

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Estudio de factibilidad del diseño de un sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento de drenajes ácidos de mina a escala laboratorio

Daniela Estefanía Flor Cevallos

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

Quito, Agosto 2012

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Estudio de factibilidad del diseño de un sistema biológico-físico-químico (BFQ)
para el tratamiento de drenajes ácidos de mina a escala laboratorio

Daniela Estefanía Flor Cevallos

Valeria Ochoa-Herrera, Ph.D.

Directora de Tesis

y Miembro del comité de tesis

Ródney Peñafiel, Ph.D.

Miembro del comité de tesis

Réne Parra, Ph.D.

Miembro del comité de tesis

Stella de la Torre, Ph.D.

Miembro del comité de tesis

© Derechos de autor

Daniela Estefanía Flor Cevallos

Resumen

La actividad minera en el mundo ha crecido considerablemente durante los últimos años debido a los beneficios económicos que surgen por la gran dependencia del uso de metales para el desarrollo tecnológico; sin embargo, con esta actividad se producen grandes impactos ambientales como son daños a los ecosistemas y la contaminación de cuerpos de agua por la descarga de los drenajes ácidos de mina. Los drenajes ácidos de mina son efluentes generados por la oxidación de sulfuros minerales que se caracterizan principalmente por tener valores de pH bajo, altas concentraciones de metales pesados y sulfatos. El objetivo de este estudio fue demostrar la potencialidad del sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento de drenajes ácidos de mina (DAM) a escala laboratorio. El sistema BFQ está compuesto de un reactor biológico empacado con un consorcio microbiano rico en bacterias sulfato reductoras (BSR) para la producción de sulfuro biogénico, conectado en serie a un reactor físico-químico donde ocurre la precipitación de metales pesados, Cu (II) y Zinc (II), como sulfuros metálicos. El reactor biológico fue alimentado de manera continua con flujo ascendente con medio basal con acetato como donador de electrones a una concentración de 2500 mg DQO-acetato L⁻¹ y sulfato como aceptor de electrones a una concentración de 4000, 3000 y 2000 mg L⁻¹, respectivamente. El reactor físico-químico fue alimentado simultáneamente con el efluente de reactor biológico y con DAM sintético con pH entre 2.7-3 y concentraciones de Cu (II) en la Fase I de 30 mg L⁻¹, en la Fase II de 60 mg L⁻¹, en la Fase III de 100 mg L⁻¹ y por último la Fase IV con 30 mg L⁻¹ y Zn (II) con una concentración de 30 mg L⁻¹. El sistema de tratamiento biológico-físico-químico (BFQ) demostró ser altamente eficiente para el tratamiento de metales pesados con remociones de cobre (II) y zinc (II) mayores al 97% y un incremento de pH del drenaje ácido de mina sintético a 8.5. En base a los resultados obtenidos se concluyó que las condiciones de operación del bioreactor empacado con BSR tales como pH adecuado, temperatura de 30°C, sistema anóxico y una concentración de sulfato y acetato (relaciones entre DQO-sulfato menor a 1), son determinantes para el crecimiento microbiano y por lo tanto para el buen funcionamiento del sistema BFQ.

Abstract

The mining activity worldwide has grown during the last years due to the economic benefits that arise because of the great dependence of metals for technology development. Nevertheless, this activity has huge environmental impacts such as damage of the ecosystem and water pollution due to untreated acid mine drainages discharges. Acid mine drainages (AMD) are generated as a result of the oxidation of sulphur minerals, these liquid discharges contain high concentrations of heavy metals and sulfates and very low pH values. The aim of this study was to demonstrate the feasibility of a biological-physical-chemical (BPQ) system at laboratory scale for the treatment of AMD. The system consists of a biological reactor packed with a microbial consortium rich in sulfate-reducing bacteria (SBR) for the production of biogenic sulphur connected in series to a physical-chemical reactor for the precipitation of heavy metals, Cu (II) and Zn (II), as metallic sulphur. The bioreactor was fed in an ascending flow mode with 2500 mg COD-acetate L⁻¹ as the electron donor and sulfate with concentrations of 4000, 3000 and 2000 mg L⁻¹ as electron acceptor. The physical-chemical reactor was fed with the effluent from the bioreactor and the synthetic AMD with concentrations of Cu (II) of 30 (Phase I), 60 (Phase II) and 100 mg L⁻¹ (Phase III) and Zn (II) with a concentration of 30 mg L⁻¹ (Phase IV). The biological-physical-chemical (BPQ) system demonstrated to be highly efficient for the removal of heavy metals, with removals of Cu (II) and Zn (II) higher than 97% and an increase in the pH value of the synthetic acid mine drainage to 8.5. The favorable conditions for the good functioning of the biological system were found to be the following: an anoxic system, suitable pH, temperature around 30°C and concentrations of sulphate and acetate (DQO-sulfate relations lower than 1).

Agradecimientos

A mi familia por su apoyo incondicional, especialmente a mi MADRE por su inmenso amor, por siempre estar cuando la necesito y por su gran paciencia. A mi HERMANO por ser mi guía y mi ejemplo. A mi PADRE, por todo el cariño que me ha dado. A mis abuelos por siempre estar en todos los momentos especiales y ser como unos padres. A mis tíos y primos por enseñarme a cruzar los caminos de la vida siempre con una sonrisa.

A mis amigos del colegio, por compartir tantos momentos lindos conmigo. A mis amigos de la universidad, porque son las mejores personas con las que me pude cruzar durante esta etapa, por siempre estar ahí cuando los necesitaba, por todas las risas y recuerdos. A Santi que en esta etapa ha sido mi apoyo y mis ganas de seguir.

A mis profesores por ser personas admirables en cuanto a calidad humana y profesional. A René Parra, quien siempre ha estado dispuesto a ayudarme y enseñarme. A Rodny Peñafiel, por todo su tiempo y paciencia que ha tenido durante la carrera.

A mi directora de tesis Valeria Ochoa, por incentivar me al trabajo de investigación, por su tiempo y dedicación en este trabajo y por transferirme la emoción y pasión a la carrera y al trabajo.

¡Muchas gracias a todos los que estuvieron presentes durante esta etapa de mi vida!

Tabla de contenidos

Introducción.....	1
Drenajes ácidos de Mina (DAM).....	5
Tipos de Tratamiento	8
Justificación	12
Objetivo General.....	13
Objetivos Específicos	13
Materiales y Métodos	15
Reactivos.....	15
Medio Basal Mineral	15
Métodos Analíticos	17
Sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento de los Drenajes Ácidos de Mina Sintéticos (DAM).....	24
Resultados y Discusión.....	32
Evaluación del funcionamiento del Reactor Biológico	32
Balances de Sustrato y Biomasa en el reactor Biológico.....	48
Evaluación del funcionamiento del sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento del drenaje ácido de mina sintético.....	61
Remoción de Metales Pesados.....	70
Precipitación sulfuros metálicos.	77
Conclusiones.....	81
Bibliografía.....	83

Lista de Tablas

Tabla 1 Ensayos para la determinación de la precipitación del cobre (II) como sulfuro de cobre (CuS)	30
Tabla 2 Balance de azufre en el reactor biológico, el balance se lo realizó cuando alimentación en el reactor biológico era de 2000 mg L ⁻¹ de sulfato.....	60
Tabla 3. Concentración calculada de iones sulfuro e hidróxidos para la precipitación de Cu (II) como sulfuro de cobre (CuS) e hidróxido de cobre (Cu(OH) ₂), respectivamente en diferentes tratamientos con concentraciones de cobre (II) de 5, 10,15, 25 y 50 mg L ⁻¹ correspondientes a los tratamientos T-1, T-2, T-3, T-4 y T-5 respectivamente.....	79
Tabla 4. Porcentaje de remoción de sulfuro y Cu (II) en el control (ausencia de cobre (II)) y en los diferentes tratamientos con concentraciones de cobre (II) de 5, 10,15, 25 y 50 mg L ⁻¹ de Cu (II) correspondientes a los tratamientos T-1, T-2, T-3, T-4 y T-5, respectivamente.....	80

Lista de Figuras

- Figura 1.** Ingresos por la producción total de la minería en el Ecuador en el año 2000 hasta el 2009. Fuente: Información obtenida del Instituto Nacional de Estadística y Censos. Manufactura y Minería 3
- Figura 2.** Ubicación de los proyectos mineros en el Ecuador: Quimsacocha, Río Blanco, San Carlos Panantza, Mirador y Fruta del Norte. Fuente: diario El Comercio. 4
- Figura 3.** Fotografía del medio basal alimentado al reactor biológico compuesto de 2500 mg DQO-acetato L^{-1} como donador de electrones y sulfato en concentraciones de 4000, 3000 y 2000 mg L^{-1} como aceptor de electrones con un pH entre 7.1-7.3 (Fotografía por Daniela Flor)..... 16
- Figura 4** Fotografía de la medición de sulfuro por el método colorimétrico de azul de metileno (Fotografía por Daniela Flor) 18
- Figura 5** Fotografía de los estándares empleados para la determinación de la demanda química de oxígeno mediante el método colorimétrico (Fotografía tomada por Daniela Flor)..... 22
- Figura 6** Diagrama de bloques del Sistema Biológico-Físico-Químico (BFQ) de tratamiento del drenaje ácido de mina sintético (DAM). El sistema está conformado por dos reactores conectados en serie, el reactor biológico alimentado de manera continua con flujo ascendente con medio basal con acetato como donador de electrones a una concentración de 2500 mg DQO-acetato L^{-1} y sulfato como aceptor de electrones a una concentración de 4000, 3000 y 2000 mg L^{-1} . El reactor físico-químico fue alimentado con el efluente de reactor biológico y el DAM sintético con concentraciones de Cu (II) de 30, 60 y 100 mg L^{-1} durante todo el estudio y Zn (II) con concentración de 30 mg L^{-1} 26
- Figura 7** Esquema del diseño del Sistema Biológico-Físico-Químico (BFQ) de tratamiento del drenaje ácido de mina sintético (DAM). El sistema está conformado por dos reactores conectados en serie, el reactor biológico alimentado de manera continua con un flujo ascendente con medio basal con acetato como donador de electrones en una concentración de 2500 mg DQO-acetato L^{-1} y sulfato como aceptor de electrones con concentraciones de 4000, 3000 y 2000 mg L^{-1} . El reactor físico-químico fue alimentado con el efluente de reactor biológico y el DAM sintético con concentraciones de Cu (II) de 30, 60 y 100 mg L^{-1} durante todo el estudio y Zn (II) con concentración de 30 mg L^{-1} . (Las dimensiones de los reactores se encuentran en cm) 27

Figura 8 . Fotografía de los experimentos Batch para evaluar la precipitación de CuS Los ensayos corresponden a un control (ausencia de cobre (II)) y diferentes tratamientos con concentraciones en aumento de cobre (II) de 5, 10,15, 25 y 50 mg L⁻¹ correspondientes a los tratamientos T-1, T-2, T-3, T-4 y T-5, respectivamente (Fotografía Daniela Flor)..... 31

Figura 9. Producción de sulfuro con respecto al tiempo en el de monitoreo del reactor biológico parte del sistema de tratamiento BFQ de DAM que comprende dos estudios previos y el presente análisis desde t= 475 días. El reactor biológico funciona en modo de operación continua con flujo ascendente empacado con 15 g SVS L⁻¹ de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentación de 2.5 g DQO L⁻¹ de acetato y 4000 mg L⁻¹ de sulfato hasta t=140 días, 3000 mg L⁻¹ hasta t=637 días y 2000 mg L⁻¹ hasta el t=816 días. Leyenda:() Limpieza del reactor biológico t=530, (·····) aumento de temperatura a 32°C t=578 (- -) cambio en la concentración de sulfato a 2000 mg L⁻¹ t=637. 35

Figura 10 Porcentaje de remoción de la demanda química de oxígeno (DQO) con respecto al tiempo en el de monitoreo del reactor biológico parte del sistema de tratamiento BFQ de DAMM que comprende dos estudios previos y el presente análisis desde t= 475 días. El reactor biológico funciona en modo de operación continua con flujo ascendente empacado con 15 g SVS L⁻¹ de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentación de 2.5 g DQO L⁻¹ de acetato y 4000 mg L⁻¹ de sulfato hasta t=140 días, 3000 mg L⁻¹ hasta t=637 días y 2000 mg L⁻¹ hasta el t=816 días. Leyenda:() Limpieza del reactor biológico t=530 (·····) aumento de temperatura a 32°C t=578 (- -) cambio en la concentración de sulfato a 2000 mgL⁻¹ t=637 40

Figura 11. Composición fraccional de sulfuros con respecto al pH. Figura realizada con los valores de $k_1=9,5 \times 10^{-8}$, $k_2=1 \times 10^{-14}$. Leyenda: (·····) Composición fraccional de la especie H₂S, (- -) Composición fraccional de la especie HS⁻, (- · -) Composición fraccional de la especie S²⁻ 47

Figura 12. Esquema del balance de masa del reactor biológico parte del sistema de tratamiento BFQ de DAM. El reactor biológico de flujo ascendente en modo de operación continua alimentado con acetato como donador de electrones en una concentración de 2500 mg DQO-acetato L⁻¹ y sulfato como aceptor de electrones en una concentración de 2000 mg L⁻¹ Leyenda: Q=caudal, S₀=concentración inicial de acetato, X₀= concentración inicial de biomasa, S₁= concentración final de sustrato y X₁=concentración final de biomasa..... 53

Figura 13. Variación de sulfuro con respecto al tiempo en el sistema biológico-físico- químico (BFQ) para el tratamiento de DAM sintético. El reactor biológico fue empacado con 15 g SVS L⁻¹ de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con 2.5 g DQO L⁻¹ de acetato y 4000 mg L⁻¹ de sulfato hasta t=140 días, 3000 mg L⁻¹ de sulfato hasta t=637 días y 2000 mg L⁻¹ de sulfato hasta el t=816. El reactor físico-químico fue alimentado con DAM sintético con concentraciones variables de cobre divididas en 4 fases. Fase I: concentración de cobre (II) de 30 mgL⁻¹ desde su montaje hasta t=

509 días. Fase II: concentración de cobre (II) de 60 mgL⁻¹ hasta t=581. Fase III: concentración de cobre (II) de 100 mg L⁻¹ hasta t= 715. Fase IV: concentración de cobre de 30 mg L⁻¹ y zinc de 30 mg L⁻¹.

Leyenda: (—◆—) Efluente del reactor biológico (—□—) Efluente del reactor físico-químico (—) Limpieza del reactor biológico t=530 (———) Incremento de temperatura a 32 °C t=578 (- - - -) Cambio concentración de sulfato a 2000 mg L⁻¹ t=637..... 64

Figura 14. Variación de flujo con respecto al tiempo en el sistema biológico-físico- químico (BFQ) para el tratamiento de DAM sintético. El reactor biológico fue empacado con 15 g SVS L⁻¹ de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con 2.5 g DQO L⁻¹ de acetato y 4000 mg L⁻¹ de sulfato hasta t=140 días, 3000 mg L⁻¹ de sulfato hasta t=637 días y 2000 mg L⁻¹ de sulfato hasta el t=816. El reactor físico-químico fue alimentado con DAM sintético con concentraciones variables de cobre divididas en 4 fases. Fase I: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ desde su montaje hasta t= 509 días. Fase II: Cu (II) igual a 60 mg L⁻¹ hasta t=581. Fase III: Cu (II) igual a 100 mg L⁻¹ hasta t= 715. Fase IV: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ y Zn (II) igual a 30 mg L⁻¹. Leyenda: (◆) efluente del reactor biológico, (□) afluente del reactor físico-químico..... 66

Figura 15. Variación del pH con respecto al tiempo en el sistema biológico-físico- químico (BFQ) para el tratamiento de DAM sintético. El reactor biológico fue empacado con 15 g SVS L⁻¹ de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con 2.5 g DQO L⁻¹ de acetato y 4000 mg L⁻¹ de sulfato hasta t=140 días, 3000 mgL⁻¹ de sulfato hasta t=637 días y 2000 mg L⁻¹ de sulfato hasta el t=816. El reactor físico-químico fue alimentado con DAM sintético con concentraciones variables de cobre divididas en 4 fases. Fase I: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ hasta t= 509 días. Fase II: Cu (II) igual a 60 mgL⁻¹ hasta t=581. Fase III: Cu (II) igual a 100 mg L⁻¹ hasta t= 715. Fase IV: Cu igual a 30 mg L⁻¹ y Zn (II) igual a 30 mg L⁻¹. Leyenda: (◆) Efluente del reactor biológico (□) Efluente del reactor físico-químico (●) afluente DAM (◇) Medio basal. 69

Figura 16. Concentración de metales el afluente del reactor físico-químico parte del sistema biológico-físico- químico (BFQ) para el tratamiento de DAM sintético. El reactor físico- químico de flujo ascendente en modo de operación continua fue alimentado con DAM sintético con concentraciones variables de cobre divididas en 4 fases. . Fase I: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ hasta t= 509 días. Fase II: Cu (II) igual a 60 mg L⁻¹ hasta t=581. Fase III: Cu (II) igual a 100 mg L⁻¹ hasta t= 715. Fase IV: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ y Zn (II) igual a 30 mg L⁻¹.Leyenda: (●) Concentración de Cu (II) en mg L⁻¹, (□) Concentración de Zn (II) en mgL⁻¹..... 71

Figura 17. Concentración de metales en el efluente del reactor físico-químico parte del sistema biológico-físico- químico (BFQ) para el tratamiento de DAM sintético. El reactor físico-químico fue alimentado con DAM sintético con concentraciones variables de cobre divididas en 4 fases. Fase I: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ hasta t= 509 días. Fase II: Cu (II) igual a 60 mg L⁻¹ hasta t=581. Fase III: Cu (II)

igual a 100 mg L⁻¹ hasta t= 715. Fase IV: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ y Zn (II) igual a 30 mg L⁻¹.
Leyenda: (•) Concentración de Cu (II) en mgL⁻¹, (◻) Concentración de Zn (II) en mg L⁻¹ 74

Figura 18. Porcentaje de remoción de Cu (II) en el sistema biológico-físico- químico (BFQ) para el tratamiento de DAM sintético. El reactor físico-químico fue alimentado con DAM sintético con concentraciones variables de cobre divididas en 4 fases. Fase I: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ hasta t= 509 días. Fase II: Cu (II) igual a 60 mg L⁻¹ hasta t=581. Fase III: Cu (II) igual a 100 mg L⁻¹ hasta t= 715. Fase IV: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ y Zn (II) igual a 30 mg L⁻¹ 75

Figura 19. Porcentaje de remoción de Zn (II) en el sistema biológico-físico- químico (BFQ) para el tratamiento de DAM sintético. El reactor físico-químico fue alimentado con DAM sintético con concentraciones variables de cobre divididas en 4 fases. Fase I: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ hasta t= 509 días. Fase II: Cu (II) igual a 60 mg L⁻¹ hasta t=581. Fase III: Cu (II) igual a 100 mg L⁻¹ hasta t= 715. Fase IV: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ y Zn (II) igual a 30 mg L⁻¹ 76

Introducción

La actividad minera en el mundo ha crecido durante los últimos años debido a los beneficios económicos que surgen por la gran dependencia del uso de metales para el desarrollo tecnológico. La explotación minera trae muchos ingresos para un país ya que el mercado de minerales es muy grande. Las perspectivas del incremento del precio del oro, plata y cobre hacen que las empresas mineras sean de las más atractivas para los inversionistas, a corto y mediano plazo [1]. El oro tiene un precio de 2000 USD por onza, la plata 42 USD por onza y el cobre 0.25 USD por onza. El mercado de los metales ha servido como un refugio para los inversionistas debido a la incertidumbre de otros mercados en Estados Unidos y en Europa como el inmobiliario, automotriz, electrónico y energético. [1]

En el Ecuador ha ocurrido el mismo comportamiento que en otros lugares del mundo donde la minería ha llegado a ser un sector económico importante. En la Figura 1 se muestra como desde el año 2000 hasta el año 2009 los ingresos totales por la explotación minera han ido en aumento. En el año 2000 hubo una producción total de aproximadamente once mil millones USD mientras que el incremento para el año 2009 fue de casi el doble llegando a un valor de veinte y un mil millones USD.

En la actualidad existen diferentes proyectos mineros en el Ecuador, cuya ubicación se encuentra descrita en la Figura 2. El proyecto Mirador (Inversión = 7500 millones USD a 20 años, Ingresos = 164 millones USD anuales por 20 años), proyecto Fruta del Norte (Inversión= 2400 millones USD a 20 años, Ingresos= 85 millones USD anuales), proyecto Río Blanco (Inversión= 1230 millones USD, Ingresos= 11 millones USD anuales por ocho años),

proyecto San Carlos (Inversión= 22000 millones USD, Ingresos= 480 millones USD anuales por veinte años) y el proyecto Quimsacocha (Inversión= 740 millones USD a ocho años, Ingresos= 40 millones USD anuales). Se dice que el Proyecto Fruta del Norte generará 9000 empleos indirectos y directos [2].

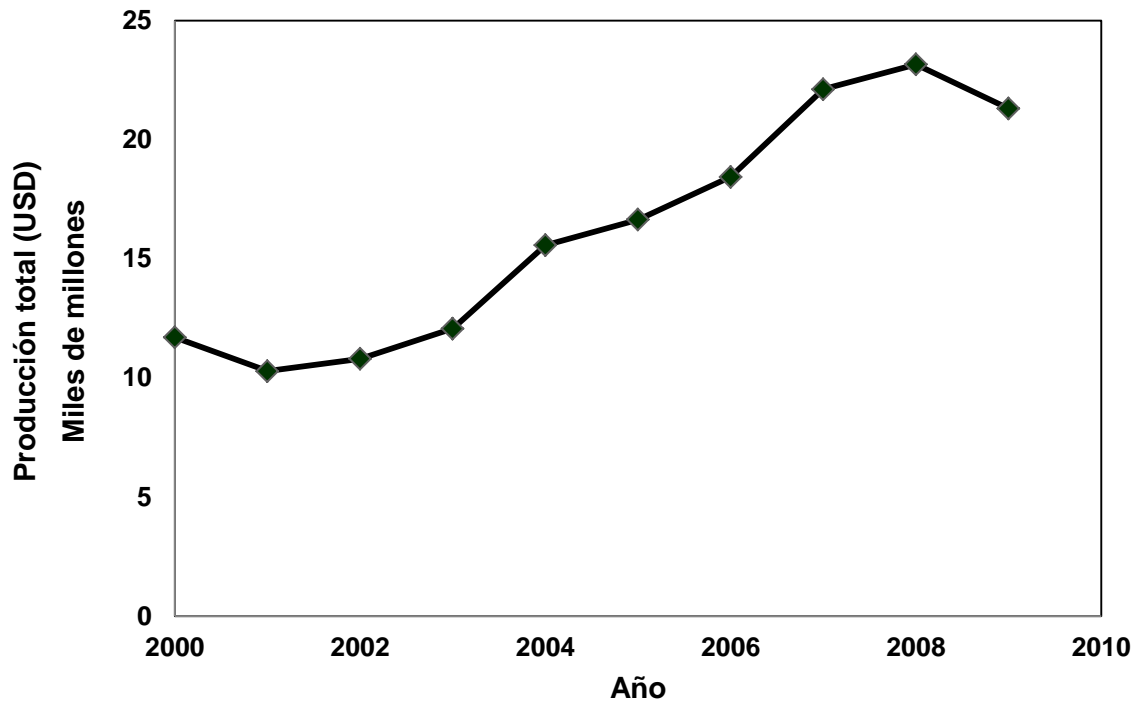


Figura 1. Ingresos por la producción total de la minería en el Ecuador en el año 2000 hasta el 2009. Fuente: Información obtenida del Instituto Nacional de Estadística y Censos. Manufactura y Minería



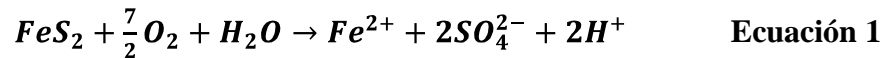
Figura 2. Ubicación de los proyectos mineros en el Ecuador: Quimsacocha, Río Blanco, San Carlos Panantza, Mirador y Fruta del Norte. Fuente: diario El Comercio.

