

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Evaluación del Funcionamiento de un Sistema Biológico-físico-químico
(BFQ) para el Tratamiento de los Drenajes Ácidos de Mina a Escala
Laboratorio**

Lorena Fernanda Gallardo Lastra

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

Quito, 13 de octubre del 2011

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACION DE TESIS

**Evaluación del Funcionamiento de un Sistema Biológico-físico-químico
(BFQ) para el Tratamiento de los Drenajes Ácidos de Mina a Escala
Laboratorio**

Lorena Fernanda Gallardo Lastra

Valeria Ochoa, PhD.
Directora de la Tesis
y Miembro del Comité de Tesis

Ródney Peñafiel, PhD.
Miembro del Comité de Tesis

René Parra, PhD.
Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, PhD.
Decana del Colegio de Ciencias
Biológicas y Ambientales

Quito, 13 de octubre del 2011

© Derechos de Autor

Lorena Fernanda Gallardo Lastra

2011

Resumen

Los drenajes ácidos de mina (DAM) constituyen hoy en día un problema ambiental muy serio producto de todas las actividades mineras. Dichos drenajes se caracterizan por tener un alto contenido de metales pesados disueltos, iones sulfato y pH ácido lo cual tiene implicaciones serias no sólo en la salud humana sino también en los diversos ecosistemas en los cuales los DAM son descargados. El objetivo del presente estudio fue evaluar el funcionamiento de un sistema biológico-físico-químico para descontaminar los DAM mediante la utilización de bacterias sulfato-reductoras (BSR) que producen sulfuro biogénico para precipitar los metales pesados en forma de sulfuros metálicos. Se utilizó un bioreactor empacado con bacterias sulfato-reductoras el cual fue alimentado con 3000 mg sulfato L^{-1} y 2500 mg acetato L^{-1} como donador de electrones y fue estabilizado hasta llegar a producir concentraciones de sulfuro biogénico de aproximadamente 130 mg L^{-1} . Después, se puso en marcha el reactor físico-químico conectado en serie con el reactor biológico y con un segundo afluente compuesto de una muestra sintética de DAM con 30 mg L^{-1} cobre (II) y pH igual a 2.7. Este sistema híbrido logró aumentar el pH hasta tener valores 8.5 en el efluente del sistema; además, se logró obtener una remoción de cobre (II) mayor al 98% durante 148 días de operación.

Se determinó también en este estudio la toxicidad de metales pesados, en este caso cobre (II), a las BSR para evaluar la factibilidad de incorporar todo el sistema BFQ desarrollado en esta investigación en un reactor único. Se utilizaron sedimentos de una laguna artificial como inóculo bacteriano y acetato como donador de electrones bajo condiciones de operación controladas. Los efectos de la toxicidad del cobre (II) fueron evaluados en términos de la producción de sulfuro en presencia de diferentes concentraciones de cobre (II): 1, 5, 10, 30, 50 mg L^{-1} durante un período de 760 horas. Los resultados obtenidos demuestran que una concentración mínima de cobre (II) de 1 mg L^{-1} actúa como micronutriente y no es tóxico lo cual estimula el crecimiento microbiano de las BSR; no obstante, a concentraciones de Cu (II) mayores a 1 mg L^{-1} la actividad metabólica de las BSR se ve afectada de manera moderada. La concentración de cobre (II) que causó un 20% de inhibición (IC_{20}) en la producción de sulfuro por parte de las BSR fue de 13 mg L^{-1} . En presencia de elevadas concentraciones de cobre (II) no se registraron mayores inhibiciones (IC_{50} y IC_{80}) de la actividad metabólica normalizada debido a que las BSR demostraron ser resistentes a concentraciones de cobre (II) tan altas como 50 mg L^{-1} .

Los resultados demuestran que la bioremediación de los DAM puede ser una herramienta útil y exitosa para resolver este problema ambiental que afecta de manera significativa la salud humana y la naturaleza.

Abstract

Acid mine drainages (AMD) are nowadays a very serious environmental problem caused by all the mine activities. These drains are characterized for having a high content of dissolved heavy metals, sulphate ions and acid pH which have negative consequences not only in human health but also in many ecosystems in which they are discharged. The main purpose of this study was to evaluate the operation of a physical-chemical-biological (PQB) system to decontaminate the AMD using sulphate-reducing bacteria (SRB) that produce biogenic sulphur to precipitate heavy metals into metal sulphurs. A bioreactor packed with SRB was used; it was fed with 3000 mg sulphate L⁻¹ and 2500 mg acetate L⁻¹ as the electron donor and was stabilized until obtaining sulphur concentrations of approximately 130 mg L⁻¹. A physical-chemical reactor was connected in series to the bioreactor and had as a second affluent a synthetic DAM composed by 30 mg L⁻¹ copper (II) and a pH of 2.7. This hybrid system raised the pH of the sample until obtaining values around 8.5 in the final effluent; furthermore, a copper (II) removal greater than 98% was obtained during the 148 days of operation.

The toxicity of heavy metals, in this case copper (II), to SRB was also determined in this study in order to evaluate the feasibility of incorporating the entire PQB system in a unique reactor. Sediments of an artificial lake were used as bacterial inoculum and acetate as the electron donor under controlled operation conditions. The effects of copper (II) toxicity were evaluated in terms of the sulphur production in presence of copper (II) concentrations of: 1, 5, 10, 30, 50 mg L⁻¹ during a 760 hours period. The obtained results demonstrate that a minimum concentration of copper (II) of 1 mg L⁻¹ acts as a micronutrient and it is not toxic, instead, it stimulates the microbial growth of SRB; however, higher concentrations are toxic and affect SRB growth. The copper (II) concentration that caused a 20% of inhibition (IC₂₀) in the sulphur production by the SRB was 13 mg L⁻¹. In presence of elevated concentrations of copper (II) there were not important inhibitions registered (IC₅₀ and IC₈₀) of metabolic activity, the SRB demonstrated to be resistant to high concentrations of copper up to 50 mg L⁻¹.

These results show that DAM bioremediation can be an important and successful tool to solve this environmental problem that affects human health and nature.

Agradecimientos

A mi familia, mis papás, mis hermanas y hermano que siempre me han apoyado para cumplir todas las metas que me he propuesto, por darme todo su amor incondicional, por guiarme siempre a ser una mejor persona que sea solidaria con los demás.

A mis abuelitas, tíos y primos, por siempre haber estado en todos los momentos más importantes de mi vida, por apoyarme en las situaciones alegres y difíciles, por enseñarme a ser útil en el mundo.

A Valeria Ochoa, mi directora de tesis, por su gran paciencia y arduo trabajo para sacar este proyecto adelante, por sus palabras de apoyo, por transmitirme no sólo sus conocimientos sino también la pasión y emoción por la ciencia.

A Ródney Peñafiel y René Parra, que además de ser miembros del Comité, fueron una fuente de conocimiento durante estos años de estudio, por haber transmitido su experiencia y sabiduría de manera desinteresada a todo momento buscando siempre el progreso de todos.

A todos mis amigos y compañeros, por siempre sacarme una sonrisa y compartir momentos inolvidables, por su apoyo y por ser siempre incondicionales.

Tabla de Contenidos

1. Introducción.....	1
2. Diseño y puesta en marcha de un sistema de tratamiento biológico-físico-químico (BFQ) de los drenajes ácidos de mina (DAM)	3
2.1 Resumen	3
2.2 Introducción.....	5
2.3 Materiales y Métodos	11
2.3.1 <i>Reactivos</i>	11
2.3.2 <i>Medio basal mineral</i>	11
2.3.3 <i>Métodos analíticos</i>	11
2.3.4 <i>Sistema de tratamiento biológico-físico-químico (BFQ) de los DAM</i>	14
2.4 Resultados y Discusión.....	23
2.4.1 <i>Estabilización del reactor biológico</i>	23
2.4.2 <i>Montaje del reactor físico-químico a continuación del reactor biológico</i>	37
2.5 Conclusiones	48
2.6 Referencias Bibliográficas	49
3. Toxicidad de iones cobre (II) en las bacterias sulfato-reductoras (BSR).....	52
3.1 Resumen.....	52
3.2 Introducción.....	54
3.3 Materiales y Métodos	60
3.3.1 <i>Sedimentos</i>	60
3.3.2 <i>Medio de cultivo</i>	60
3.3.3 <i>Reactivos</i>	60

3.3.4 <i>Métodos analíticos</i>	61
3.3.5 <i>Toxicidad Microbiana</i>	61
3.4 Resultados y Discusión	63
3.5 Conclusiones	78
3.6 Referencias Bibliográficas	79
4. Conclusiones	82

Lista de Tablas

Tabla 2.1 DQO en los puertos de alimentación y de salida del sistema de tratamiento BFQ de los DAM	47
Tabla 3.1 Actividades máximas específicas de producción de sulfuro y consumo de sulfato de los sedimentos de la laguna de la Universidad San Francisco de Quito (10% v/v) en presencia de distintas concentraciones de cobre (II)	72
Tabla 3.2 Efecto inhibitorio del cobre (II) sobre las bacterias sulfato-reductoras de los sedimentos de la laguna de la Universidad San Francisco de Quito.	77

Lista de Figuras

- Figura 2.1: 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 físico-químico (b). 15
- Figura 2.2 Fotografía del reactor biológico. El bioreactor de flujo ascendente fue empacado con 15 g SVS L⁻¹ de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ soportados en arena y alimentado con medio basal mineral con 2500 mg DQO-acetato L⁻¹ como donador de electrones y 3000 mg L⁻¹ de sulfato como aceptor de electrones en modo de operación continuo (Fotografía tomada por Lorena Gallardo). 18
- Figura 2.3: Fotografía del reactor físico-químico conectado en serie con el reactor biológico. El reactor fue empacado con arena y alimentado simultáneamente por el puerto que está en la base con DAM sintético con 30 mg L⁻¹ de cobre (II) y pH 2.7, y por el puerto lateral inferior con sulfuro biogénico en una concentración de aproximadamente 130 mg L⁻¹. (Fotografía tomada por Lorena Gallardo). 21
- Figura 2.4 Fotografía del sistema de tratamiento biológico-físico-químico (BFQ) de los drenajes ácidos de mina. El bioreactor de flujo ascendente fue alimentado con una muestra sintética compuesta por acetato (2.5 g DQO L⁻¹), sulfato (3000 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. El reactor físico-químico de flujo ascendente fue empacado con arena y alimentado

simultáneamente por el puerto lateral inferior con el sulfuro biogénico generado en el bioreactor en una concentración de 130 mg L^{-1} aproximadamente y por el puerto que está en la base con DAM sintético con 30 mg L^{-1} de cobre (II) y pH 2.7. (Fotografía tomada por Lorena Gallardo).

22

Figura 2.5 Variación del pH con respecto al 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 hasta el $t=139$ días y 3000 mg L^{-1} de sulfato a partir del $t=140$ días. Leyenda: (■) pH del afluente; (□) pH del efluente; (---) Ingreso de NaOH al bioreactor; (.....) Degradación del afluente.

27

Figura 2.6 Variación del flujo 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 hasta el $t=139$ días y 3000 mg L^{-1} de sulfato a partir del $t=140$ días. Leyenda: (-----) Ingreso de NaOH al bioreactor; (— · —) Fuga en las mangueras.

29

Figura 2.7 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 hasta el t= 140 días y 3000 mg L⁻¹ de sulfato a partir del t=140 días antes y después de haber instalado el reactor físico-químico. Leyenda: (- - -) Ingreso de NaOH al reactor t=128 d; (- . -) Cambio en la concentración de sulfato t=153; (— · -) Disminución de temperatura t=194; (— —) Montaje del reactor físico químico en el t= 253 d. Las barras de error representan desviaciones estándares de muestras analizadas por triplicado.

33

Figura 2.8 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 hasta el t= 140 días y 3000 mg L⁻¹ de sulfato a partir del t=140 días.

36

Figura 2.9: Concentración de cobre en el afluente y efluente del reactor físico-químico del sistema de tratamiento BFQ de los DAM con respecto al tiempo. El reactor físico-químico empacado con arena fue operado en modo continuo y conectado en serie con el bioreactor. El reactor físico-químico de flujo ascendente fue alimentado con 130 mg L⁻¹ de sulfuro biogénico y con una muestra sintética de DAM de 30 mg L⁻¹ de Cu (II) y pH igual a 2.7. Leyenda: (▲) Afluente reactor físico-químico; (▴) Efluente reactor físico-químico. Las barras de error representan desviaciones estándares de muestras analizadas por triplicado.

41

Figura 2.10: Porcentaje de remoción de cobre (II) en reactor físico-químico del sistema de tratamiento BFQ de los DAM con respecto al tiempo. El reactor físico-químico empacado con arena fue operado en modo continuo y conectado en serie con el bioreactor. El reactor físico-químico de flujo ascendente fue alimentado con 130 mg L^{-1} de sulfuro biogénico y con una muestra sintética de DAM de 30 mg L^{-1} de Cu (II) y pH igual a 2.7. 42

Figura 2.11: Variación del pH con respecto al tiempo en los afluentes y efluentes del bioreactor y del reactor físico-químico del sistema de tratamiento BFQ de los DAM con respecto al tiempo. . Leyenda: (■) pH del afluente del reactor biológico; (□) pH del efluente del reactor biológico y afluente del reactor físico-químico; (▲) pH del afluente del reactor físico-químico; (△) pH del efluente del reactor físico-químico 45

Figura 2.12: Variación del flujo en el reactor físico-químico del sistema de tratamiento BFQ de los DAM con respecto al tiempo. El reactor físico-químico empacado con arena fue operado en modo continuo y conectado en serie con el bioreactor. El reactor físico-químico de flujo ascendente fue alimentado con 130 mg L^{-1} de sulfuro biogénico y con una muestra sintética de DAM de 30 mg L^{-1} de Cu (II) y pH igual a 2.7. Leyenda: (— —) Fugas en mangueras. 46

Figura 3.1 Producción de sulfuro con respecto al tiempo por acción de las BSR en presencia de 3000 mg L^{-1} de sulfato y $2500 \text{ mg DQO L}^{-1}$ de acetato en los controles bióticos y abióticos. Leyenda: (—◆—) control biótico

con BSR; (—□—) control abiótico ausencia de BSR. Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por triplicado.

66

Figura 3.2 Producción de sulfuro biogénico a partir de 3000 mg L^{-1} de sulfato y $2500 \text{ mg DQO L}^{-1}$ de acetato en presencia de diferentes concentraciones de cobre (II). Leyenda: (—◆—) control biótico; (—□—) control abiótico; (—■—) 1 mg L^{-1} ; (—▲—) 5 mg L^{-1} ; (—■—) 10 mg L^{-1} ; (—■—) 30 mg L^{-1} ; (—●—) 50 mg L^{-1} . Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por triplicado.

70

Figura 3.3 Actividad normalizada de las BSR con diferentes concentraciones de cobre (II). Leyenda: (---) concentración de cobre (II) que inhibe el 20% de crecimiento microbiano(IC_{20})

74

CAPÍTULO I

Introducción

Los drenajes ácidos de minas (DAM) son efluentes generados de manera natural en toda actividad minera existente y representan un problema no sólo en términos ambientales sino también a nivel social y económico. Se caracterizan por contener una alta concentración de sulfato y metales pesados en solución así como un pH ácido lo cual afecta a diversos ecosistemas e incluso a la salud humana. Los DAM son generalmente descargados en cuerpos de agua superficiales de donde en muchos casos se extrae agua para consumo humano, constituyendo un serio problema social y de salud pública que atañe a varias poblaciones en el mundo donde se desarrollan actividades mineras. Asimismo, causan un gran daño a los ecosistemas afectando a varias especies que habitan en los mismos. Los métodos de tratamiento físico-químicos de los drenajes ácidos de mina tales como la adición de cal, carbonato de calcio, hidróxido de sodio, entre otros resultan costosos y son poco comunes. Adicionalmente las regulaciones respecto a estas descargas son permisivas e incluso en muchos países, inexistentes. En Ecuador, a pesar de que la normativa ambiental TULAS estipula límites de descargas de contaminantes, los mismos no son respetados.

En Ecuador, la minería tiene una gran importancia a pesar de los problemas ambientales y socio-productivos que conlleva. La mayoría de las actividades mineras se concentran en el sur del país principalmente en las áreas de Ponce-Enríquez, Santa Rosa, Portovelo-Zaruma y Nambija; sin embargo, en estos lugares donde se lleva a cabo minería artesanal no se toman las medidas necesarias para prevenir la descarga de los DAM al medio ambiente sin un

tratamiento previo para remover los metales pesados y elevar el pH principalmente. Además, evitar la formación de estos drenajes es prácticamente imposible ya que siempre que haya presencia de oxígeno, se producen. Este estudio presenta una propuesta de tratamiento de los DAM mediante la utilización de bacterias sulfato-reductoras (BSR) para la producción de sulfuro biogénico como su mayor componente y un proceso físico-químico para la remoción de metales pesados. El objetivo principal es evaluar la eficiencia de tratamiento de una muestra sintética de DAM en un sistema híbrido biológico-físico-químico compuesto de un bioreactor y de un reactor físico-químico conectados en serie. Dicho sistema tiene como objetivos específicos evaluar la generación de sulfuro biogénico en el bioreactor empacado con BSR y su precipitación como sulfuro metálico con los metales pesados también presentes en los DAM. Asimismo, a través de este sistema se pretende reducir la acidez propia de los DAM, mediante la elevación del pH como resultado del proceso de degradación.

El desarrollo de un sistema completo e integrado de tratamiento de los DAM requiere conocer los límites de concentración de metales pesados que pueden tolerar las BSR para sobrevivir y desarrollar sus actividades metabólicas. Es por eso que otro objetivo específico de esta investigación es evaluar la toxicidad de los metales pesados, en este caso el cobre (II) en las BSR para determinar las concentraciones apropiadas que no resulten letales para dichas bacterias.

CAPÍTULO II

Diseño y puesta en marcha de un sistema de tratamiento biológico-físico-químico (BFQ) de los drenajes ácidos de mina (DAM)

2.1 Resumen

Los drenajes ácidos de mina (DAM) constituyen en la actualidad uno de los problemas ambientales más serios generados por las actividades mineras. El desarrollo de tecnologías limpias que ayuden a contrarrestar este problema que presenta afectaciones ambientales y a la salud pública es cada vez más urgente. Los sistemas híbridos compuestos de procesos biológicos y físico-químicos están recibiendo mayor atención como una alternativa de tratamiento por su efectividad y aplicabilidad. Es así que en el presente estudio se desarrolló un sistema híbrido compuesto por un reactor físico-químico y un reactor biológico, un sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina. En el bioreactor las bacterias sulfato-reductoras generan sulfuro, y dicho sulfuro es alimentado al reactor físico-químico en el que ocurre la precipitación de cobre (II) como sulfuro de cobre. El bioreactor empacado con bacterias sulfato-reductoras fue alimentado con 3000 mg sulfato L⁻¹ como aceptor de electrones y 2500 mg acetato L⁻¹ como donador de electrones y fue estabilizado hasta llegar a producir concentraciones de sulfuro biogénico de aproximadamente 130 mg L⁻¹. Posteriormente, se puso en marcha el reactor físico-químico que sirvió para precipitar los metales pesados y fue alimentado con el efluente del reactor biológico y con una muestra sintética de DAM compuesta por 30 mg L⁻¹ de cobre (II) y pH igual a 2.7. El sistema

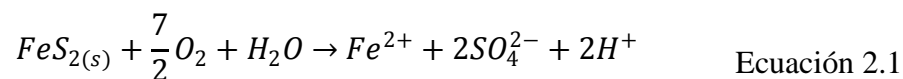
híbrido BFQ demostró ser muy eficiente para el tratamiento de los DAM, el pH del efluente del sistema fue de 8.5 y se logró obtener una remoción de cobre (II) mayor al 98% durante 148 días de operación.

