

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUÍMICAS “LUIS ENRIQUE
TERRAZAS SILES”



**PROCESOS DE BIOPRECIPITACIÓN DE METALES
PESADOS Y BIOREDUCCIÓN DE HIERRO (III)
PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS ÁCIDAS DE
MINAS A ESCALA LABORATORIO**

(Tesis presentada para obtener el grado de *Magister Scientiarum* en Ciencias
Biológicas y Biomédicas, Mención Biotecnología)

Elaborado por: Lic. Roxana Quiroga Flores

LA PAZ- BOLIVIA

2015

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUIMICAS “LUIS ENRIQUE
TERRAZAS SILES”



**PROCESOS DE BIOPRECIPITACIÓN DE METALES
PESADOS Y BIOREDUCCIÓN DE HIERRO (III)
PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS ÁCIDAS DE
MINAS A ESCALA LABORATORIO**

(Tesis presentada para obtener el grado de *Magister Scientiarum* en Ciencias
Biológicas y Biomédicas, Mención Biotecnología)

Elaborado por: Lic. Roxana Quiroga Flores

Tutora: María Teresa Álvarez Aliaga PhD.

LA PAZ- BOLIVIA

2015

Dedicatoria:

A mis padres: Alfredo y Eva,

porque gracias a ellos soy todo lo que soy.

A mis hermanos: Alfredo y Luis Enrique,

por estar ahí para mí siempre.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios, por haberme dado fuerza, fortaleza, perseverancia, paz mental, paciencia y voluntad, elementos claves que me permitieron continuar y terminar. Este trabajo, más allá de un logro académico, se ha llevado un pedazo de mi vida por los obstáculos que se presentaron en el camino en todo aspecto, es por eso que siempre lo recordaré con mucho cariño.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Área de Biotecnología Microbiana. Un especial agradecimiento al Dr. Enrique Terrazas (†), quien me abrió las puertas del instituto y que gracias a ello, estoy viviendo experiencias no contempladas antes.

Un especial agradecimiento a mi tutora, Dra. María Teresa Álvarez, por entender mi pasión por la investigación y nunca ponerme frenos en mis inquietudes ni límites en el trabajo y poder aprender cada vez más y más. Gracias por haberme enseñado a tener mi independencia.

A la Empresa Minera Sinchi Wayra S.A. con un especial agradecimiento al Ing. Álvaro Portanda y al Ing. Grover Ignacio, por su colaboración con el proyecto que

iniciamos y que avanzamos juntos. Fue un placer trabajar para ustedes y espero volverlo a hacer en un futuro no lejano.

A mis amigos y amigas, cercanos o lejanos, que indirectamente o directamente me apoyaron para poder terminar este trabajo. Un especial agradecimiento a la Lic. Zenyy Arguedas Capcha, mi colega en ese entonces del laboratorio, que me ayudó con las lecturas de muestras el HPLC, gracias por su apoyo y sus pensamientos positivos, espero siempre tenerla en contacto por el resto de mi vida. También agradezco a la Ing. Nadya Alave Padilla, quien fue un hombro para mí en situaciones de alegría y frustración. Gracias por su amistad y su apoyo!

Finalmente, agradezco a mi familia. A mis padres y hermanos, que en la distancia me dan su apoyo incondicional todos los días. A mis padres, por permitirme seguir estudiando y querer que me supere cada vez más, no existen palabras para poder expresar mi agradecimiento hacia ustedes, junto a mis hermanos, son mi motor y mi pilar para seguir adelante. Agradezco a mis hermanos por su comprensión, apoyo, y por sus deseos positivos, también por ser mis personas que gozan de mi completa confianza. Por último, a mis queridas mascotas: a mis gatos, Pelusa y Leono, y mi perro Max, los seres que cambian mi estado de ánimo para bien y siempre me alegran el día, gracias por la pureza de sus seres y el cariño hacia mí. Lamento la trágica pérdida de dos ellos durante el transcurso de esta tesis.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