Es notable la cantidad de proyectos que se pueden desarrollar en el país así como la gran cantidad de dinero que se podría obtener de los mismos; sin embargo, con estos proyectos se producen grandes impactos ambientales como son: daños a los ecosistemas y la contaminación del agua producida por los drenajes ácidos de mina. En Bolivia existen varios casos donde se generan externalidades negativas por las actividades mineras. Por ejemplo, en las minas de Oruro y Huanuni, los drenajes ácidos de mina han deteriorado las tuberías de las poblaciones cercanas provocando que ingresen contaminantes al sistema de agua, afectando así a la salud de los pobladores. Otro caso en Bolivia ocurrió por las actividades mineras en la ciudad de Potosí, donde la contaminación llegó río abajo afectando la salud de los habitantes, animales y la productividad agrícola [3].

Drenajes ácidos de Mina (DAM)

Los drenajes ácidos de mina son efluentes generados por la oxidación de sulfuros metálicos que se caracterizan por tener valor de pH bajo, altas concentraciones de metales pesados y sulfatos, y otros contaminantes peligrosos. Por ejemplo, en los drenajes ácidos de la mina S. Domingos en Portugal se encontró un pH de 2.4, una demanda química de oxígeno de 0.25 g L^{-1} , una concentración de sulfato de 3.1 g L^{-1} y los principales metales encontrados fueron Fe (II), Cu (II) y Zn (II) con concentraciones de 497, 49 y 107 mg L^{-1} respectivamente [4]. En Latinoamérica se tiene el caso de la Paz- Bolivia de la mina San Francisco donde se encontraron metales pesados especialmente Zn (II), Cu (II), Fe (II) y Cd (II) con concentraciones de 1435, 2.54, 915 y 10.92 mg L^{-1} y un pH de 2.7 [5].

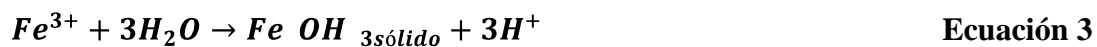
Los drenajes ácidos de mina (DAM) se producen en la naturaleza por la exposición de sulfuros minerales de la roca siendo uno de los precursores más comunes la pirita (FeS_2). El proceso de formación de DAM se inicia con la oxidación de la pirita como se ilustra en la siguiente Ecuación [6].



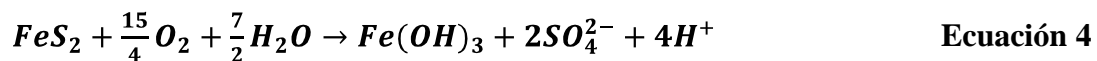
Debido a la presencia de iones hidronios (H^+), sulfatos (SO_4^{2-}) e iones ferrosos (Fe^{2+}) la acidez y la cantidad de sólidos disueltos aumentan. Si el ambiente es lo suficientemente oxidante la mayoría del hierro ferroso se oxidaría a hierro férrico, como se muestra en la Ecuación 2 [6]:



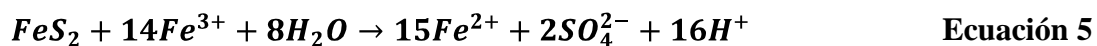
Cuando el pH se encuentra entre 2.3 y 3.5, el ión férrico precipita como $\text{Fe}(\text{OH})_3$ o jarosita disminuyendo el pH [6] como se indica en la Ecuación 3:



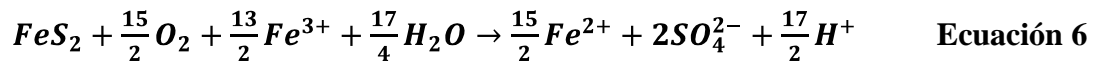
La ecuación completa donde ocurre precipitación del hierro como $\text{Fe}(\text{OH})_3$ es la siguiente:



Todos los iones férricos que no precipitan pueden ser usados para oxidar la pirita sobrante de acuerdo a la siguiente ecuación [6]:



La ecuación general para la oxidación adicional de pirita con el ión férrico es [6]:



La Ecuación 6 es la ecuación característica para la formación de DAM, la oxidación de un mol de pirita (FeS_2) libera $\frac{17}{2}$ moles de ión hidronio (H^+) lo cual aumenta la acidez abriendo paso para la liberación de metales. Otro aspecto que se puede observar de la Ecuación 6 es que por cada mol de pirita se generan dos moles de sulfato, que pueden resultar tóxicos para el ambiente. El Fe^{2+} de la Ecuación 6 puede oxidarse en Fe^{3+} y empezar el ciclo nuevamente.

Existen varios factores que determinan la generación de drenajes ácidos de mina como lo son: oxígeno disuelto en el agua, actividad microbiana, pH entre otros. Por ejemplo, si la permeabilidad es alta, el ingreso de oxígeno también es alto y aumenta la oxidación de la pirita o cualquier mineral sulfurado. En el caso de la actividad microbiana se debe considerar que las bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans* son más activas con un pH menor de 3.2, en estas condiciones existiría mayor formación de drenaje ácido de mina ya que la oxidación de Fe^{2+} se vería catalizada por estas bacterias y se produciría Fe^{3+} que sirve como agente oxidante durante la oxidación de FeS_2 [6]. La velocidad de oxidación de la pirita (FeS_2) con Fe^{3+} es mucho más rápida que la oxidación con O_2 por lo que la generación de drenajes ácidos de mina es mayor cuando existe Fe^{3+} que ha sido catalizado por las bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

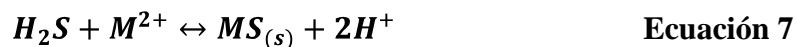
Las actividades mineras pueden incrementar la formación de los drenajes ácidos de mina ya que aumentan la exposición de sulfuros minerales en la roca [6]. Existen diferentes tipos de minería, la de cielo abierto y la minería subterránea, para ambos tipos se realizan procesos de

extracción de suelo que están a varios metros de profundidad, la extracción de este suelo abre paso a la exposición de los sulfuros minerales en la roca a oxígeno y agua. Este drenaje ácido de mina puede llegar a contaminar las aguas superficiales, las aguas subterráneas y el suelo [7]. Algunos de los drenajes ácidos de mina se mantienen sin tratamiento debido a que las tecnologías de tratamiento pueden resultar muy caras o poco comunes [8].

Tipos de Tratamiento

Existen varias tecnologías para la remediación de los drenajes ácidos de mina. Estos tratamientos se clasifican en tratamientos abióticos y biológicos los cuales a su vez se dividen en activos y pasivos [9]. El método más usado a nivel mundial para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina consiste en la adición de un agente químico neutralizante, este es un tratamiento abiótico activo [10]. Durante este tratamiento la adición del químico alcalino produce una elevación del pH y precipita los metales pesados como hidróxidos y carbonatos. Los diferentes agentes alcalinos empleados para elevar el pH son la cal, carbonato de calcio, hidróxido de sodio, óxido de magnesio e hidróxido [7]. A un pH alrededor de 9.5 los metales como el hierro (Fe), Zinc (Zn) y Cobre (Cu) precipitan ya que la concentración de hidróxidos (OH^-) y la constante de solubilidad (k_{sp}) permite que este fenómeno ocurra [11]. La remoción del sulfato se puede lograr con un agente neutralizante que contenga calcio. Este tipo de tratamiento resulta muy efectivo; sin embargo, las desventajas de este proceso son los altos costos de operación, la cantidad de lodo que se genera y su posterior tratamiento [7]

Otro de los procesos que se utilizan para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina es la biorremediación. Existen varios estudios donde se demuestra que las procariontas tales como las bacterias sulfato reductoras y las eucariotas tales como algas y hongos pueden remover metales pesados del suelo y el agua por vías metabólicas [12]. El tratamiento biológico de los drenajes ácidos de mina usando bacterias sulfato reductoras (BSR) es una opción de bajo costo que ha sido ampliamente investigada en la actualidad [13-17]. Las BSR son un grupo fisiológico muy importante para la producción de sulfuro; por ejemplo, en ambientes anóxicos de baja temperatura la única fuente de sulfuro es la que se produce por la reducción del sulfato por parte de dichas BSR [18]. Esta producción de sulfuro biogénico precipita los metales como metales sulfurosos ofreciendo un gran potencial para remediar los drenajes ácidos de mina [19, 20], como se indica a continuación [21]:



Donde M puede ser cualquier metal como Fe, Zn, Ni, Cu, entre otros.

Las BSR poseen requerimientos ambientales específicos que incluyen: un ambiente anaeróbico, pH mayor a 5, la presencia de un sustrato (donador de electrones), sulfato (aceptor de electrones) y un soporte físico para su crecimiento [21]. Las bacterias sulfato reductoras son muy diversas, y estas pueden utilizar diferentes vías bioquímicas para reducir el sulfato usando diferentes donadores de electrones como H_2 o algún compuesto orgánico de cadena corta [22].

En la actualidad las BSR son empacadas en reactores para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina. Los reactores biológicos sulfidogénicos tienen como ventajas: la separación

de los metales pesados y la reducción de la concentración de sulfato [9]. Según Canty la reducción biológica de sulfato mejora la calidad del agua de los drenajes ácidos de mina de cuatro maneras [23]:

- Precipitación de sulfuros metálicos
- Neutralización del pH de los drenajes ácidos de mina.
- Producción de alcalinidad por la formación de bicarbonato durante la oxidación de la materia orgánica
- Remoción de sulfato para la producción de sulfuros.

Existen dos tecnologías empleadas actualmente para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina en reactores. La primera es un *Sistema Biosulfuro* y consiste en un componente biológico y uno químico que actúan de manera independiente [24]. El sistema consiste en dos reactores. El primer reactor contiene las bacterias sulfato reductoras para la producción de sulfuro biogénico. El efluente con sulfuro biogénico entra a un segundo reactor donde se mezcla con los drenajes ácidos de mina y logra precipitar metales pesados y elevar el pH. Una parte del drenaje ácido tratado se recircula al reactor biológico para proporcionar de una fuente de sulfato para las BSR. En ocasiones para que el tratamiento funcione de manera correcta es necesario, añadir un químico alcalino. Las BSR son muy sensibles a la acidez por lo que estos bioreactores han sido construidos para proteger a los microorganismos de tal manera que no estén directamente expuestos a los drenajes ácidos de mina [9].

El otro sistema de tratamiento se llama *Thiopaq* que consta de dos poblaciones de microorganismos, la primera las BSR que generan sulfuro biogénico con el objetivo de precipitar los metales pesados y la segunda las bacterias oxidantes de sulfuro encargadas de

convertir sulfuro de hidrógeno sobrante a sulfuro elemental. Este proceso ha operado de manera exitosa desde 1992 en Holanda en la refinería de zinc llamada Budelco, para tratar agua subterránea contaminada con zinc. El sulfuro de zinc que es producido en el tratamiento se incorpora a la refinería para los procesos con zinc metálico [9]. En esta planta de tratamiento se tratan alrededor de $300 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$ de agua subterránea para remover zinc y sulfato, convirtiendo un flujo de $500 \text{ kg SO}_4^{2-} \text{ h}^{-1}$ en ZnS [25]. También se han obtenido exitosos resultados en una planta piloto en una mina de Utah donde se ha recuperado más del 99% del cobre a un pH de 2.6 [26]. En esta mina se producen 280 kilotoneladas al año de cobre, la planta de tratamiento consiste en dos secciones, la primera sección es la producción de sulfuro biogénico y la precipitación del cobre, la segunda sección es la recuperación del cobre, por medio de un clarificador, que luego será llevado a los procesos de tratamiento para su futura comercialización. El afluente de este sistema tiene una concentración de cobre (II) de 180 mg L^{-1} , mientras que el efluente tiene valores menores a 0.3 mg L^{-1} [27].

En el presente estudio se muestra como alternativa de tratamiento un sistema Biológico-Físico-Químico (BFQ) a escala de laboratorio el cual consiste en dos reactores en serie un reactor biológico y otro reactor físico-químico. El reactor biológico empacado con bacterias sulfato-reductoras (BSR) de flujo ascendente fue alimentado de manera continua con medio basal mineral con acetato como donador de electrones y sulfato en concentraciones decrecientes de 4000, 3000 y 2000 mg L^{-1} como aceptor de electrones. El reactor físico-químico fue alimentado a través de su puerto lateral izquierdo con el efluente del reactor biológico y por el puerto inferior con el DAM sintético con concentraciones en aumento de Cu (II) y Zn (II). El tratamiento consiste en la formación de sulfuro biogénico en el reactor biológico para la precipitación de metales pesados en el reactor físico-químico. El sistema

BFQ de tratamiento de los DAM se realizó durante tres fases de estudio, siendo esta la tercera donde se pretende demostrar la pre-factibilidad del sistema de tratamiento BFQ para drenajes ácidos de mina

Justificación

Los efectos ambientales y toxicológicos que los drenajes ácidos de mina pueden causar son unas de las razones que incentivan la investigación de tecnologías para su tratamiento, especialmente si la explotación minera sigue en aumento. Por ejemplo, en Perú, en una mina de cobre y molibdeno se utilizan 575 galones por segundo para la obtención de los minerales lo cual simboliza una gran cantidad de agua para ser tratada posteriormente. Si el agua no es tratada puede traer grandes problemas, por ejemplo, en el Complejo Clark Fork en Montana donde se minó cobre por más de un siglo, después de ser abandonada se llenó de agua llegando a contener niveles tóxicos de arsénico, cobre, zinc y azufre. Esta contaminación afectó a las aves que pasaban por esta laguna para refrescarse causando la muerte de 342 gansos. La rehabilitación de la cuenca tuvo un costo de 1.5 millones de USD [28].

Con el objetivo de evitar que el agua contaminada afecte al ecosistema por las concentraciones tóxicas de los metales pesados, sulfatos y la elevada acidez es necesario que exista tratamiento para los drenajes ácidos de mina. La biorremediación presenta una solución muy prometedora para su tratamiento. Es un tipo de tratamiento que ocurre de manera natural por lo que no se generan subproductos químicos que posteriormente habrá que tratarlos. El tratamiento de

metales pesados con bacterias sulfato reductoras es un tratamiento de biorremediación muy investigado en la actualidad debido a los grandes beneficios que produce.

Este tipo de tratamiento permite la precipitación de los metales pesados y en un futuro se puede mejorar este sistema para recuperar estos metales pesados e incluirlos en los diferentes procesos productivos. También este sistema logra disminuir las concentraciones de sulfato y elevar el pH. La investigación a escala de laboratorio con el fin de conocer las condiciones aptas para el funcionamiento y la factibilidad de este sistema resulta muy importante para poder aplicar dicha tecnología a gran escala en el futuro.

Objetivo General

- Demostrar la potencialidad del sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento de drenaje ácido de mina a escala laboratorio, mediante la remoción de cobre y zinc y aumento del pH; empleando un reactor biológico de flujo ascendente empacado con un consorcio microbiano que contiene BSR para la producción de sulfuro conectado en serie con un reactor físico-químico alimentado con un DAM sintético.

Objetivos Específicos

- Monitorear y estabilizar el reactor biológico con cambios de concentración de sulfato para determinar la concentración óptima de operación.
- Realizar balances de masa del aceptor y del donador de electrones y balances de sustrato y biomasa considerando la cinética microbiana de las bacterias sulfato reductoras.

- Realizar un balance de azufre en el reactor biológico, considerando la fase gaseosa y la fase acuosa.
- Demostrar la precipitación de los metales pesados como sulfuros metálicos en experimentos batch.
- Utilizar diferentes concentraciones de cobre (II) en el afluente de drenaje ácido de mina sintético (DAM), e incorporar zinc (II) para evaluar la eficiencia de remoción del sistema en presencia de estos metales pesados.

Materiales y Métodos

Reactivos

El sulfato de sodio (100%, pureza), sulfato de amonio y hierro (III) (99%), acetato de sodio (96%) , cloruro de zinc (100%) y ácido acético (99.8%) fueron obtenidos de Laboratorios Químicos H.V.O (Quito, Ecuador). El ácido sulfúrico (95.0-97.0%) e hidróxido de sodio (99%) fueron obtenidos de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). El DMP (oxalato de N,N-dimetil-p- fenildiamina) (>99%) se obtuvo de J.T. Baker (Zedelgem, Bélgica). El cloruro dihidratado de cobre (100%) se obtuvo de Sigma- sigma Aldrich. El dicloruro de bario dihidratado (99-100%) se obtuvo de Laboratorios Químicos H.V.O (Quito, Ecuador).

Medio Basal Mineral

El medio basal mineral, afluyente del reactor biológico, tiene la siguiente composición en mg L^{-1} con un pH de 7.1-7.3 (Figura 3): NH_4Cl (280); KH_2PO_4 (195); MgSO_4 (49); CaCl_2 (10); NaHCO_3 (3000); extracto de levadura (10) y 1 mL L^{-1} de solución de elementos traza. La composición de los elementos traza en mg L^{-1} : H_3BO_3 (50); $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2000); ZnCl_2 (50); MnCl_2 (32); $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (50); AlCl_3 (50); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2000) ; $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (50); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (44); $\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (100); EDTA (1000); resazurina (200) y 1 mL L^{-1} de HCL 36% . El acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) fue alimentado al reactor con 2.5 g demanda química de oxígeno (DQO)-acetato L^{-1} como donador de electrones. El sulfato de sodio (Na_2SO_4) fue alimentado en concentraciones de 4000, 3000 y 2000 mgL^{-1} [29].



Figura 3. Fotografía del medio basal alimentado al reactor biológico compuesto de 2500 mg DQO-acetato L^{-1} como donador de electrones y sulfato en concentraciones de 4000, 3000 y 2000 mg L^{-1} como aceptor de electrones con un pH entre 7.1-7.3 (Fotografía por Daniela Flor).

Métodos Analíticos

Medición de sulfuro

La medición de sulfuro disuelto se realizó usando un espectrofotómetro (Spectronic 20D+, Nueva York, Estados Unidos) por el método colorimétrico de azul de metileno a una longitud de onda de 670 nm [30, 31]. La formación de azul de metileno se monitoreó a través de la reacción entre el sulfuro y el reactivo colorimétrico oxalato de N,N-dimetil-p. fenildiamina (DMP) en un medio ácido [32] En un estudio previo se realizó una curva de calibración para determinar la relación entre la absorbancia y la concentración de sulfuro empleando una solución madre de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y se estableció que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración, la relación lineal se evaluó hasta una concentración de $1\text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ [32].

En un balón volumétrico de 25 mL se colocaron 5 mL de cloruro de zinc (2%), 2.5 mL de DMP (2 g L^{-1}) con 20% de ácido sulfúrico concentrado, 0.125 mL de la solución de sulfato de amonio y hierro (II) (100 g L^{-1}) y la muestra a ser analizada tomando en cuenta que la cantidad de sulfuro (S^{2-}) presente no fue mayor a 1 mg L^{-1} (Figura 4).



Figura 4 Fotografía de la medición de sulfuro por el método colorimétrico de azul de metileno (Fotografía por Daniela Flor)

Medición de sulfuro gaseoso

El sulfuro gaseoso fue medido mediante el método de absorción en una solución de hidróxido de sodio al 2% durante 1.3 días, que corresponde al tiempo de residencia del reactor biológico. Se usó el método de azul de metileno descrito en la sección anterior para medir la cantidad de sulfuro capturado en el hidróxido de sodio; sin embargo, la concentración obtenida al final, fue multiplicada por un factor de corrección de 0.9. El factor de 0.9 fue calculado teniendo en consideración la diferencia en la medición del sulfuro diluido en agua o en hidróxido de sodio. El cálculo del factor 0.9, se obtuvo empleando una solución de $100 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ en agua y $100 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$ en hidróxido de sodio con una solución madre como $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, donde la solución acuosa presentó una concentración mayor que la solución en hidróxido de sodio. Las concentraciones se diferenciaron por un factor de 0.9.

Medición de sulfato

La medición de sulfato (SO_4^{2-}) se realizó en el afluente y el efluente del reactor biológico. Se tomaron 25 mL de la muestra y se procedió a ajustarla a un pH ácido con ácido clorhídrico (HCl) al 30%. La muestra fue filtrada y a continuación se añadió 25 mL de una solución 0.1 M de cloruro de bario ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) la muestra se dejó reposar durante una hora y el sulfato presente en la solución precipitó como sulfato de bario (BaSO_4), para asegurarse que todo el sulfato haya precipitado se añadieron gotas adicionales de la solución de cloruro de bario. Posteriormente, se realizó una filtración al vacío empleando filtros de micro fibra de vidrio con un diámetro de 45.5 mm y tamaño de poro $1.2 \mu\text{m}$ (Whatman, Inglaterra, Reino Unido) las muestras filtradas fueron secadas en un horno GC- Series Lab Ovens (Quincy Lab. Inc, Chicago, Estados Unidos) durante 8 horas. La cantidad de sulfato de bario formada se

determinó por diferencia de peso entre el peso del filtro y el peso del filtro con la muestra seca después de las 8 horas en el horno a 105°C. La determinación de la cantidad de sulfato en la muestra se realizó empleando la Ecuación 8:

$$C_{SO_4^{2-}} = \frac{M_{BaSO_4} \times PM_{SO_4^{2-}}}{PM_{BaSO_4} \times V_{muestra}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde

$C_{SO_4^{2-}}$ = concentración de sulfato en la muestra

M_{BaSO_4} = masa del sulfato de bario

$PM_{SO_4^{2-}}$ = peso molecular del sulfato

PM_{BaSO_4} = peso molecular del sulfato de bario

$V_{muestra}$ = volumen de la muestra.

Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno se determinó mediante un método colorimétrico a una longitud de onda de 600 nm de acuerdo al protocolo descrito en Métodos Normalizados para el análisis de agua potable y residual [33]. Una solución de digestión con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y ácido sulfúrico concentrado fueron empleadas para la determinación de la DQO. También se empleó ácido sulfúrico con nitrato de plata en una relación de 6 g $AgNO_3$ por kg H_2SO_4 . La digestión de las muestras se realizó con 2.5 mL de muestra, 1.5 mL de solución de digestión y 3.5 mL de ácido sulfúrico con nitrato de plata por dos horas a una temperatura de 150°C en un horno GC- Series Lab Ovens (Quincy Lab. Inc, Chicago, Estados

Unidos). Se realizaron curvas de calibración con una solución madre de 1000 mg O₂ L⁻¹ de KHP en un rango de concentración de 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 mg O₂ L⁻¹. Los estándares empleados se ilustran en la Figura 5 a continuación:

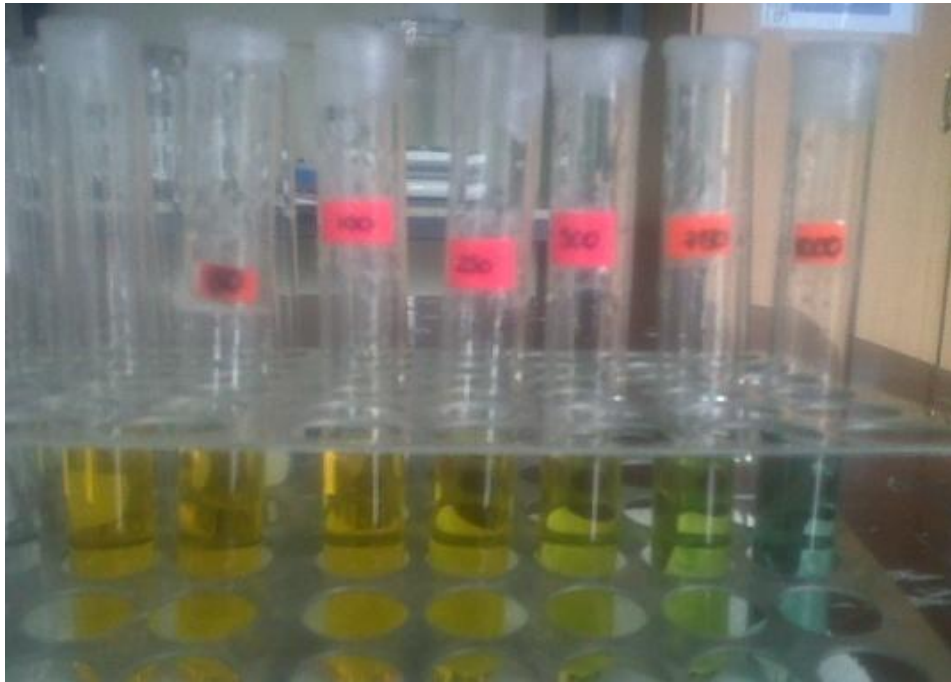


Figura 5 Fotografía de los estándares empleados para la determinación de la demanda química de oxígeno mediante el método colorimétrico (Fotografía tomada por Daniela Flor)

Medición de Cobre(II)

La determinación de cobre (II) se realizó con un espectrofotómetro de absorción atómica 210 VGP (BuckScientific, CT, USA) empleando una lámpara de cátodo hueco. La curva de calibración se realizó con diluciones volumétricas de una solución madre de 1000 mg L⁻¹ de Cu (II) como cloruro dihidratado de cobre (CuCl₂·2H₂O). Los estándares usados fueron de 1, 2, 3, 4 y 5 mg L⁻¹ de Cu (II)

Medición de Zinc (II)

La determinación de zinc (II) se realizó con un espectrofotómetro de absorción atómica 210 VGP (BuckScientific, CT, USA) empleando una lámpara de cátodo hueco. La curva de calibración se realizó con diluciones volumétricas de una solución madre de 1000 mg L⁻¹ de Zn (II) como cloruro dihidratado de zinc (ZnCl₂·2H₂O). Los estándares usados fueron de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L⁻¹ de Zn (II)

Determinación de sólidos volátiles en suspensión (SVS)

La determinación de SVS se realizó de acuerdo al protocolo descrito en Métodos Normalizados para el Análisis de Agua Potable y Agua Residual [33]. Brevemente, la muestra a analizar (200 mL del efluente del reactor biológico) fue filtrada al vacío empleando filtros de micro fibra de vidrio con un diámetro de 45.5 mm y tamaño de poro de 1.2 μm (Whatman, Inglaterra, Reino Unido) las muestras filtradas se colocaron en un horno GC- Series Lab Ovens (Quincy Lab. Inc, Chicago, Estados Unidos) a 105°C durante 8 horas.

A continuación se obtuvo el peso del filtro seco y se procedió a realizar la calcinación de la muestra en una mufla (Vulcan 2-Series Burnout Furnaces, Hanau, Alemania) por 3 horas a

una temperatura de 550°C. Posteriormente a la calcinación se obtuvo el peso del filtro con cenizas y se determinó los SVS empleando la Ecuación 9:

$$SVS = \frac{P_{seco} - P_{cenizas}}{\text{Volumen de la muestra}} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde:

SVS = sólidos volátiles suspendidos,

P_{seco} = peso del filtro seco

P_{cenizas} = peso del filtro con cenizas

Volumen de la muestra = volumen de filtrado inicial que se usa para la determinación de los SVS.

Sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento de los Drenajes Ácidos de Mina Sintéticos (DAM)

El sistema de tratamiento biológico-físico-químico (BFQ) del drenaje ácido de mina sintético está formado por dos reactores, un reactor biológico y un reactor físico químico conectados en serie. En la Figura 6 se presenta el diagrama de bloques del sistema de tratamiento BFQ y en la Figura 7 el esquema de dicho sistema de tratamiento. El reactor biológico empacado con bacterias sulfato-reductoras (BSR) de flujo ascendente fue alimentado de manera continua con medio basal mineral con acetato como donador de electrones y sulfato en concentraciones decrecientes de 4000, 3000 y 2000 mg L⁻¹ como aceptor de electrones. El reactor físico-químico fue alimentado a través de su puerto lateral izquierdo con el efluente del reactor biológico y por el puerto inferior con el DAM sintético con concentraciones en aumento de Cu

(II) y Zn (II). Los dos reactores fueron montados en estudios previos [32, 34] que se describen a continuación:

El reactor biológico fue construido de vidrio con un diámetro de 5 cm y 43 cm de largo (Figura 7) con un volumen de operación de 480 mL. El reactor biológico fue empacado con 15 g SVS L⁻¹ de bacterias sulfato reductoras empleando como inóculo microbiano los sedimentos de la laguna artificial de la Universidad San Francisco de Quito cuyo contenido de sólidos volátiles en suspensión (SVS) y sólidos totales en suspensión (STS) fue de 6.28 y 14.9% respectivamente. Arena con una densidad de 1.668 g m L⁻¹ fue empleada como soporte físico para el crecimiento de las bacterias sulfato-reductoras. El reactor biológico cuenta con dos puertos, uno inferior para la alimentación del medio basal con acetato de flujo ascendente de 0.21-0.25 mL min⁻¹ en promedio proporcionado por una bomba peristáltica (Peri-Star Pro Peristaltic Pump, Florida, Estados Unidos) y uno lateral para la salida del efluente líquido rico en sulfuro biogénico [32].

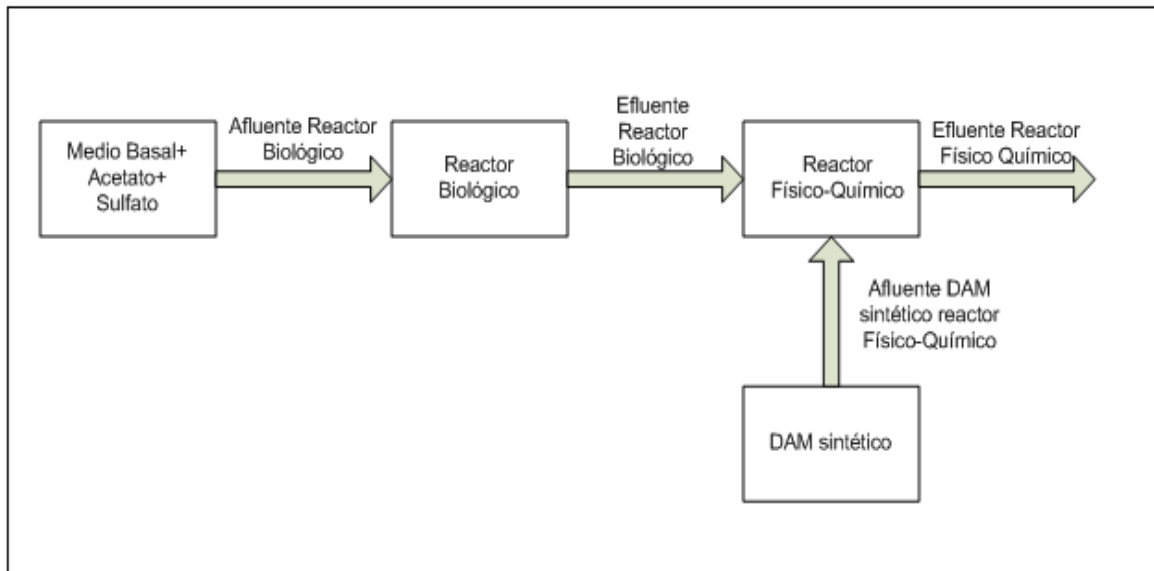


Figura 6. Diagrama de bloques del Sistema Biológico-Físico-Químico (BFQ) de tratamiento del drenaje ácido de mina sintético (DAM). El sistema está conformado por dos reactores conectados en serie, el reactor biológico alimentado de manera continua con flujo ascendente con medio basal con acetato como donador de electrones a una concentración de 2500 mg DQO-acetato L⁻¹ y sulfato como aceptor de electrones a una concentración de 4000, 3000 y 2000 mg L⁻¹. El reactor físico-químico fue alimentado con el efluente de reactor biológico y el DAM sintético con concentraciones de Cu (II) de 30, 60 y 100 mg L⁻¹ durante todo el estudio y Zn (II) con concentración de 30 mg L⁻¹.

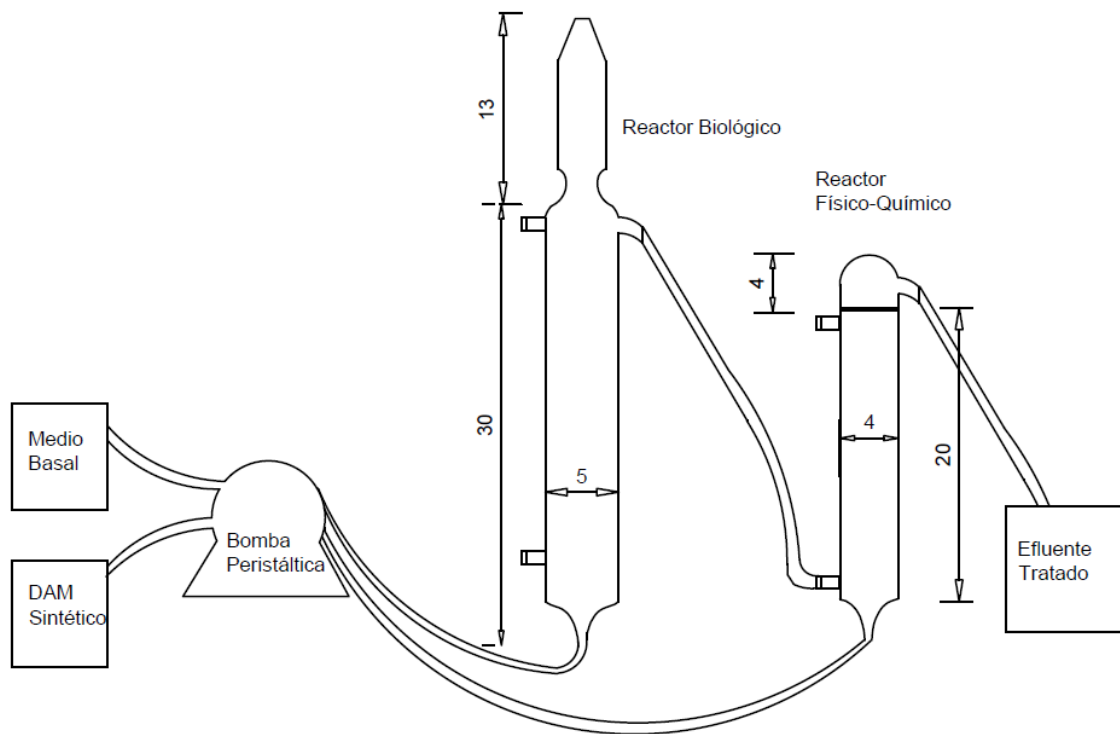


Figura 7. Esquema del diseño del sistema biológico-físico-químico (BFQ) de tratamiento del drenaje ácido de mina sintético (DAM). El sistema está conformado por dos reactores conectados en serie, el reactor biológico alimentado de manera continua con un flujo ascendente con medio basal con acetato como donador de electrones en una concentración de $2500 \text{ mg DQO-acetato L}^{-1}$ y sulfato como aceptor de electrones con concentraciones de 4000, 3000 y 2000 mg L^{-1} . El reactor físico-químico fue alimentado con el efluente de reactor biológico y el DAM sintético con concentraciones de Cu (II) de 30, 60 y 100 mg L^{-1} durante todo el estudio y Zn (II) con concentración de 30 mg L^{-1} . (Las dimensiones de los reactores se encuentran en cm)

El reactor biológico fue alimentado con un afluente sintético compuesto por medio basal mineral con los micro y macro nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano, 2.5 g DQO-acetato L⁻¹ como donador de electrones y fuente de carbono. Adicionalmente, se empleó sulfato como sulfato de sodio (Na₂SO₄) para la reducción microbiana a sulfuro por parte de las bacterias sulfato reductoras (BSR). La concentración inicial de sulfato fue 4000 mg L⁻¹ de sulfato por 139 días de operación del bioreactor. A los 140 días de funcionamiento se redujo la concentración de sulfato a 3000 mg L⁻¹ hasta el día 637 donde la concentración de sulfato se disminuyó a 2000 mg L⁻¹.

El reactor físico-químico fue montado en el día 257 de operación del reactor biológico y, fue empacado con 360 g de arena con una densidad de 1.11 g mL⁻¹. El reactor físico-químico fue construido en vidrio con un volumen de operación de 324 mL [34], tiene un diámetro de 4 cm y 24 cm de largo. El reactor cuenta con dos puertos de entrada (lateral e inferior) y uno de salida (lateral). La entrada lateral del reactor físico-químico está conectado en serie con el efluente del reactor biológico, la misma que consiste en el efluente de reactor biológico compuesto de sulfuro biogénico (Figuras 6 y 7). La otra entrada localizada en la parte inferior del reactor físico-químico consiste en una solución de DAM sintético compuesta de cobre (II) como cloruro dihidratado de cobre (CuCl₂·2H₂O) y zinc (II) como cloruro dihidratado de zinc (ZnCl₂·2H₂O). Este afluente fue Desde el montaje del reactor físico-químico hasta el día 509 considerando el tiempo de operación del reactor biológico la concentración de alimentación de cobre fue de 30 mg L⁻¹ (Fase I). A partir de este día hasta el día 581 la concentración de cobre (II) aumentó a 60 mg L⁻¹ (Fase II). Posteriormente la concentración de cobre (II) se incrementó a 100 mg L⁻¹ (Fase III) hasta el día 715 donde se redujo a 30 mg L⁻¹ y se incorporó

zinc (II) como cloruro dihidratado de zinc en una concentración de 30 mg L^{-1} hasta el final del estudio (Fase IV).

La temperatura de operación del sistema de tratamiento biológico-físico-químico (BFQ) del drenaje de mina sintético fue de $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Esta temperatura se mantuvo con un controlador universal y un relé de estado sólido. Tanto los dos reactores como las mangueras y conexiones fueron cubiertos con papel aluminio para inhibir el crecimiento de bacterias fotolitotróficas [35].

Experimentos Batch: Precipitación de S^{-2} con Cu (II) para la formación de CuS

El objetivo de los experimentos Batch fue estudiar la precipitación de cobre (II) en presencia de sulfuro como sulfuro de cobre (CuS). Los ensayos se realizaron por duplicado en botellas de vidrio de 160 mL selladas con tapones de caucho y tapas de aluminio para evitar la volatilización del sulfuro. La precipitación de CuS fue evaluada a través de la remoción de sulfuro y cobre (II) disuelto al inicio de cada ensayo y después de 8 horas de tratamiento, se empleó un control (ausencia de cobre (II)) y diferentes tratamientos con concentraciones en aumento de cobre (II) de 5, 10, 15, 25 y 50 mg L^{-1} correspondientes a los tratamientos T-1, T-2, T-3, T-4 y T-5, respectivamente. La concentración de Cu (II) en cada ensayo se obtuvo a partir de una solución stock de Cu (II) de 2500 mg L^{-1} preparada colocando 3.35 g de cloruro dihidratado de cobre ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y aforado a 500 mL con agua destilada con una molaridad de 0.01M de HCl. En cada ensayo se colocó efluente del reactor biológico, la solución stock de Cu (II) correspondiente a cada ensayo y agua destilada según requerido (Figura 8). En la Tabla 1 se presenta en detalle los ensayos de la precipitación de Cu (II) como de sulfuro de cobre (CuS).

Tabla 1 Ensayos para la determinación de la precipitación del cobre (II) como sulfuro de cobre (CuS)

Ensayo	Ensayo	Volumen efluente biogénico (mL)	Volumen de agua (mL)	Cobre (II) (mg L ⁻¹)	Cobre (II) Solución Stock (mg L ⁻¹)	Volumen solución stock (mg L ⁻¹)	Volumen Total (mL)
Control	C	25	25	0	0	0	50
Tratamiento 1	T-1	24.5	24.5	5	250	1	50
Tratamiento 2	T-2	24.5	24.5	10	500	1	50
Tratamiento 3	T-3	24.5	24.5	15	750	1	50
Tratamiento 4	T-4	24.5	24.5	25	1250	1	50
Tratamiento 5	T-5	24.5	24.5	50	2500	1	50



Figura 8 . Fotografía de los experimentos Batch para evaluar la precipitación de CuS Los ensayos corresponden a un control (ausencia de cobre (II)) y diferentes tratamientos con concentraciones en aumento de cobre (II) de 5, 10,15, 25 y 50 mg L^{-1} correspondientes a los tratamientos T-1, T-2, T-3, T-4 y T-5, respectivamente (Fotografía Daniela Flor)

Resultados y Discusión

Evaluación del funcionamiento del Reactor Biológico

El presente estudio es la continuación de dos estudios previos en los cuáles se evaluó el potencial de generación de sulfuro por las bacterias sulfato-reductoras (BSR) y el tratamiento del drenaje ácido de mina sintético a escala laboratorio respectivamente. El objetivo de este estudio es demostrar la potencialidad del sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento de drenajes ácidos de mina (DAM) a escala laboratorio usando un reactor biológico empacado con un consorcio microbiano que contiene BSR para la producción de sulfuro biogénico y la precipitación de metales pesados, Cu (II) y Zinc (II) como sulfuros metálicos en un reactor físico-químico.

En el primer estudio realizado previamente se evaluó la selección del mejor inóculo microbiano y donador de electrones para el funcionamiento del reactor biológico. Los inóculos microbianos evaluados fueron sedimentos de la planta de tratamiento ETAPA en Cuenca y de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Quito, sedimentos de la laguna artificial San Francisco de Quito y de una laguna natural ubicada en la provincia de Orellana ; y los sustratos orgánicos evaluados fueron acetato, lactato, etanol y peptona. En base a los resultados obtenidos se concluyó que el inóculo microbiano idóneo, fueron los sedimentos de la laguna artificial de la Universidad San Francisco de Quito y el mejor donador de electrones fue el acetato [32]. Los resultados obtenidos se respaldan por otros estudios de la literatura; por ejemplo, Christensen et al en un estudio piloto de drenajes ácidos de mina con BSR evaluó

las tasas de oxidación de diferentes sustratos y obtuvo que el acetato fue el más rápido en ser oxidado seguido por el lactato y el etanol [36].

En el primer estudio realizado previamente se concluyó que el reactor biológico del sistema biológico-físico-químico de los DAM con una alimentación de 2500 mg DQO-acetato L⁻¹ y 4000 mg L⁻¹ de sulfato alcanzó una producción final acumulada de sulfuro de 463 mg S²⁻ L⁻¹, la actividad específica de producción de sulfuro fue 9 mg S²⁻ g⁻¹ acetato d⁻¹ y la actividad máxima específica de reducción de sulfato fue de 52 mg SO₄²⁻ g⁻¹ acetato d⁻¹ [32]. Después de 66 días de operación se obtuvo una producción de sulfuro de 167 mg S²⁻ L⁻¹ lo que demostró que la cantidad de sulfuro producida era adecuada para el tratamiento de drenajes ácidos de mina ya que el sulfuro biogénico producido puede reaccionar con los metales pesados y removerlos a través de la precipitación de sulfuros [32]. Se obtuvo un 13% de remoción de la DQO, el pH del afluente se mantuvo constante en un valor de 7.2 y el pH del efluente del reactor biológico presentó valores entre 8.10 y 8.92 [32]. El incremento en el pH en el efluente se debe a la formación de bicarbonatos durante la oxidación de la materia orgánica debido a la reducción microbiana del sulfato [32].

Adicionalmente, en el segundo estudio realizado previamente se evaluó la potencialidad de incluir un reactor físico-químico para la remoción de metales pesados mediante la precipitación como sulfuros metálicos. En este estudio la concentración de sulfato en el reactor biológico se redujo a 3000 mg L⁻¹ y la producción de sulfuro se estabilizó en aproximadamente 130 mg L⁻¹ [34] Posteriormente se puso en marcha el reactor físico-químico del sistema de tratamiento BFQ para el drenaje ácido de mina sintético con una concentración de cobre (II) de 30 mg L⁻¹ y un pH de 2.7. En este sistema se incrementó el pH alrededor de 8.5 y se

alcanzó una remoción de 98% de Cu (II) durante los 148 días de operación del reactor físico-químico. Se realizó también un estudio de toxicidad de metales pesados para evaluar en un futuro la factibilidad de incorporar un reactor único, es decir, tener un reactor empacado con bacterias sulfato reductoras para la producción de sulfuro y lograr la precipitación de metales pesados con el sulfuro en el mismo reactor, tomando en cuenta que la producción de sulfuro puede ser afectada por la toxicidad de los metales. Los resultados obtenidos demostraron que la concentración de Cu (II) que causó un 20% de inhibición (IC_{20}) en la producción de sulfuro por parte de las BSR fue 13 mg L^{-1} . Sin embargo, se demostró que a concentraciones de Cu(II) tan altas como 50 mg L^{-1} no se registraron mayores inhibiciones, por lo que no existe una inhibición del 50 y 80% en la producción de sulfuro (IC_{50} y IC_{80}) [34].