2.2 Introducción

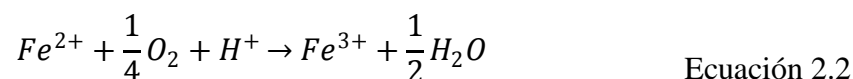
Los drenajes ácidos de mina se caracterizan por tener valores de pH bajos y elevadas concentraciones de sulfato y metales pesados, estos efluentes son el resultado de las actividades mineras que exponen los minerales sulfurados al aire y agua [1].

En la actualidad la generación de los drenajes ácidos de mina (DAM) ha sido muy estudiada, la misma que se compone de la combinación de varios procesos químicos y biológicos. La formación de los DAM ocurre cuando los sulfuros (particularmente pirita y pirrotita) se exponen a agua y oxígeno convirtiéndose así en sulfatos y oxihidróxidos de hierro; sin embargo, el mecanismo por el cual esto ocurre todavía necesita ser clarificado [2]. Además, el problema es más amplio cuando las reacciones son catalizadas por bacterias aeróbicas como *Acidithiobacillus* (antes *Thiobacillus*) *ferrooxidans* ya que a valores de pH bajos (2 a 4) tienden a ser muy activas y pueden incrementar la velocidad de oxidación de Fe^{2+} por factores mayores a 10^6 [3].

Varias reacciones están envueltas en la formación de los DAM. El proceso se inicia con pH neutro por la liberación de ion férrico (Fe^{2+}) en solución por oxidación de la pirita, de acuerdo a la Ecuación 2.1[3]:

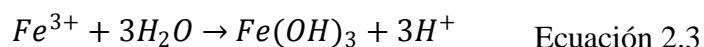


El siguiente paso ocurre a valores de pH bajos (<4) de acuerdo a la Ecuación 2.2:



Se conoce esta reacción como “el paso determinante de la velocidad” en el proceso generador de ácido porque las bacterias oxidadoras de hierro incrementan notablemente la velocidad.

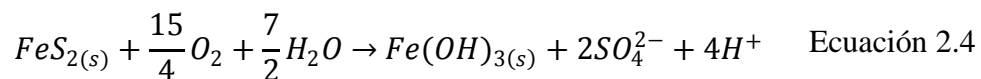
El Fe^{3+} no es soluble en agua si el pH es mayor a 2.3 a 3.5 (dependiendo de la concentración de hierro) y precipita como oxihidróxido liberando H^+ y bajando el pH como se muestra en la Ecuación 2.3:



A medida que el pH disminuye, el ciclo se reinicia por el Fe^{3+} remanente en la solución, reducido subsecuentemente por pirita y generando Fe^{2+} y acidez, hasta que el Fe^{3+} o la pirita se terminen.

La velocidad de oxidación de la pirita en presencia de Fe^{3+} es mucho mayor que la oxidación con O_2 . Además, la oxidación “indirecta” de un mol de pirita libera 16 moles de H^+ comparada a 2 moles de H^+ en la Ecuación 2.1.

La reacción general está dada por la adición de las Ecuaciones 2.1, 2.2 y 2.3 que se muestra a continuación:



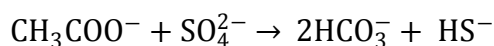
Estas reacciones incrementan progresivamente la acidez del agua, resultando en la movilización de metales de los residuos de minas [3].

La remediación biológica de los DAM puede ser realizada en sistemas activos (como bioreactores) o sistemas pasivos (como barreras reactivas permeables, BRP), ambos para explotar la producción de sulfuro [4]. Es así que, una buena alternativa de tratamiento de los DAM son los bioreactores de campo ya que son efectivos para incrementar el pH y la alcalinidad, reducir el sulfato a sulfuro y de esta manera remover metales por períodos de hasta cuatro años [5]. Las BRP utilizan compuestos orgánicos como donadores de electrones los cuales se caracterizan por ser mezclas de materiales biológicos escogidos por su disponibilidad y accesibilidad; los materiales biodegradables (compost municipal, excremento de vaca, caballo y oveja) son generalmente mezclados con materiales más recalcitrantes (aserrín, paja, compost de hojas) que sirven como soporte para asegurar el crecimiento de las bacterias sulfato-reductoras (BSR) por largos períodos de tiempo [4]. En las aplicaciones a gran escala de las BRP también se añade grava para mejorar la permeabilidad de la barrera y piedra caliza para incrementar el pH y favorecer el crecimiento de las BSR [4].

El donador de electrones (materia orgánica) constituye el costo de operación más alto en un sistema biológico de tratamiento de los DAM. Actualmente, este tipo de sistemas están siendo alimentados con compuestos orgánicos tales como el etanol, y desechos como aguas residuales de la industria de fermentación o celulósica [5].

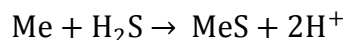
Además del etanol, se utilizan otros compuestos como donadores de electrones debido a su eficiencia y/o costo. En el sistema implementado en este estudio se utilizó acetato el cual resultó más ser más eficiente comparado con otros tales como peptona y lactato. El sulfuro

biogénico producto de la oxidación de acetato se produce de acuerdo a la siguiente reacción[6]:



Ecuación 2.5

En la Ecuación 2.5 el acetato es el donador de electrones y el sulfato el aceptor de electrones formando bicarbonato como uno de los productos de la reacción lo cual genera un incremento del pH en el tratamiento de los DAM y finalmente se produce también sulfuro de hidrógeno [7].



Ecuación 2.6

La Ecuación 2.6 muestra el mecanismo de precipitación de metales pesados utilizando el sulfuro biogénico producido en un bioreactor [7].

Los reactores biológicos que reducen sulfato a sulfuro para la posterior precipitación de los metales como sulfuros metálicos pueden tener una o más etapas, es así que la sulfato-reducción y la precipitación de metales puede ocurrir simultáneamente o en procesos unitarios separados [6]. Los procesos de una fase tienen costos de operación bajos, pero son más propensos a la inhibición de la producción de sulfuro debido a que el agua residual puede resultar tóxica para las bacterias sulfato-reductoras ya que contienen altas cantidades de metales pesados. Por tanto, un balance cuidadoso de la carga de agua residual debe hacerse para que pueda ser tratada con la capacidad de sulfato-reducción del reactor [6]. Por el

contrario, el tratamiento de los DAM en varias etapas maximiza la eficiencia de precipitación de los metales como hidróxidos pero es un proceso más costoso. Adicionalmente, la estabilidad química de la mayoría de hidróxidos metálicos es menor que aquella de los sulfuros metálicos, por tanto, la estabilidad de metales es preferida en la forma de sulfuro [6]. Otros procesos, tales como intercambio iónico, ósmosis inversa, electrodiálisis y recuperación electrolítica, están también disponibles para el tratamiento de los DAM pero son costosos y no muy comunes[6].

De acuerdo a Neculita et al., durante los últimos 15 años, los bioreactores han sido utilizados exitosamente para el tratamiento de los DAM [5]. Estos bioreactores se basan en el empleo de BSR capaces de oxidar cadenas cortas de carbono orgánico a bicarbonato y reducir el sulfato a sulfuro. En los reactores, el bicarbonato incrementa el pH y la alcalinidad de los DAM, y el sulfuro de hidrógeno remueve los metales a través de la precipitación de sulfuros metálicos [5].

Varios estudios han demostrado que la descarga de drenajes ácidos de mina no tratados ocasiona daños importantes en el ambiente. Por ejemplo, en Ely Creek (Virginia, USA) se realizó un estudio para evaluar el impacto de los DAM en el río. Se tomaron muestras en 20 estaciones diferentes, 12 de las cuales tenían valores de pH menores a 6. El estudio de macroinvertebrados bénticos indicó que 11 de las 12 estaciones monitoreadas no presentaban insectos acuáticos de la orden Ephemeroptera y más aún muestras de 5 de los sitios mayormente impactados no presentaban macroinvertebrados de ningún tipo. En contraste, muestras de estaciones sin impacto de los DAM en Ely Creek registraban entre 41 a 69 insectos acuáticos de la Orden Ephemeroptera y abundancia total de organismos [8].

De igual forma, los metales pesados causan un daño importante no sólo para la salud humana sino también para el ecosistema.

Por tanto, el objetivo del presente estudio fue diseñar y poner en marcha un sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento de los DAM generados durante las actividades mineras para así aumentar el pH de los mismos y a la vez remover metales pesados. Dicho sistema consta de un bioreactor alimentado con sulfato y acetato como donador de electrones para producir sulfuro biogénico mediante la sulfato-reducción microbiana, y por un reactor físico-químico conectado en serie con el bioreactor para llevar a cabo la precipitación de metales pesados como sulfuros metálicos.

2.3 Materiales y Métodos

2.3.1 Reactivos

El sulfato de sodio (100%, pureza) fue obtenido de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). El sulfato de amonio y hierro (III) y el acetato de sodio fueron obtenidos de Laboratorios Químicos H.V.O. (Quito, Ecuador). El ácido sulfúrico (95.0 - 97.0 %) fue obtenido de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). El DMP (oxalato de N,N-dimetil-p-fenildiamina) (>99%) fue obtenido de J.T. Baker (Zedelgem, Bélgica). El N₂ gas fue entregado por AGA Ecuador (Quito, Ecuador). Todos los reactivos fueron utilizados en el estado en el que fueron recibidos.

2.3.2 Medio basal mineral

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 (2000), ZnCl₂ (50), MnCl₂ (32), (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (50), AlCl₃ (50), CoCl₂·6H₂O (2000), NiCl₂·6H₂O (50), CuSO₄·5H₂O (44), NaSeO₃·5H₂O (100), EDTA (1000), resazurina (200) y 1mL L⁻¹ de HCl 36% [9].

2.3.3 Métodos analíticos

Medición de sulfuro

Para medir el sulfuro se utilizó el método colorimétrico de azul de metileno a una longitud de onda de 670 nm empleando un colorímetro Spectronic 20D+ (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) [10]. En este método se monitorea la formación de 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 mediante el uso de un colorímetro.

La medición de sulfuro disuelto se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación: 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, considerando que la concentración máxima de sulfuro en el balón no debía exceder 1 mg L^{-1} . Previo a la medición de las muestras, se realizaron curvas de calibración entre 0 y $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ S}^{2-}$ empleando una solución madre de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ equivalente a 250 mg L^{-1} de S^{2-} a partir de la cual se realizaron las diluciones respectivas.

Determinación de la demanda química de oxígeno

La demanda química de oxígeno (DQO) fue determinada en base al protocolo descrito en Métodos Normalizados para el Análisis de Agua Potable y Agua Residual [11, 12]. Se empleó una solución de digestión de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 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 . Las muestras fueron centrifugadas y 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°C por 2 horas. Previo al procedimiento descrito, se realizaron curvas de calibración con estándares de KHP de 50, 100, 250, 750 y $1000 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ las mismas que fueron usadas antes de cada

medición. Finalmente, se midió la absorbancia de los estándares y de las muestras a una longitud de onda de 600 nm empleando un colorímetro Spectronic 20D+ (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA).

Medición de cobre (II)

La medición de cobre (II) se realizó utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica 210 VGP (BuckScientific, CT, USA). La medición de cobre se llevó a cabo a una longitud de onda de 324 nm. Primero se construyeron curvas de calibración utilizando una solución madre de 1000 mg L⁻¹ de cobre (II) en forma de CuCl₂, a partir de la solución madre se realizaron diluciones en serie hasta obtener estándares de 1, 2, 3, 4, 5 mg L⁻¹. Posteriormente, se procedió a medir la concentración de cobre (II) en el efluente del reactor físico-químico.

Actividad metanogénica

El volumen del gas metano generado durante el funcionamiento del bioreactor se determinó mediante un método de desplazamiento de líquido utilizando una botella de suero. El reactor continuo se conectó mediante una manguera a una botella de suero (160 mL colocada de forma inversa), suministrada con la solución de NaOH (2%) previamente sellada con un tapón de caucho y una tapa de aluminio. El biogás formado en el bioreactor anaeróbico está compuesto por dióxido de carbono y metano. A medida que el dióxido de carbono (CO₂) pasa a través de la solución de hidróxido de sodio, éste 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, la actividad metanogénica máxima específica se determina en términos de CH₄-DQO g⁻¹ SVS d⁻¹[13].

2.3.4 Sistema de tratamiento biológico-físico-químico (BFQ) de los DAM

El sistema de tratamiento biológico-físico-químico (BFQ) de los DAM está formado por dos reactores conectados en serie. El primer reactor fue empacado con arena y bacterias sulfato reductoras presentes en los lodos de la Universidad San Francisco de Quito; en dicho reactor se buscó reducir el sulfato a sulfuro así como aumentar el pH del afluente. El segundo reactor conectado a continuación del primero tuvo como fin producir la precipitación de sulfuros metálicos utilizando el sulfuro biogénico producido en el primer bioreactor. La Figura 2.1 presenta el diagrama de bloques y el esquema del sistema de tratamiento biológico-físico-químico de los DAM.

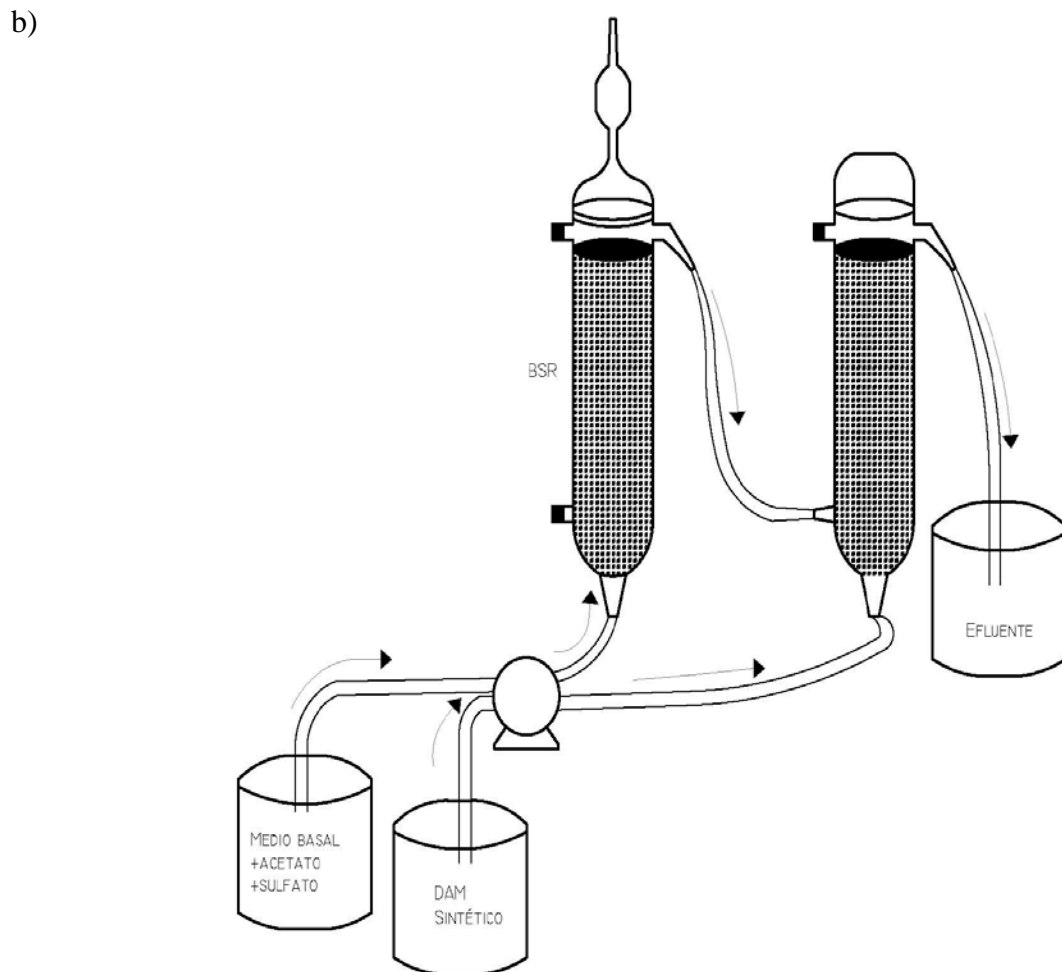
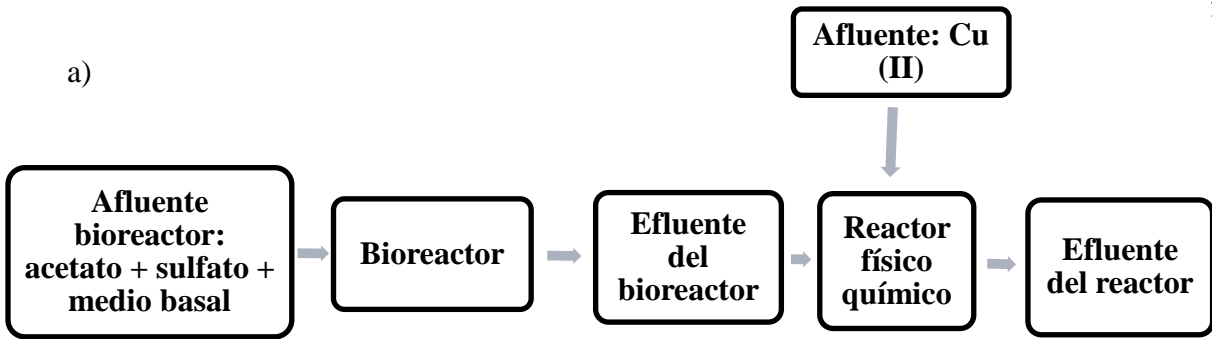


Figura 2.1: Diagrama de bloques (a) y esquema del diseño del sistema de tratamiento de los drenajes ácidos de mina utilizando dos reactores en serie: un bioreactor y un reactor físico-químico (b).

Estabilización del reactor biológico

En un estudio previo se evaluó el potencial de generación de sulfuro por la acción de bacterias sulfato-reductoras utilizando diferentes sustratos e inóculos microbianos en experimentos batch obteniendo como mejor sustrato el acetato y como mejor inóculo los sedimentos de la laguna artificial de la Universidad San Francisco de Quito [13]. En base a estos resultados se procedió a montar el reactor biológico para producir sulfuro.

El bioreactor de vidrio fue construido con un volumen de operación de 480 mL y 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. El bioreactor de 5.5 cm de diámetro y 46 cm de largo fue alimentado con un flujo ascendente de $0.21\text{-}0.24 \text{ mL min}^{-1}$ en promedio proporcionado por una bomba peristáltica (Peri-Star Pro Peristaltic Pump, Florida, Estados Unidos) (Figura 2.2)

El bioreactor fue alimentado con un afluente sintético compuesto por el medio basal mineral como medio de cultivo, acetato como donador de electrones y fuente de carbono, y sulfato como aceptor terminal de electrones durante la sulfato-reducción microbiana. El acetato como acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) fue alimentado al bioreactor en una concentración de $2.5 \text{ mg DQO-acetato L}^{-1}$, mientras que la concentración de sulfato como sulfato de sodio (Na_2SO_4) alimentada fue de 4000 mg L^{-1} durante los primeros 139 días de funcionamiento del bioreactor y a partir del día 140 la concentración del sulfato de sodio disminuyó a 3000 mg L^{-1} con el propósito de mejorar el rendimiento de producción de sulfuro y así optimizar el reactor. 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. El bioreactor y las conexiones para el transporte del líquido fueron cubiertos con papel aluminio con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias fotolitotróficas.

La generación de sulfuro biogénico, la demanda química de oxígeno del afluente y del efluente del bioreactor, el pH del afluente y efluente del bioreactor, y el flujo fueron monitoreados continuamente.



Figura 2.2 Fotografía del reactor biológico. El bioreactor de flujo ascendente fue empacado con 15 g SVS L^{-1} de los sedimentos de la laguna artificial de la USFQ soportados en arena y alimentado con medio basal mineral con $2500 \text{ mg DQO-acetato L}^{-1}$ como donador de electrones y 3000 mg L^{-1} de sulfato como aceptor de electrones en modo de operación continuo (Fotografía tomada por Lorena Gallardo).