1. Introducción	4
2. Antecedentes	6
3. Objetivos	8
3.1 Objetivo General	8
3.2 Objetivos Específicos	8

4. Justificación	8
5. MARCO TEÓRICO	3
5.1 Drenaje Acido de Mina	3
5.1.1 Formación del Drenaje Acido de mina	12
5.2 Situación actual de la contaminación por metales pesados en Bolivia	15
5.3 Métodos de remediación de aguas contaminadas por metales pesados	22
5.3.1 Precipitación química.....	23
5.3.2 Intercambio Iónico	24
5.3.3 Adsorción.....	25
5.3.4 Filtración con membranas	27
5.3.5 Coagulación y floculación	29
5.3.6 Flotación	29
5.3.7 Tratamiento electroquímico	30
5.4 Bacterias sulfato reductoras (BSR)	33
5.4.1 Definición.....	33
5.4.2 Filogenia	33
5.4.3 Diversidad de BSR	34
5.4.4 Biotecnología de las BSR	40
5.5 Bacterias hierro reductoras (BHR)	42
5.5.1 Diversidad Filogenética	42
5.5.2 BHR en la biorremediación	43
6. MATERIAL Y MÉTODOS	45
6.1 Material Biológico, enriquecimiento y selección	46

6.1.1	Reactivación de consorcios de bacterias sulfato reductoras	46
6.1.2	Muestras de suelo y líquidas	46
6.1.3	Aislamiento de bacterias sulfato reductoras y hierro reductoras	47
6.1.4	Preparación de fuente de carbono para las BSR y BHR	48
6.1.5	Diseño Factorial para optimizar las proporciones de materia orgánica en cultivos de BSR	49
6.2	Diseño experimental para el tratamiento de aguas ácidas	51
6.2.1	Tratamiento de aguas de Dique de colas	51
6.2.2	Tratamiento de Drenaje Ácido de Mina (DAM)	53
6.3	Determinaciones Analíticas	56
6.3.1	Determinación del Potencial de Hidrogeniones, Salinidad, Conductividad y sólidos totales disueltos (STD)	56
6.3.2	Determinación de Demanda Química de Oxígeno (DQO)	56
6.3.3	Determinación de Sulfato	56
6.3.4	Determinación de Sulfuro de hidrógeno	57
6.3.5	Determinación de Hierro (III)/(II)	57
6.3.6	Determinación de Hierro, Zinc, Cadmio y Cobre total.....	57
6.4	Detección de la biodiversidad de BSR mediante Hibridación fluorescente <i>in situ</i>	58
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
7.1	Características de aguas de mina	61
7.2	Aislamiento de consorcios de BSR	63
7.3	Tratamiento de agua de Dique y selección del modo de operación de reactores.....	64

7.3.1	Sistema R2 y R3 para el tratamiento de agua de Dique en modo continuo.....	66
7.3.2	Sistema R1 para el tratamiento de agua de Dique en modo batch.....	68
7.4	Caracterización de la materia orgánica a emplear	73
7.5	Diseño factorial para la optimización de la fuente de carbono para BSR.....	75
7.6	Tratamiento de DAM	82
7.6.1	Tratamiento DAM recambio 70 % de volumen efectivo y tiempo de retención de 12 horas	82
7.6.2	Tratamiento DAM recambio 30 % de volumen efectivo y tiempo de retención de 12 horas	91
7.6.3	Tratamiento secuencial de DAM: precipitación química acoplada a precipitación biológica.....	95
7.8	Detección de géneros y especies de consorcios de BSR	104
8.	CONCLUSIONES	106
9.	RECOMENDACIONES	108
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXOS		

Índice de Tablas

Tabla 1.	Parámetros en agua de Minas de Bolivia	21
Tabla 2.	Casos estudios de remediación de drenajes ácidos de mina empleando BSR.....	41