El monitoreo del sistema de tratamiento BFQ del DAM sintético de este estudio inició en el día de operación 475. En la Figura 9 se presenta la producción de sulfuro a lo largo de 816 días de operación que comprende los tres estudios realizados en este sistema de tratamiento BFQ del DAM sintético. Se puede observar que la producción de sulfuro en el reactor biológico se estabilizó en una concentración promedio de 170.57 mg L^{-1} hasta el día de operación 530. A partir de este día se observa una disminución en la concentración de sulfuro a 98.4 mg L^{-1} equivalente a una disminución del 42% con respecto a su producción anterior. Esta reducción en la producción de sulfuro biogénico coincide con la limpieza del puerto de entrada del reactor biológico, por lo que se presume que durante la limpieza ingreso oxígeno al reactor y esto afectó considerablemente a las bacterias sulfato-reductoras que se caracterizan por ser anaerobias estrictas.

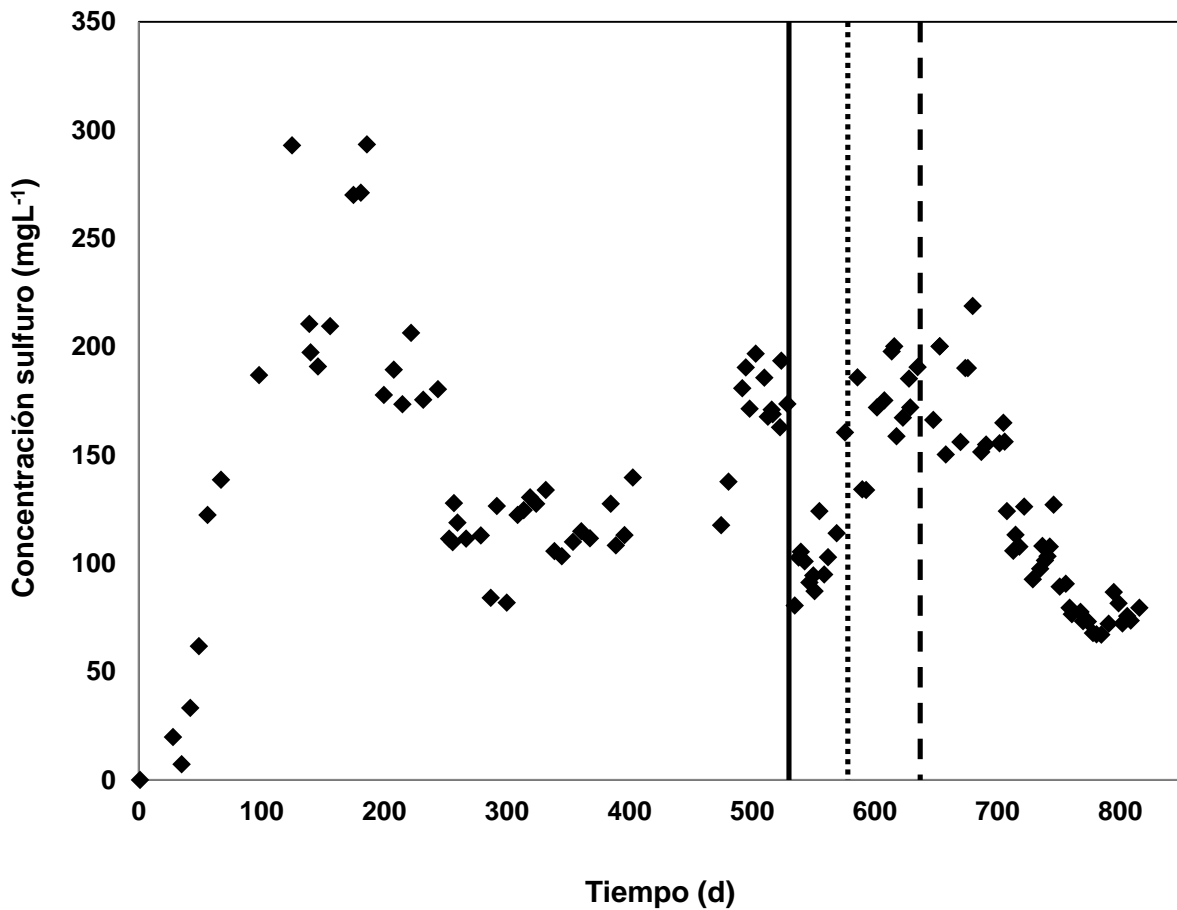


Figura 9. Producción de sulfuro con respecto al tiempo en el de monitoreo del reactor biológico parte del sistema de tratamiento BFQ de DAM que comprende dos estudios previos y el presente análisis desde $t=475$ días. El reactor biológico funciona en modo de operación continua con flujo ascendente empacado con 15 g SVS L^{-1} de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentación de 2.5 g DQO L^{-1} de acetato y 4000 mg L^{-1} de sulfato hasta $t=140$ días, 3000 mg L^{-1} hasta $t=637$ días y 2000 mg L^{-1} hasta el $t=816$ días. Leyenda: () Limpieza del reactor biológico $t=530$, (.....) aumento de temperatura a 32°C $t=578$ (- -) cambio en la concentración de sulfato a 2000 mg L^{-1} $t=637$.

En un estudio conducido por Krekeler et al. se realizó un conteo microbiano usando el método del número más probable (NMP) para bacterias sulfato reductoras (BSR) en una zona aerobia y otra anóxica del lago “Solar Lake” (Sinai, Egypt). Los resultados demostraron que la concentración microbiana en la zona aerobia fue 20 veces menor que en la zona anóxica [37]. En otro estudio realizado por Edwards et al. en un reactor biológico a pequeña escala para la remoción de manganeso, se encontró que las BSR funcionan mejor en un pH neutral y en la ausencia de nitrato y oxígeno [38]. En base a estos estudios, se puede evidenciar que la presencia de oxígeno es perjudicial para las BSR, lo cual justifica la disminución de sulfuro en este estudio.

Debido al aumento de la temperatura de 28 a 32°C en el día de operación 578 se observó un incremento en la concentración de sulfuro alcanzando valores de 171.47 mg L⁻¹, lo cual representa un incremento en la producción del sulfuro del 74%. Este resultado no es sorprendente teniendo en consideración que la temperatura es uno de los factores ecológicos más importantes para el crecimiento de los microorganismos [39]. En un estudio realizado por Middleton y Lawrence se evaluó el efecto de la temperatura (en un rango de 21 a 31 °C) en la cinética microbiana de la producción de sulfuro biogénico a partir de una fuente orgánica de carbono como acetato. Los resultados demostraron que a medida que la temperatura aumentó, la tasa máxima específica de utilización de carbono orgánico (k) también se incrementó, mientras que el coeficiente de velocidad media k_s disminuye. A 20°C se obtuvo un k de 5 día⁻¹ y un k_s de 50 mg acetato L⁻¹ mientras que a 31 °C se obtuvo un k de 8.3 día⁻¹ y un k_s de 5.7 mg acetato L⁻¹ [36]. Estos resultados evidencian claramente que las tasas de crecimiento microbiano son dependientes de la temperatura. En el estudio mencionado previamente se

comparó el efecto de la temperatura en las tasas de crecimiento obtenidas experimentalmente en base a la ecuación de Arrhenius (Ecuación 10) [40]:

$$k = Ae^{\frac{-Ea}{RT}} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde

k = coeficiente de la tasa de reacción química,

A = factor de frecuencia

Ea =energía de activación

R =constante universal de los gases

T =temperatura absoluta

La ecuación de Arrhenius indica que la temperatura es directamente proporcional a k , es decir, que si aumenta la temperatura también aumenta k , por lo tanto a mayor temperatura mayor tasa de reacción química. Sin embargo, se debe considerar que existen rangos óptimos de temperatura para las BSR ya que a temperaturas muy altas se pueden observar efectos adversos. Por ejemplo, en la investigación realizada por Al-Zuhair, y colaboradores se estudió cultivos microbianos de BSR con una concentración de sulfato de 2500 mg L^{-1} en un tiempo de 500 minutos y se observó un crecimiento microbiano de $3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para una temperatura de 35°C , un crecimiento de $1.3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para 20°C y un crecimiento de $0.2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para 50°C , estos resultados demuestran que el rango óptimo de crecimiento fue de 35°C [41]. En base a la

literatura y a los datos experimentales se puede inferir que el sistema de tratamiento BFQ de este estudio está trabajando en rangos óptimos de temperatura.

En el día de operación 637 se redujo la concentración de sulfato de 3000 a 2000 mg L⁻¹ con el objetivo de determinar la concentración de sulfato óptima para el funcionamiento del sistema de tratamiento BFQ. Durante los primeros 50 días de este cambio no se evidencia una reducción o aumento significativo en la producción de sulfuro, manteniéndose en una concentración promedio de 170 mg L⁻¹; sin embargo, después de este tiempo se observa una disminución significativa del 56% en la producción de sulfuro llegando a estabilizarse hasta el día final de este estudio (t=816) en una concentración de 74 mg L⁻¹. Estos resultados evidencian la dependencia entre la producción de sulfuro y la concentración de sulfato ya que afecta directamente la actividad microbiana. Estudios con consorcios de BSR alimentados con acetato y etanol han demostrado que la cinética de la sulfato reducción está altamente influenciada por la concentración de sulfato [42-44].

Teniendo en consideración que la relación entre la concentración de sulfato y demanda química de oxígeno puede resultar muy determinante para la producción de sulfuro por parte de las BSR, este efecto también fue evaluado en el reactor biológico del sistema de tratamiento BFQ del DAM. En la Figura 10 se presenta el porcentaje de remoción de la demanda química de oxígeno (DQO), con respecto al tiempo en el afluente y efluente del reactor biológico. En términos generales se puede observar claramente que la remoción de DQO aumenta con el tiempo. El presente estudio empieza en el día 475, hasta este día de operación la remoción de DQO fue menor al 25%. La remoción de DQO aumentó a 50% hasta el día 578, este aumento puede atribuirse a la estabilización del consorcio microbiano en el bioreactor. En el

día 578 la temperatura del sistema de incubación se incrementó de 28 a 32°C y se observó un incremento significativo en la remoción de la DQO, alcanzando una remoción máxima del 69%. La temperatura es un factor muy importante en cuanto al crecimiento microbiano como se mencionó anteriormente.

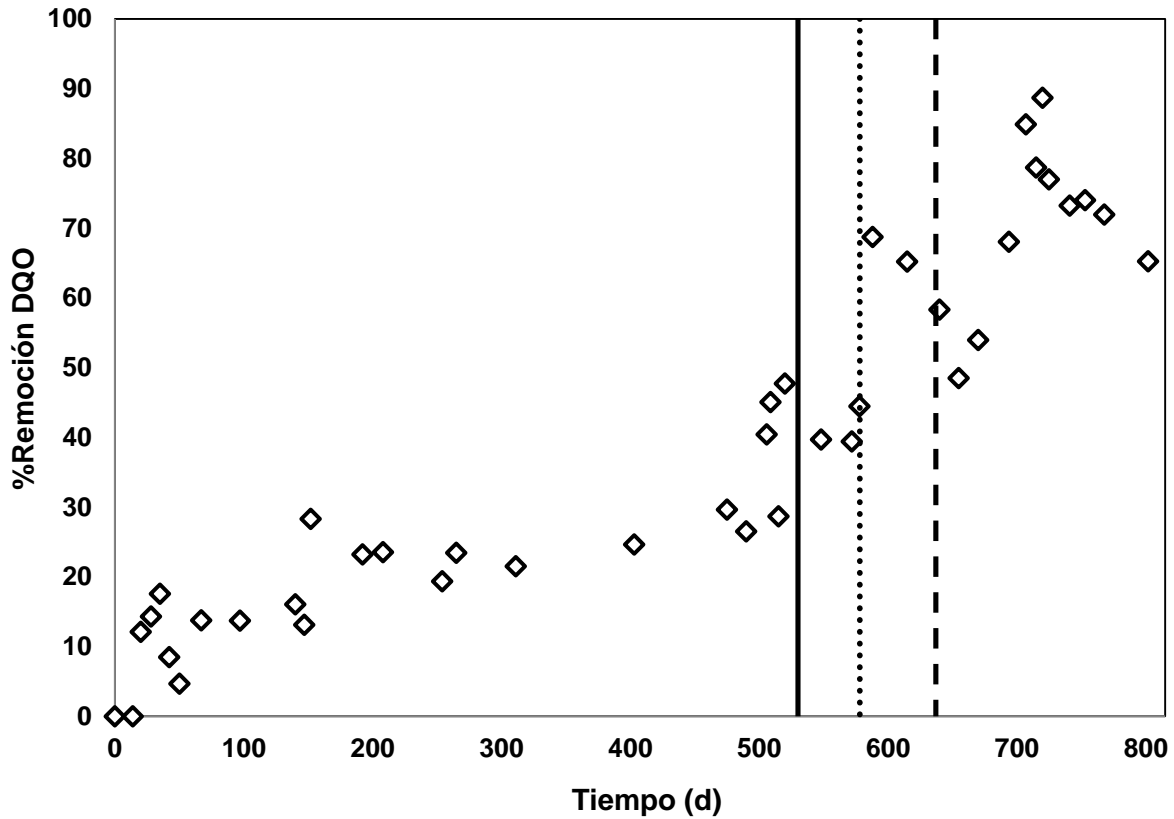


Figura 10. Porcentaje de remoción de la demanda química de oxígeno (DQO) con respecto al tiempo en el de monitoreo del reactor biológico parte del sistema de tratamiento BFQ de DAM que comprende dos estudios previos y el presente análisis desde $t=475$ días. El reactor biológico funciona en modo de operación continua con flujo ascendente empacado con 15 g SVS L^{-1} de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentación de 2.5 g DQO L^{-1} de acetato y 4000 mg L^{-1} de sulfato hasta $t=140$ días, 3000 mg L^{-1} hasta $t=637$ días y 2000 mg L^{-1} hasta el $t=816$ días. Leyenda: () Limpieza del reactor biológico $t=530$ (.....) aumento de temperatura a 32°C $t=578$ (---) cambio en la concentración de sulfato a 2000 mg L^{-1} $t=637$

El cambio más relevante en cuanto a remoción de la DQO en el reactor biológico fue por la disminución de concentración de sulfato de 3000 a 2000 mg L⁻¹, al principio la remoción de DQO decrece a valores de 50% pero posteriormente llega a un valor de remoción máximo de 88.66% y un valor promedio de remoción 75.72% mostrando la remoción más alta en el estudio. El efecto del aumento de remoción de la DQO en el reactor biológico probablemente se puede atribuir a un crecimiento microbiano. Cabe recordar que el reactor biológico contiene sedimentos de la laguna artificial de la Universidad San Francisco de Quito, los sedimentos en condiciones anaerobias y anóxicas generalmente son hábitat para distintos microorganismos, entre ellos están las bacterias que reducen nitrato, las BSR, los homoacetógenos y los metanógenos [45], este grupo de bacterias se lo llama consorcio microbiano. Las diferentes condiciones que se presentan en el reactor biológico pueden favorecer unas bacterias más que otras. El objetivo de este estudio es favorecer las BSR, sin embargo, la competencia entre bacterias por el sustrato orgánico y la presencia de sulfato puede determinar la predominancia de las BSR. En este caso, el aumento en de la remoción de la DQO en el reactor biológico no se da por parte de las BSR ya que como se observó anteriormente no existe un aumento en la producción de sulfuro al disminuir la concentración de sulfato. La remoción de la DQO se da por parte de las demás bacterias en el consorcio microbiano, en presencia de concentraciones de sulfato más bajas se ven favorecidas y su crecimiento es estimulado. Estudios de identificación molecular en los diferentes grupos de microorganismos presentes en el consorcio microbiano se deberían llevar a cabo para confirmar los resultados.

La principal competencia del donador de electrones (acetato) bajo condiciones anaerobias, en el consorcio microbiano se da entre las BSR y las bacterias metanogénicas. Bajo ciertas condiciones las bacterias BSR predominan sobre las bacterias metanogénicas, mientras que

bajo otras condiciones esto puede resultar lo contrario [46-48]. Las BSR son predominantes cuando la relación entre el donador de electrones y el sulfato es baja (menor a 1) mientras que para que las bacterias metanogénicas predominen esta relación debe ser alta (mayor a 1) [49]. En este estudio se experimentó con varias relaciones entre DQO-acetato: sulfato (mg:mg), durante los 140 primeros días de funcionamiento del reactor la relación fue de 0.63, luego hasta el día de operación 637 la relación fue de 0.83 y durante los últimos días de funcionamiento del bioreactor, es decir hasta el día 816, la relación entre DQO-acetato: sulfato fue de 1.25. La relación más alta de 1.25 favoreció a la degradación del acetato por parte de las bacterias metanogénicas existiendo mayor oxidación de acetato por lo tanto mayor porcentaje de remoción. En estudios futuros se recomienda utilizar una relación de DQO-acetato: sulfato que favorezca la reducción del acetato por parte de las BSR. En el estudio realizado por Prasad et al, se obtuvieron resultados similares donde se encontró que a relaciones de DQO-acetato: sulfato (mg:mg) mayores a 1 las bacterias metanogénicas predominaron [49]. En este estudio, si se toma en cuenta la producción de sulfuro y la remoción de DQO, se puede concluir que las BSR predominaron cuando la relación de DQO-acetato: sulfato fue de 0.63 y 0.83, obteniéndose producción de sulfuro mayor a 100 mg L^{-1} , mientras que cuando esta relación fue de 1.25, las bacterias metanogénicas predominaron, obteniéndose una concentración de sulfuro de 74 mg L^{-1} . Adicionalmente, en un estudio realizado por Choi et al. se observó que a relaciones de DQO: sulfato (mg:mg) de 1.7 a 2.7 las bacterias metanogénicas y las BSR están en una competencia activa, por debajo de este rango las BSR son dominantes, mientras que por encima de este rango las bacterias metanogénicas son las que predominan [50]. En base a estos resultados se puede determinar que la cantidad de DQO-acetato debería ser menor a la cantidad de sulfato para que las BSR no tengan gran

competencia con las metanogénicas. Por lo tanto, si la concentración es de 2500 mg DQO-acetato L⁻¹, la concentración óptima de sulfato debe estar entre 2000 y 3000 mg L⁻¹, por lo que se recomienda realizar más estudios con relaciones de DQO-acetato: sulfato (mg:mg) en este rango para determinar el rango de concentración óptimo

El sulfuro y el sulfato pueden tener un efecto tóxico en las bacterias anaerobias, excepto las BSR, presentes en el consorcio microbiano, por lo que al reducir las concentraciones de estos compuestos, la actividad microbiana de las otras bacterias anaerobias puede aumentar. A medida que aumenta la concentración de sulfato, las BSR predominan y existe más formación de sulfuro, mientras que las otras bacterias anaerobias presentan toxicidad y disminuyen la oxidación del acetato[51, 52]. Se menciona que el hidrógeno de sulfuro neutralmente cargado es tóxico para los organismos celulares ya que penetran la membrana celular, mientras que las especies de sulfuro iónico no logran penetrar esta membrana si no son parte de un sistema activo de transporte [53]. Cuando el sulfuro de hidrógeno llega al citoplasma puede desnaturalizar las proteínas por la formación de sulfuro y disulfuro que forman enlaces entre las cadenas polipeptídicas [54]. El sulfuro de hidrógeno también puede interferir con las uniones de sulfuro de la coenzima A y M causando inhibición de estas proteínas metabólicas [55].

Es preciso mencionar la composición fraccional de sulfuros con respecto al pH con el objetivo de observar si existe efecto tóxico de alguna de las especies de sulfuro en el reactor biológico. En la Figura 11 se presenta la composición fraccional de sulfuro con respecto al pH. La Figura 11 se realizó tomando en cuenta las siguientes consideraciones [56]:

El ácido sulfhídrico es un ácido diprótico la disociación de estos sistemas de ácidos se puede representar por las Ecuaciones 11 y 12:



Donde las constantes de disociación k_1 y k_2 están dadas por las Ecuaciones 13 y 14:

$$k_1 = \frac{H^+ HA^-}{H_2A} = 9,5 \times 10^{-8} \quad \text{Ecuación 13}$$

$$k_2 = \frac{H^+ A^{2-}}{HA^-} = 1 \times 10^{-14} \quad \text{Ecuación 14}$$

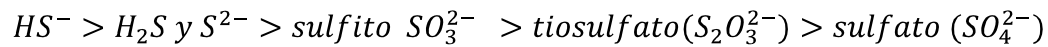
Usando las ecuaciones anteriormente mencionadas se puede obtener la forma fraccional de cada especie en las ecuaciones a continuación:

$$\alpha_{H_2A} = \frac{H^+{}^2}{H^+{}^2 + H^+ k_1 + k_1 k_2} \quad \text{Ecuación 15}$$

$$\alpha_{HA} = \frac{H^+ k_1}{H^+{}^2 + H^+ k_1 + k_1 k_2} \quad \text{Ecuación 16}$$

$$\alpha_{A^{2-}} = \frac{k_1 k_2}{H^+{}^2 + H^+ k_1 + k_1 k_2} \quad \text{Ecuación 17}$$

El pH en el reactor biológico oscila entre 8.5 y 9, en la Figura 11 se puede observar que la especie de sulfuro que predomina a este pH es el HS^- . En un estudio realizado por Khan y Trottier se reportó que la especie HS^- es la más tóxica, en la siguiente escala se puede observar la potencialidad de inhibición de los compuestos sulfurados [57]:



En este estudio, el reactor biológico tiene altas concentraciones de HS^- lo cual puede generar toxicidad hacia las demás bacterias anaerobias que no son las BSR presentes en el consorcio microbiano. Cuando la producción de sulfuro en el reactor biológico se encontraba en un rango de 170 mg L^{-1} , la remoción de DQO fue aproximadamente de 50%, posteriormente cuando la producción de sulfuro se redujo a un promedio de 90 mg L^{-1} se alcanzó una remoción de DQO del 75.72%. Estos resultados sugieren que el sulfuro a altas concentraciones puede afectar a la remoción de la DQO por parte de las otras bacterias anaerobias presentes en el consorcio microbiano, especialmente las bacterias metanogénicas que son muy competitivas. Es importante mencionar que el grupo de bacterias al que se quiere favorecer son las BSR, por lo que es pertinente estudiar las concentraciones de inhibición de sulfuro y sulfato en las bacterias metanogénicas para evitar que oxiden el acetato. En varios estudios se ha reportado que los sulfuros disueltos (H_2S, HS^-, S^{2-}) son tóxicos para las bacterias metanogénicas entre en el $100\text{-}800 \text{ mg L}^{-1}$ [39, 57-62]. En el estudio realizado por Karhadkar et al. también se pudo observar un 50% de inhibición en cuanto a la producción de metano por concentraciones de sulfuros disueltos entre un rango de $100 \text{ a } 224 \text{ mg L}^{-1}$ [63]. La concentración de 170 mg L^{-1} en el reactor biológico simbolizó una cantidad tóxica para las bacterias metanogénicas y se refleja en una baja remoción de la DQO. No obstante, en el

estudio realizado por Choi y Rim se obtuvo que las bacterias metanogénicas se inhiben en presencia de los sulfuros disueltos en un rango de 120 a 140 mg L⁻¹ pero se demostró que las bacterias en reactores anaeróbicos se pueden recuperar de la inhibición causada por sulfuro [59], lo cual corrobora al presente estudio ya que el consorcio microbiano después de haber sido sometido a concentraciones de sulfuro que causaron inhibición pudieron recuperarse y esto se ve reflejado en el aumento de la remoción de DQO. Sin embargo, no es de interés de este estudio que la oxidación de la fuente de carbono sea por parte de las bacterias metanogénicas sino por parte de las BSR por lo que la producción de sulfuro tiene que conservarse en niveles altos para inhibir la actividad microbiana de las bacterias metanogénicas, esto se puede lograr conservando rangos de DQO-acetato: sulfato óptimos como se mencionó anteriormente para favorecer a las BSR.

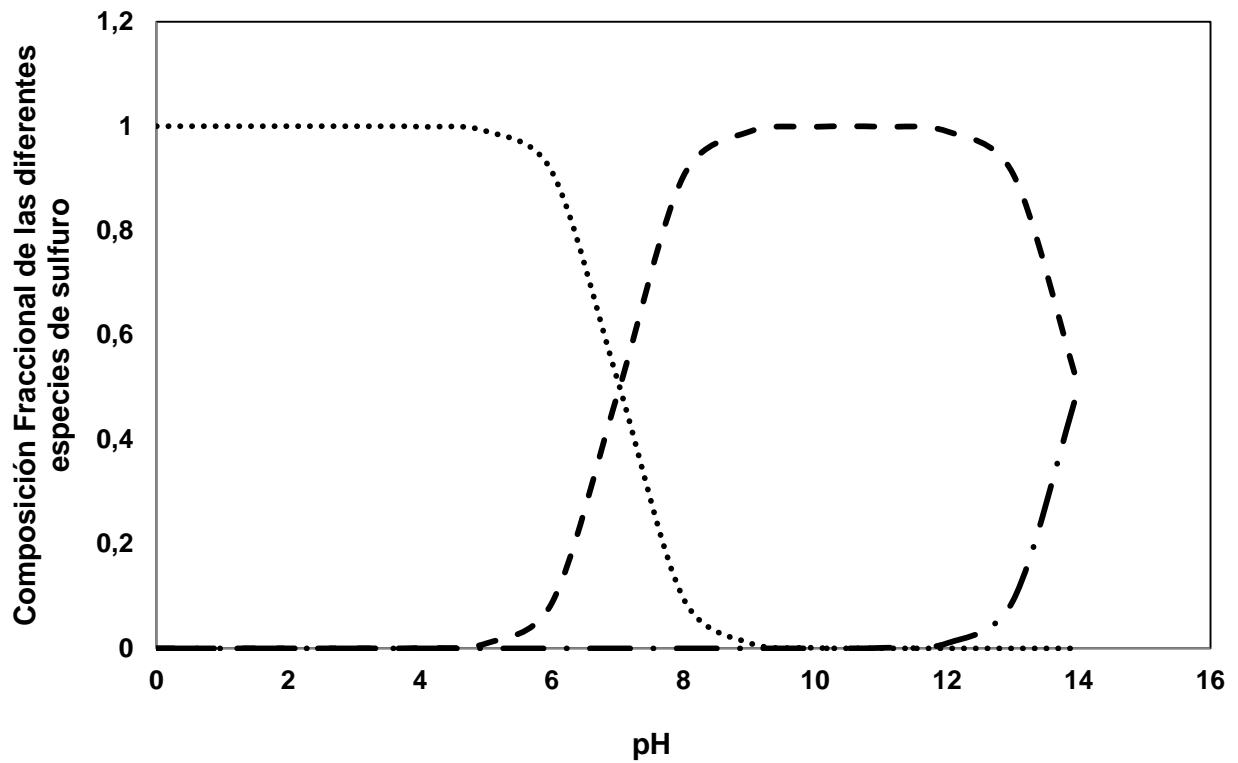
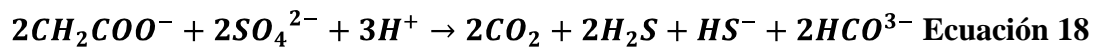


Figura 11. Composición fraccional de sulfuros con respecto al pH. Figura realizada con los valores de $k_1=9,5 \times 10^{-8}$, $k_2=1 \times 10^{-14}$. Leyenda: (····) Composición fraccional de la especie H_2S , (— —) Composición fraccional de la especie HS^- , (— · —) Composición fraccional de la especie S^{2-} .

Balances de Sustrato y Biomasa en el reactor Biológico

Balances químicos y biológicos fueron realizados en el reactor biológico en el día de operación 755 por 8 días para entender mejor su funcionamiento. De acuerdo a la Ecuación 18, se calcula la cantidad química necesaria para oxidar 2500 mg DQO-acetato L⁻¹ que equivalen a 2343.75 mg acetato L⁻¹ por la reducción de sulfato. La concentración teórica necesaria de sulfato es de 3813.56 mg L⁻¹; sin embargo, la alimentación del reactor biológico tiene una concentración de 2000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ lo cual evidencia que el reactivo limitante es el SO₄²⁻, por lo que se necesitarían solamente 1229.17 mg acetato L⁻¹ para reducir 2000 mg SO₄²⁻ L⁻¹.



La relación teórica química de acetato y el sulfato en masa (mg) debe ser de 1:1.62; sin embargo, estas cantidades no aplicables en procesos biológicos. En este estudio los resultados experimentales indican que se consume alrededor de 1600 mg DQO-acetato L⁻¹ y alrededor de 590 mg sulfato L⁻¹. La diferencia entre las cantidades teóricas presentadas anteriormente y los valores experimentales se debe a que no se están considerando las condiciones biológicas ni la cinética microbiana por lo que para el estudio es preciso realizar un balance de sustrato (acetato) y de biomasa en el reactor biológico considerando las condiciones biológicas.

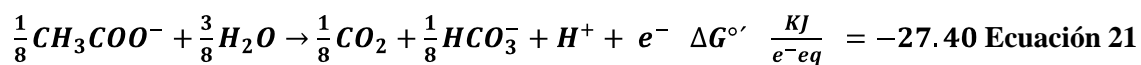
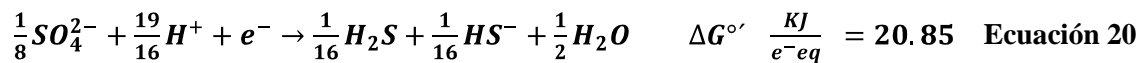
Los microorganismos consumen un sustrato para su metabolismo, para esto se lleva a cabo reacciones de oxidación y reducción. En los tratamientos biológicos, el crecimiento de los microorganismos heterotróficos se da por la oxidación de un compuesto orgánico como el

acetato [64]. La relación entre la biomasa producida y la cantidad de sustrato consumida se denomina rendimiento celular (Y), se define típicamente con respecto al donador de electrones [64], en este caso el acetato:

$$\text{Rendimiento celular (Y)} = \frac{\text{g de biomasa producida}}{\text{g sustrato consumido}} \quad \text{Ecuación 19}$$

La biomasa producida se puede medir en base a los sólidos volátiles suspendidos (SVS) o también la demanda química de oxígeno (DQO) particulada, que es igual la DQO total menos la DQO soluble. Existen otros métodos más exactos como medir el contenido de proteínas, al medir el contenido de proteínas se puede saber la cantidad de biomasa presente, de la misma manera también se puede medir ADN y ATP como indicativos de la cantidad de biomasa generada [64]. A partir de los datos experimentales también se pueden obtener los rendimientos celulares. La mayoría de los rendimientos celulares se calculan con valores obtenidos de bioreactores, plantas piloto o sistemas a gran escala. El rendimiento celular también se puede estimar teóricamente mediante cálculos de bioenergía [64]

En esta investigación se empleó cálculos de bioenergía para obtener el rendimiento celular de las BSR que emplean acetato como donador de electrones. El cálculo se realiza considerando las siguientes semireacciones (Ecuación 20 y 21):



Estas semireacciones, Ecuaciones 20 y 21 representan la transferencia de un mol de electrón equivalente en la reducción del sulfato y la oxidación del acetato respectivamente. La energía que se deriva de la reacción total de estas dos semireacciones se usa para el crecimiento celular. Sin embargo, no toda la energía puede ser transferida para el crecimiento celular y existen pérdidas como por ejemplo, la energía que se transfiere en forma de calor elevando así la temperatura del sistema [64]. La energía necesaria para la síntesis celular depende de la fuente de carbono y de nitrógeno que se emplea para el crecimiento [64]. Esta energía requerida para la síntesis celular se calcula utilizando las siguientes deducciones y ecuaciones:

- Primero se debe determinar la energía necesaria para convertir un electrón equivalente de una fuente de carbono en biomasa, para este cálculo se utiliza la Ecuación 22:

$$\Delta G_s = \frac{\Delta G_p}{km} + \Delta G_c + \frac{\Delta G_N}{K} \quad \text{Ecuación 22}$$

Donde:

ΔG_s = energía necesaria para convertir un electrón equivalente de una fuente de carbono en material celular KJ / e^{-eq}

ΔG_p = energía libre para convertir un electrón equivalente de la fuente de carbono al intermediario piruvato KJ / e^{-eq}. En ese caso se toma el valor de 8.12 como referencia.

k = fracción de la energía transferida capturada, se determina un valor de referencia de 0.6

m se define con +1 si la energía libre ΔG_p es positiva y -1 si la energía libre ΔG_p es negativa.

ΔG_c = energía libre para convertir un electrón equivalente del intermediario piruvato a un electrón equivalente de células. El valor es de 31,41 KJ/e^{-eq} [65]

ΔG_N = energía libre por electrón equivalente de células para reducir el nitrógeno a amonio, en este caso se usa como fuente de nitrógeno NH_4^+ por lo que $\Delta G_N = 0$ kJ/e⁻ eq.

Reemplazando los valores correspondientes se obtiene que:

$$\Delta G_s = 44.94 \text{ KJ/e}^- \text{ eq}$$

- Se calcula ΔG_r sumando las energías libres de Gibbs de las dos semirreacciones, Ecuación 20 y 21, y se obtiene la siguiente Ecuación 23:



- Posteriormente se realiza un balance de energía relativo al sustrato (Ecuación 24) para poder obtener f_e y f_s [64]:

$$k\Delta G_r \frac{f_e}{f_s} = -\Delta G_s \quad \text{Ecuación 24}$$

Donde:

ΔG_r = es la energía que se libera de las reacciones de oxidación y reducción, kJ/ mol e⁻ eq

f_e = mol de sustrato oxidado por mol de sustrato usado

f_s = mol de síntesis celular por mol de sustrato usado

ΔG_s = la energía usada para el crecimiento celular (KJ/ mol e⁻ eq transferido para el crecimiento celular)

Con las ecuaciones ya deducidas se procede a realizar el cálculo para el rendimiento celular,

Despejando $\frac{f_e}{f_s}$ de la Ecuación 24 y reemplazando los valores obtenidos se tiene que:

$$\frac{f_e}{f_s} = \frac{-\Delta G_s}{K\Delta G_r} = 10.98 \quad \text{Ecuación 25}$$

Se sabe que:

$$f_s = 1 - f_e \quad \text{Ecuación 26}$$

A partir de las Ecuaciones 25 y 26 se obtiene que los valores de f_s y f_e son 0.09 y 0.91 g células-DQO g DQO⁻¹, respectivamente. Al valor de f_s se lo divide para 1.42 g DQO SVS⁻¹ (DQO equivalente para oxidar 1 g de células (C₅H₇NO₂)) y se obtiene el rendimiento celular (Y) con un valor de 0.064 mg SVS mg DQO-acetato⁻¹. Este valor se encuentra dentro de los rangos reportado por la literatura. Por ejemplo, en un estudio realizado sobre de la cinética microbiana de la reducción de sulfato empleando acetato como donador de electrones, se obtuvo un rendimiento celular de 0.065 mg células mg DQO-acetato⁻¹ [40].

Una vez calculado el rendimiento celular (Y) se procedió a realizar el balance de sustrato y biomasa en el reactor biológico empleado en este estudio. La Figura 12 presenta un esquema para el balance de sustrato y biomasa para el reactor biológico, de donde se dedujeron las siguientes ecuaciones a partir de la teoría presentada por Metcalf & Eddy en su libro “Wastewater engineering: Treatment and Reuse” [64].

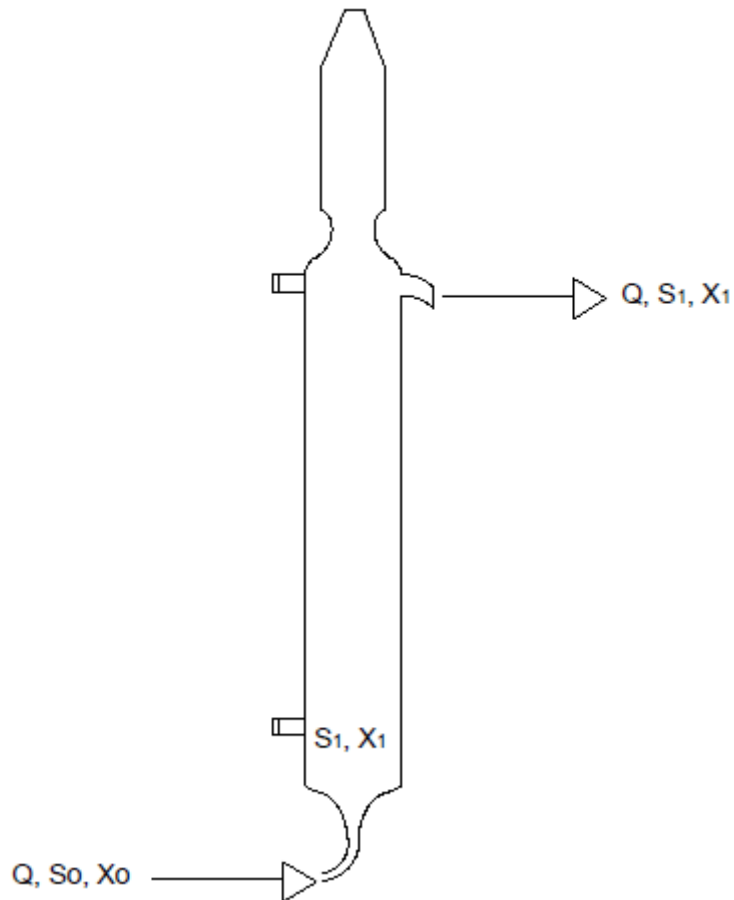


Figura 12. Esquema del balance de masa del reactor biológico parte del sistema de tratamiento BFQ de DAM. El reactor biológico de flujo ascendente en modo de operación continua alimentado con acetato como donador de electrones en una concentración de 2500 mg DQO-acetato L^{-1} y sulfato como aceptor de electrones en una concentración de 2000 mg L^{-1}
 Leyenda: Q =caudal, S_0 =concentración inicial de acetato, X_0 = concentración inicial de biomasa, S_1 = concentración final de sustrato y X_1 =concentración final de biomasa.

La cantidad de sustrato necesario para el crecimiento celular de las BSR se obtiene del balance de la biomasa. La tasa de acumulación de biomasa en el reactor es igual a la tasa de entrada menos la tasa de salida más la tasa de generación de la biomasa representada en la Ecuación 27. La tasa de acumulación se puede considerar nula para sistemas en equilibrio.

$$\frac{dX}{dt} \forall = Qx_0 - Qx_1 + rg\forall = 0 \quad \text{Ecuación 27}$$

Donde:

$\frac{dX}{dt}$ = tasa de acumulación de biomasa en el reactor con respecto al tiempo.

\forall = volumen de trabajo del reactor (L)

Q = flujo de entrada y salida del reactor biológico, se toma el valor experimental de este estudio de 0.36 L d^{-1} .

rg = tasa volumétrica de crecimiento de la biomasa ($\text{g SVS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)

x_1 = concentración de biomasa en el reactor biológico (g SVS L^{-1})

x_0 = concentración de entrada de biomasa al reactor biológico (g SVS L^{-1})

De la Ecuación 27 se puede asumir que x_0 es 0 ya que no ingresa biomasa al reactor biológico y se obtiene la Ecuación 28:

$$Qx_1 = rg\forall \quad \text{Ecuación 28}$$

Se conoce que la tasa volumétrica de crecimiento de la biomasa es igual a:

$$r_g = -Yr_{ut} - kdx_1 \quad \text{Ecuación 29}$$

Donde

r_{ut} = tasa volumétrica de utilización de sustrato (g SVS L⁻¹ d⁻¹)

Y = rendimiento celular (g SVS g DQO⁻¹), calculado anteriormente con un valor de 0.064 g SVS g DQO-acetato⁻¹.

kd = es el coeficiente de decaimiento endógeno con un valor de 0.06 g VSS gVSS⁻¹d⁻¹

Reemplazando la Ecuación 29 en la Ecuación 28 se obtiene:

$$Qx_1 = (-Yr_{ut} - kdx_1)\forall \quad \text{Ecuación 30}$$

Al mismo tiempo r_{ut} se define como:

$$r_{ut} = \frac{-q_{max}s_1x_1}{k_s+s_1} \quad \text{Ecuación 31}$$

Donde:

q_{max} = velocidad máxima de utilización de sustrato, para este estudio se utilizó el valor de 15.6 g DQO g VSS⁻¹ d⁻¹.

k_s = constante de saturación de sustrato de la ecuación de Monod con el valor de 60 mg L DQO⁻¹

Reemplazando la Ecuación 31 en la Ecuación 30 se obtiene:

$$\frac{Q}{v} = \frac{Yq_{max}s_1}{k_s+s_1} - kd \quad \text{Ecuación 32}$$

Despejando de la Ecuación 32 la variable s_1 se obtiene que:

$$s_1 = \frac{k_s}{\frac{yq_{max}}{Q} + kd} - 1$$

Ecuación 33

A partir de la Ecuación 33 se puede obtener la concentración de sustrato, en este caso el acetato que las bacterias sulfato reductoras oxidarían para la obtención de energía y fuente de carbono para su crecimiento celular, y este valor es igual a que las BSR requieren 239.8 mg acetato L^{-1} . Esta cantidad de acetato necesario para las BSR obtenido del balance solamente corresponde al 10% de la cantidad de acetato que entra al reactor por lo que la mayoría de la remoción del DQO (75.72%) ocurre por la oxidación del acetato por parte de las bacterias metanogénicas como se explicó anteriormente.

De acuerdo a la Ecuación 18, si las BSR oxidan 239.8 mg L^{-1} de acetato se reducirían 520.25 mg L^{-1} de sulfato que comparado con el valor experimental medido de 515.78 mg L^{-1} de sulfato se tiene solamente una diferencia del 0.8% entre el valor teórico y el experimental. Esto implica que las BSR remueven 25.8% de sulfato alimentado, 2000 mg L^{-1} . Estos valores coinciden con los reportados en la literatura, Benner y colaboradores instalaron una membrana permeable empacada con bacterias sulfato reductoras para remediar drenaje ácido de mina rico en níquel, el cuál contenía 2000- 4000 mg sulfato L^{-1} y después de 3 años de su instalación el efluente tenía concentraciones menores e igual a 1000 mg L^{-1} es decir una remoción alrededor del 30% [66-68], similar al 26% que se removió en el reactor biológico de este estudio. Sin embargo, se encontró un estudio realizado por Waybrant et al. donde se logró una remoción de sulfato mayor al 99% [69], este estudio consistía en evaluar la sulfato reducción y la remoción de metales pesados para diferentes mezclas con proporciones de agua residual, hojas, y otros

desecho orgánicos. Se observó que la remoción de sulfato depende de las cantidades de C, N y P. En otro estudio realizado por Champagne la remoción fue de 73% [70] para este estudio se hizo un bioreactor a escala laboratorio para la reducción de sulfato y operó durante 290 días, la reducción de sulfato en este caso pudo ser mayor que la de esta investigación debido a que el sistema operó todo el tiempo a una concentración de sulfato de 3030 mg L^{-1} , mientras que en el sistema de tratamiento BFQ se realizaron mediciones de sulfato cuando la concentración del efluente era de 2000 mg L^{-1} que simbolizó una reducción en la producción de sulfuro y por ende en la remoción de sulfato. En otros estudios de barreras permeables reactivas o en humedales artificiales se obtuvo una eficiencia de remoción de sulfato de alrededor del 70% [71], la remoción en humedales puede resultar más alta debido a que existen varios organismos interactuando en los procesos de remoción como lo son las algas, plantas y las bacterias. Los valores de remoción reportados en la literatura son mucho más altos que los obtenidos en este estudio, se puede adjudicar esta diferencia a varios factores como la concentración de sulfato inicial, el consorcio microbiano, la temperatura de operación, entre otros.

Con el balance de sustrato en el reactor biológico se puede obtener la cantidad biomasa que se genera. En el balance de sustrato se tiene que la tasa de consumo de sustrato en el reactor es igual a la tasa de entrada más la tasa de utilización de sustrato menos la tasa de salida. Nuevamente para el cálculo se considera que es un sistema en equilibrio por lo que la tasa de acumulación es nula de donde se obtiene:

$$\frac{ds}{dt} \forall = Qs_o - Qs_1 + r_{ut} \forall = 0 \quad \text{Ecuación 34}$$

Donde:

s_o = concentración de sustrato que entra al reactor biológico g DQO L⁻¹

De donde se obtiene la Ecuación 35:

$$Q s_o - s_1 + r_{ut} \forall = 0 \quad \text{Ecuación 35}$$

Reemplazando r_{ut} (Ecuación 31) en la Ecuación 35 obtiene:

$$Q s_o - s_1 + \frac{-q_{max} s_1 x_1}{k_s + s_1} \forall = 0 \quad \text{Ecuación 36}$$

Finalmente se despeja X_1 de la Ecuación 36 y se obtiene la cantidad de biomasa generada en el reactor biológico:

$$x_1 = \frac{Q(s_o - s_1)}{\forall q_{max} s_1} k_s + s_1 \quad \text{Ecuación 37}$$

Empleando la Ecuación 37 se calcula que la generación obtenida de biomasa es de 113.23 g SVS L⁻¹. Experimentalmente se determinó una concentración de sólidos suspendidos volátiles del efluente de 31 mg SVS L⁻¹, cabe indicar que debido a la hermeticidad del sistema no se pudo muestrear la cantidad de SVS en el reactor como tal. Evidentemente existe una gran diferencia que existe entre el valor teórico y el experimental que se puede atribuir a que la acumulación de biofilm en el reactor ocasiona el crecimiento de una “torta” en la arena por lo que hace que la salida de biomasa del reactor sea muy baja.

En el reactor biológico también se realizó un balance de azufre experimental donde se midió la concentración de sulfuro en la fase gaseosa y la concentración de sulfuro disuelto en el efluente, la concentración de sulfato en el afluente y la concentración sulfato en el efluente

dando como resultado 22.6, 92.54, 1991.16 y 1475.37 mg L⁻¹ respectivamente (Tabla 2). En base a estos resultados se calculó que ingresaron al sistema 318.58 mg azufre L⁻¹ mientras que abandonaron el sistema de 283.86 mg azufre L⁻¹, es decir que existe una pérdida del 10% de azufre. Una de las razones de este porcentaje de pérdida pudo deberse a la alta volatilidad de sulfuro que provocó que la medición del sulfuro disuelto sea más baja que la real. Otra de las razones puede ser la precipitación del sulfato como sulfato de calcio con el ión calcio ya que este está presente en el medio basal, aunque esta precipitación puede resultar mínima debido a las bajas concentraciones de calcio [21]. Se puede observar que la concentración de sulfato en el efluente fue de 1475.37 mg L⁻¹, este valor es alto y sobrepasa el límite de descarga a un cuerpo de agua dulce de 1000 mg L⁻¹ descrito en el Libro VI- Anexo 1 del Texto Unificado de Legislación Secundaria (TULSMA) [72]. La remoción de la concentración de sulfato se puede mejorar aumentando la actividad microbiana de las BSR de tal manera que la concentración de este ión en el efluente cumpla con los límites de descarga.

En cuanto a las concentración de sulfuros, estos valores también sobrepasan el límite de 0.5 mg L⁻¹ para descarga a un cuerpo de agua dulce [72], sin embargo, la cantidad de sulfuro en el efluente no es preocupante ya que este sulfuro puede reaccionar con otros metales o con concentraciones más altas de metales mejorando así la eficiencia de remoción de metales pesados del sistema de tratamiento BFQ.

Tabla 2 Balance de azufre en el reactor biológico, el balance se lo realizó cuando alimentación en el reactor biológico era de 2000 mg L⁻¹ de sulfato.

	Sulfato afluente (mg L ⁻¹)	Sulfato efluente (g L ⁻¹)	Sulfuro disuelto efluente (mg L ⁻¹)	Sulfuro fase gaseosa (mg L ⁻¹)
	1991.16	1475.37	92.54	22.6
Azufre (mg)	663.71	491.79	92.54	22.6

Evaluación del funcionamiento del sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento del drenaje ácido de mina sintético

El tratamiento de drenaje ácido de mina sintético en el sistema biológico-físico-químico consiste en un sistema compuesto de dos reactores conectados en serie. El primer reactor es el reactor biológico ya descrito previamente, en este reactor las BSR reducen el sulfato a sulfuro, el efluente con alto sulfuro biogénico entra al segundo reactor, el reactor físico-químico donde ocurre el aumento de pH y la remoción de metales pesados. El reactor físico-químico consta de dos puertos de entrada (lateral e inferior) y uno de salida (lateral). La entrada lateral del reactor físico-químico está conectada en serie con el efluente del reactor biológico. La otra entrada localizada en la parte inferior del reactor físico-químico es alimentada por una solución de DAM sintética con pH entre 2.7 y 3 compuesta de cobre (II) como cloruro dihidratado de cobre ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y zinc (II) como cloruro dihidratado de zinc ($\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Este afluente fue ajustado a un pH entre 2.7 y 3.

Desde el montaje del reactor físico-químico hasta el día 509 considerando el tiempo de operación del reactor biológico la concentración de alimentación de cobre fue de 30 mg L^{-1} (Fase I). A partir de este día hasta el día 581 la concentración de cobre (II) aumentó a 60 mg L^{-1} (Fase II). Posteriormente la concentración de cobre (II) se incrementó a 100 mg L^{-1} (Fase III) hasta el día 715 donde se redujo a 30 mg L^{-1} y se incorporó zinc (II) como cloruro dihidratado de zinc en una concentración de 30 mg L^{-1} hasta el final del estudio (Fase IV).

En la Figura 13, se puede observar la concentración de sulfuro en el sistema biológico-físico-químico para el tratamiento de DAM sintético. Las fluctuaciones en las concentraciones de sulfuro del efluente del reactor biológico y el efluente del reactor físico- químico son

similares. El efluente del reactor biológico ingresa al reactor físico-químico donde se realiza una dilución de la concentración de sulfuro a la mitad debido al ingreso del DAM sintético en la misma proporción. La reducción en la concentración de sulfuro en el reactor físico-químico también se puede adjudicar a la volatilización del sulfuro. Durante la primera fase del estudio se tienen fluctuaciones en la producción de sulfuro debido a la estabilización del reactor y al cambio de concentración de sulfato de 4000 a 3000 mg L⁻¹, la producción promedio de sulfuro para esta fase fue de 143 mg L⁻¹ para el reactor biológico mientras que para el reactor físico químico fue de 55.4 mg L⁻¹. En la segunda fase se tuvieron cambios en la producción de sulfuro debido a la limpieza del reactor biológico y al incremento de temperatura, la producción de sulfuro fue de 145.6 mg L⁻¹ para el reactor biológico mientras que para el reactor físico químico fue de 58.9 mg L⁻¹. En la fase III del estudio se tuvieron cambios en la producción de sulfuro ocasionado por el cambio de concentración del sulfato de 3000 mg L⁻¹ a 2000 mg L⁻¹, este cambio fue muy significativo para los dos reactores, en esta fase se observa un incremento de sulfuro en el reactor biológico a 167 mg L⁻¹ para el reactor biológico, en cuanto al reactor físico-químico se tiene una concentración de 54.3 mg L⁻¹. La concentración en el reactor físico químico sufrió una disminución en vez de un incremento esto pudo deberse que durante la Fase III se tuvieron concentraciones más altas de cobre. En la última fase existió una disminución de la concentración de sulfuro para el reactor biológico y el reactor físico- químico a 87.45 y 15.21 mg L⁻¹, respectivamente, la disminución en la concentración pudo deberse a un efecto atrasado del cambio de concentración del sulfato. Sin embargo, la concentración necesaria de sulfuro para precipitar los metales pesados es muy pequeña por lo que la disminución en la producción de sulfuro, la volatilización y dilución no afecta de gran manera al tratamiento del DAM sintético. Para demostrar la cantidad de sulfuro necesaria para

la remoción de metales pesados se realizaron experimentos batch que serán descritos en la siguiente sección.

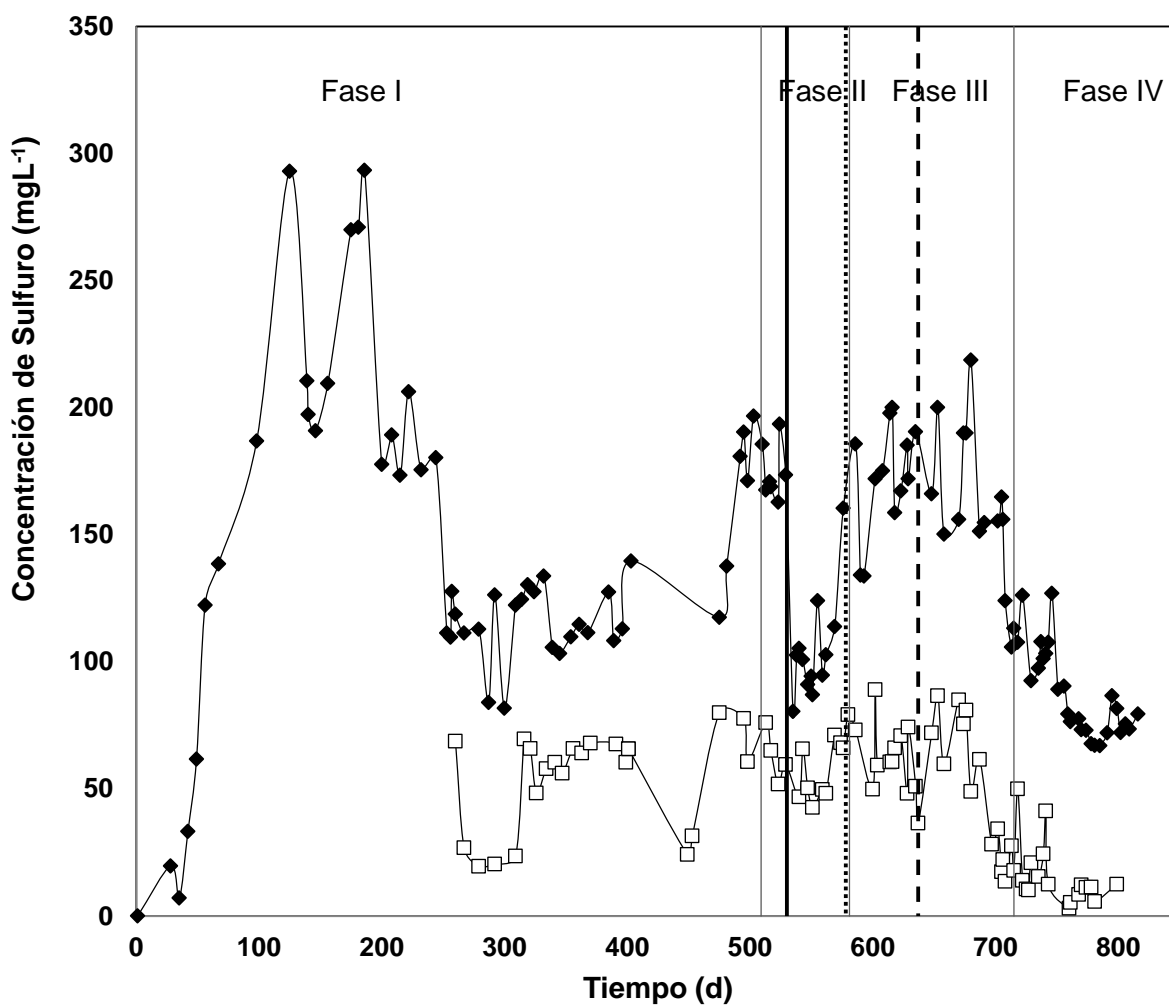


Figura 13. Variación de sulfuro con respecto al tiempo en el sistema biológico-físico- químico (BFQ) para el tratamiento de DAM sintético. El reactor biológico fue empacado con 15 g SVS L^{-1} de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con 2.5 g DQO L^{-1} de acetato y 4000 mg L^{-1} de sulfato hasta $t=140$ días, 3000 mg L^{-1} de sulfato hasta $t=637$ días y 2000 mg L^{-1} de sulfato hasta el $t=816$. El reactor físico-químico fue alimentado con DAM sintético con concentraciones variables de cobre divididas en 4 fases. Fase I: concentración de cobre (II) de 30 mgL^{-1} desde su montaje hasta $t= 509$ días. Fase II: concentración de cobre (II) de 60 mgL^{-1} hasta $t=581$. Fase III: concentración de cobre (II) de 100 mg L^{-1} hasta $t= 715$. Fase IV: concentración de cobre de 30 mg L^{-1} y zinc de 30 mg L^{-1} . Leyenda: (\blacklozenge) Efluente del reactor biológico (\square) Efluente del reactor físico-químico (—) Limpieza del reactor biológico $t=530$ (-----) Incremento de temperatura a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ $t=578$ (- - - -) Cambio concentración de sulfato a 2000 mg L^{-1} $t=637$.

En la Figura 14 se presenta la variación del flujo del sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina sintético con respecto al tiempo. El flujo del afluente del reactor biológico y el afluente del DAM sintético del reactor físico-químico fueron los mismos suministrados por una bomba peristáltica por lo que se evidenció unos rangos de variación de flujo constantes a lo largo del estudio. El efluente del reactor biológico se mantuvo en un rango de 0.2 a 0.25 mL min⁻¹, mientras que el efluente del reactor físico-químico se mantuvo en un rango de 0.5 a 0.55 mL min⁻¹. La diferencia entre los valores de flujo pudo deberse a ligeros taponamientos en las mangueras; sin embargo, se logró mantener el flujo en su gran mayoría constante. El flujo y el volumen del reactor determinan el tiempo de residencia, en este estudio se estableció que el tiempo de residencia es de 1.3 días para el reactor biológico. El tiempo de residencia es muy importante en cuanto a la remoción de sulfato, por ejemplo, en un estudio de recuperación de metales a escala laboratorio usando la precipitación de metales con sulfuro por bacterias sulfato reductoras realizado por Foucher et al. se determinó que el tiempo de residencia óptimo de operación para remover sulfato es de 0.9 días, mientras más bajo era el tiempo de residencia se registro menor remoción de sulfato había[73].

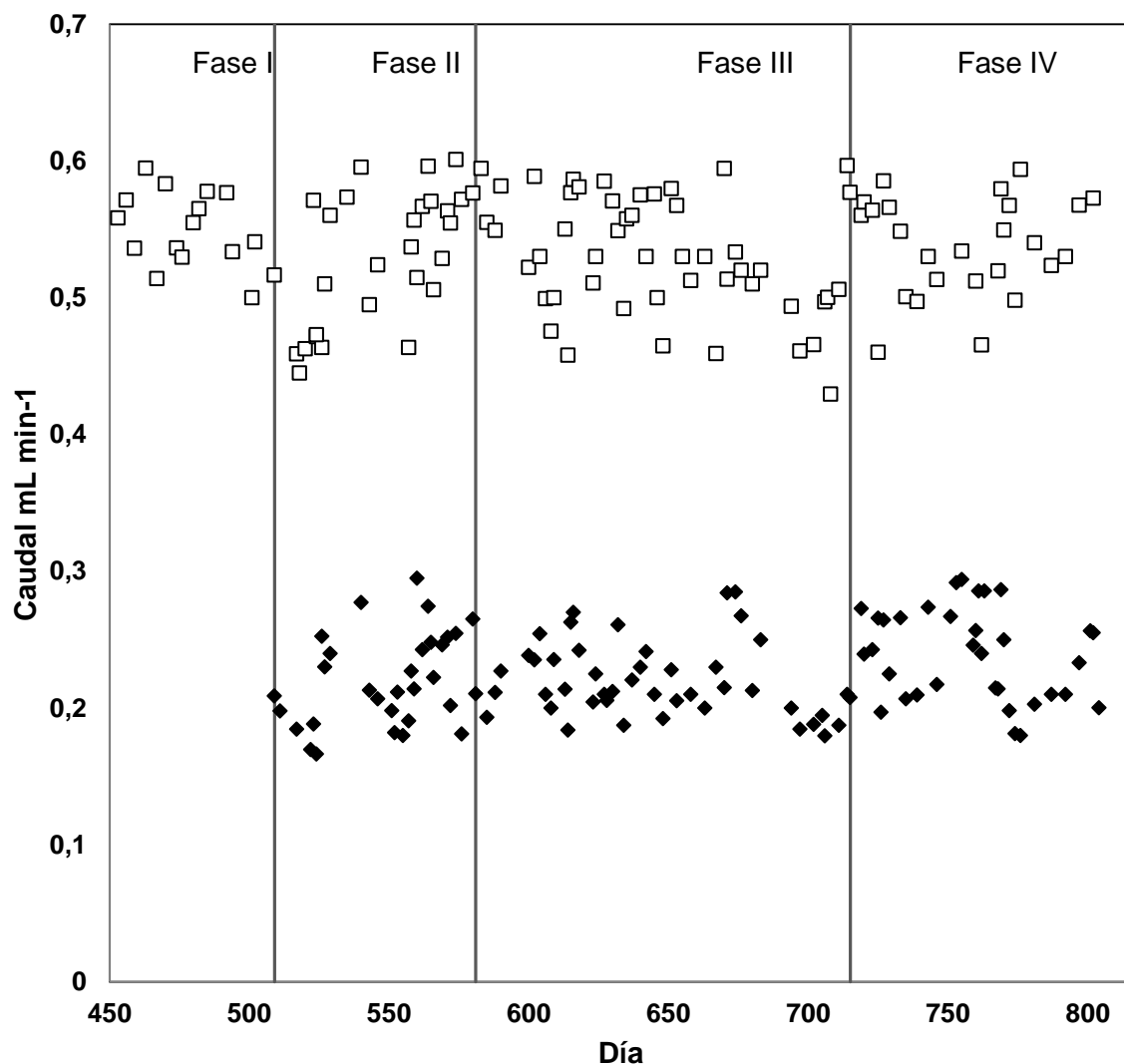
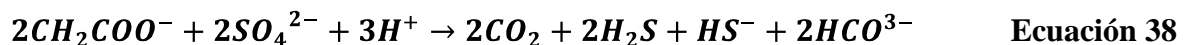


Figura 14. Variación de flujo con respecto al tiempo en el sistema biológico-físico- químico (BFQ) para el tratamiento de DAM sintético. El reactor biológico fue empacado con 15 g SVS L⁻¹ de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con 2.5 g DQO L⁻¹ de acetato y 4000 mg L⁻¹ de sulfato hasta t=140 días, 3000 mg L⁻¹ de sulfato hasta t=637 días y 2000 mg L⁻¹ de sulfato hasta el t=816. El reactor físico-químico fue alimentado con DAM sintético con concentraciones variables de cobre divididas en 4 fases. Fase I: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ desde su montaje hasta t= 509 días. Fase II: Cu (II) igual a 60 mg L⁻¹ hasta t=581. Fase III: Cu (II) igual a 100 mg L⁻¹ hasta t= 715. Fase IV: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ y Zn (II) igual a 30 mg L⁻¹. Leyenda: (◆) Efluente del reactor biológico, (□) Efluente del reactor físico-químico

La Figura 15 presenta la variación del pH con respecto al tiempo del sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento del drenaje ácido de mina sintético. El afluente del reactor biológico (medio basal) se mantuvo constante en un rango de 7.1 a 7.5. Barton menciona que el pH óptimo para el crecimiento de las BSR es 7.2 [74], lo que indica que durante el estudio se trabajó en un pH óptimo para las bacterias sulfato-reductoras. En algunas ocasiones el pH del afluente se elevó hasta 8, la razón del incremento del pH fue por la oxidación del acetato con oxígeno antes de ingresar al reactor biológico, lo que ocasionó la formación de bicarbonatos. La oxidación del acetato con oxígeno tiene una energía libre de Gibbs negativa lo que indica que esta reacción es favorable y se puede dar espontáneamente sin la catalización de bacterias, por lo que la descomposición del acetato antes de ingresar al reactor biológico puede ocurrir [64].

El efluente del reactor biológico presentó valores de pH entre 8.5 y 9, este incremento de 1.5 a 2 unidades pH con respecto al pH del afluente se puede atribuir a la oxidación del acetato de sodio por la reducción de sulfato catalizada por las bacterias sulfato-reductoras. Dvorak menciona que en base al equilibrio químico bajo condiciones de sulfato-reducción, el pH y la alcalinidad del drenaje ácido de mina aumenta, además los iones carbonato e hidróxidos generados por el aumento del pH también pueden formar precipitados [75]. En la siguiente ecuación se puede observar claramente que por cada mol de acetato consumida una mol de bicarbonato es producida, lo que hace que el pH aumente:



En cuanto al pH del efluente del reactor físico-químico se tiene un rango promedio de 8 a 8.5, que indica un aumento de pH del DAM sintético que tiene valores de pH de 2.8 a 3 antes de entrar al reactor físico-químico. Se puede observar claramente como la alcalinidad del efluente rico en sulfuro biogénico logra incrementar el pH ácido del DAM sintético alcanzando valores básicos.

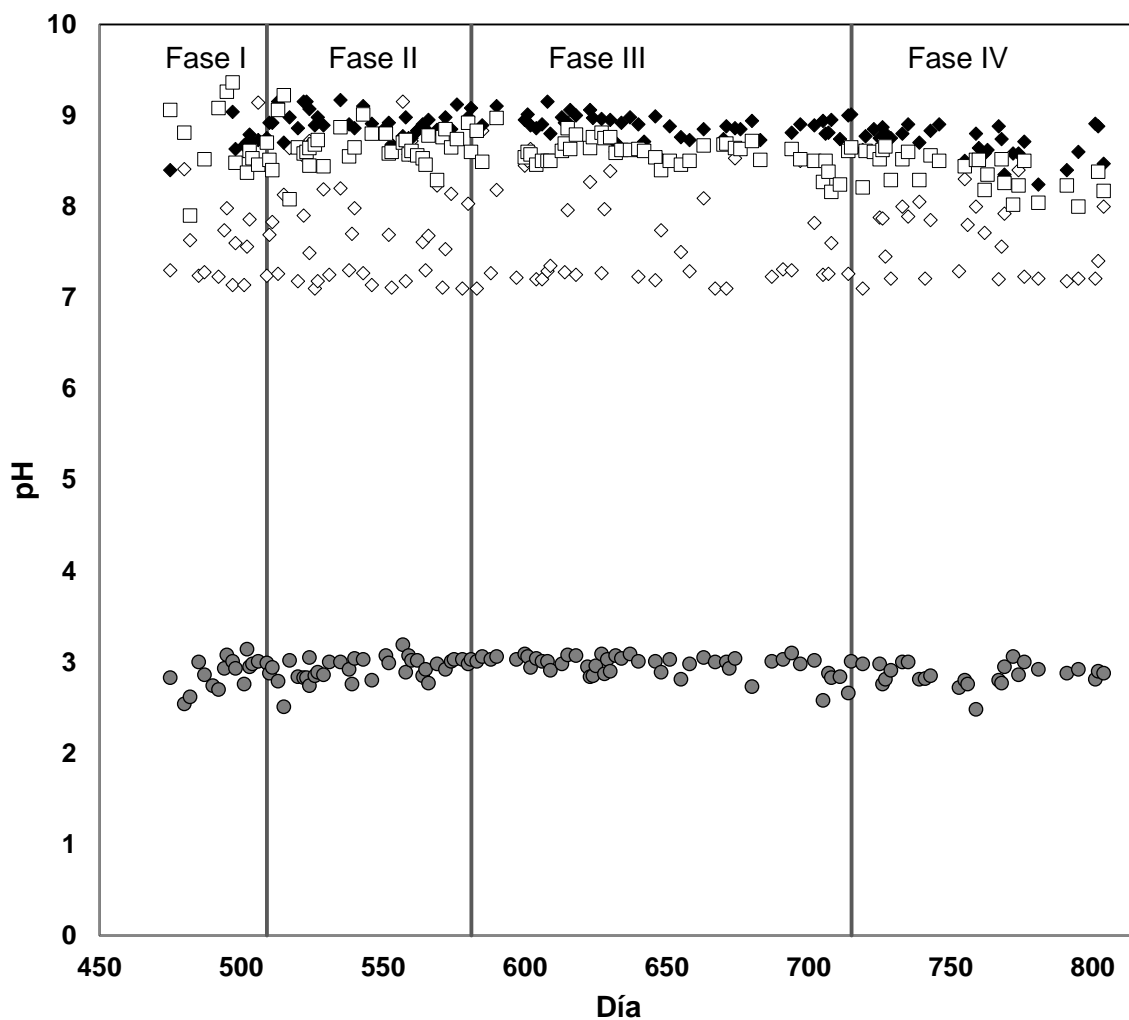


Figura 15. Variación del pH con respecto al tiempo en el sistema biológico-físico- químico (BFQ) para el tratamiento de DAM sintético. El reactor biológico fue empacado con 15 g SVS L^{-1} de sedimentos de la laguna artificial de la USFQ y alimentado con 2.5 g DQO L^{-1} de acetato y 4000 mg L^{-1} de sulfato hasta $t=140$ días, 3000 mg L^{-1} de sulfato hasta $t=637$ días y 2000 mg L^{-1} de sulfato hasta el $t=816$. El reactor físico-químico fue alimentado con DAM sintético con concentraciones variables de cobre divididas en 4 fases. Fase I: Cu (II) igual a 30 mg L^{-1} hasta $t= 509$ días. Fase II: Cu (II) igual a 60 mg L^{-1} hasta $t=581$. Fase III: Cu (II) igual a 100 mg L^{-1} hasta $t= 715$. Fase IV: Cu igual a 30 mg L^{-1} y Zn (II) igual a 30 mg L^{-1} . Leyenda: (◆) Efluente del reactor biológico (□) Efluente del reactor físico-químico (●) Afluente DAM (◇) Medio basal.

Remoción de Metales Pesados

La eficiencia del sistema de tratamiento biológico-físico-químico para remover los metales de los drenajes ácidos de mina fue evaluada en presencia de cobre (II) y de zinc (II). La Figura 16 presenta las concentraciones de Cu (II) y de Zn (II) presentes en el DAM sintético que ingresan al reactor físico-químico para su respectivo tratamiento. En basa a lo explicado anteriormente, la alimentación con diferentes concentraciones se dividió en cuatro fases. Fase I: Cu (II) igual a 30 mg L^{-1} desde el montaje del reactor físico-químico hasta $t= 509$ días. Fase II: Cu (II) igual a 60 mg L^{-1} hasta $t=581$. Fase III: Cu (II) igual a 100 mg L^{-1} hasta $t= 715$. Fase IV: Cu (II) igual a 30 mg L^{-1} y Zn (II) igual a 30 mg L^{-1} .

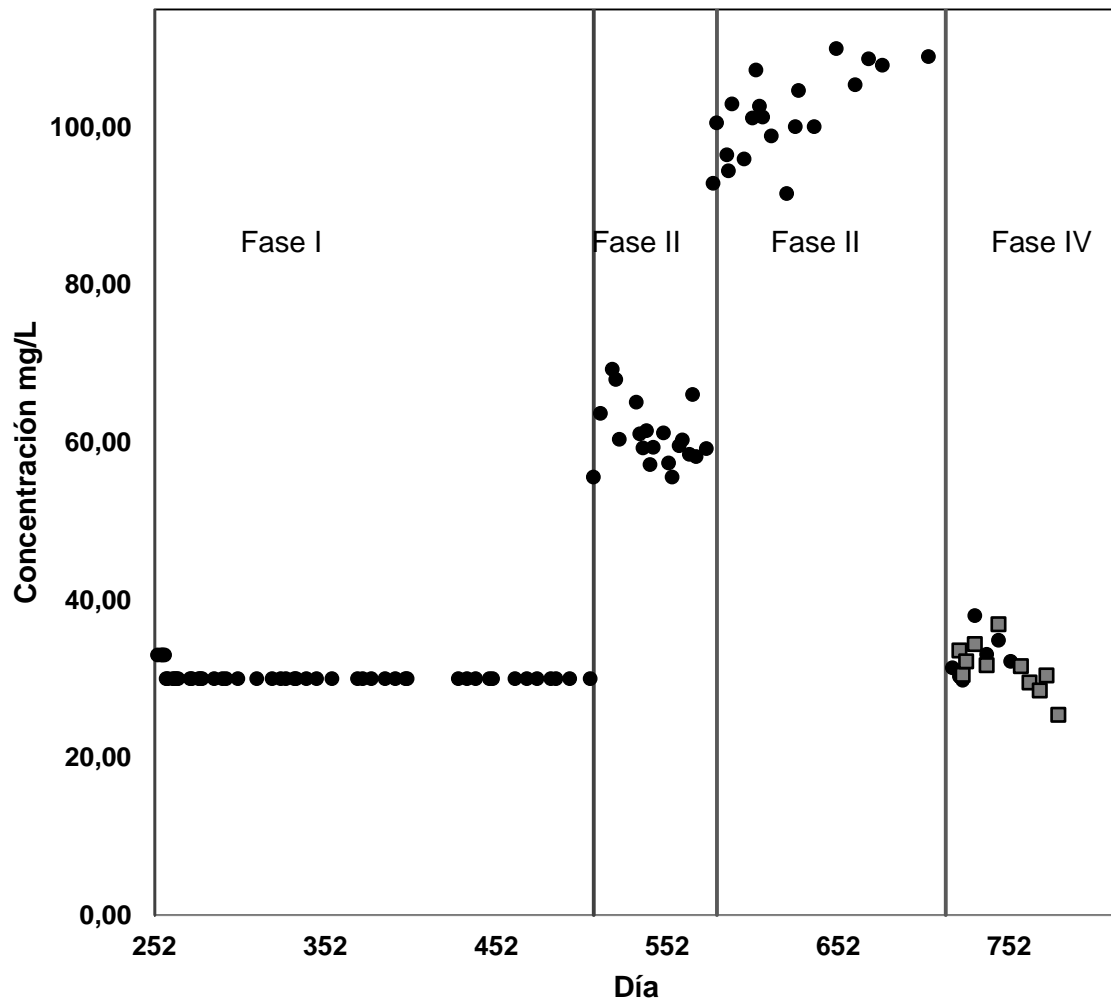


Figura 16. Concentración de metales en el afluente del reactor físico-químico parte del sistema biológico-físico- químico (BFQ) para el tratamiento de DAM sintético. El reactor físico-químico de flujo ascendente en modo de operación continua fue alimentado con DAM sintético con concentraciones variables de cobre divididas en 4 fases. . Fase I: Cu (II) igual a 30 mg L^{-1} hasta $t= 509$ días. Fase II: Cu (II) igual a 60 mg L^{-1} hasta $t=581$. Fase III: Cu (II) igual a 100 mg L^{-1} hasta $t= 715$. Fase IV: Cu (II) igual a 30 mg L^{-1} y Zn (II) igual a 30 mg L^{-1} .Leyenda: (•) Concentración de Cu (II) en mg L^{-1} , (■) Concentración de Zn (II) en mgL^{-1}

En la Figura 17 se presentan las concentraciones de Cu (II) y Zn (II) en el efluente del reactor físico-químico del sistema de tratamiento BFQ con respecto al tiempo. Durante las cuatro fases de operación del sistema BFQ, las concentraciones de Cu (II) en el efluente se encuentran en un rango 0.2 a 0.6 mg L⁻¹, mientras que las de Zn (II) están alrededor de 0.4 a 0.8 mg L⁻¹, alcanzando remociones mayores al 97% lo cual demuestra la efectividad del sistema biológico-físico-químico de DAM para remover metales pesados tales como Cu (II) y Zn (II). Las concentraciones de salida de cobre cumplen con los “límites máximos de descarga a un cuerpo de agua dulce” descrito en la Tabla 12 del Libro VI- Anexo 1 del Texto Unificado de Legislación Secundaria (TULSMA), los cuales corresponden a 1 mg L⁻¹ para el cobre y 5mg L⁻¹ para el zinc [72]. La remoción para Cu (II) en promedio fue de 99% durante las cuatro fases evaluadas en este estudio (ver Figura 18). La remoción para Zn (II) fue en promedio de 97,7% (ver Figura 19). La diferencia entre los porcentajes de remoción entre Cu (II) y Zn (II) se puede atribuir a la diferencia entre los respectivos valores de la constante de solubilidad (k_{sp}). El k_{sp} para el sulfuro de cobre es de 8×10^{-37} mientras que el k_{sp} para el sulfuro de zinc es de 2×10^{-25} ; debido a que el k_{sp} del sulfuro de cobre es menor que el k_{sp} del sulfuro de zinc, el cobre precipitará primero que el zinc.

En varios estudios sobre el tratamiento de drenajes ácidos de mina usando el sulfuro biogénico generado por las BSR para la precipitación de metales como Fe, Ni, Zn, Al, Mn, Cu, U, Se, As y V se han reportado remociones mayores al 95% [13, 36, 69, 75], valores similares a los obtenidos en el sistema BFQ de los DAM evaluados en este estudio. Por ejemplo, en un estudio realizado en Perú donde se utilizó un reactor para las bacterias sulfato reductoras y otro reactor para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina, en 21 días se logró tener una remoción de metales del 95%, incluyendo el cobre (II) y el zinc (II) [11]. Adicionalmente en

un estudio piloto realizado para la mina Lilly/Orphan Boy se obtuvieron eficiencias de remoción de 99% para el zinc, 99% para el aluminio, 96% para el manganeso, 98% para el cadmio y 96% para el cobre [23].

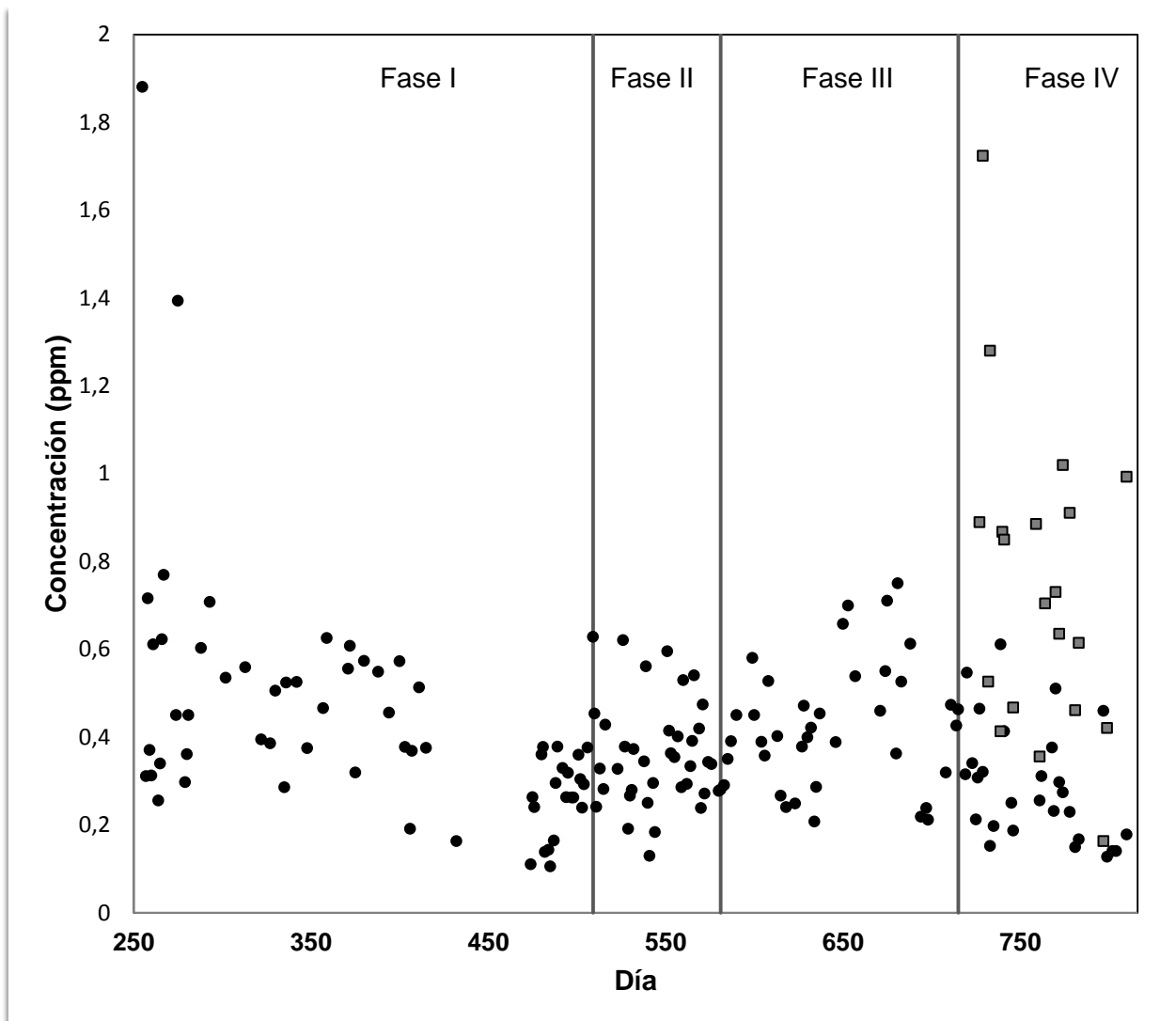


Figura 17. Concentración de metales en el efluente del reactor físico-químico parte del sistema biológico-físico- químico (BFQ) para el tratamiento de DAM sintético. El reactor físico-químico fue alimentado con DAM sintético con concentraciones variables de cobre divididas en 4 fases. Fase I: Cu (II) igual a 30 mg L^{-1} hasta $t=509$ días. Fase II: Cu (II) igual a 60 mg L^{-1} hasta $t=581$. Fase III: Cu (II) igual a 100 mg L^{-1} hasta $t=715$. Fase IV: Cu (II) igual a 30 mg L^{-1} y Zn (II) igual a 30 mg L^{-1} . Leyenda: (•) Concentración de Cu (II) en mg L^{-1} , (□) Concentración de Zn (II) en mg L^{-1}

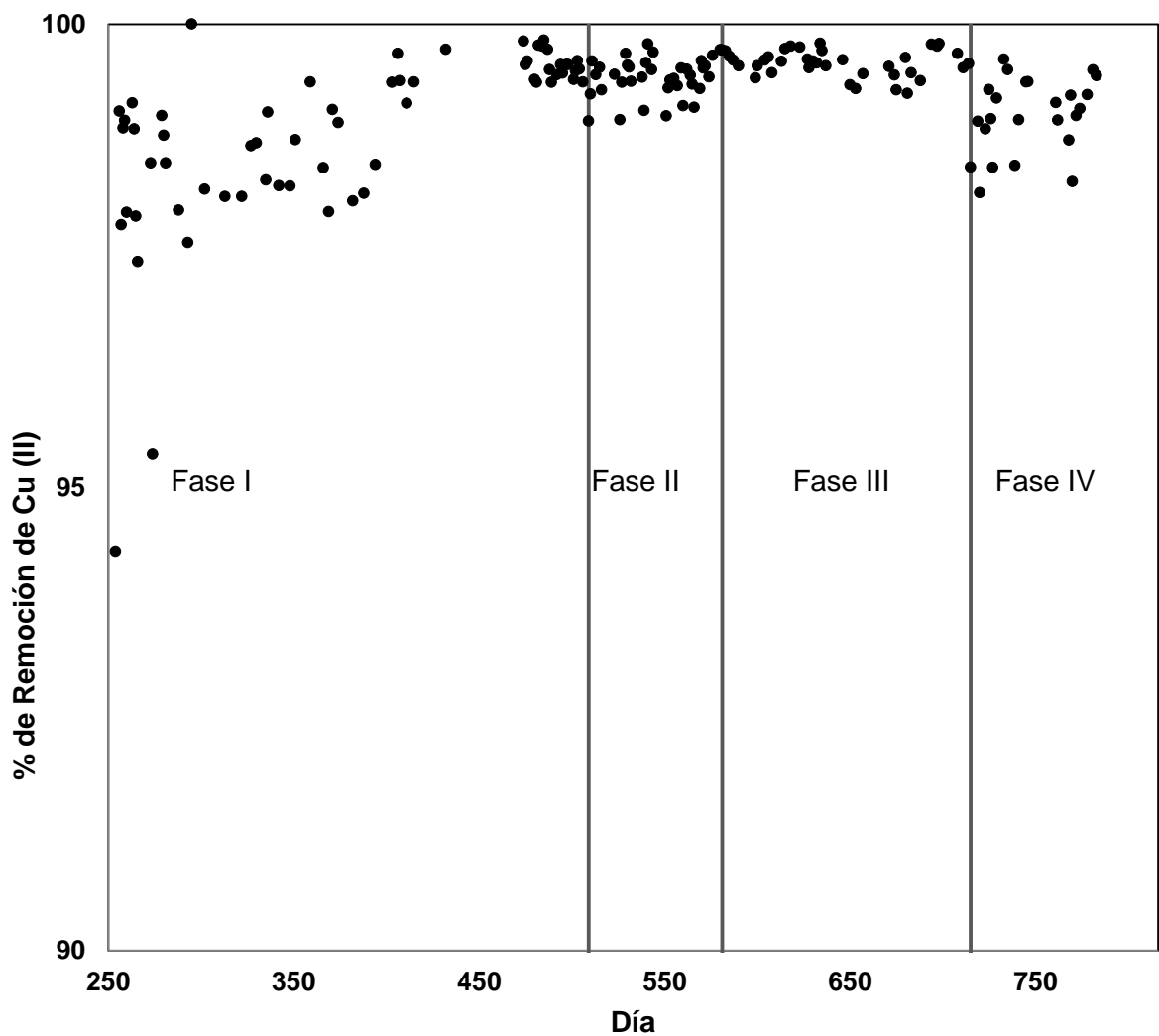


Figura 18. Porcentaje de remoción de Cu (II) en el sistema biológico-físico- químico (BFQ) para el tratamiento de DAM sintético. El reactor físico-químico fue alimentado con DAM sintético con concentraciones variables de cobre divididas en 4 fases. Fase I: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ hasta t= 509 días. Fase II: Cu (II) igual a 60 mg L⁻¹ hasta t=581. Fase III: Cu (II) igual a 100 mg L⁻¹ hasta t= 715. Fase IV: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ y Zn (II) igual a 30 mg L⁻¹.

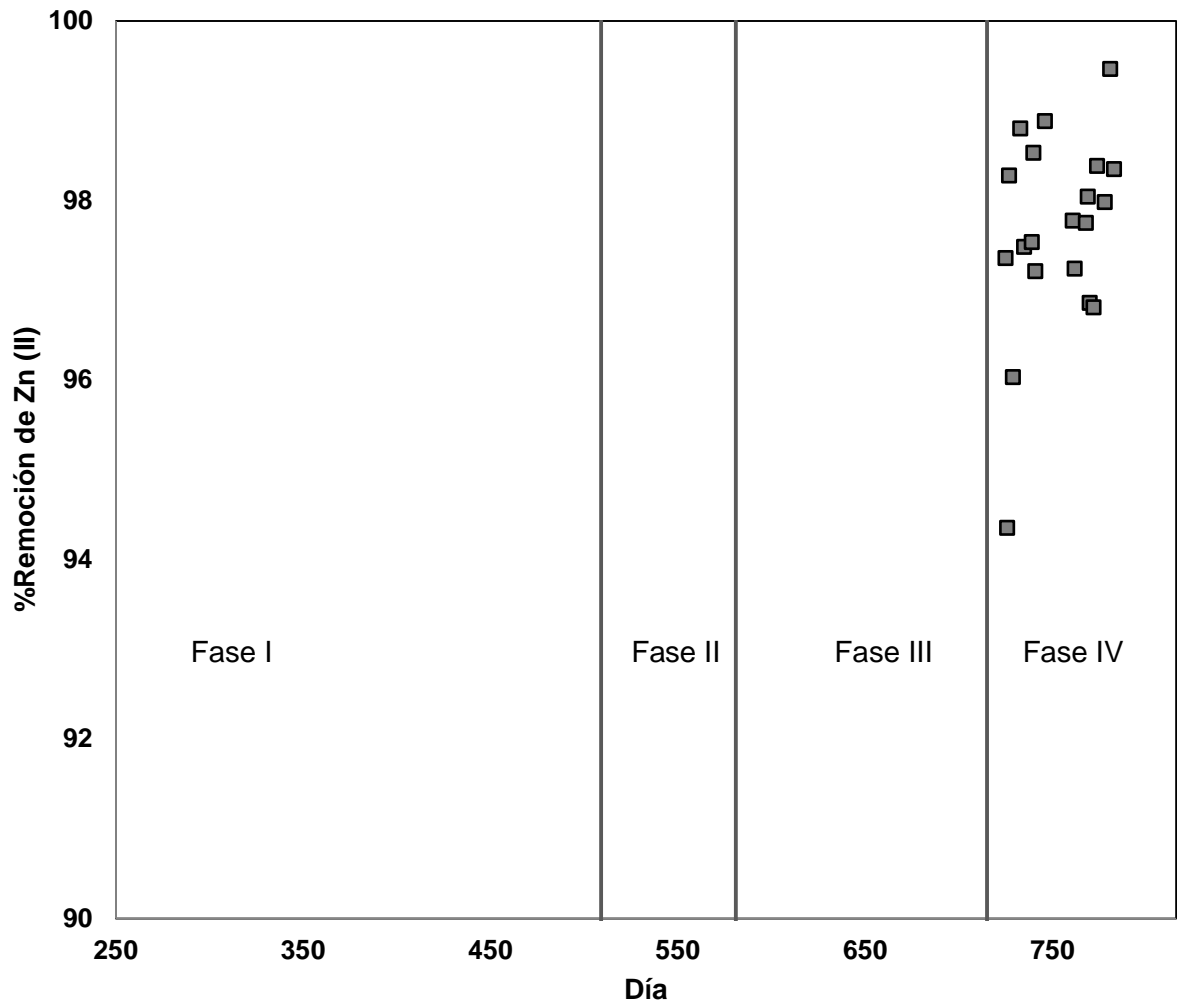


Figura 19. Porcentaje de remoción de Zn (II) en el sistema biológico-físico- químico (BFQ) para el tratamiento de DAM sintético. El reactor físico-químico fue alimentado con DAM sintético con concentraciones variables de cobre divididas en 4 fases. Fase I: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ hasta t= 509 días. Fase II: Cu (II) igual a 60 mg L⁻¹ hasta t=581. Fase III: Cu (II) igual a 100 mg L⁻¹ hasta t= 715. Fase IV: Cu (II) igual a 30 mg L⁻¹ y Zn (II) igual a 30 mg L⁻¹.

Precipitación sulfuros metálicos.

La formación de sulfuros metálicos se evaluó en experimentos batch con los objetivos de demostrar la precipitación de Cu (II) en presencia de sulfuro como sulfuro de cobre (CuS) y establecer la cantidad mínima requerida sulfuro para que reaccione con cobre (II). La precipitación de cobre (II) como sulfuro de cobre (CuS) fue evaluada por la remoción de sulfuro y cobre disuelto al inicio de cada ensayo y después de 8 horas de tratamiento de acuerdo al procedimiento descrito en la sección de Materiales y Métodos. Brevemente, la determinación de la precipitación de CuS se realizó por duplicado en botellas de vidrio de 160 mL selladas con tapones de caucho y tapas de aluminio. En estos ensayos se emplearon un control (ausencia de cobre (II)) y diferentes tratamientos con concentraciones en aumento de cobre (II) de 5, 10, 15, 25 y 50 mg L⁻¹ correspondientes a los tratamientos T-1, T-2, T-3, T-4 y T-5 respectivamente.

En base al valor del k_{sp} del sulfuro de cobre (8×10^{-37}) se determinó la cantidad teórica necesaria de sulfuro en cada tratamiento para la precipitación del cobre (II). Adicionalmente, se calculó la concentración de hidróxidos necesaria para la precipitación de hidróxidos metálicos teniendo en consideración que el k_{sp} de hidróxido de cobre es igual a $4,8 \times 10^{-20}$, en la Tabla 3 se resume los resultados obtenidos. La concentración de sulfuros requerida para la precipitación de 25 mg L⁻¹ de Cu (II) como sulfuro de cobre es $2,04 \times 10^{-33}$, esta concentración es mucho menor que aquella requerida de hidróxido igual a $1,11 \times 10^{-8}$ requerida para la formación de hidróxido de cobre (Cu(OH)₂), por lo tanto se concluye que el cobre (II), preferentemente precipitaría como sulfuro de cobre, con una remoción despreciable de sulfuro.

Los datos experimentales corroboran los datos teóricos, los resultados de los diferentes tratamientos se presentan en la Tabla 4, donde en todos los tratamientos se obtienen remociones de sulfuro menores a 5.31% mientras que la remoción de cobre (II) es mayor al 90%. La remoción de sulfuro de 5.31% se debe básicamente a errores experimentales al momento de medir la concentración de sulfuro, por ejemplo, durante la determinación colorimétrica de la absorbancia los errores volumétricos pueden estar presentes; otro aspecto que pudo influir en la remoción de sulfuro es la volatilización de este, aumentando así la cantidad de sulfuro en la fase gaseosa y disminuyendo el sulfuro disuelto que se midió en fase acuosa. En todos los tratamientos se observó la formación de un precipitado de color verdoso lo cual indica la precipitación del cobre como sulfuro de cobre. Los experimentos batch demuestran que el método de tratamiento de los drenajes ácidos de mina por la precipitación de los metales como sulfuros metálicos resulta factible ya que se obtiene altas remociones de los metales. El tratamiento con hidróxido también es posible; sin embargo, se necesita más cantidad de hidróxido que de sulfuro y esta cantidad incidiría en los costos de operación. Los costos de operación se verían implicados en tratamiento de los lodos obtenidos del proceso de tratamiento y los insumos de químicos como el hidróxido de sodio.

Tabla 3. Concentración teórica de iones sulfuro e hidróxidos para la precipitación de Cu (II) como sulfuro de cobre (CuS) e hidróxido de cobre (Cu(OH)₂), respectivamente en diferentes tratamientos con concentraciones de cobre (II) de 5, 10,15, 25 y 50 mg L⁻¹ correspondientes a los tratamientos T-1, T-2, T-3, T-4 y T-5 respectivamente.

Tratamiento	Concentración necesaria para la precipitación del Cu(II) mg L ⁻¹	
	OH ⁻	S ²⁻
T-1	2.56E-08	3.49E-28
T-2	1.90E-08	1.93E-28
T-3	1.47E-08	1.16E-28
T-4	1.11E-08	6.51E-29
T-5	7.89E-09	3.32E-29

Tabla 4. Porcentaje de remoción de sulfuro y Cu (II) en el control (ausencia de cobre (II)) y en los diferentes tratamientos con concentraciones de cobre (II) de 5, 10,15, 25 y 50 mg L⁻¹ de Cu (II) correspondientes a los tratamientos T-1, T-2, T-3, T-4 y T-5, respectivamente.

Tratamiento	Remoción de S ²⁻ (%)	Remoción Cu (II) (%)
Control	0	0
T-1	0	93.71
T-2	2.54	96.16
T-3	2.39	97.74
T-4	5.31	99.08
T-5	3.05	99.11

Conclusiones

La investigación acerca de nuevas tecnologías para el tratamiento de drenajes ácidos de mina es muy importante debido a que la explotación de minerales en el mundo está incrementando y sus consecuencias ambientales pueden ser muy graves. En el presente estudio se evaluó el funcionamiento del sistema biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento de drenajes ácidos de mina a escala laboratorio en presencia de cobre (II) y zinc (II). El tratamiento consiste en precipitar los metales con sulfuro que producen las bacterias sulfato-reductoras por la oxidación del acetato, aumentar el pH ácido característico del DAM y remover sulfatos.

El sistema de tratamiento biológico-físico-químico (BFQ) demostró ser altamente eficiente para el tratamiento de metales pesados con remociones de cobre (II) y zinc (II) mayores al 97% y logra elevar el pH del drenaje ácido de mina sintético a 8.5. Los resultados demuestran la factibilidad de utilizar esta tecnología como tratamiento para los drenajes ácidos de mina. El tratamiento biológico puede resultar muy atractivo ya que se logra remover el sulfato y metales sin tener que añadir compuestos externos como el hidróxido de sodio. Sin embargo, los reactores biológicos son muy sensibles por lo que se debe proporcionar condiciones aptas como la temperatura y el pH para no afectar la actividad microbiana de las bacterias sulfato-reductoras. En los resultados obtenidos es evidente que las condiciones a las que se somete a las BSR: un sistema anóxico, pH adecuado, temperatura de alrededor 30°C y una concentración de sulfato y acetato adecuada es determinante para el crecimiento microbiano. Por lo tanto, si se controlan los parámetros adecuados se pueden obtener remociones de sulfato y de DQO deseadas.

La remoción de sulfato en el reactor biológico fue de 25.9% esta remoción aun no es lo suficientemente alta para que el efluente del sistema de tratamiento BFQ cumpla con las concentraciones de descarga en un cuerpo de agua dulce presentados en el TULSMA. Sin embargo, mejorando la actividad microbiana de las bacterias sulfato reductoras, por ejemplo, se puede reducir la competencia por el sustrato con las bacterias metanogénicas manteniendo relaciones entre DQO-sulfato menor a 1 y así se logre favorecer a las BSR. En cuanto al sulfuro acuoso, tampoco se cumple con los límites permisibles para descarga a un cuerpo de agua dulce, pero estas concentraciones de sulfuro pueden ser utilizadas para la precipitación de otros metales pesados antes de ser descargada, lo cual es favorable para el sistema de tratamiento BFQ descrito en este trabajo de investigación.

El presente estudio presenta resultados prometedores para el tratamiento DAM; pero el sistema BFQ aún necesita ser mejorado para que pueda ser considerado como un tratamiento eficiente frente a otras tecnologías ya que como se observó pequeños cambios en la temperatura o en la concentración de sulfato puede afectar de gran manera la actividad microbiana alterando así a todo el sistema. El desarrollo de un sistema BFQ para el tratamiento de DAM como un reactor único en el futuro puede resultar un avance muy interesante para este tipo de tratamiento, pero es necesario considerar las concentraciones de sulfato, el pH y la toxicidad de los metales pesados ya que estos factores pueden condicionar la reducción microbiana de sulfato catalizada por las BSR.

Bibliografía

1. Bibian, C., Metales con precios tenaces. *CNNexpansión* 20 de Septiembre, 2011.
2. Ivasconez, Ecuador está listo para iniciar labores de minería a gran escala. *Hoy* 20 de Septiembre, 2011.
3. Escobari, J., Problemática ambiental en Bolivia. *Unidad de análisis de políticas sociales y económicas* **2003**.
4. Costa, M.; Martins, M.; Jesus, C.; Duarte, J., Treatment of Acid Mine Drainage by Sulphate-reducing Bacteria Using Low Cost Matrices. *Water, Air, & Soil Pollution* **2008**, *189*, (1), 149-162.
5. Huanca, R. Tratamiento de aguas de drenaje ácido de mina (DAM). Universidad Mayor de San Andrés, 2003.
6. Ata Akcil, S. K., Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. *Journal of cleaner production* **2006**, *14*, 1139-1145.
7. A Peppas, K. K., I Hlikia, Use of organic covers for acid mine drainage control. *Minerals Engineering* **2000**, *13*, 563-574.
8. Diz, H. Chemical and biological treatment of acid mine drainage for the removal of heavy metals and acidity. Virginia Polytechnic Institute and State University, 1997.
9. Johnson, D. B.; Hallberg, K. B., Acid mine drainage remediation options: a review. *Science of The Total Environment* **2005**, *338*, (1-2), 3-14.
10. R. Coulton, C. B., C. Hallet, The design and optimization of active mine water active treatment plant-design, construction and operation. *Land Contam Reclam* **2003**, *11*, 273-9.
11. Chambe, M. N. Evaluación de los métodos químicos y biogénico para el tratamiento de drenaje ácido de mina a escala de laboratorio. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Peru, 2008.

12. Labrenz, M.; Banfield, J. F., Sulfate-Reducing Bacteria-Dominated Biofilms That Precipitate ZnS in a Subsurface Circumneutral-pH Mine Drainage System. *Microbial Ecology* **2004**, *47*, (3), 205-217.
13. R.W Hammack, A. d. V., AL Schoneman, The removal of sulfate and metals from mine waters using bacterial sulfate reduction: pilot plant results. *Mine Water Environ* **1998**, *17*, (1), 8-27.
14. Lens, P.; Vallerol, M.; Esposito, G.; Zandvoort, M., Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **2002**, *1*, (4), 311-325.
15. Luo, Q.; Tsukamoto, T.; Zamzow, K.; Miller, G., Arsenic, Selenium, and Sulfate Removal using an Ethanol-Enhanced Sulfate-Reducing Bioreactor. *Mine Water and the Environment* **2008**, *27*, (2), 100-108.
16. S. Moosa, S. H., *Product inhibition by sulphide species on biological sulphate reduction for the treatment of acid mine drainage*. 2006; p 214-222.
17. Nemati, M.; Jenneman, G. E.; Voordouw, G., Mechanistic study of microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs. *Biotechnology and bioengineering* **2001**, *74*, (5), 424-34.
18. Ledin, M.; Pedersen, K., The environmental impact of mine wastes — Roles of microorganisms and their significance in treatment of mine wastes. *Earth-Science Reviews* **1996**, *41*, (1–2), 67-108.
19. N. Wakao, T. T., Y. Sakurai, H. Shiota, *Ferment Technol* **1979**, *57*, 445.
20. S. Macheimer, T. R. W., *Contam hydrol* **1992**, *9*, 115-131.
21. Gibert, O.; de Pablo, J.; Cortina, J. L.; Ayora, C., Treatment of acid mine drainage by sulphate-reducing bacteria using permeable reactive barriers: A review from laboratory to full-scale experiments. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **2002**, *1*, (4), 327-333.
22. Chapelle, F. H., *Groundwater Microbiology and Geochemistry*. John Wiley & Sons Inc: New York, 1993.
23. Canty, M., Overview of the sulfate-reducing bacteria demonstration project under the mine waste technology program. *Mining Engineering* **1999**, *51*, (6), 93.

24. M. Rowley, D. W., V. Sicotte In *Site demonstration of the biosulfide process at the former Britannia mine*, Fourth International Conference on Acid Rock Drainage, Vancouver, May 30-June 6, 1997; Vancouver, 1997; pp 1531-48.
25. C.J.N. Buisman, S. H. J. V., G.H.R. Janssen, H. Dijkman, Biological sulfide production for metalrecovery. In *Fundamentals of lead and zinc extraction and recycling*, Balk, Netherlands, 1999.
26. Boonstra, J.; van Lier, R.; Janssen, G.; Dijkman, H.; Buisman, C. J. N., Biological treatment of acid mine drainage. In *Process Metallurgy*, Amils, R.; Ballester, A., Eds. Elsevier: 1999; Vol. Volume 9, pp 559-567.
27. H. Dijkman, C. J. N. B., Biotechnology in the mining and metallurgical industries: cost savings through selective precipitation of metal sulfides. *Environmental expert*.
28. Fleweger, M. E., *Es un monstruo grande y pisa fuerte: La minería en el Ecuador y el mundo*. Quito-Ecuador, 1998.
29. Ochoa-Herrera, V.; Banihani, Q.; León, G.; Khatri, C.; Field, J. A.; Sierra-Alvarez, R., Toxicity of fluoride to microorganisms in biological wastewater treatment systems. *Water Research* **2009**, *43*, (13), 3177-3186.
30. Trüper, H. G.; Schlegel, H. G., Sulphur metabolism in Thiorhodaceae I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii*. *Antonie van Leeuwenhoek* **1964**, *30*, (1), 225-238.
31. Cline J, D., Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **1969**, *14*, 454-458.
32. 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. Universidad San Francisco de Quito, Quito-Ecuador, 2010.
33. Walter, W. G., STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (11th ed.). *American Journal of Public Health and the Nations Health* **1961**, *51*, (6), 940-940.

34. Lastra, L. F. G. Evaluación del Funcionamiento de un Sistema Biológico-físico-químico (BFQ) para el tratamiento de los Drenajes Ácidos de Mina a Escala Laboratorio. Pregrado, Universidad San Francisco de Quito, Quito-Ecuador, 2011.
35. Pruden, M., Pereyra, Hanso, Hiibel, and Reardon, The effect of inoculum on the performance of sulfate-reducing columns treating heavy metal contaminated water. *Water Research* **2007**, *41*, 904-914.
36. Christensen, B.; Laake, M.; Lien, T., Treatment of acid mine water by sulfate-reducing bacteria; results from a bench scale experiment. *Water Research* **1996**, *30*, (7), 1617-1624.
37. Krekeler, D.; Teske, A.; Cypionka, H., Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat. *FEMS Microbiology Ecology* **1998**, *25*, (2), 89-96.
38. Edwards, J.; Barton, C.; Karathanasis, A., A Small-Scale Sulfate-Reducing Bioreactor for Manganese Removal from a Synthetic Mine Drainage. *Water, Air, & Soil Pollution* **2009**, *203*, (1), 267-275.
39. Cappenberg, T. E., A study of mixed continuous cultures of sulfate-reducing and methane-producing bacteria. *Microbial Ecology* **1975**, *2*, (1), 60-72.
40. Middleton, A. C.; Lawrence, A. W., Kinetics of Microbial Sulfate Reduction. *Journal (Water Pollution Control Federation)* **1977**, *49*, (7), 1659-1670.
41. Sulaiman Al-Zuhair, M. H. E.-N., Huda Al-Hassani, Sulfate inhibition effect on sulfate reducing bacteria. *Biochemical Technology* **2008**, *1*, (2), 39-44.
42. Lens, P.; Massone, A.; Rozzi, A.; Verstraete, W., Effect of sulfate concentration and scraping on aerobic fixed biofilm reactors. *Water Research* **1995**, *29*, (3), 857-870.
43. Moosa, S.; Nemati, M.; T. L. Harrison, S., A kinetic study on anaerobic reduction of sulphate, Part I: Effect of sulphate concentration. *Chemical Engineering Science* **2002**, *57*, (14), 2773-2780.

44. O.O. Oyekola, R. v. H., STL Harrinson, Kinetic analysis of biological sulphate reduction using lactate as carbon source and electron donor: effect of sulphate concentration. *Chemistry Engineering Science* **2010**, *65*, 4771-2781.
45. Michael T. Madigan, J. M. M., Jack Parker, *Biología de los microorganismos*. 10 ed.; Prentice Hall: Madrid, 2003; p 1011.
46. Rinzema, A.; Lettinga, G., Anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. In *Biotreatment systems*, D.L. Wise (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, vol. 3 (1988) 65-110., 1988.
47. Widdel, F., Microbiology and ecology of sulfate-and sulfur-reducing bacteria. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. **1988**, 469-585.
48. B.L. Hilton, J. A. O., Sulfide-Induced Inhibition of Anaerobic Digestion. *Environmental Enginnering* **1988**, *116*, (6), 1377.
49. D. Prasad, G. H., S. Haik In *Role of Sulfate Reducing Bacteria in Anaerobic Treatment of Landfill Leachate*, CSCE annual conference 10th Canadian Hydrotechnical Conference, Vancouver, 1991; Vancouver, 1991.
50. E. Choi, J. M. R., Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment. *Water Science Technology* **1991**, *23*, 1259.
51. F.E. Mosey, e. a., Factors affecting the availability of heavy metals to inhibit anaerobic digestion. *Institute Water pollution control* **1971**, *71*, 2.
52. A.W. Lawrence, e. a., The effects of sulfides on anaerobic treatment. *Air and water pollution* **1966**, *10*, 207.
53. J.F. Tursman, D. J. C., Influence of Sulfate and Sulfate reducing Bacteria on Anaerobic Digestion Technology. *Biological Waste Treatment* **1989**, 273.
54. E.E. Conn, P. K. S., G. Bruening, R.H. Doi, *Outlines of Biochemistry*. John Wiley and Sons: New York, 1987.

55. Stouthamer, A. H., *Bioenergetics and Yields with Electron Acceptors other than Oxygen*. Marcel Dekker: New York, 1988.
56. Harris, D. C., *Quantitative Chemical Analysis*. 6th ed.; W.A. Freeman and Company: New York, 2002.
57. Khan, A. W.; Trotter, T. M., Effect of sulfur-containing compounds on anaerobic degradation of cellulose to methane by mixed cultures obtained from sewage sludge. *Journal Name: Appl. Environ. Microbiol.; (United States); Journal Volume: 35:6 1978*, Medium: X; Size: Pages: 1027-1034.
58. Lawrence, A. W.; McCarty, P. L., The Role of Sulfide in Preventing Heavy Metal Toxicity in Anaerobic Treatment. *Journal (Water Pollution Control Federation) 1965, 37, (3), 392-406*.
59. Parkin, G. F.; Speece, R. E.; Yang, C. H. J.; Kocher, W. M., Response of methane fermentation systems to industrial toxicants. *Journal Name: J. - Water Pollut. Control Fed.; (United States); Journal Volume: 55:1 1983*, Medium: X; Size: Pages: 44-53.
60. Willem Rudolfs, H. A., White water Treatment: II. Effect of Sulfides on Digestion. *Sewage and Industrial Wastes 1952, 24, (10), 1278-1287*.
61. D.B. Aulenbach, H. H., Transformation and effects of reduced sulfur compounds in Sludge Digestion. *Sewage and Industrial Wastes 1955, 27, 1147*.
62. Mountfort, D. O.; Asher, R. A., Effect of inorganic sulfide on the growth and metabolism of *Methanosarcina barkeri* strain DM. *Journal Name: Appl. Environ. Microbiol.; (United States); Journal Volume: 37:4 1979*, Medium: X; Size: Pages: 670-675.
63. Karhadkar, P. P.; Audic, J.-M.; Faup, G. M.; Khanna, P., Sulfide and sulfate inhibition of methanogenesis. *Water Research 1987, 21, (9), 1061-1066*.
64. Metcalf, E., *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. 4th ed.; Tata McGraw-Hill.
65. McCarty, P. L.; Rittman, B. E.; Reinhard, M., Processes affecting the movement and fate of trace organics in the subsurface environment. *Environmental Science and Technology 1981*.

66. Benner, S. G.; Blowes, D. W.; Ptacek, C. J., A full-scale porous reactive wall for prevention of acid mine drainage. *Journal Name: Ground Water Monitoring and Remediation; Journal Volume: 17; Journal Issue: 4; Other Information: PBD: Fal 1997* **1997**, Medium: X; Size: pp. 99-107.
67. Benner, S. G.; Blowes, D. W.; Herbert, R. B. J.; Ptacek, C. J.; Gould, W. D., Geochemistry of a permeable reactive barrier for metals and acid mine drainage. *Journal Name: Environmental Science and Technology; Journal Volume: 33; Journal Issue: 16; Other Information: PBD: 15 Aug 1999* **1999**, Medium: X; Size: pp. 2793-2799.
68. Benner, S. G.; Blowes, D. W.; Ptacek, C. J.; Mayer, K. U., Rates of sulfate reduction and metal sulfide precipitation in a permeable reactive barrier. *Applied Geochemistry* **2002**, 17, (3), 301-320.
69. K.R. Waybrant, D. W. B., C.J. Ptacek, Selection of reactive mixtures for use in permeable reactive walls for treatment of mine drainage. *Environmental Science and Technology* **1998**, 32, (13), 1972-1979.
70. Champagne, P.; Geel, P.; Parker, W., A Bench-scale Assessment of a Combined Passive System to Reduce Concentrations of Metals and Sulphate in Acid Mine Drainage. *Mine Water and the Environment* **2005**, 24, (3), 124-133.
71. P. E. McIntire, H. M. E. In *The use of bacterial sulfate reduction in the treatment of drainage from coal mines*, Mining and reclamation, West Virginia University, 1990; West Virginia University, 1990.
72. Texto Unificado de Legislación Secundaria. In Ecuador, 2006.
73. Foucher, S.; Battaglia-Brunet, F.; Ignatiadis, I.; Morin, D., Treatment by sulfate-reducing bacteria of Chessy acid-mine drainage and metals recovery. *Chemical Engineering Science* **2001**, 56, (4), 1639-1645.
74. P. Eger, J. W. In *Sulfate reduction for the treatment of acid mine drainage: Long term solution or short term fix*(Mining and the Environment, Ottawa, 1995; T.P. Hynes, M. C. B., Ed. Ottawa, 1995; pp 515-524.

75. Dvorak, D. H.; Hedin, R. S.; Edenborn, H. M.; McIntire, P. E., Treatment of metal-contaminated water using bacterial sulfate reduction: results from pilot-scale reactors. *Biotechnology and bioengineering* **1992**, *40*, (5), 609-16.