Puesta en marcha del reactor físico-químico

El reactor físico-químico fue construido en vidrio con un volumen de operación de 324 mL. El reactor consta de un puerto para muestreo y medición de pH así como de dos puertos de entrada y uno de salida. El puerto de entrada en la parte lateral del reactor está conectado en serie con el reactor biológico, es así que el efluente del bioreactor conformado por sulfuro biogénico es el primer afluente del reactor físico-químico. La concentración de sulfuro biogénico generada en el bioreactor fue de aproximadamente de 130 mg L⁻¹ de sulfuro con valores de pH mayores a 8 después de 401 días de operación. El segundo afluente del reactor físico-químico ingresa por el puerto que está en la base y consiste en una solución de DAM sintética de 30 mg L⁻¹ de cobre (II) como CuCl₂ y pH igual a 2.7. El reactor fue operado en modo continuo, alimentado con un flujo ascendente proporcionado por una bomba peristáltica (Peri-Star Pro Peristaltic Pump, FL, Estados Unidos) de 0.21 - 0.24 mL min⁻¹ en promedio por cada afluente; es decir, en total ingresaron al reactor físico-químico entre 0.42 - 0.48 mL min⁻¹. Las conexiones se realizaron con sondas naso-gástricas de marca Medex No. 8 y 10. El reactor fue empacado con 360 g de arena de densidad 1.11 g mL⁻¹. La arena fue previamente tamizada con un grosor de malla 8 (>2 mm) y funcionó como soporte para el sulfuro de cobre precipitado. El tiempo de residencia fue calculado en base al volumen de operación y el flujo, y fue de 0.6 días. La temperatura de operación del reactor fue de 30 ±2 °C. El control de temperatura se realizó con un controlador universal y un relé de estado sólido en una incubadora donde se ubicó el sistema de tratamiento BFQ. Tanto el reactor como las conexiones para el transporte del líquido fueron cubiertos con papel aluminio con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias fotolitotróficas.

El pH de los afluentes y del efluente del reactor físico-químico, el flujo y el porcentaje de remoción de cobre fueron monitoreados periódicamente.

La Figura 2.3 muestra una fotografía del reactor físico-químico en operación y la Figura 2.4 muestra una fotografía del sistema de tratamiento biológico-físico-químico (BFQ) de los DAM desarrollado y puesto en marcha en este estudio.

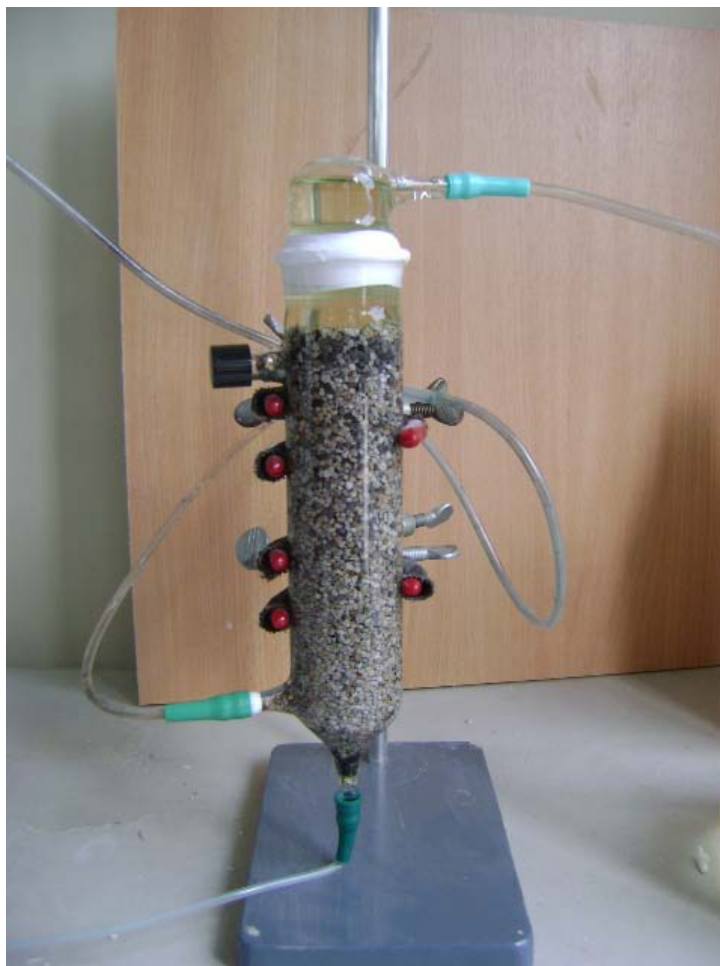


Figura 2.3: Fotografía del reactor físico-químico conectado en serie con el reactor biológico. El reactor fue empacado con arena y alimentado simultáneamente por el puerto que está en la base con DAM sintético con 30 mg L^{-1} de cobre (II) y pH 2.7, y por el puerto lateral inferior con sulfuro biogénico en una concentración de aproximadamente 130 mg L^{-1} . (Fotografía tomada por Lorena Gallardo).



Figura 2.4 Fotografía del sistema de tratamiento biológico-físico-químico (BFQ) de los drenajes ácidos de mina. El bioreactor de flujo ascendente fue alimentado con una muestra sintética compuesta por acetato (2.5 g DQO L^{-1}), sulfato (3000 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. El reactor físico-químico de flujo ascendente fue empacado con arena y alimentado simultáneamente por el puerto lateral inferior con el sulfuro biogénico generado en el bioreactor en una concentración de 130 mg L^{-1} aproximadamente y por el puerto que está en la base con DAM sintético con 30 mg L^{-1} de cobre (II) y pH 2.7. (Fotografía tomada por Lorena Gallardo).

2.4 Resultados y Discusión

2.4.1 *Estabilización del reactor biológico*

En un estudio previo se evaluó en ensayos batch la eficiencia de diferentes sustratos tales como acetato, lactato, etanol y peptona como donadores de electrones durante la sulfato-reducción bacteriana empleando diferentes inóculos microbianos. El acetato demostró ser el mejor donador de electrones junto con el inóculo microbiano proveniente de la laguna artificial de la Universidad San Francisco de Quito, con una producción de sulfuro acumulada de $455 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ después de 40 días de tratamiento [13]. En base a estos resultados se montó el reactor biológico empleando acetato como sustrato y donador de electrones y los sedimentos de la laguna artificial de la Universidad San Francisco de Quito como inóculo microbiano.

En el presente estudio se monitoreó y estabilizó la producción de sulfuro en el 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 reactor biológico fue estabilizado durante 253 días, a partir de este día se conectó el reactor físico-químico y el sistema de tratamiento BFQ empezó a operar hasta el final del presente estudio.

La Figura 2.5 muestra la variación del pH del afluente y del efluente del reactor biológico con el tiempo. El pH del afluente fue constante y se mantuvo alrededor de 7.1 y 7.3; mientras que el pH del efluente presentó valores más altos con variaciones entre 8.0 y 9.0 bajo condiciones de operación normales. Esta elevación del pH se debe a que durante el proceso de reducción de sulfato a sulfuro mediado por las bacterias sulfato-reductoras utilizando acetato como donador de electrones se producen bicarbonatos como productos intermedios los mismos que

aumentan la alcalinidad y por tanto, incrementa el pH [14]. Por ejemplo, en un estudio realizado por Qiu et al. Se aisló una cepa de bacterias sulfato-reductoras, después de 7 días de estudio se observó un cambio en el pH de la muestra variando de 6 a 7.5 bajo condiciones anaeróbicas. Este es un claro indicador de que la oxidación de una fuente de carbono orgánica genera la formación de productos intermedios tales como el bicarbonato [15]. Existe una correlación muy fuerte entre la concentración residual de sulfato y el pH del efluente; mientras el sulfato residual es menor por lo tanto mayor formación de sulfuro, el pH del medio también es mayor. Es decir, cuando el sulfato ha sido completamente utilizado por las BSR, se registra mayor producción de sulfuro, por lo tanto mayor consumo de la fuente orgánica, en este estudio el acetato, entonces el pH del medio es mucho mayor debido a la formación de bicarbonato como producto intermedio que genera un aumento de la alcalinidad [16].

El monitoreo constante del pH se detuvo el día 55 durante aproximadamente un mes debido a la finalización de la primera parte del estudio el cual consistió en poner en marcha y monitorear el bioreactor evaluando así la efectividad de las bacterias sulfato-reductoras presentes. Es así que el día 90 se retoma el monitoreo normalmente hasta el final del presente estudio.

En el día 125 se puede observar un aumento significativo del pH a 9.8 – 10 debido a ingreso de NaOH en el bioreactor durante la evaluación de la actividad metanogénica. Las bacterias metanogénicas se caracterizan por competir con las sulfato-reductoras por la fuente de carbono bajo condiciones anaeróbicas. Con el objetivo de evaluar esta posible competencia se determinó la actividad metanogénica del cultivo microbiano presente en el bioreactor utilizando el método de desplazamiento de líquido que consiste en medir la cantidad de

metano producida atrapando el CO₂ en una solución de NaOH (2%) previamente sellada con un tapón de caucho y una tapa de aluminio, es así que el volumen de hidróxido de sodio desplazado es equivalente al volumen de metano formado [17]. Durante la medición de la actividad metanogénica, el puerto superior del bioreactor fue conectado con una manguera a la solución de hidróxido de sodio, después de 24 horas se observó que no había desplazamiento del líquido indicando que no existe actividad metanogénica. Por el contrario, horas más tarde el NaOH ingresó al bioreactor ocasionando cambios en el sistema. Es importante indicar que si bien es cierto el pH incrementó en aproximadamente una unidad, las BSR demostraron ser resistentes a cambios de pH y lograron sobrevivir en un medio tan alcalino aunque como era de esperarse con una producción de sulfuro significativamente menor a la obtenida en condiciones normales de operación. En un estudio realizado por Foti et al. se investigó la diversidad, actividad y abundancia de BSR en muestras de sedimentos y cultivos enriquecidos de varios lagos hipersalinos y muy alcalinos (con pH alrededor de 11) de Kulunda Steppe en el sudeste de Siberia, Rusia. Como resultado se observó en un análisis de secuencia comparativa, la presencia de varios grupos nuevos de BSR, principalmente relacionados al orden de Desulfovibrionales y la familia Desulfobacteraceae; además, se detectaron velocidades de sulfato-reducción entre 12 y 423 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para la mayoría de lagos [18]. Estos resultados indican la presencia de varias y diversas comunidades activas de BSR en estos ecosistemas extremos con pH muy alcalinos.

De igual manera, la composición del medio se vio afectada en el día 138 llegando a tener valores de pH de 9.34 en el afluente del bioreactor. Este cambio en el pH puede atribuirse a una descomposición del medio basal mineral antes de que el mismo entre en el bioreactor. Esta degradación ocurrió porque el medio basal mineral fue preparado en exceso, lo cual implica

mayor tiempo de almacenamiento dando lugar al crecimiento bacteriano y por lo tanto la descomposición del afluente (acetato).

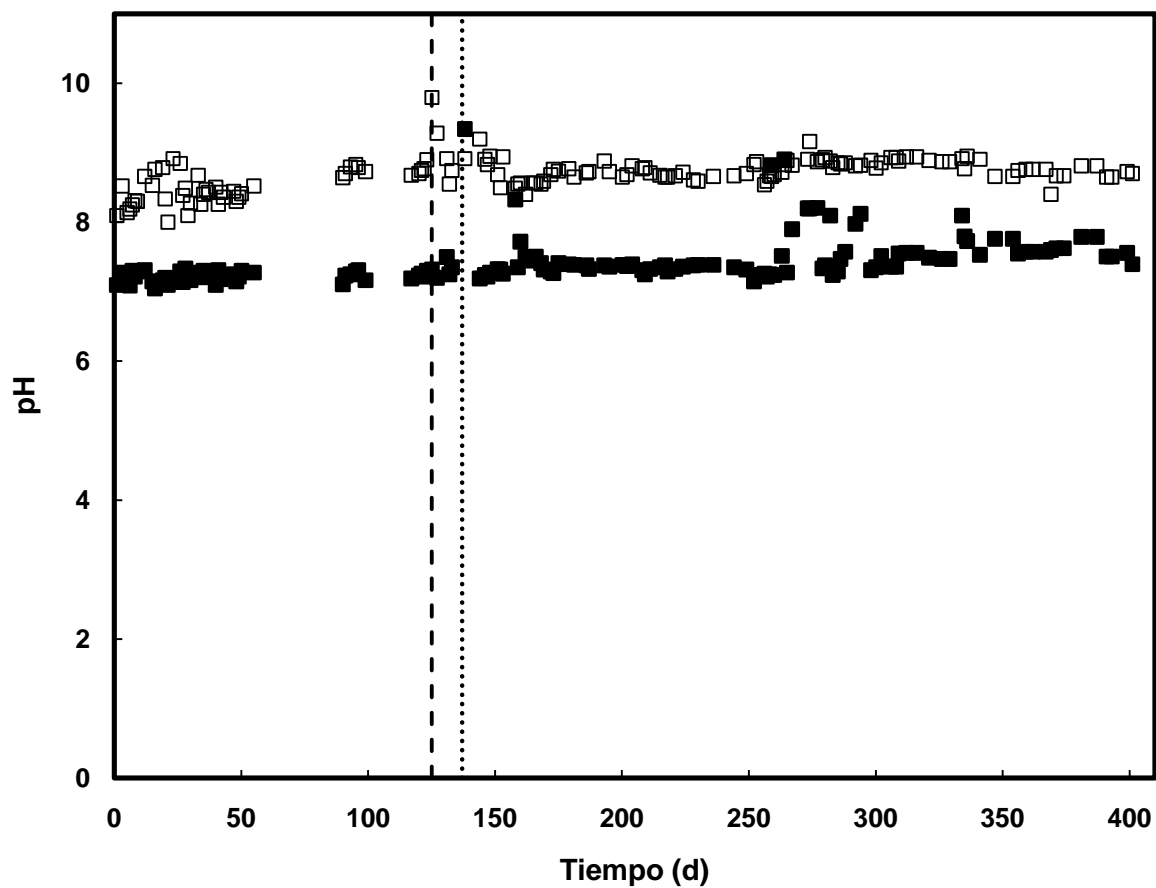


Figura 2.5 Variación del pH con respecto al tiempo en el afluente y efluente del bioreactor de flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con 15 g SVS L^{-1} de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO L^{-1} de acetato y 4000 mg L^{-1} de sulfato hasta el $t=139$ días y 3000 mg L^{-1} de sulfato a partir del $t=140$ días. Leyenda: (■) pH del afluente; (□) pH del efluente; (---) Ingreso de NaOH al bioreactor; (.....) Degradación del afluente.

En la Figura 2.6 se presenta la variación del flujo del reactor biológico con respecto al tiempo. En términos generales se puede observar que el flujo del bioreactor se mantuvo constante entre 0.21 a 0.24 mL min⁻¹ a lo largo de los 252 días de operación salvo dos ocasiones, en los días 125 y 252. La variación de los valores del caudal se deben principalmente a que la medición fue realizada pesando el efluente del bioreactor lo cual pudo ocasionar errores instrumentales. En el día 125 se produjo un incremento del flujo debido al ingreso de NaOH al bioreactor, mientras que en el día 252 se produjo una disminución del caudal debido a una mala conexión en la manguera de alimentación. Evidentemente, el valor más alto registrado para el flujo se dio el día 125 en que el NaOH ingresó al reactor debido al procedimiento descrito previamente donde se acumuló el volumen tanto del bioreactor como de la solución de NaOH; el valor obtenido fue de 0.28 mL min⁻¹. Una vez que se solucionaron los inconvenientes descritos anteriormente, el flujo del bioreactor se estabilizó. A partir del día 253 el reactor físico químico fue conectado al bioreactor completando de esta manera el sistema híbrido; en la siguiente sección se describirá el flujo del sistema completo de tratamiento BFQ de los DAM.

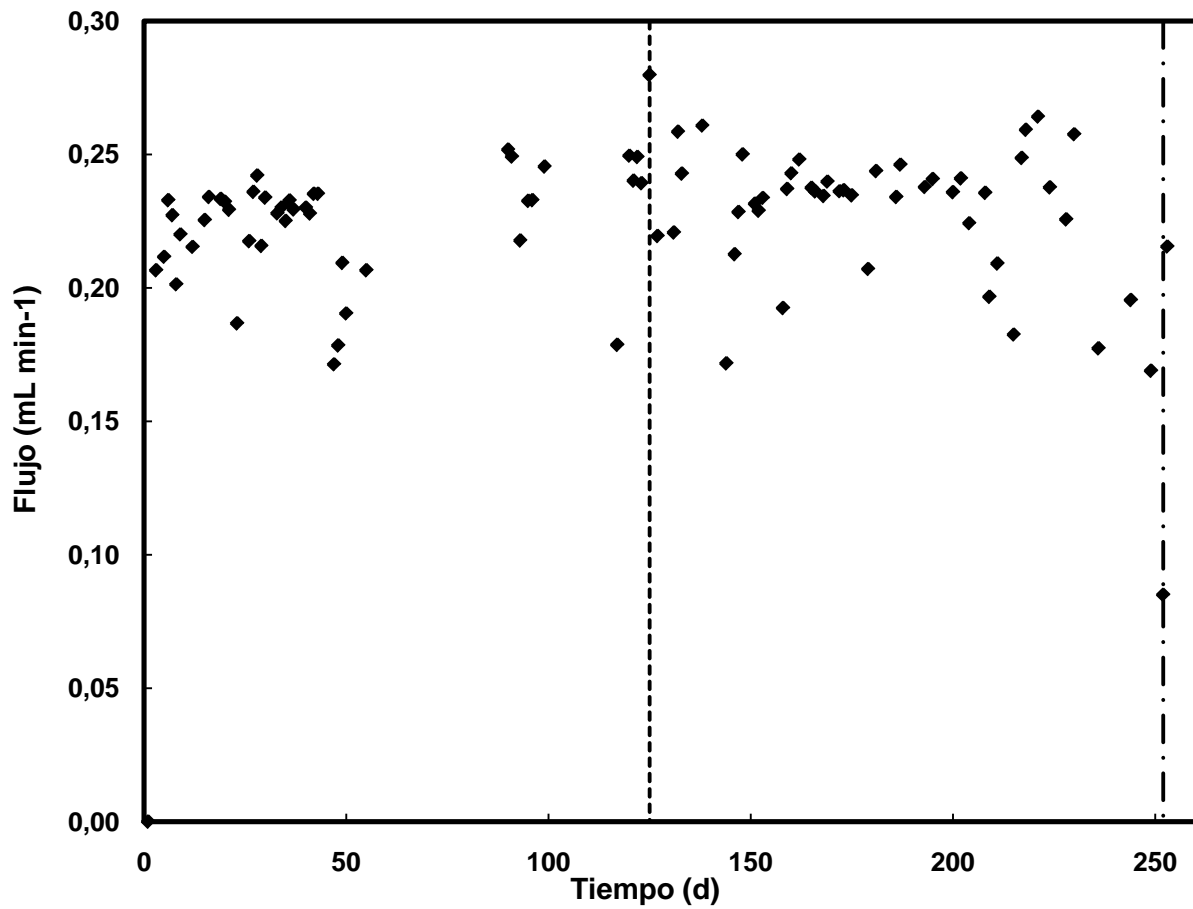


Figura 2.6 Variación del flujo con respecto al tiempo en el bioreactor de flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con 15 g SVS L^{-1} de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO L^{-1} de acetato y 4000 mg L^{-1} de sulfato hasta el $t= 139$ días y 3000 mg L^{-1} de sulfato a partir del $t=140$ días. Leyenda: (-----) Ingreso de NaOH al bioreactor; (— · —) Fuga en las mangueras.