Tabla 3. Características de muestras de lodo tomadas en Huanuni	46
Tabla 4. Diseño factorial 3 ³ para la optimización de la relación DQO:sulfato.....	50
Tabla 5. Características de las sondas de FISH empleadas	61
Tabla 6. Características de las aguas ácidas a tratar.....	61
Tabla 7. Características de los parámetros evaluados del sistema continuo para el tratamiento de agua de Dique de colas.....	65
Tabla 8. Remoción de sulfato y producción de H ₂ S del agua de Dique de colas en el sistema R2 y R3	67
Tabla 9. Parámetros monitoreados en Sistema R1 para el tratamiento de agua de Dique de colas.....	69
Tabla 10. Eficiencia en la remoción de metales pesados de los sistemas R1, R2 y R3 para el tratamiento de agua de Dique.....	70
Tabla 11. Demanda Química de oxígeno de las fuentes de carbono a ser empleadas.....	73
Tabla 12. Contenido de AGVs en mix de frutas	74
Tabla 13. Diseño factorial de 3 fuentes de carbono, producción de sulfuro y tasa de remoción reducción de sulfato.....	76
Tabla 14. Resultados 1ra prueba de tratamiento de DAM con 70% volumen de recambio cada 12 horas	85
Tabla 15. Resultados 2da prueba de tratamiento de DAM con 30% volumen de recambio cada 24 horas	93
Tabla 16. Resultados 3ra prueba de tratamiento de DAM: combinación tratamiento químico + biológico.....	97
Tabla 17. Demanda Química de oxígeno en diferentes puntos del reactor.....	103
Tabla 18. Géneros de BSR detectados por FISH.....	104

Índice de figuras

Figura 1. Tipos de Drenajes producidos por oxidación de sulfuros	3
Figura 2. Modelo de oxidación de la pirita	12
Figura 3. Diagrama de la lixiviación directa e indirecta	15
Figura 4. Proceso de remoción de metales mediante intercambio iónico	25
Figura 5. Clasificación de Tecnologías de remediación de metales pesados	32
Figura 6. Árbol filogenético basado en secuencias del ARN ribosomal 16S de especies de especies de bacterias sulfato reductoras.	34
Figura 7. Patrón secuencia de la degradación microbiana de materia orgánica compleja	37
Figura 8. Pasos de la reducción de sulfato por desasimilación y la conservación de la energía quimiosmótica con H ₂ como el donador de electrones.....	39
Figura 9. Esquema General de la Fase Experimental.....	46
Figura 10. Dimensiones de reactor R1	51
Figura 11. Dimensiones reactor R2 y R3	52
Figura 12. Esquema de Sistema de Tratamiento de reactores para el agua de Dique.....	52
Figura 13. Descripción del sistema de tratamiento de DAM.....	54
Figura 14. Descripción del tratamiento secuencial de DAM por BSR y BHR.	55
Figura 15. Ionización de sulfuro en función al pH.....	67
Figura 16. Relación de bacterias acetógenas y sulfato reductoras	81
Figura 17. Vista plano superior del reactor R-BSR. Ubicación de la materia orgánica sólida en reactor	83
Figura 18. Diagrama Eh-pH (potencial redox – pH) de hierro en la presencia de azufre disuelto	88
Figura 19. Especiación de Fe(III) en función al pH.....	88
Figura 20. Puntos de muestreo para evaluar la difusión de materia orgánica disuelta.....	103

Índice de gráficas

Gráfica 1. Disminución de Sulfatos y generación de sulfuros en Sistemas R2 y R3 para el tratamiento de agua de Dique de colas	68
Gráfica 2. Parámetros monitoreados en Sistema R1 para el tratamiento de agua de Dique de colas.....	69
Gráfica 3. Cambios de pH en el agua de Dique tratada	71
Gráfica 4. Análisis estadístico del tratamiento de agua de Dique por los sistemas R1, R2 y R3.....	72
Gráfica 5. Superficie de respuesta para la producción de sulfuro de hidrogeno del diseño factorial	78
Gráfica 6. Tratamiento de DAM con 70% de recambio de volumen de reactor cada 12 horas	86
Gráfica 7. Tratamiento de DAM con 30% de recambio de volumen reactor cada 24 horas	94
Gráfica 8. Resultados 3ra prueba de tratamiento de DAM: combinación tratamiento químico + biológico (recambio 30% volumen c/24 horas)	99
Gráfica 9. Demanda Química de oxígeno en diferentes puntos del reactor	104

Abreviaturas

BSR: Bacteria Sulfato reductoras

BHR: Bacterias Hierro reductoras

FISH: Hibridación Fluorescente in situ

DAM: Drenaje ácido de mina.

COMIBOL: Corporación Minera de Bolivia.

ATP: Adenosin trifosfato

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NADH: Nicotinaminda adenina dinucleótido reducido

CA: Carbón activado

NTC: Nanotubos de carbono

UF: Ultrafiltración

OI: Osmosis inversa

NF: Nanofiltración

ED: Electrodialisis

EC: Electrocoagulación

EF: Electroflotación

ED: Electrodeposición

ARN: Ácido ribonucleico

DQO: Demanda Química de oxígeno

AAS: Espectrofotometría de absorción a la llama

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión

PBS: Tampón fosfato salino

TRH: Tiempo de retención hidráulica

BMs: Bacterias metanogénicas

ANOVA: Análisis de Varianza

MANOVA: análisis de varianza múltiple

BAs: Bacterias acetogénicas

BHs: Bacterias hidrolíticas

AGVs: Ácidos grasos volátiles

APHs: Acetógenos productores de hidrógeno

HFO: Óxidos de hierro hidratados

SEM: Microscopia electrónica de Barrido

XRD: Difracción por rayos X

EDX: Espectroscopia de dispersión de energía de rayos X

PROCESOS DE BIOPRECIPITACIÓN DE METALES PESADOS Y BIOREDUCCIÓN DE HIERRO (III) PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS ÁCIDAS DE MINAS A ESCALA LABORATORIO

RESUMEN

En el presente trabajo, se estableció procesos de bioprecipitación y bio-reducción para el tratamiento de aguas ácidas de mina. El primero hace referencia a la precipitación de metales con sulfuro biogénico producido por bacterias sulfato reductoras, las cuales fueron aisladas de una zona con contaminación crónica de drenajes mineros. El segundo, consistió en la reducción biológica de Fe^{3+} a Fe^{2+} , para que de esta manera, éste metal pueda ser precipitado por el sulfuro producido y así, alcanzar a mayores porcentajes de remoción. El enfoque de tratamiento fue a escala laboratorio y se trató dos tipos de aguas ácidas con distintas concentraciones de metales y sulfatos (agua ácida de Dique de colas y drenaje ácido de mina, DAM) en condiciones cercanas a la realidad y teniendo como modelo a las operaciones mineras: Bolívar, Colquiri y Huanuni (minas Bolivianas). La optimización del tratamiento consideró los siguientes factores: por una parte, elección del modo de operación adecuado de los reactores, que resultó ser batch con tiempo de retención de 24 horas (éste se determinó experimentando con el tratamiento de agua de Dique); también la carga orgánica a emplear, donde se tuvo como resultado el empleo de dos sustratos celulósicos: papel bond en desuso y cascarilla de arroz. Una vez optimizado estos dos puntos se procedió a tratar el DAM, donde la relación DQO (demanda química de oxígeno) se ajustó a la concentración de sulfato, que contenía aproximadamente 16 g/L. Las concentraciones de hierro (Fe) y zinc (Zn) en el DAM fueron alrededor de 2900 mg/L y 6000 mg/L, respectivamente. Y para su tratamiento, se experimentó con el DAM en 3 circunstancias diferentes: 70% de recambio de volumen efectivo de reactor con 12 horas de tiempo de retención, 30% de recambio de volumen efectivo con 24 horas de tiempo de retención y, por último, la conexión de un pre-tratamiento químico seguido del tratamiento biológico (solamente con bacterias sulfato reductoras) para evaluar ventajas y desventajas de ambos. El segundo y tercer tratamiento tuvieron similar eficiencia (con excepción de la remoción de Zn y sulfatos), y la elección de uno sobre el otro recaerá en los costos de escalamiento y aplicación. Los resultados muestran que en éstos últimos dos

tratamientos, se alcanzó a remover hasta 70% de sulfatos (con desventaja en el segundo caso que generó más sulfato en el reactor de hierro reducción), entre ~60-80% de Fe y Zn y, 95-100 % de remoción de cadmio (Cd) y cobre (Cu). Cabe resaltar que la eficiencia fue disminuyendo al transcurrir el tiempo por razones mayormente atribuibles al diseño del reactor, ubicación de la materia orgánica. Finalmente, se detectaron géneros sulfato reductores mediante la técnica molecular de hibridación fluorescente *in situ* (FISH), donde existió predominancia de *Desulfovibrio spp.*, *Desulfobotulus sapovorans* y *Desulfovibrio fairfieldensis*. Seguidos de: *Desulfobacter spp.*, *Desulfobulbus spp.*, *Desulfosarcina sp.*, *Desulfonema spp.*, *Desulfococcus sp.*, *Desulfobacterium spp.*, *Desulfobotulus sp.*, *Desulfostipes sp.*, *Desulfomusa sp.* y, *Desulfofrigus* y *Desulfofaba spp.*

Palabras clave: Bacterias sulfato reductoras (BSR), bacterias hierro reductoras (BHR), bioprecipitación, bioreducción, demanda química de oxígeno, remoción, sulfatos, hierro, zinc, hibridación fluorescente in situ (FISH)

ABSTRACT

The present study established bioprecipitation and bioreduction processes. The former refers to the precipitation of metals with hydrogen sulfide produced by sulfate reducing bacteria which were isolated from a contaminated area with constant mining activity. The latter consisted in the biological reduction of ferric iron to ferrous iron; therefore iron can be precipitated by the hydrogen sulfide produced earlier. In that sense more iron removal can be achieved being one of the drawbacks of the precipitation with sulfides. The treatment system was conducted at bench scale treating two kinds of acid waters (water of Dike and drainage acid of mine, DAM) with conditions that tried to mimic mining operations such as: Bolivar, Colquiri and Huanuni (Bolivian mines). The treatment was optimized considering different factors: testing two operational modes where the chosen mode was batch with hydraulic retention time of 24 hours (determined when treating the water of Dike); on the other hand, it was evaluated different types of organic matter and its quantity, where the selected one was comprised of cellulosic materials. Furthermore and with these two optimized factors, the DAM was treated and the chemical oxygen demand (COD) was adjusted to sulfate concentration that was approximately 16 g/L in DAM. The concentration of iron (Fe) and zinc (Zn) was 2900

mg/L and 6000 mg/L, respectively. Then, DAM was treated under three kind of circumstances: 70 % of effective volume exchanged and retention time of 12 hours, 30 % of effective volume exchanged and retention time of 24 hours, and a sequential connection between a chemical pre-treatment (precipitation with lime) followed by the biological treatment with only sulfate reducing bacteria (SRB). The 2nd and the 3rd were the best showing ~70 % of sulfate removed (except in the 2nd case where sulfate was generated in the iron reduction reactor), between 60-80 % of iron and zinc removal, and 95-100 % of cadmium and copper removal. It is noteworthy to state that the treatment efficiency decreased along the time due to design drawbacks of the reactor i.e., design and location of organic matter. Finally, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was conducted in order to detect sulfate reducing bacteria populations and the ones detected were the following genera: *Desulfovibrio spp.*, *Desulfobotulus sapovorans* y *Desulfovibrio fairfieldensis*. Followed by: *Desulfobacter spp.*, *Desulfobulbus spp.*, *Desulfosarcina sp.*, *Desulfonema spp.*, *Desulfococcus sp.*, *Desulfobacterium spp.*, *Desulfobotulus sp.*, *Desulfostipes sp.*, *Desulfomusa sp.* y, *Desulfofrigus spp.* y *Desulfofaba spp.*

Key words: Sulfate reducing bacteria (SRB), iron reducing bacteria (IRB), bioprecipitation, bioreduction, chemical oxygen demand (COD), removal, sulfates, iron, zinc and fluorescent in situ hybridization (FISH).

1. Introducción

Bolivia es un país el cual tiene como pilar de su economía la extracción y exportación de recursos naturales. La extracción de minerales y el petróleo ha sido considerada históricamente como estratégica y, en las actuales circunstancias, este criterio aún se mantiene. El programa productivo del gobierno, reflejado en el Plan Nacional de Desarrollo, prioriza y destaca a los sectores de los Hidrocarburos, Minería, Energía y Medio Ambiente como los pilares para el desarrollo productivo nacional, y plantea que los objetivos sectoriales deben compatibilizarse con los enfoques del desarrollo nacional sustentable (López, Cuenca, Lafuente, Madrid, & Molina, 2010). Sin embargo, paralelamente la actividad minera y metalúrgica causa considerables cambios en el medio ambiente: degradación de la tierra, deforestación y, contaminación de aguas y aire. La magnitud de la degradación ambiental depende de la tecnología usada y de las prácticas de gestión ambiental. Hay tecnologías que son más degradadoras que otras. De manera más general, la actividad minera al ocuparse de extraer materiales depositados por la naturaleza durante millones de años, que se encuentran bajo sistemas de equilibrio ecológico, rompe este equilibrio desencadenando una serie de efectos que dañan el medio ambiente, en diversos grados (Evia & Morales, 1995).

La minería boliviana ha causado, y sigue causando, un gran impacto negativo en el medio ambiente natural y humano. Sin embargo, los datos acerca de los impactos específicos son escasos y no organizados sistemáticamente. Los impactos más importantes en Bolivia son: (a) Consumo de recursos escasos y agotables: uso de la tierra, remoción de minerales y uso del agua (de superficie, subterránea o fósil), (b) Transformación del paisaje: apertura de tajos abiertos, dragado, diques de colas, disposición de desmontes y acumulación de los residuos de lixiviación en pilas, (c) Contaminación de las aguas de superficie, subterráneas y de suelos con: agua de mina, agua de procesamiento, colas en suspensión en el agua de proceso y lixiviado de antiguos diques de colas u otras fuentes (d) Acumulación de residuos sólidos: rocas residuales de mina, colas de las operaciones de concentración de minerales, (e) Emisiones de polvo, que contiene metales pesados que pueden contaminar el agua y

los suelos, y (f) Descuidada salud ocupacional y seguridad (especialmente en la minería informal o a pequeña escala) (Bocángel Jerez, 2007).

Por tanto, la aplicación de métodos de remediación de la contaminación de metales pesados es una necesidad para nuestro país. Las tecnologías para tratar metales pesados son varias, entre ellas se puede mencionar: precipitación química, intercambio iónico, adsorción, filtración por membrana, coagulación y floculación (como ser: Magnafloc, Superfloc A, Hyperfloc, etc. (Ebeling, Rishel, & Sibrell, 2005; Fu & Wang, 2011; Hashim, Mukhopadhyay, Sahu, & Sengupta, 2011) y el tratamiento biológico empleando sulfuro de hidrógeno para precipitar metales y así separarlos para obtener una mejor calidad de agua (Alvarez, Pozzo, & Mattiasson, 2006; Kieu, Müller, & