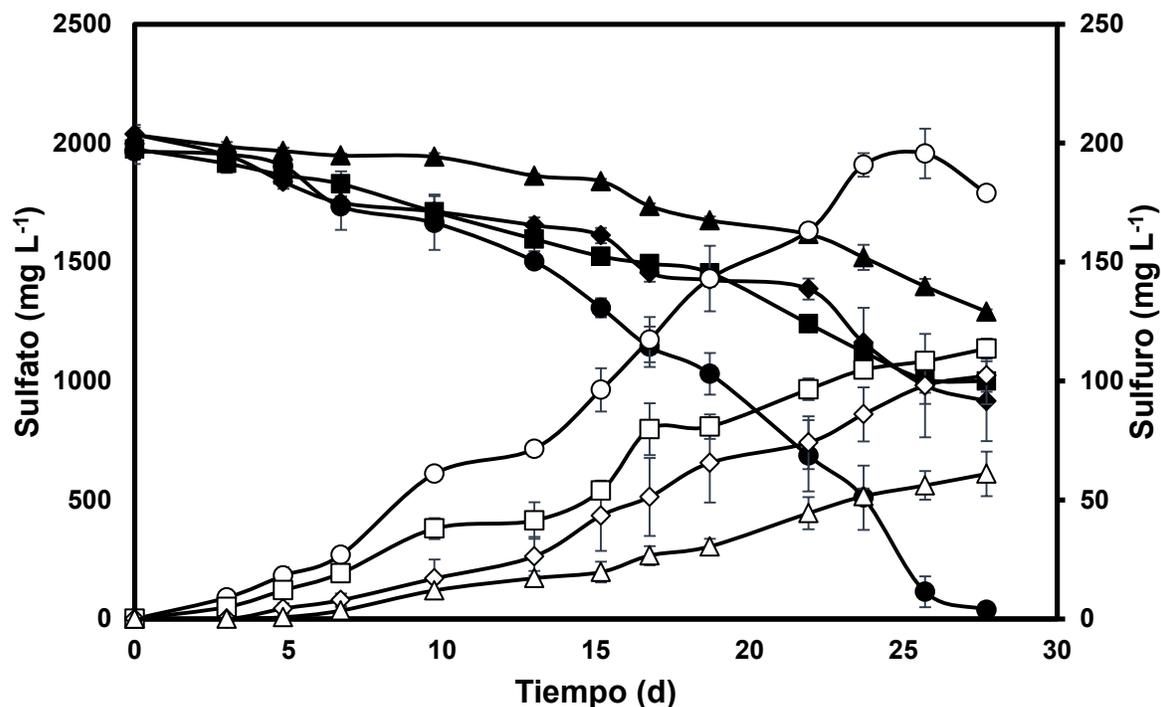


Figura 5. Variación de la concentración de sulfato (mg L^{-1}) (eje primario) y sulfuro (mg L^{-1}) (eje secundario) con respecto al tiempo en los ensayos batch de toxicidad microbiana con 15 mg L^{-1} de Cu (II) y Zn (II) , con una relación DQO-acetato/sulfato de 1.25 y con sedimentos anaerobios (10% v/v) incubados a 30°C . **Leyenda:** sulfato (●) y sulfuro (○) en el control biótico: ausencia de metales, sulfato (■) y sulfuro (□) en T1: 15 mg L^{-1} de Cu , sulfato (◆) y sulfuro (◇) en T2: 15 mg L^{-1} de Zn , sulfato (▲) y sulfuro (△) en T3: 15 mg L^{-1} de Cu y 15 mg L^{-1} de Zn . Las barras de error representan las desviaciones estándar de ensayos realizados por triplicado.