En la Figura 2.7 se presenta la producción de sulfuro en el reactor biogénico durante 401 días de operación. En esta figura se puede observar que durante los primeros 125 días, la producción de sulfuro tiene un comportamiento exponencial, mismo que es propio de la fase de crecimiento bacteriano hasta llegar a alcanzar una concentración máxima de 293 mg L^{-1} en el día 125. Como se describió anteriormente, el ingreso de NaOH en el día 125 provocó un aumento del pH a 10, lo cual afectó a las BSR presentes en el bioreactor disminuyendo significativamente su actividad microbiana en un factor de 10 llegando a registrar valores de sulfuro biogénico de 35 mg L^{-1} . Si bien es cierto que entre el día 135 y 139 las bacterias sulfato-reductoras lograron recuperar su actividad metabólica, el sistema se recuperó parcialmente llegando a generar valores de sulfuro biogénico de aproximadamente 200 mg L^{-1} , equivalente aproximadamente un 70% de la producción máxima de sulfuro biogénico.

Gutiérrez et al. analizaron los efectos de elevar el pH por largos períodos de tiempo en biofilms de bacterias sulfato-reductoras. En dicho estudio se estabilizó la producción de sulfuro durante 45 días y a partir de entonces se inyectó NaOH en el reactor experimental. Se pudo concluir que la actividad sulfato reductora fue reducida en un 30 y 50% con valores del pH de 8.6 y 9.0, respectivamente. Una vez que se restableció el pH normal a 7.0, la actividad de las BSR se recuperó totalmente en aproximadamente un mes [19]. En contraste, en el presente estudio las bacterias lograron recuperar su actividad metabólica en un 70% en aproximadamente 10 a 15 días.

Una vez que la generación de sulfuro biogénico se estabilizó, en el día 140 se cambió la concentración de sulfato de 4000 a 3000 mg L^{-1} para asemejar el afluente a los DAM típicos y así poder además optimizar el sistema. Inmediatamente, se observó una disminución en la producción de sulfuro biogénico seguida de un incremento óptimo llegando a recuperar

totalmente la actividad metabólica inicial de las BSR, es así que se registraron valores de 293 mg L⁻¹ en el día 186. Esta recuperación de la actividad microbiana de generación de sulfuro debido a una disminución en la concentración de sulfato puede deberse a varios factores. Una concentración de sulfato de 4000 mg L⁻¹ probablemente fue muy elevada y se encontraba en exceso, generando toxicidad microbiana y por lo tanto la inhibición de la actividad metabólica de las BSR lo cual impedía tener un rendimiento totalmente positivo en la producción de sulfuro. En un estudio realizado por Al Zuhair y colaboradores se analizó el crecimiento microbiano de BSR variando las concentraciones iniciales de sulfato desde 500 hasta 4000 mg L⁻¹ a 35°C y pH 7; los resultados obtenidos demostraron que existe inhibición del crecimiento microbiano en presencia de 4000 mg L⁻¹[20]. La velocidad específica de crecimiento incrementó de manera lineal de 0.0079 min⁻¹ con una concentración de sulfato de 500 mg L⁻¹ a 0.0083 min⁻¹ con una concentración de 2500 mg L⁻¹ de sulfato, luego decayó a 0.0063 min⁻¹ con 4000 mg L⁻¹ de sulfato. Estos resultados claramente muestran una inhibición en presencia de un exceso de sulfato [20].

La generación de sulfuro biogénico se estabilizó en el período de tiempo comprendido entre el día 175 y 186 alcanzando valores entre 270 y 296 mg L⁻¹. Lamentablemente, en el día 194 se produjo un cambio brusco de temperatura debido a una falla mecánica en la incubadora, la temperatura disminuyó de 30 a 20°C. Este incidente resultó en una disminución en la actividad de generación de sulfuro en un 30%. Finalmente, a partir del día 195 se logró estabilizar el bioreactor alcanzando una concentración de sulfuro promedio de 200 mg L⁻¹. White y Gadd investigaron el efecto de la temperatura en la producción de sulfuro catalizada por las BSR, la concentración de sulfuro incrementó en un 50% cuando la temperatura aumentó de 5 a 20°C; mientras que la concentración de sulfuro biogénico se duplicó cuando la temperatura aumentó

a 30 °C, siendo ésta la temperatura óptima [21]. Estos resultados coinciden con los resultados reportados en esta investigación ya que la temperatura óptima de operación en la cual las bacterias mantuvieron su producción de sulfuro estable fue aproximadamente 30 °C.

El bioreactor fue estabilizado hasta alcanzar una producción promedio de 200 mg L⁻¹ de sulfuro desde el día 200 hasta el día 253. En el día 253 se montó el sistema de tratamiento físico-químico y biológico de los DAM conectando el reactor físico-químico a continuación del reactor biológico. Se puede observar que a partir de la conexión el sistema se redujo la concentración de sulfuro a 130 mg L⁻¹; esto se debe principalmente a que el momento de realizar las conexiones se da paso a una mínima entrada de oxígeno en el bioreactor lo cual es nocivo para las BSR ya que las mismas son anaeróbicas. Sin embargo, a partir del día 253 se estabiliza la producción de sulfuro hasta finalizar con el estudio en el día 401 con una concentración de sulfuro de aproximadamente 130 mg L⁻¹.

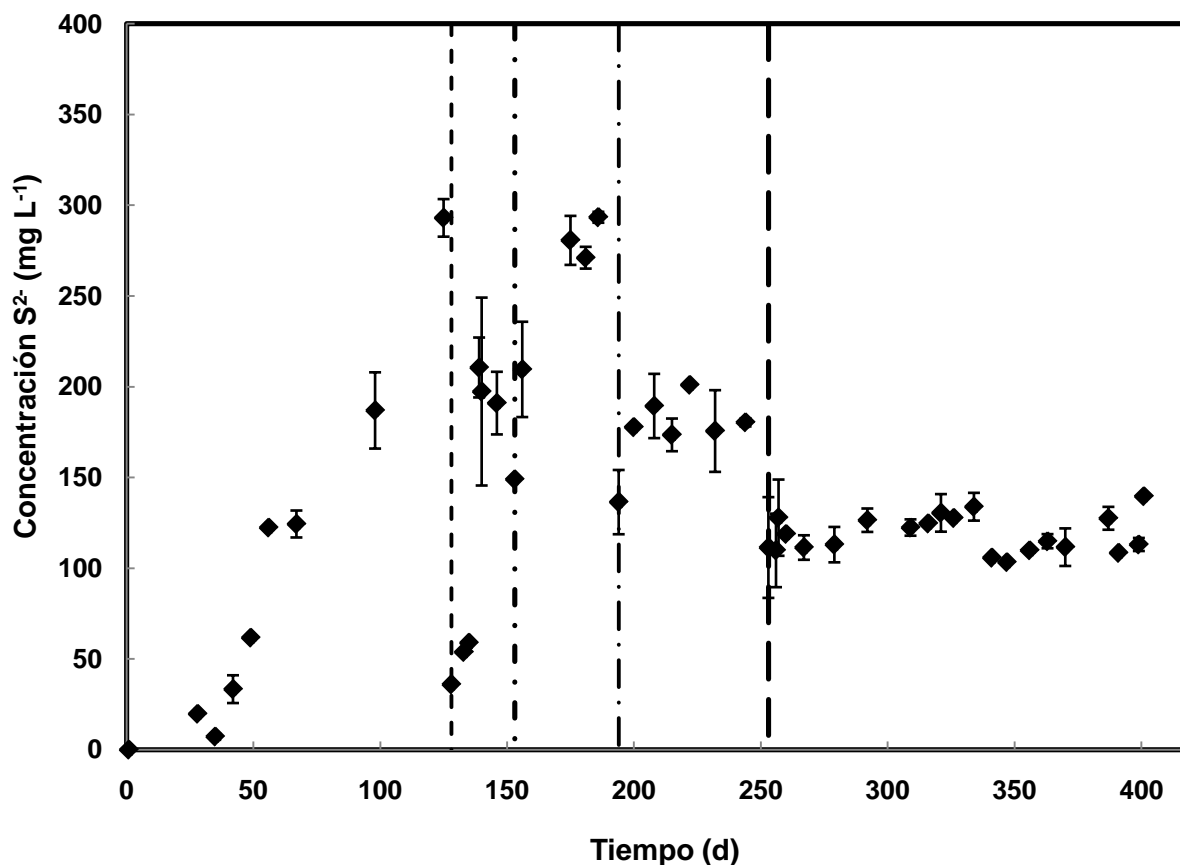


Figura 2.7 Producción de sulfuro con respecto al tiempo en el bioreactor de flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con 15 g SVS L^{-1} de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO L^{-1} de acetato y 4000 mg L^{-1} de sulfato hasta el $t=140$ días y 3000 mg L^{-1} de sulfato a partir del $t=140$ días antes y después de haber instalado el reactor físico-químico. Leyenda: (---) Ingreso de NaOH al reactor $t=128$ d; (-.-) Cambio en la concentración de sulfato $t=153$; (-.-) Disminución de temperatura $t=194$; (—) Montaje del reactor físico químico en el $t=253$ d. Las barras de error representan desviaciones estándares de muestras analizadas por triplicado.

La demanda química de oxígeno (DQO) en el afluente y efluente del reactor biológico también se monitoreó siguiendo el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos. El porcentaje de remoción de la DQO en el bioreactor con respecto al tiempo de operación se presenta en la Figura 2.8. Durante los primeros días de operación del bioreactor, la remoción de DQO incrementó hasta llegar a estabilizarse en 13% aproximadamente, a partir del día 97 la remoción incrementó de manera significativa hasta llegar a una remoción máxima alcanzada de 24% en el día de operación 208, valor que se mantuvo constante en las siguientes mediciones después de conectar el reactor físico-químico.

Estudios similares de sulfato-reducción microbiana empleando fuentes de carbono orgánicas reportan porcentajes de degradación de DQO significativamente mayores a los encontrados en esta investigación. Por ejemplo, Sahinkaya et al. lograron una remoción del 85% de la DQO en un reactor anaeróbico alimentado con etanol como fuente de carbono [14]. Por otro lado, en una investigación realizada por Celis y colaboradores, se utilizó un reactor anaeróbico de flujo descendente para promover el crecimiento de bacterias sulfato-reductoras y producir sulfuro; en dicho estudio se logró remover el 80% de la DQO luego de 85 días de operación continua; sin embargo, durante los primeros 50 días de operación se observaron porcentajes de remoción tan bajos como 18%, valor consistente con el obtenido en el presente estudio (24%) [22].

El porcentaje de remoción de DQO del presente estudio es menor que el de estudios similares, lo cual puede ser atribuido a la relación DQO/SO_4^{2-} manejada en el bioreactor. Velasco et al, evaluaron el efecto de la relación entre DQO y SO_4^{2-} en la producción de sulfuro biogénico por las BSR. El valor recomendado de DQO/SO_4^{2-} para tratar drenajes ácidos de mina que contienen metales pesados en el rango entre 10 y 100 mg L⁻¹ se demostró que debía ser igual o mayor a 1.5 [23]. La relación entre DQO/SO_4^{2-} en la presente investigación corresponde a

aproximadamente 0.83 con una concentración de sulfato de 3000 mg L⁻¹, este valor está por debajo de lo recomendado, lo cual implica que el sulfato está concentraciones elevadas, por lo que si se baja la concentración de sulfato la relación DOQ/SO_4^{2-} subiría y probablemente se tendrían mayores porcentajes de remoción de DQO.

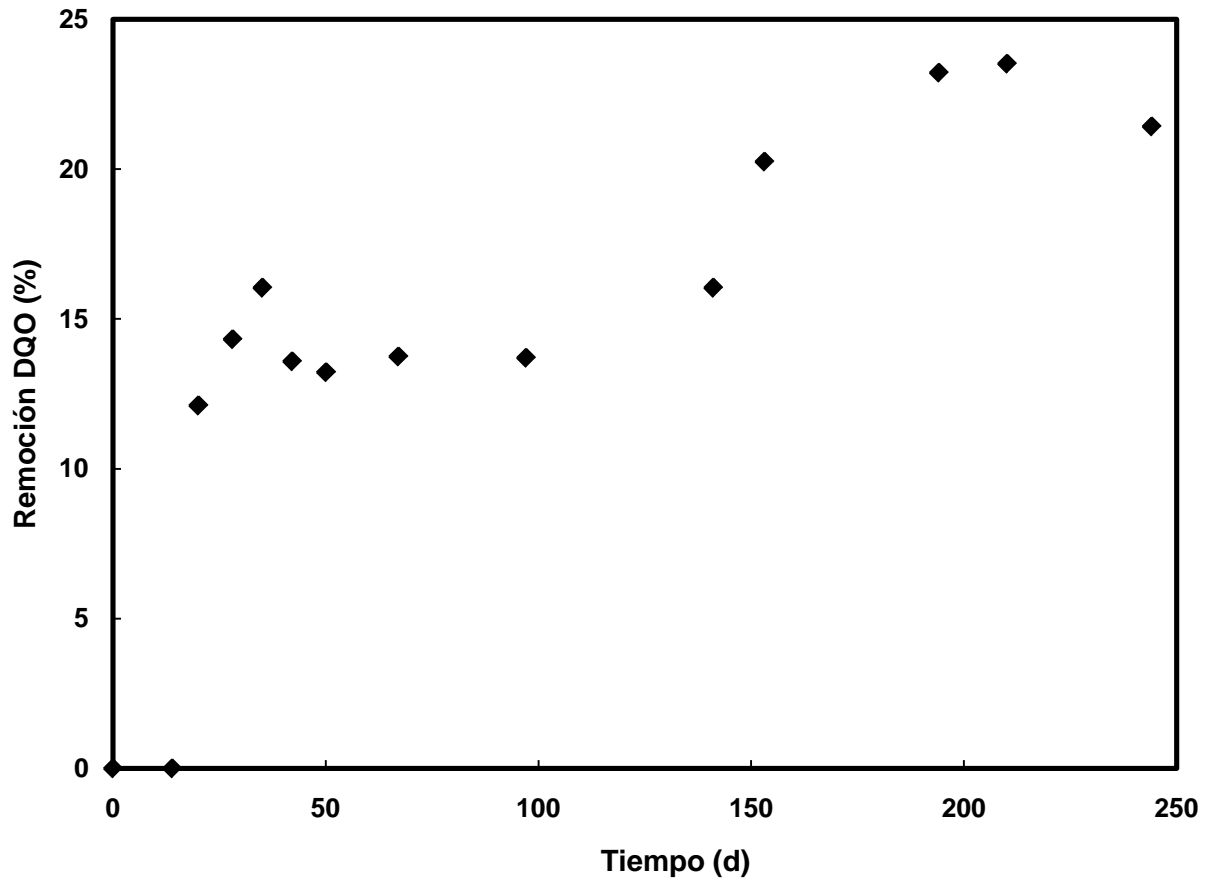


Figura 2.8 Porcentaje de remoción de la demanda química de oxígeno (DQO) con respecto al tiempo en el bioreactor de flujo ascendente en modo de operación continuo empacado con 15 g SVS L⁻¹ de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con una muestra sintética de 2.5 g DQO L⁻¹ de acetato y 4000 mg L⁻¹ de sulfato hasta el t= 140 días y 3000 mg L⁻¹ de sulfato a partir del t=140 días.

2.4.2 Montaje del reactor físico-químico a continuación del reactor biológico

El objetivo de este proyecto de investigación fue evaluar el potencial de aplicación del sistema de tratamiento biológico-físico-químico (BFQ) compuesto de un bioreactor y un reactor físico-químico conectados en serie para la remediación de los DAM generados durante las actividades mineras. En el bioreactor las bacterias sulfato-reductoras generan sulfuro, y dicho sulfuro es alimentado al reactor físico-químico en el que ocurre la precipitación de metales pesados tales como cobre (II) que precipita como sulfuro de cobre.

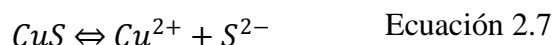
El sistema de tratamiento BFQ se encuentra descrito en detalle en la sección de Materiales y Métodos. Una vez que el bioreactor fue estabilizado se conectó en serie el reactor físico-químico en el día 253 como se mencionó previamente y el sistema BFQ operó por un período de 148 días. El reactor físico-químico, conectado en serie al reactor biológico, fue alimentado tanto del efluente del reactor biológico con una concentración de sulfuro promedio de 130 mg L⁻¹ así como con una muestra sintética de DAM con 30 mg cobre (II) L⁻¹ y pH igual a 2.7. Dicho reactor estuvo empacado con arena para retener los sulfuros metálicos formados y precipitados, y fue operado con flujo ascendente en modo continuo utilizando una bomba peristáltica con el mismo caudal de alimentación del reactor biológico descrito en la Figura 2.2.

La producción de sulfuro en el bioreactor del sistema de tratamiento BFQ de los DAM se puede observar en la Figura 2.7, que fue descrita en la sección anterior. De dicha gráfica se puede apreciar que el sistema tardó 253 en estabilizarse alcanzando una producción aproximada de 130 mg sulfuro L⁻¹ hasta el final del presente estudio.

El porcentaje de remoción de sulfuro en el reactor físico-químico fue muy bajo. Los primeros valores de remoción estuvieron alrededor de 50% después de 14 días de operación del reactor

físico químico, luego bajaron hasta valores cercanos a cero y finalmente llega a un valor de 4% de remoción. Esto considerando la dilución producida al mezclar el sulfuro biogénico con la muestra sintética de cobre (II) sintético en el reactor físico químico. La remoción de sulfuro tan baja se debe a que la precipitación de cobre (II) en forma de sulfuro de cobre (CuS) requiere de una cantidad mínima de sulfuro. El producto de solubilidad de muchos sulfuros metálicos es extremadamente bajo, por ejemplo de CuS, PbS, CdS, NiS, CoS, y ZnS varían desde 2×10^{-37} hasta $10^{-20.4}$, lo cual implica que los metales precipitan en forma de sulfuros metálicos y no en forma de hidróxidos metálicos ya que el producto de solubilidad de estos últimos, es mayor [24].

En equilibrio, la cantidad que se requiere para remover 15 mg cobre (II) L^{-1} (considerando la dilución 2:1 en la entrada del reactor físico-químico) puede conocerse de acuerdo a la estequiometría de la reacción siguiente:



Es así que teóricamente la cantidad de sulfuro que se requiere para precipitar el cobre (II) es aproximadamente 7 mg L^{-1} . Este valor es comparable con el obtenido en la práctica ya que al haber tenido un porcentaje de remoción de aproximadamente 4%, se conoce que el sulfuro que se utilizó estuvo alrededor de 5 mg L^{-1} .

En un estudio realizado por Sampaio et al., el cobre fue precipitado de manera continua y selectiva utilizando Na_2S . En presencia de una concentración de 600 mg cobre (II) L^{-1} en el afluente y un pS de 25 ($pS = -\log(S^{2-})$), se obtuvo un porcentaje de remoción mayor a 99%. Estos demuestran la efectividad del sistema de tratamiento BFQ de los DAM y su gran

potencial de aplicación y además, respaldan el hecho de que se necesita poco sulfuro para precipitar el cobre (II) en forma de CuS [25].

En la Figura 2.9 se presenta la concentración de cobre en el afluente y en el efluente del reactor físico-químico del sistema de tratamiento BFQ de los DAM. Como se puede observar en esta figura, la concentración del afluente se mantuvo constante en $30 \text{ mg cobre (II) L}^{-1}$ durante el período de estudio desde que se realizó el montaje del reactor físico químico hasta el día de operación 148 del sistema completo de tratamiento BFQ; de igual forma, se puede observar que la concentración de cobre en el efluente disminuyó de manera significativa llegando a tener concentraciones menores a $1 \text{ mg cobre (II) L}^{-1}$ durante todo el período de estudio.

La remoción de cobre en el sistema de tratamiento BFQ demostró ser muy alta con valores entre 97 - 99% en promedio como se puede observar en la Figura 2.10. Durante la primera medición, la remoción de cobre registró el valor más bajo de 94% debido probablemente a una necesaria estabilización del sistema. En el día de operación 21 del sistema de tratamiento BFQ también se observó un valor bajo correspondiente al 95% de remoción de cobre y esto posiblemente se debe a errores de operación del sistema. Sin embargo, incluso los valores más bajos de remoción de cobre (94 y 95%) son valores muy altos y demostrando que el sistema BFQ es bastante exitoso y eficiente para el tratamiento de los DAM.

Resultados similares han sido reportados en la literatura científica. En un estudio realizado por Hsiu-Feng y colaboradores se evaluó el grado de precipitación de cobre en presencia de bacterias sulfato-reductoras y se pudo observar una remoción de cobre (II) de 99.2% después de un día de tratamiento [26]. De igual manera, Sierra-Álvarez et al. demostraron una eficiencia de remoción que superaba el 99% con concentraciones de cobre (II) de hasta $89 \mu\text{g}$

L^{-1} en el efluente de un sistema integrado entre un bioreactor sulfurogénico y un reactor de cristalización con un lecho de fluidización empacado de arena fina para facilitar la recuperación de cobre (II) [24].

En otro estudio, Meyla Chambe evaluó el porcentaje de remoción de cobre de una muestra sintética de DAM utilizando sulfuro biogénico producido con BSR alimentadas con diferentes sustratos en un reactor de 2 etapas. La concentración inicial de cobre fue de 106.6 mg L^{-1} y la final fue de 0.08 mg L^{-1} obteniendo así una remoción de 99.92% [27].

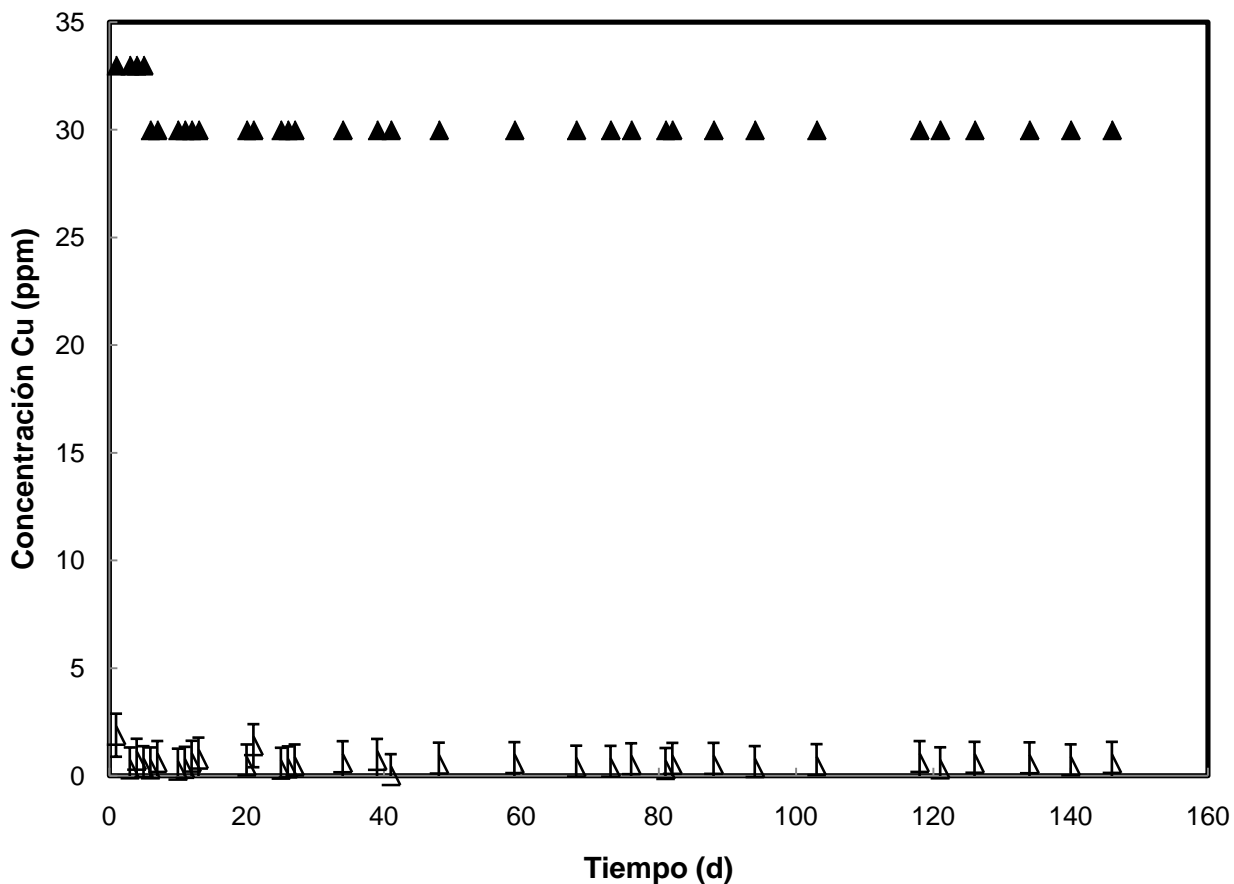


Figura 2.9: Concentración de cobre en el afluente y efluente del reactor físico-químico del sistema de tratamiento BFQ de los DAM con respecto al tiempo. El reactor físico-químico empacado con arena fue operado en modo continuo y conectado en serie con el bioreactor. El reactor físico-químico de flujo ascendente fue alimentado con 130 mg L^{-1} de sulfuro biogénico y con una muestra sintética de DAM de 30 mg L^{-1} de Cu (II) y pH igual a 2.7. Leyenda: (\blacktriangle) Afluente reactor físico-químico; (\triangle) Efluente reactor físico-químico. Las barras de error representan desviaciones estándares de muestras analizadas por triplicado.

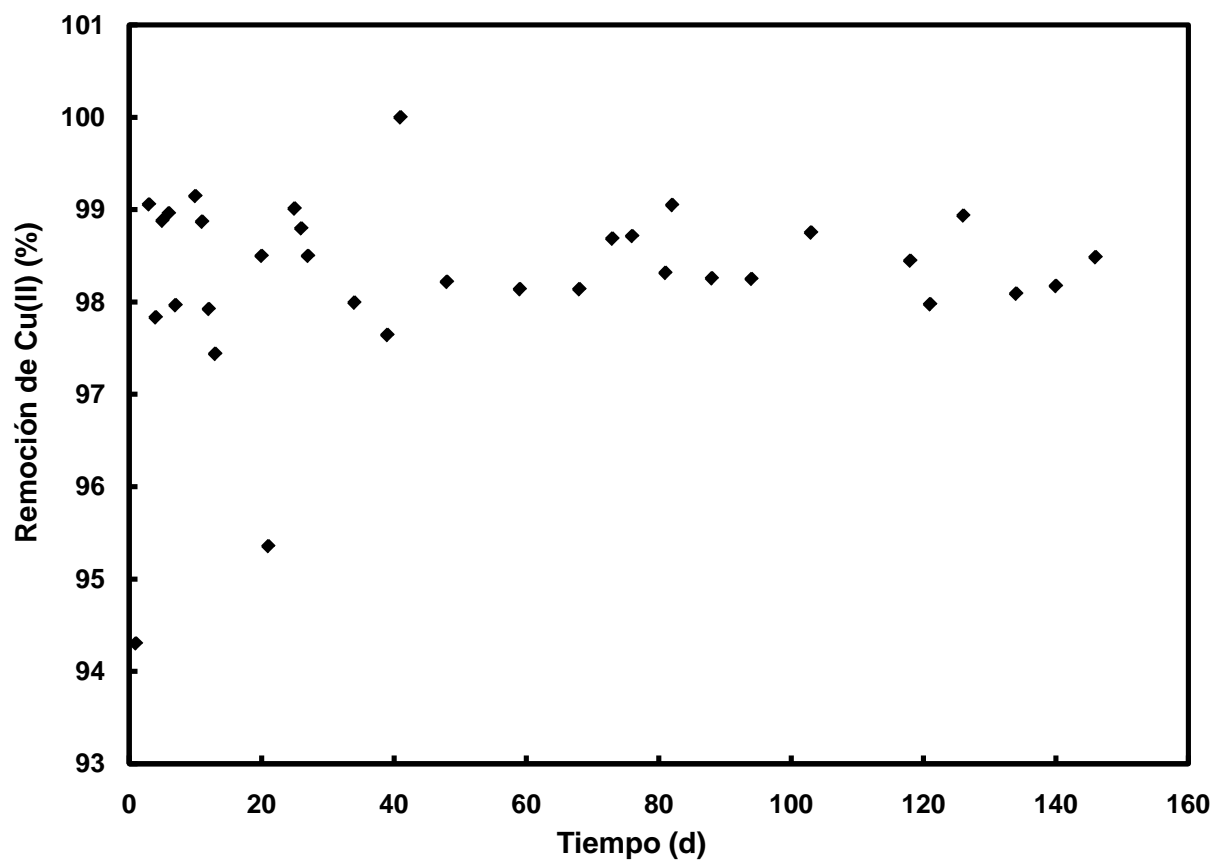


Figura 2.10: Porcentaje de remoción de cobre (II) en reactor físico-químico del sistema de tratamiento BFQ de los DAM con respecto al tiempo. El reactor físico-químico empacado con arena fue operado en modo continuo y conectado en serie con el bioreactor. El reactor físico-químico de flujo ascendente fue alimentado con 130 mg L^{-1} de sulfuro biogénico y con una muestra sintética de DAM de 30 mg L^{-1} de Cu (II) y pH igual a 2.7.

La Figura 2.11 presenta el pH de los diferentes afluentes y efluentes del sistema de tratamiento biológico-físico-químico evaluado en este estudio. Los valores de pH del afluente y efluente del reactor biológico fueron discutidos en detalle en la sección de estabilización del reactor biológico desde el montaje del mismo hasta la culminación del presente estudio (Figura 2.5). En la Figura 2.11 se puede observar claramente que en el sistema de tratamiento BFQ durante los 148 días de operación existe un incremento de pH. En el reactor biológico el pH aumentó de 7 hasta 8 y 9 en la salida, este efluente posteriormente se convirtió en el primer afluente del reactor físico-químico. El segundo afluente del reactor físico-químico fue la muestra sintética de DAM con valores de pH entre 2.7 y 3. Finalmente, el pH del efluente del reactor físico-químico fue de 8.5, lo cual demuestra la efectividad del sistema BFQ al cumplir con uno de los objetivos que fue incrementar el pH de los drenajes ácidos de mina tratados.

En un estudio realizado por Meyla Chambe en Perú, se observó al igual que en este estudio que existió una elevación de pH significativa en una muestra de DAM sintético sometida a tratamiento biológico con BSR; el valor inicial del pH fue de 2.21 y los valores finales estuvieron sobre 6.5 [27]. Por otro lado, en un estudio realizado por Nevatalo *et al.* se logró demostrar que en un reactor de lecho fluido empacado con BSR el pH varió de 4 en el afluente a 6.5-7.4 en una muestra de DAM sintética utilizando acetato como donador de electrones [6].

El flujo del reactor físico-químico se mantuvo constante con valores entre 0.34 y 0.49 mL min⁻¹ (Figura 2.12). Este valor equivale al doble del valor del flujo del reactor biológico (0.23 mL min⁻¹ en promedio aproximadamente) debido a que el reactor físico-químico tiene dos puertos de entrada, el primero correspondiente al efluente del reactor biológico y el segundo alimentado con una muestra sintética con cobre (II) con un caudal igual ya que se empleó la

misma bomba peristáltica en todo el sistema de tratamiento BFQ de los DAM. En dos ocasiones el flujo de salida del sistema híbrido BFQ disminuyó de manera significativa, días de operación del sistema 56 y 106 y ambos se atribuyen a problemas con el funcionamiento de las mangueras de conexión tales como taponamientos o rupturas de las mismas; sin embargo, estos incidentes no generaron un impacto significativo y tan pronto fueron resueltos, el sistema funcionó con normalidad.

En cuanto a la DQO medida en el sistema de tratamiento BFQ durante el período de estudio, se puede observar en la Tabla 2.1 que el valor de DQO en el afluente del reactor biológico fue de 2500 mg DQO L⁻¹ como se lo había diseñado y en el efluente del mismo el valor fue de aproximadamente 2000 mg DQO L⁻¹, lo cual indica una remoción de DQO de aproximadamente un 24% durante el período de estabilización del bioreactor. Por otro lado, el afluente y el efluente del sistema de tratamiento BFQ registraron valores de aproximadamente 1000 y 580 mg DQO L⁻¹, respectivamente; equivalente a una remoción de DQO de 42%.

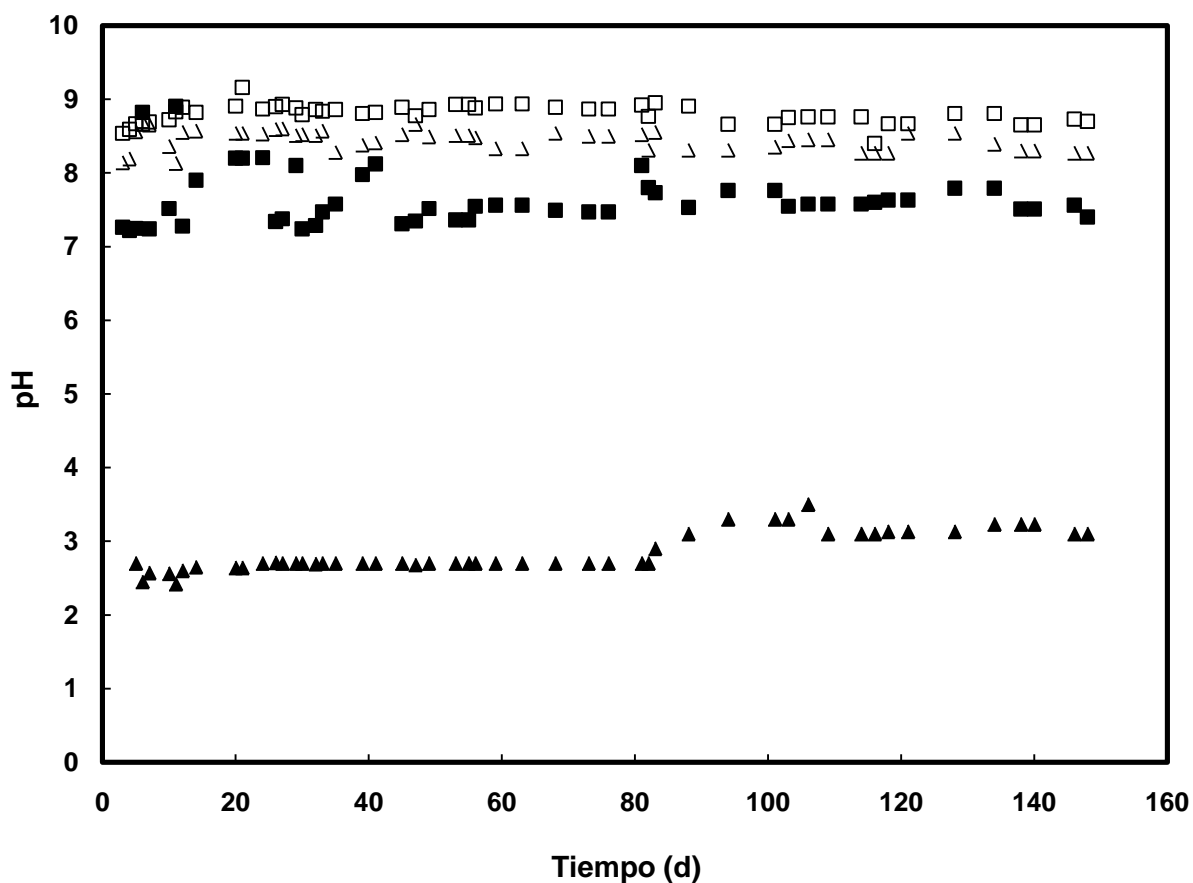


Figura 2.11: Variación del pH con respecto al tiempo en los afluentes y efluentes del bioreactor y del reactor físico-químico del sistema de tratamiento BFQ de los DAM con respecto al tiempo. . Leyenda: (■) pH del afluente del reactor biológico; (□) pH del efluente del reactor biológico y afluente del reactor físico-químico; (▲) pH del afluente del reactor físico-químico; (△) pH del efluente del reactor físico-químico

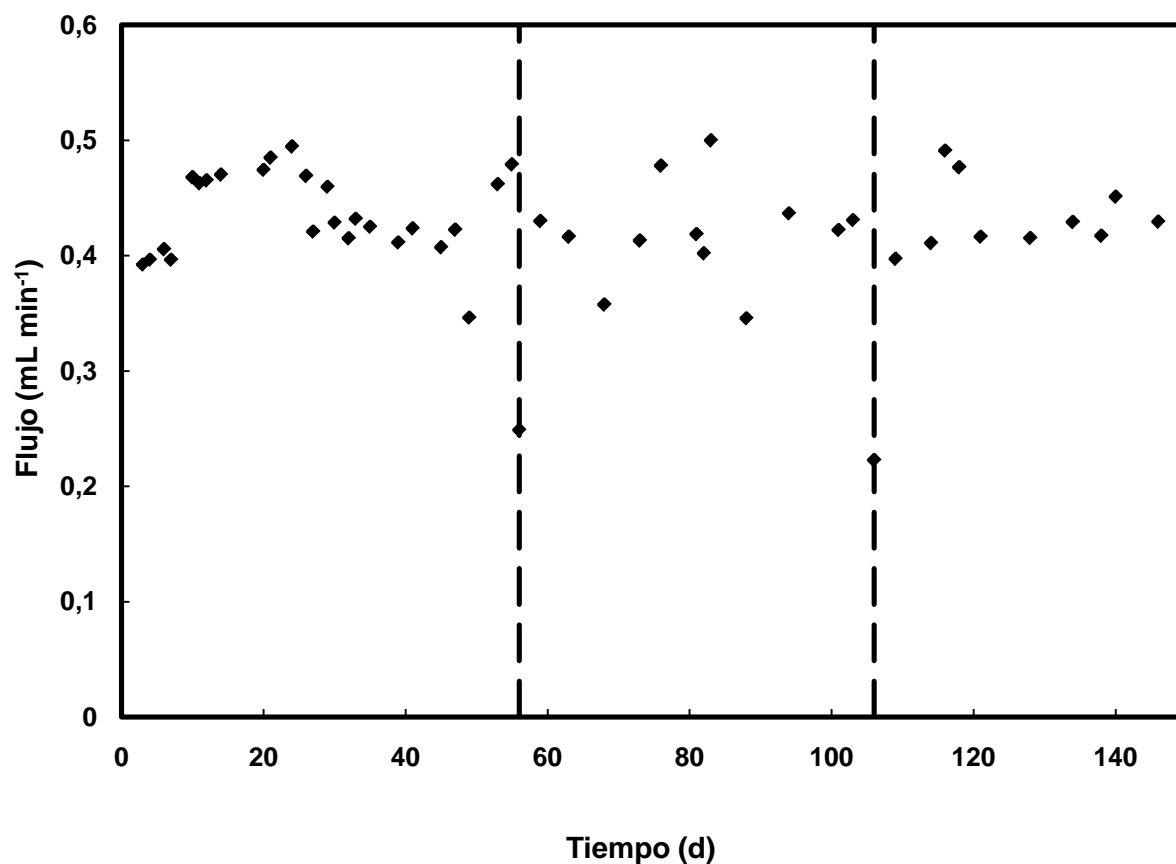


Figura 2.12: Variación del flujo en el reactor físico-químico del sistema de tratamiento BFQ de los DAM con respecto al tiempo. El reactor físico-químico empacado con arena fue operado en modo continuo y conectado en serie con el bioreactor. El reactor físico-químico de flujo ascendente fue alimentado con 130 mg L⁻¹ de sulfuro biogénico y con una muestra sintética de DAM de 30 mg L⁻¹ de Cu (II) y pH igual a 2.7. Leyenda: (— —) Fugas en mangueras.

Tabla 2.1 DQO en los puertos de alimentación y de salida del sistema de tratamiento BFQ de los DAM

Punto de medición	DQO (mg L ⁻¹)
Afluyente reactor biológico	2580.13
Efluente reactor biológico	2009.18
Afluyente reactor físico-químico	1004.59
Efluente reactor físico-químico	587.94

2.5 Conclusiones

En el presente estudio se desarrolló un sistema híbrido biológico-físico-químico para el tratamiento de los DAM compuesto por un reactor biológico conectado en serie con un reactor físico-químico que en conjunto lograron la generación biológica de sulfuro para luego utilizar este último para precipitar metales pesados.

La producción de sulfuro en el reactor biológico logró estabilizarse después de haber sufrido disminuciones significativas por cambios tanto de pH como de temperatura diferentes a los inicialmente establecidos. Sin embargo, el sistema biológico-físico-químico demostró tener una capacidad de regeneración bastante eficiente ya que se recuperó con normalidad después de haber presenciado cambios de estos parámetros.

El reactor físico químico empacado con arena sirvió como soporte para los sulfuros metálicos precipitados utilizando el sulfuro biogénico producido en el bioreactor.

Mediante este sistema, además de incrementar el pH de los DAM, se precipitó metales pesados obteniéndose porcentajes de remoción sumamente altos (> 98%) de manera que se pudo cumplir con los objetivos establecidos inicialmente. Se demostró así que el sistema es una buena alternativa para el tratamiento para los drenajes ácidos de mina producto de las actividades mineras y que podría ser aplicado para remediar sitios contaminados en Ecuador.

2.6 Referencias Bibliográficas

1. Hiibel, S.R., et al., *Microbial community analysis of two field-scale sulfate-reducing bioreactors treating mine drainage*. Environmental Microbiology, 2008. **10**(8): p. 2087-2097.
2. Usher, C.R., et al., *Origin of Oxygen in Sulfate during Pyrite Oxidation with Water and Dissolved Oxygen: An In Situ Horizontal Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy Isotope Study*. Environmental Science & Technology, 2004. **38**(21): p. 5604-5606.
3. Gerald Zagury, C.N., Bruno Bussière, *Passive Biological Treatment of Acid Mine Drainage: Challenges of the 21st. Century*, in *2e Symposium sur l'environnement et les mines organisé par l'ICM 2005*, École Polytechnique de Montréal: Rouyn-Noranda.
4. Pagnanelli, F., et al., *Bioassessment of a combined chemical-biological treatment for synthetic acid mine drainage*. Journal of Hazardous Materials, 2008. **159**(2/3): p. 567-573.
5. Neculita, C.-M., B. Vigneault, and G.J. Zagury, *TOXICITY AND METAL SPECIATION IN ACID MINE DRAINAGE TREATED BY PASSIVE BIOREACTORS*. Environmental Toxicology & Chemistry, 2008. **27**(8): p. 1659-1667.
6. Nevatalo, L.M., et al., *Biological hydrogen sulfide production in an ethanol-lactate fed fluidized-bed bioreactor*. Bioresource Technology. **101**(1): p. 276-284.
7. Gutiérrez, A., L. Terrazas, and M. Álvarez, *Aislamiento y cultivo de bacterias sulfato reductoras acidófilas para la Producción de Sulfuro Biogénico para la Precipitación de Metales Pesados*. BIOFARBO, 2007: p. 5-12.
8. David, J.S., S.C. Donald, and E.Z. Carl, *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**(4): p. 1059-1073.
9. Ochoa-Herrera, et al., *Toxicity of fluoride to microorganisms in biological wastewater treatment systems*. Water Research, 2009. **49**: p. 3177-3186.
10. Trüper, H.G. and H.G. Schlegel, *Sulphur metabolism in Thiorhodaceae I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii**. Antonie van Leeuwenhoek, 1964. **30**(1): p. 225-238.
11. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 1998, Washington D.C.: American Public Health Association.
12. Cline, J.D., *Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide in Natural Waters*. Limnology and Oceanography, 1969(14): p. 454-458.

13. Andrade, V., *Evaluación del Ptencial 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*, in *Colegio Politécnico*. 2010, Universidad San Francisco de Quito: Quito. p. 132.
14. Sahinkaya, E., et al., *Separate recovery of copper and zinc from acid mine drainage using biogenic sulfide*. *Journal of Hazardous Materials*, 2009. **171**(1-3): p. 901-906.
15. Qiu, R., et al., *Sulfate reduction and copper precipitation by a *Citrobacter sp.* isolated from a mining area*. *Journal of Hazardous Materials*, 2009. **164**(2/3): p. 1310-1315.
16. White, C. and G.M. Gadd, *Mixed sulphate-reducing bacterial cultures for bioprecipitation of toxic metals: Factorial and*. *Microbiology* (13500872), 1996. **142**(8): p. 2197.
17. Field, J., *Wageningen Agricultural University* 1987.
18. Foti, M., et al., *Diversity, Activity, and Abundance of Sulfate-Reducing Bacteria in Saline and Hypersaline Soda Lakes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007. **73**(7): p. 2093-2100.
19. Gutierrez, O., et al., *Effects of long-term pH elevation on the sulfate-reducing and methanogenic activities of anaerobic sewer biofilms*. *Water Research*, 2009. **43**(9): p. 2549-2557.
20. Al-Zuhair, S., M.H. El-Naas, and H. Al-Hassani, *Sulfate inhibition effect on sulfate reducing bacteria*. *Journal of Biochemical Technology*, 2008. **1**(2): p. 39-44.
21. White, C. and G.M. Gadd, *An internal sedimentation bioreactor for laboratory-scale removal of toxic metals from soil leachates using biogenic sulphide precipitation*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1997. **18**(6): p. 414.
22. Celis, L.B., et al., *Characterization of sulfate-reducing bacteria dominated surface communities during start-up of a down-flow fluidized bed reactor*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009. **36**(1): p. 111-121.
23. Velasco, A., et al., *Evaluation of feed COD/sulfate ratio as a control criterion for the biological hydrogen sulfide production and lead precipitation*. *Journal of Hazardous Materials*, 2008. **151**(2/3): p. 407-413.
24. Sierra-Alvarez, R., J. Hollingsworth, and M.S. Zhou, *Removal of Copper in an Integrated Sulfate Reducing Bioreactor-Crystallization Reactor System*. *Environmental Science & Technology*, 2007. **41**(4): p. 1426-1431.
25. Sampaio, R.M.M., et al., *Selective precipitation of Cu from Zn in a pS controlled continuously stirred tank reactor*. *Journal of Hazardous Materials*, 2009. **165**(1-3): p. 256-265.

26. Hsiu-Feng, H., et al., *Extent of Precipitation and Sorption During Copper Removal from Synthetic Wastewater in the Presence of Sulfate-Reducing Bacteria*. Environmental Engineering Science, 2009. **26**(6): p. 1087-1096.
27. Chambe, M.N., *Evaluación de los métodos químicos y biogénico para el tratamiento de drenaje ácido de mina a escala laboratorio*. 2008: Lima.

CAPÍTULO III

Toxicidad de iones cobre (II) en las bacterias sulfato-reductoras (BSR)

3.1 Resumen

La bioremediación de los drenajes ácidos de mina (DAM) hoy en día es una técnica utilizada para tratar dichos efluentes mediante el uso de organismos vivos, en este caso, bacterias sulfato-reductoras (BSR). Por tanto, es importante estudiar la toxicidad de los metales pesados que se encuentran en los DAM como el cobre a estas bacterias para determinar las concentraciones máximas de cobre que pueden ser remediadas sin afectar a la población bacteriana. La toxicidad de cobre (II) en las BSR fue evaluada en este estudio utilizando sedimentos de una laguna artificial y acetato como donador de electrones bajo condiciones de operación controladas. Los efectos de la toxicidad del cobre (II) fueron evaluados en términos de la producción de sulfuro en presencia de diferentes concentraciones de cobre (II): 1, 5, 10, 30, 50 mg L⁻¹ correspondientes a los tratamientos T-1, T-5, T-10, T-30 y T-50, respectivamente, durante un período de 760 horas. Los resultados obtenidos demuestran que una concentración mínima de cobre (II) de 1 mg L⁻¹ es beneficiosa y estimula el crecimiento microbiano de las BSR ya que dicho elemento actúa como micronutriente y no es tóxico; no obstante, a concentraciones de Cu (II) mayores a 1 mg L⁻¹ y a medida que aumenta la concentración de este metal también aumenta su toxicidad afectando la actividad metabólica de las BSR de manera moderada. La concentración de cobre (II) que causó un 20% de inhibición (IC₂₀) en la producción de sulfuro por parte de las BSR fue de 13 mg L⁻¹. En

presencia de elevadas concentraciones de cobre (II) no se registraron mayores inhibiciones (IC_{50} y IC_{80}) de la actividad metabólica debido a que las bacterias sulfato-reductoras demostraron ser resistentes a concentraciones de cobre (II) tan altas como 50 mg L^{-1} .

3.2 Introducción

Los drenajes ácidos de mina (DAM) se caracterizan por ser efluentes con niveles de pH bajos y altas concentraciones de sulfato y metales pesados. Los DAM representan uno de los mayores problemas ambientales para la minería y la industria metalúrgica en el mundo entero. Gemici (en Liang, 2008) evaluó el impacto ambiental de los DAM en una mina abandonada de mercurio en Turquía. El agua de esta mina se caracterizaba por su elevado contenido de sulfato y valores de pH muy bajos: alrededor de 2.55 durante la época seca y 2.70 en la época húmeda, lo cual puede ser atribuido a la oxidación de minerales de sulfuro, la mayoría pirita [1]. Asimismo, la concentración de sulfato en el DAM de esta mina era de 3981 mgL^{-1} , mucho más alta que el estándar de agua de consumo humano de 250 mgL^{-1} establecido por la Organización Mundial de Salud (OMS); el DAM también contenía metales pesados tales como As, Fe, Mn, y Al en concentraciones más altas de los estándares de agua de consumo humano [1].

La descarga de DAM en el ambiente sin el debido tratamiento es un problema no sólo por su pH bajo sino también por la alta concentración de sulfato y de metales pesados que poseen. Es así que, un pH bajo y/o una concentración de metales pesados alta en agua de corriente son dos de los factores más importantes asociados con cambios en la comunidad de macroinvertebrados bénticos en aguas en movimiento [2]. Varios estudios han demostrado que la probabilidad de que existan varias especies es limitada en sitios ácidos comparados con sitios con pH neutro; asimismo, los recursos alimentarios son menores en corrientes ácidas [2].

Por otro lado, los metales pesados descargados al ambiente provenientes de los DAM causan daño a la salud humana, obstaculizan el uso de los recursos naturales y afectan a la calidad del

ambiente en general debido principalmente por su alta persistencia en la naturaleza y por su capacidad de incorporarse en la cadena alimenticia [3, 4]. Por ejemplo, se han reportado clásicos casos de contaminación por metales pesados como la enfermedad de Minamata y la enfermedad de Itai-Itai las cuales dieron como resultado la muerte de varias personas [3]. El episodio de la enfermedad de Minamata que ocurrió en la prefectura Kumamoto en Japón es un famoso caso de envenenamiento por metilmercurio en la comida, mismo que presentó el primer paciente en 1956 y finalizó en 1968 [5]. De igual forma, la enfermedad de Itai-Itai ocurrió también en Japón en la prefectura de Nagasaki después de la segunda guerra mundial y consiste en el ablandamiento de los huesos como resultado de una disfunción renal tubular por el consumo de alimentos contaminados con cadmio [6].

El tratamiento biológico con bacterias sulfato-reductoras (BSR) ha sido considerado como la alternativa más prometedora para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina. Dicho tratamiento está basado en la producción biológica de sulfuro de hidrógeno a través de la reducción de sulfato, el aumento del pH y la precipitación de sulfuros metálicos [7]. De acuerdo a Neculita *et al.*, durante los últimos 15 años, los bioreactores empacados con BSR han sido usados exitosamente para el tratamiento de los DAM [8]. En el 2008, Pagnanelli *et al.* investigaron las características ecotoxicológicas de muestras sintéticas de DAM antes y después de un sistema químico-biológico combinado [9]. El tratamiento fue desarrollado en un reactor de dos columnas que consistía en la precipitación química utilizando caliza y un refinamiento biológico con BSR [9]. Johnson estudió tres bioreactores que actuaban como sistemas de remediación pasivos construidos para tratar los DAM de una antigua mina de estaño en Cornwall, Reino Unido durante 16 meses. En dicha investigación se pudo detectar

la presencia de BSR en un sólo bioreactor que demostró tener una gran capacidad de incrementar el pH y disminuir las concentraciones de metales pesados [10].

Las BSR, responsables de este tratamiento, son procariotas anaeróbicas encontradas de manera difundida en la naturaleza [11]. Estas bacterias, específicamente las del género *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*, en presencia de un compuesto orgánica donador de electrones utilizan sulfato (SO_4^{2-}) como aceptor de electrones y lo reduce a sulfuro de hidrógeno, que es altamente reactivo y tóxico. Dicho sulfuro después puede reaccionar con iones metálicos para formar los respectivos sulfuros metálicos [12]. Durante la bioremediación de los DAM, el metabolismo de las BSR ocasiona un incremento del pH debido a un aumento de la alcalinidad por la oxidación del compuesto orgánico, se genera sulfuro a través de la reducción de sulfato y dicho sulfuro hace que los metales tóxicos como el cobre (II), níquel (II) y cadmio (II), entre otros precipiten como sulfuros metálicos en descargas ácidas como por ejemplo, los efluentes mineros [11].

Por otro lado, la reducción bacteriana de sulfato juega un papel muy importante en los ciclos biogeoquímicos de carbón y azufre. Las BSR son las responsables de la mayor parte de la mineralización de carbón en ambientes ricos en sulfato, atribuyéndoles una oxidación de igual o más del 50% del carbón orgánico total en ecosistemas como sedimentos de pantano y esteras bacterianas [13].

Si bien es cierto que las BSR se caracterizan por participar en los procesos de bioremediación de metales pesados presentes en efluentes industriales principalmente aquellos provenientes de actividades mineras, se conoce que una de las mayores limitaciones de las BSR es su elevada sensibilidad hacia la presencia de dichos iones metálicos. Varios estudios han reportado que

concentraciones de iones metálicos tales como cobre y zinc mayores a 1 mg L^{-1} afectan adversamente el crecimiento de estos microorganismos generándoles toxicidad [12]. La toxicidad microbiana a metales pesados es conocida por interferir en los procesos microbiológicos importantes incluyendo la degradación aeróbica y anaeróbica de la materia orgánica. Los efectos tóxicos también incluyen el desplazamiento y/o sustitución de iones esenciales en sitios celulares y el bloqueo de grupos funcionales de moléculas importantes [14].

En cuanto a la diversidad y actividad de las BSR, varios estudios basados en la secuencia de genes 16S rRNA y *dsrAB* han sido reportados, particularmente en sedimentos marinos y de estuarios; así como en sitios contaminados con compuestos orgánicos y metales pesados [13]. Sin embargo, se conoce poco acerca de la diversidad de las comunidades sulfato-reductoras en respuesta a la toxicidad de metales [13]. En un estudio realizado por Leloup y colaboradores se estudió la diversidad de las BSR en núcleos profundos de sedimentos marinos de 3 a 5 m, mismos que comprenden la zona de sulfato reducción y la zona metanogénica alta. Se encontró que la abundancia de las BSR correspondía en promedio al 13% de la comunidad bacteriana total en la zona de sulfato, 22% en la zona de transición de sulfato-metano y 8% en la zona de metano. Se pudo asimismo determinar que los genes *dsrAB* en los sedimentos cercanos a la superficie estaban compuestos por secuencias cercanas a *Desulfobacteraceae*, incluyendo oxidadores completos e incompletos como *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium* y *Desulfococcus*[15].

La toxicidad del cobre (II) en algunos microorganismos ha sido estudiada y se han reportado estudios con resultados interesantes y variados. La tolerancia a cobre (II) ha sido evaluada con algunas cepas de BSR. En general, las cepas puras tienden a ser más sensibles al cobre (II)

comparadas con los cultivos mixtos. Un estudio realizado por Sani *et al.* (2001) con una cepa *Desulfovibrio desulfuricans* en un medio especialmente diseñado para evitar la precipitación abiótica de metales resultó en 50% de inhibición del crecimiento bacteriano a una concentración de 0.84 mg L^{-1} cobre (II) [14]. Este valor es dos órdenes de magnitud más bajo que el 50% de inhibición de 100 mg L^{-1} cobre (II) a la sulfato reducción en un cultivo mixto [16].

De acuerdo a Mohanty y colaboradores, el uso de BSR para el tratamiento de efluentes que contiene iones de metales pesados puede ser posible sólo cuando las bacterias se cultivan por separado y el producto biogénico formado por la reducción de sulfato es usado después para remover los iones de la solución [12]. Por tanto, la aplicación de BSR para el tratamiento de efluentes que contienen tanto SO_4^{2-} como metales pesados es limitada cuando la concentración de estos últimos es elevada.

Varios estudios han demostrado que concentraciones de cobre (II) inhibe la actividad microbiana de manera muy amplia, incluso para microorganismos que se encuentran en el mismo grupo trófico. Por ejemplo, las concentraciones de cobre (II) que generaron 50% de inhibición en la actividad metabólica de las BSR están en un rango muy amplio comprendido entre 0.84 y 200 mgL^{-1} [17, 18]. Esta variación significativa en los niveles inhibitorios reportados para cobre (II) se debe probablemente a los diferentes tipos de BSR utilizados y a las variaciones en las condiciones experimentales empleadas en los ensayos realizados como por ejemplo la composición del medio, valores de pH, temperatura, concentración de sulfuro, etc. que se conoce que tener un gran impacto en la especiación de cobre y su biodisponibilidad. Por otro lado, varios estudios en la literatura han demostrado que la

disponibilidad de los iones metálicos afecta significativamente la toxicidad microbiana, es así que la unión de metales a contaminantes ambientales, tales como materiales orgánicos y partículas arcillosas, tienen efectos considerables en la disponibilidad biológica del metal reduciendo la toxicidad del mismo hacia los microorganismos [19].

El objetivo de este proyecto de investigación fue evaluar el efecto inhibitorio de cobre (II) en las bacterias sulfato-reductoras a diferentes concentraciones que variaron desde 0 a 50 mg L⁻¹ de cobre (II) bajo condiciones de operación controladas. Se determinaron las actividades máximas específicas de producción de sulfuro para cada bioensayo para establecer las concentraciones de cobre (II) que producen inhibiciones del 20%, 50% y 80% de la actividad metabólica de las BSR evaluadas en este estudio.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Sedimentos

Los bioensayos de toxicidad microbiana se realizaron empleando sedimentos provenientes de la laguna artificial de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). Los sedimentos fueron empleados inmediatamente después de su obtención. La composición de los sedimentos de acuerdo a la caracterización de los sólidos totales en suspensión (STS) y los sólidos volátiles en suspensión (SVS) fue de 14.9 y 6.28%, respectivamente [20].

3.3.2 Medio de cultivo

La composición del medio basal mineral (pH 7.1-7.3) empleado en los bioensayos de toxicidad 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 composición de la solución de elementos traza fue (en mg L⁻¹): H₃BO₃ (50), FeCl₂·4H₂O (2000), ZnCl₂ (50), MnCl₂ (32), (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (50), AlCl₃ (50), CoCl₂·6H₂O (2000), NiCl₂·6H₂O (50), CuSO₄·5H₂O (44), NaSeO₃·5H₂O (100), EDTA (1000), resazurina (200) y 1mL L⁻¹ de HCl 36% [21].

3.3.3 Reactivos

El sulfato de sodio (100%, pureza) fue obtenido de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). El sulfato de amonio y hierro (III) y el acetato de sodio fueron obtenidos de Laboratorios Químicos H.V.O. (Quito, Ecuador). El ácido sulfúrico (95.0-97.0 %) fue obtenido de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). El DMP (oxalato de N,N-dimetil-p-fenildiamina) (>99%) fue

obtenido de J.T. Baker (Zedelgem, Bélgica). El N_2 gas fue entregado por AGA Ecuador (Quito, Ecuador). Todos los reactivos fueron utilizados en el estado en el que fueron recibidos.

3.3.4 Métodos analíticos

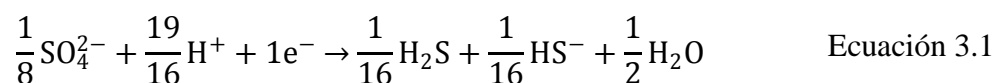
El método utilizado para la medición del sulfuro total fue el de azul de metileno a una longitud de onda de 670 nm empleando un colorímetro Spectronic 20D+ (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) [22, 23]. En este método se monitorea la formación de azul de metileno que resulta de la reacción entre el sulfuro y el reactivo colorimétrico, DMP (oxalato de N, N- dimetil-p.fenildiamina) en medio ácido mediante el uso de un colorímetro.

La medición de sulfuro disuelto se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación: 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, considerando que la concentración máxima de sulfuro en el balón no debía exceder 1 mg L^{-1} . Previo a la medición de las muestras, se realizaron curvas de calibración entre 0 y $1 \text{ mg L}^{-1} S^{2-}$ empleando una solución madre de 250 mg L^{-1} de S^{2-} como $Na_2S \cdot 9H_2O$.

3.3.5 Toxicidad Microbiana

La determinación de la toxicidad microbiana de las BSR en presencia de iones Cu (II) se realizó por triplicado en botellas de vidrio de 160 mL selladas con tapones de caucho y tapas de aluminio. En cada bioensayo se colocó el medio basal mineral (50 mL), sulfato (3000 mg L^{-1}), acetato ($2500 \text{ mg DQO L}^{-1}$), inóculo microbiano (10% v/v) y concentraciones de 1, 5, 10, 30 y 50 mg L^{-1} de Cu (II) como $CuCl_2$, respectivamente. En cada bioensayo se realizó una

purga con nitrógeno (N₂) para asegurar condiciones anaeróbicas. Adicionalmente, se realizaron controles bióticos por triplicado con inóculo microbiano, medio basal mineral, sulfato y acetato en ausencia de Cu (II) y controles abióticos en ausencia de microorganismos. Las botellas se mantuvieron en una incubadora con la temperatura controlada a 30 ± 2 °C. Se monitoreó periódicamente la reducción de sulfato a sulfuro durante 760 h (31.67 d) midiendo la concentración de S²⁻ de acuerdo al método de medición de sulfuro descrito previamente. Para determinar la cantidad de sulfuro generado por la acción de las bacterias sulfato-reductoras se utilizó la siguiente ecuación [24]:



Las actividades máximas específicas de reducción de sulfato y las actividades máximas específicas de generación de sulfuro se expresaron en mg SO₄²⁻ g⁻¹ acetato d⁻¹ y en mg S²⁻ g⁻¹ acetato d⁻¹, respectivamente. Estos valores corresponden a las pendientes de las curvas de producción de sulfuro con respecto al tiempo de cada tratamiento con cobre (II) en el rango correspondiente a la fase exponencial o de crecimiento expresados en función acetato utilizado mediante la siguiente expresión:

Ecuación 3.2

$$\text{Act. máx. específicas (mg acetato}^{-1}\text{d}^{-1}) = \text{pendiente (mgL}^{-1}\text{d}^{-1}) \cdot \frac{V_{\text{delmediobasal}}(\text{L})}{\text{Cantidaddeacetato}(\text{g})}$$

3.4 Resultados y Discusión

En el presente estudio se evaluaron en experimentos batch la toxicidad de los iones cobre (II) en las bacterias sulfato-reductoras empleando acetato como donador de electrones y sulfato como aceptor de electrones de acuerdo al protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Brevemente, se empleó un cultivo mixto de bacterias sulfato-reductoras presentes en los sedimentos provenientes de la laguna artificial de la Universidad San Francisco de Quito y se evaluó la cantidad de sulfato reducida a sulfuro biogénico en presencia de diferentes concentraciones de cobre (II): 1, 5, 10, 30 y 50 mg L⁻¹ correspondientes a los bioensayos T-1, T-5, -T-10, T-30, T-50, respectivamente.

La Figura 3.1 representa un ejemplo ilustrativo de la producción de sulfuro por la acción de las bacterias sulfato-reductoras con respecto al tiempo con 3000 mg L⁻¹ de sulfato y 2500 mg DQO L⁻¹ de acetato en el control biótico en presencia de BSR y en el control abiótico en ausencia de microorganismos. En dicha figura se puede observar que en el control abiótico en ausencia de microorganismos no se generó sulfuro después de 760 horas de tratamiento, mientras que en el control biótico en presencia de BSR se generó sulfuro y adicionalmente la curva de producción del sulfuro biogénico corresponde a la curva de crecimiento microbiano. Al inicio, durante las primeras 70 h del bioensayo se puede observar que los microorganismos se encuentran en una fase de adaptación o *lag* en la cual las células se ajustan al ambiente y por tanto, la producción de sulfuro es mínima tendiendo a cero [25]. Luego de esta etapa, sigue la fase exponencial o logarítmica que va desde 70 horas hasta 500 horas con una concentración máxima de sulfuro biogénico de aproximadamente 180 mg L⁻¹, en esta fase la población se duplica en intervalos regulares. Inmediatamente después de esta fase, se puede observar la fase estacionaria que comienza aproximadamente desde 500 h y se mantiene hasta

el final del período estudiado donde se llega a tener una concentración de sulfuro biogénico de 195.94 mg L^{-1} en el control biótico en esta fase se establece un equilibrio dinámico en el cual no hay mayor crecimiento bacteriano [25]. En base a estos resultados se puede concluir que son los microorganismos precisamente los que generan sulfuro.

El presente estudio es comparable con el estudio realizado por Mohanty y colaboradores en el cual se reportaron tiempos de adaptación y crecimiento microbiano de las BSR similares [12]. Durante el estudio de la cinética de reducción de sulfato bajo diferentes parámetros como la concentración inicial de la biomasa, y las concentraciones de sulfato (SO_4^{2-}), nitrógeno (N_2) y fosfato (PO_4^{3-}) [12], Mohanty *et al.* reportaron que la fase de adaptación de las BSR fue de 70 horas aproximadamente, que corresponde al mismo valor observado en el presente estudio. Luego, obtuvieron una fase de crecimiento o exponencial desde las 70 h hasta las 600 h, valor que difiere en aproximadamente 100 h con el presente estudio, lo cual no significa una variación muy significativa. Finalmente, llegaron a una fase estacionaria que comenzó en 600 h y se extendió hasta las 800 h, que coincide con el tiempo en el cual se finalizó la presente investigación [12].

La actividad máxima específica de generación de sulfuro obtenida en el control biótico fue de $0.13 \text{ mg S}^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ acetato h}^{-1}$ correspondiente a $0.77 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ acetato h}^{-1}$ ($4.06 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). En el estudio realizado por Mohanty y colaboradores se reportó una actividad máxima específica correspondiente a una concentración inicial de 3.27 g L^{-1} de SO_4^{2-} de $0.49 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ acetato h}^{-1}$. Este valor es comparable con el valor obtenido en este estudio $0.77 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ acetato h}^{-1}$ considerando que se utilizó un valor similar de sulfato correspondiente a 3 g L^{-1} [12]. La pequeña diferencia que existe entre estos valores se puede atribuir a varias razones

como la composición de los sedimentos en cuanto a la cantidad inicial de biomasa presente; por otro lado, no se tomó en cuenta las cantidades iniciales de N_2 y PO_4^{3-} en este estudio y pudieron haber afectado al crecimiento microbiano. Sin embargo, en términos generales se puede concluir que los datos de consumo de sulfato obtenidos en este estudio están dentro de los valores reportados en la literatura.

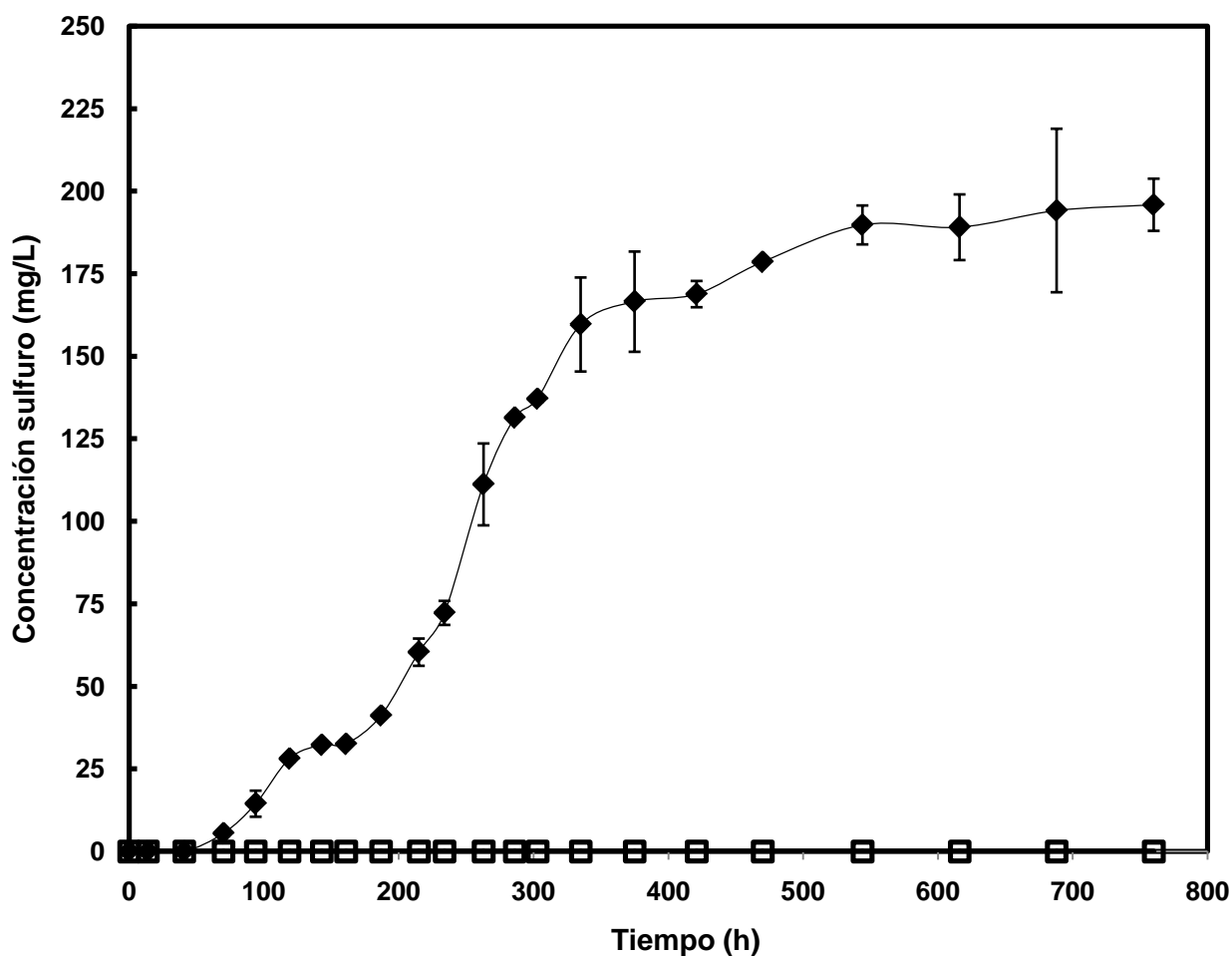


Figura 3.1 Producción de sulfuro con respecto al tiempo por acción de las BSR en presencia de 3000 mg L^{-1} de sulfato y $2500 \text{ mg DQO L}^{-1}$ de acetato en los controles bióticos y abióticos. Leyenda: (\blacklozenge) control biótico con BSR; (\square) control abiótico ausencia de BSR. Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por triplicado.

La Figura 3.2 muestra la producción de sulfuro por la acción de las bacterias sulfato-reductoras en presencia de diferentes concentraciones de Cu (II) con respecto al tiempo. Las concentraciones de Cu (II) evaluadas fueron 0, 1, 5, 10, 30 y 50 mg L⁻¹. En términos generales se puede observar que el efecto inhibitorio del cobre en la actividad metabólica de las BSR varía dependiendo de su concentración. A concentraciones menores a 1 mg L⁻¹ el cobre estimula el crecimiento microbiano, mientras que a concentraciones mayores a 5 mg L⁻¹, el cobre efectivamente inhibe la generación de sulfuro biogénico.

En los bioensayos con una concentración de 1 mg L⁻¹ de Cu (II), la cantidad de sulfuro biogénico generado después de 760 horas supera ligeramente a aquella producida en el control biótico con un valores de 204.94 mg L⁻¹ y 195.94 mg L⁻¹ de sulfuro, respectivamente. Esto indica que s concentraciones de Cu (II) de 1 mg L⁻¹ estimulan el crecimiento microbiano de las BSR ya que este metal en concentraciones bajas es un microelemento necesario para el crecimiento microbiano. En un estudio realizado por Song y colaboradores se puede evidenciar un resultado similar ya que con una concentración de 0.8 mg L⁻¹ de Cu (II), también se observó un ligero aumento en la actividad sulfato-reductora [26]. Los microorganismos requieren de algunos metales como Cu (II), Zn (II), Co (II) y Ni (II) en concentraciones bajas como micronutrientes esenciales como cofactores vitales para las metaloproteínas y ciertas enzimas [14].

En los bioensayos con concentraciones iguales o mayores a 5 mg L⁻¹ de Cu (II), se observó un efecto adverso en la actividad metabólica de las BSR, ya que conforme iba aumentando la concentración de Cu (II), la producción de sulfuro disminuyó con el tiempo. Por ejemplo, después de 760 h de tratamiento, las concentraciones de sulfuro biogénico generadas en el control biótico y en los diferentes tratamiento T-5, T-10, T-30 y T-50 fueron 191.60, 184 .82,

154.60, 102.18 mg L⁻¹ de S²⁻ respectivamente. Estos resultados evidencian el efecto inhibitorio de cobre (II) en la actividad reductora de sulfato de estos microorganismos. Sin embargo, es importante indicar que el ión cobre (II) precipita a medida que las BSR metabolizan el sulfato y producen sulfuro, por lo que si bien es cierto estas bacterias pueden verse afectadas inicialmente por la presencia de este metal, las misma se recuperan cuando el cobre (II) precipita como sulfuro de cobre (CuS). [26]. La reducción biogénica de sulfato a sulfuro se conoce que ocurre rápidamente; por lo tanto, las enzimas y los ácidos nucleicos bacterianos están protegidos de los metales, contribuyendo así a la percepción de que las BSR tienen una mayor tolerancia a los metales que otras bacterias. Por ejemplo, la BSR *Desulfovibrio desulfuricans* que se caracteriza por producir H₂S, crece en concentraciones altas de sulfuro y puede verse inafectada por la adición de concentraciones altas de metales pesados [27]. Se ha observado incluso en otros casos que los organismos que producen sulfuro pueden proteger a otros organismos más sensibles a los efectos tóxicos de los metales. Es así que cuando *D. desulfuricans* fue cultivada en un cultivo mixto con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, esta última pudo tolerar concentraciones más altas de mercurio que en un cultivo puro. Los resultados de dicho experimento indican que las BSR protegieron a la cepa de *P. aeruginosa* mediante la producción de H₂S [27].

Adicionalmente, se puede observar que todos los bioensayos en presencia de Cu (II) corresponden al crecimiento microbiano en el cual se encuentran las fases de adaptación, exponencial y estacionaria. En la fase de adaptación ocurre durante las primeras 70 horas donde la concentración de sulfuro es prácticamente nula en la mayoría de los tratamientos y control biótico, únicamente en el bioensayo con 50 mg L⁻¹ de Cu (II) (T-50) se puede observar que esta fase dura más que en las demás llegando a tener un período de estabilización

de 120 horas aproximadamente. La siguiente fase corresponde a la fase exponencial o de crecimiento; esta fase se evidencia en la mayoría de los tratamientos así como en el control biótico a partir de la hora 70 hasta la hora 335. La fase estacionaria comienza aproximadamente en la hora 335 y se extiende hasta el final del tiempo de estudio que corresponde a 760 horas.

Las actividades máximas específicas de generación de sulfato se calcularon en base a las pendientes de los diferentes tratamientos de la Figura 1.2 de acuerdo al protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos.

Por otro lado, los valores de los porcentajes de sulfato inicial en cada tratamiento al cabo de 31 días fueron los siguientes: 39.2, 40.9, 38.3, 37.0, 30.9 y 20.4 para los tratamiento con 0, 1, 5, 10, 30 y 50 mg L⁻¹ de Cu (II), respectivamente, valores obtenidos utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ desulfato inicial} = \frac{\text{concentración final de } SO_4^{2-}}{\text{concentración inicial de } SO_4^{2-}} * 100 \quad \text{Ecuación 3.3}$$

En el estudio realizado por Song y colaboradores se puede observar un 30% de la concentración original de sulfato para el tratamiento de 30 mg L⁻¹ al cabo de 35 días de estudio [26]. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este estudio en el que se obtuvo un 30% de la concentración de sulfato después de 31 días de tratamiento.

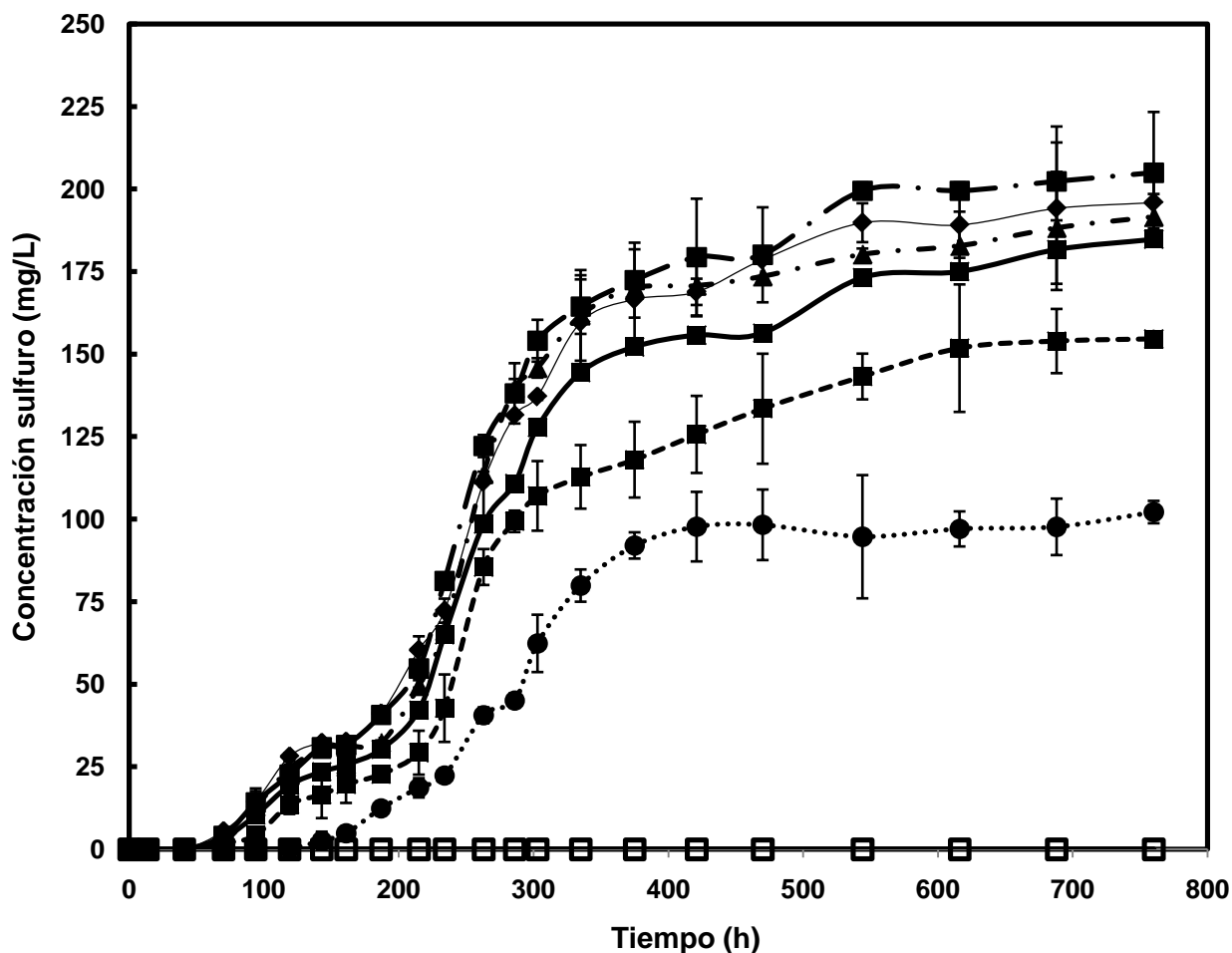


Figura 3.2 Producción de sulfuro biogénico a partir de 3000 mg L^{-1} de sulfato y $2500 \text{ mg DQO L}^{-1}$ de acetato en presencia de diferentes concentraciones de cobre (II). Leyenda: (—◆—) control biótico; (—□—) control abiótico; (—■—) 1 mg L^{-1} ; (—▲—) 5 mg L^{-1} ; (—■—) 10 mg L^{-1} ; (—■—) 30 mg L^{-1} ; (—●—) 50 mg L^{-1} . Las barras de error representan desviaciones estándar de bioensayos realizados por triplicado.

Los bioensayos de toxicidad dieron como resultado las concentraciones y actividades máximas específicas descritas en la Tabla 3.1

Las actividades máximas específicas de producción de sulfuro se determinaron para cada tratamiento. Dichas actividades específicas se calcularon con base en las pendientes de las curvas de producción expresadas en mg sulfuro producido $L^{-1} h^{-1}$ y se normalizaron con respecto al control biótico en el que se registró la mayor producción de sulfuro. Por lo tanto, el porcentaje de actividad máxima específica de producción de sulfuro de cada uno de los tratamientos se obtuvo dividiendo la actividad máxima específica a la concentración evaluada para la actividad máxima específica del control biótico multiplicado por cien, como se muestra en la siguiente ecuación.

$$Actividad(\%) = \frac{Act. \text{m}áx. \text{espec}í\text{f}ica \text{ de cada tratamiento}}{Act. \text{m}áx. \text{espec}í\text{f}ica \text{ del tratamiento con mayor producci}ón \text{ de } S^{2-}} * 10 \quad \text{Ecuaci}ón3.4$$

Tabla 3.1 Actividades máximas específicas de producción de sulfuro y consumo de sulfato de los sedimentos de la laguna de la Universidad San Francisco de Quito (10% v/v) en presencia de distintas concentraciones de cobre (II)

Tratamiento	Concentración Cu(II) (mgL ⁻¹)	Actividad máxima específica (mg S ²⁻ ·g ⁻¹ acetato h ⁻¹)	Actividad máxima específica (mg SO ₄ ²⁻ ·g ⁻¹ acetato h ⁻¹)	Actividad máxima específica de producción de sulfuro (%)
Control biótico	0	0.127	0.765	100.00
T-1	1	0.116	0.698	91.34
T-5	5	0.117	0.701	91.67
T-10	10	0.106	0.638	83.47
T-30	30	0.077	0.465	60.78
T-50	50	0.074	0.446	58.38

Las actividades máximas específicas de producción de sulfuro de las BSR presentes en los sedimentos de la laguna artificial en los bioensayos de toxicidad en presencia de 1, 5, 10, 30 y 50 mg cobre (II) L⁻¹ fueron de 91, 92, 83, 61 y 58 %, respectivamente. Estos resultados indican que la presencia de cobre (II) en los sedimentos que contienen BSR tiene un efecto inhibitorio mediano en la actividad metabólica de las BSR. Por ejemplo, en el caso de una concentración de 50 mg L⁻¹ de cobre (II), se espera que la actividad metabólica de las BSR disminuya máximo en un 40%.

El efecto inhibitorio del cobre (II) en la actividad máxima específica de BSR está ilustrado en la Figura 3.3. Los valores correspondientes a las concentraciones de cobre (II) que producen inhibiciones del 20, 50 y 80%, es decir los IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀, están resumidos en la Tabla 3.2. La concentración de Cu (II) que produce un 20% de inhibición en las BSR, IC₂₀, fue 13 mgL⁻¹. Se puede ver que a la mayor concentración de Cu (II) evaluada en este estudio 50 mg L⁻¹ no se produjo inhibición del 50% y 80% de la producción de sulfuro. Esto puede deberse, entre otras cosas, al efecto descrito con anterioridad que consiste en la precipitación del metal apenas se produce sulfuro lo que lo retira del medio y lo vuelve menos tóxico para las BSR, las mismas que se regeneran rápidamente en ausencia de cobre (II).

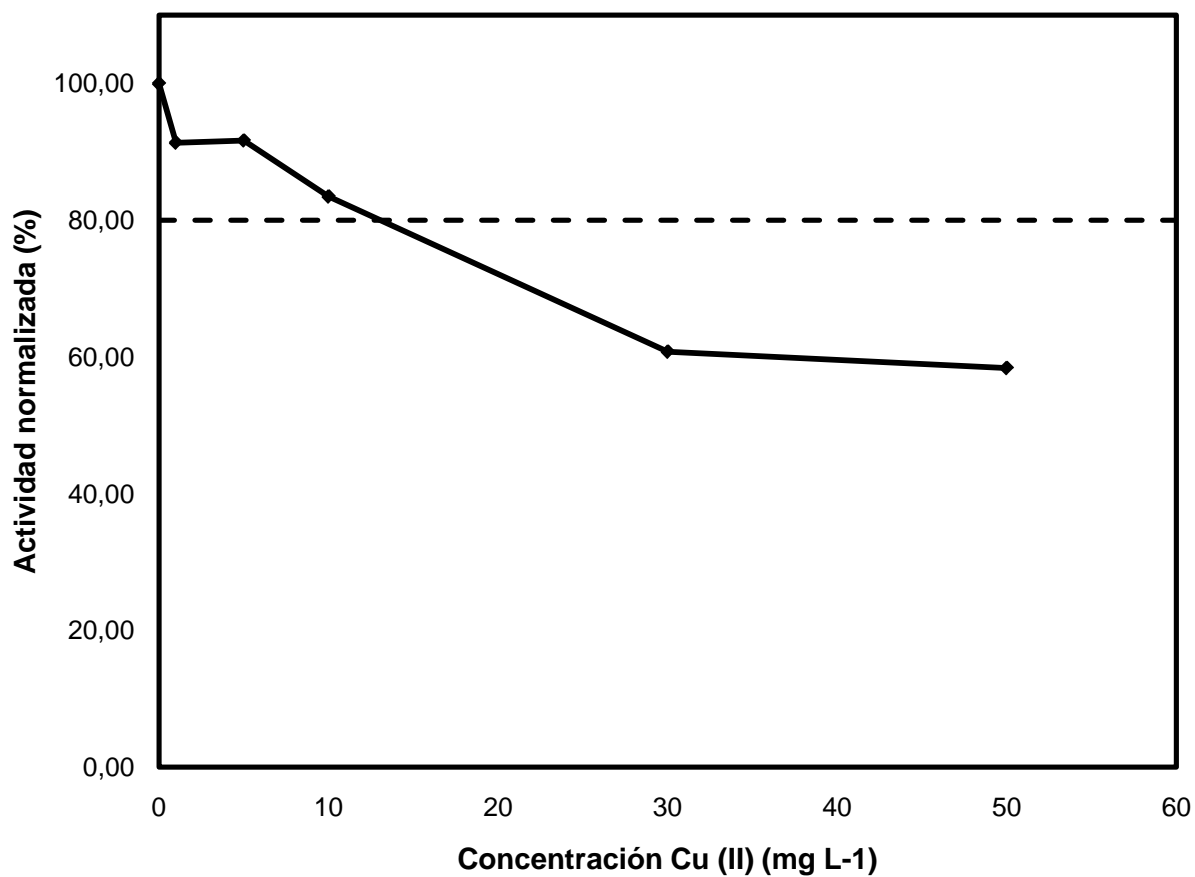


Figura 3.3 Actividad normalizada de las BSR con diferentes concentraciones de cobre (II).
Leyenda: (---) concentración de cobre (II) que inhibe el 20% de crecimiento microbiano(IC₂₀)

En un estudio realizado por Karri *et al.* se evaluó el efecto inhibitor del cobre a diferentes tipos de bacterias incluidas las bacterias y sulfato-reductoras en lodos obtenidos de un bioreactor empacado con BSR [28]. Los resultados obtenidos con las bacterias sulfato-reductoras que utilizaron acetato como donador de electrones son similares a los obtenidos en este estudio. El valor del IC_{20} fue en 11 mg L^{-1} siendo bastante similar al encontrado en esta investigación de 13 mg L^{-1} de cobre (II). Sin embargo, los valores de IC_{50} y IC_{80} correspondientes a 32.3 y 48.4 mg L^{-1} respectivamente, reportados por Karri y colaboradores difieren a los obtenidos en este estudio ya que se concluyó que no se observó inhibición ni del 50% ni 80% de la producción de sulfuro a la concentración máxima evaluada de 50 mg L^{-1} de cobre (II) [28]. De igual forma, en otro estudio realizado por un consorcio de BSR acetoclásticas la concentración que causó 50% de inhibición (IC_{50}) fue de 32.5 mg cobre (II) L^{-1} [28] que también difiere con los resultados de este estudio. La diferencia entre los IC_{50} y IC_{80} reportados puede deberse al tipo de inóculo utilizado en ambas investigaciones ya que se ha demostrado que si se emplean cultivos mixtos, las bacterias muestran mayor resistencia a la presencia de metales como es el caso del cultivo utilizado en este estudio [29].

En contraste, la actividad de un cultivo enriquecido de BSR demostró ser relativamente insensible a concentraciones de cobre de menos de 50 mg L^{-1} lo cual está estrechamente relacionado a los resultados obtenidos en el presente estudio donde las concentraciones evaluadas no llegan a inhibir ni el 50% de la actividad metabólica [17].

En un estudio realizado por Utgikaret *al.* se demostró que el cobre causó inhibición del 50% a un cultivo de bacterias sulfato-reductoras a una concentración inicial disuelta de 10.5 mg L^{-1}

de cobre (II) lo cual difiere de lo obtenido en este estudio ya que el valor de IC_{50} no pudo ser determinado; además, el valor del IC_{20} fue de 11 mg L^{-1} cobre (II).

Tabla 3.2 Efecto inhibitorio del cobre (II) sobre las bacterias sulfato-reductoras de los sedimentos de la laguna de la Universidad San Francisco de Quito.

Sustancia Inhibitoria	Concentración (mg/L)		
	IC ₂₀ (mgL ⁻¹)	IC ₅₀ (mgL ⁻¹)	IC ₈₀ (mgL ⁻¹)
Cobre (II)	13	>50 ^a	>50 ^a

^a No tóxico a la mayor concentración evaluada, en este caso, 50 mg L⁻¹

3.5 Conclusiones

En este estudio se evaluó el efecto inhibitorio de los iones Cu (II) en la actividad metabólica de las bacterias sulfato-reductoras en experimentos batch. Los bioensayos para estudiar la toxicidad del cobre (II) durante la producción de sulfuro biogénico por parte de las BSR se estabilizaron en un período de tiempo de aproximadamente un mes; tiempo en el cual se pudo observar claramente que la forma de las curvas de producción de sulfuro biogénico corresponden a aquellas de crecimiento microbiano incluyendo la etapa inicial conocida como fase de adaptación, seguida de la etapa de crecimiento o exponencial y finalmente la etapa estacionaria.

Las bacterias sulfato-reductoras demostraron ser tolerantes a los iones Cu (II); la concentración de cobre (II) que inhibió el crecimiento microbiano en un 20% (IC₂₀) fue 13 mg L⁻¹; concentración que puede ser recomendable utilizar en los procesos de bioremediación. Adicionalmente, estas bacterias resistieron concentraciones elevadas de cobre (II) con un porcentaje de inhibición bajo, de tal manera que a la concentración más alta evaluada no se registraron elevados porcentajes de inhibición de la actividad metabólica (50 y 80 %), bajo las condiciones de operación evaluadas en este estudio. .

De igual forma, la mínima concentración de cobre (II) evaluada demostró no producir un efecto inhibitorio sobre el cultivo de BSR utilizado, por el contrario resultó ser un agente estimulante, ya que el cobre (II) en concentraciones bajas actúa como micronutriente y promueve el crecimiento microbiano.

3.6 Referencias Bibliográficas

1. H.C. Liang, B.M.T., *Minerals and Mine Drainage*. Water Environment Research, 2009. **81**(10): p. 1610-1660.
2. Sandin, L., J. Dahl, and R.K. Johnson, *Assessing acid stress in Swedish boreal and alpine streams using benthic macroinvertebrates*. Hydrobiologia, 2004. **516**(1-3): p. 129-148.
3. Adebayo, O.A., D.-P.N. Kio, and O.O. Emmanuel, *Assessment of potential ecological disruption based on heavy metal toxicity, accumulation and distribution in media of the Lagos Lagoon*. African Journal of Ecology, 2007. **45**(4): p. 454-463.
4. Ermelinda Prato, F.B., Christian Scardicchio, *Test for Acute Toxicity of Copper, Cadmium and Mercury in Five Marine Species*. Turkish Journal of Zoology, 2005: p. 285-290.
5. Tsuda, T., et al., *Minamata disease: Catastrophic poisoning due to a failed public health response*. Journal of Public Health Policy, 2009. **30**(1): p. 54-67.
6. Yoshida, F., A. Hata, and H. Tonegawa, *Itai-Itai disease and the countermeasures against cadmium pollution by the Kamioka mine*. Environmental Economics & Policy Studies, 1999. **2**(3): p. 215.
7. Costa, M.C., et al., *Wine wastes as carbon source for biological treatment of acid mine drainage*. Chemosphere, 2009. **75**(6): p. 831-836.
8. Neculita, C.-M., B. Vigneault, and G.J. Zagury, *TOXICITY AND METAL SPECIATION IN ACID MINE DRAINAGE TREATED BY PASSIVE BIOREACTORS*. Environmental Toxicology & Chemistry, 2008. **27**(8): p. 1659-1667.
9. Pagnanelli, F., et al., *Bioassessment of a combined chemical and biological treatment for synthetic acid mine drainage*. Journal of Hazardous Materials, 2008. **159**(2/3): p. 567-573.
10. Johnson, D.B. and K.B. Hallberg, *Biogeochemistry of the compost bioreactor components of a composite acid mine drainage passive remediation system*. Science of the Total Environment, 2005. **338**(1/2): p. 81-93.
11. Heidelberg, J.F., et al., *The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough*. Nat Biotech, 2004. **22**(5): p. 554-559.
12. Mohanty, S.S., et al., *Kinetics of $SO_4^{(-2)}$ reduction under different growth media by sulfate reducing bacteria*. Biometals: An International Journal On The Role Of Metal Ions In Biology, Biochemistry, And Medicine, 2000. **13**(1): p. 73-76.

13. Pavissich, J.P., M. Silva, and B. González, *Sulfate reduction, molecular diversity, and copper amendment effects in bacterial communities enriched from sediments exposed to copper mining residues*. Environmental Toxicology & Chemistry, 2010. **29**(2): p. 256-264.
14. Sani, R.K., B.M. Peyton, and L.T. Brown, *Copper-induced inhibition of growth of Desulfovibrio desulfuricans G20: assessment of its toxicity and correlation with those of zinc and lead*. Applied And Environmental Microbiology, 2001. **67**(10): p. 4765-4772.
15. Leloup, J., et al., *Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): abundance and diversity related to geochemical zonation*. Environmental Microbiology, 2009. **11**(5): p. 1278-1291.
16. Song, Y.-C., et al., *Influence of electron donor and toxic materials on the activity of sulfate reducing bacteria for the treatment of electroplating wastewater*. Water Science and Technology, 1998. **38**(4-5): p. 187-194.
17. Jalali, K. and S.G. Baldwin, *The role of sulphate reducing bacteria in copper removal from aqueous sulphate solutions*. Water Res., 2000. **34**: p. 797-896.
18. Utgikar, V.P., et al., *Acute toxicity of heavy metals to acetate-utilizing mixed cultures of sulfate-reducing bacteria: EC100 and EC50*. Environ. Toxicol. Chem., 2001. **20**: p. 2662-2669.
19. Zevenhuizen, L.P.T.M., et al., *Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration*. Microbial Ecology, 1979. **5**(2): p. 139-146.
20. Andrade, V., *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*, in *Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales*. 2010, Universidad San Francisco de Quito: Quito. p. 131.
21. Ochoa-Herrera, et al., *Toxicity of fluoride to microorganisms in biological wastewater treatment systems*. Water Research, 2009. **49**: p. 3177-3186.
22. Cline, J.D., *Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide in Natural Waters*. 1969. **14**(3): p. 454-458.
23. Trüper, H.G. and H.G. Schlegel, *Sulphur metabolism in Thiorhodaceae I. Quantitative measurements on growing cells of Chromatium okenii*. Antonie van Leeuwenhoek, 1964. **30**(1): p. 225-238.
24. Metcalf, E.a., *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*. 2003.
25. Arce, O., *Cinética del Crecimiento Microbiano*, Universidad Mayor de San Simón: Cochabamba.

26. Song, J., J.I. Drever, and P.J.S. Colberg, *EFFECTS OF COPPER ON SULFATE REDUCTION IN BACTERIAL CONSORTIA ENRICHED FROM METAL-CONTAMINATED AND UNCONTAMINATED SEDIMENTS*. Environmental Toxicology & Chemistry, 2007. **26**(2): p. 225-230.
27. Gadd, G.M. and A.J. Griffiths, *Microorganisms and Heavy Metal Toxicity*. Microbial Ecology, 1977. **4**(4): p. 303-317.
28. Karri, S., R. Sierra-Alvarez, and J.A. Field, *Toxicity of copper to acetoclastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge*. Chemosphere, 2006. **62**(1): p. 121-127.
29. Karnachuk, O.V., et al., *Distribution, diversity, and activity of sulfate-reducing bacteria in the water column in Gek-Gel lake, Azerbaijan*. Microbiology (00262617), 2006. **75**(1): p. 82-89.

CAPÍTULO IV

Conclusiones

La toxicidad de cobre (II) en la actividad metabólica de generación de sulfuro de las BSR fue evaluada con éxito en el presente estudio y se logró determinar la concentración del mismo a la cual el 20% del consorcio bacteriano se vio afectado. Sin embargo, no se registró la concentración de cobre (II) que generó 50 y 80% de inhibición ya que las BSR demostraron ser resistentes incluso a las concentraciones más altas de cobre (II) utilizadas.

Por otro lado, la mínima concentración de cobre (II) evaluada no produjo ningún tipo de inhibición en la producción de sulfuro por parte de las bacterias sulfato-reductoras por lo que se puede concluir que este elemento en concentraciones muy bajas actúa como un nutriente para las BSR y no como un agente contaminante e inhibidor.

En cuanto al funcionamiento del reactor biológico se puede concluir que se logró una estabilización del mismo después de haber sufrido variaciones de temperatura, pH y disminución en la concentración del aceptor de electrones; esto indica que las BSR son resistentes a variaciones de ambiente y tienen una capacidad de recuperación rápida.

El reactor biológico se conectó en serie con el reactor físico-químico, el mismo que tuvo como afluentes el sulfuro biogénico producido en el bioreactor y una muestra sintética DAM compuesta de cobre (II) y elevada acidez. Dicho reactor operó de manera continua con el fin de precipitar el cobre (II) a manera de sulfuro de cobre y elevar el pH ácido que es común en los DAM hasta tener valores neutros alrededor de 7 a 8. La remoción de cobre (II) fue prácticamente completa obteniendo porcentajes de remoción mayores a 98%. Esto demuestra

la efectividad del sistema biológico-físico-químico para el tratamiento de los DAM, el mismo que podría ser evaluado a futuro con DAM naturales para una posterior aplicación en el campo y poder así contribuir a la remediación de los cuerpos de agua contaminados con efluentes mineros.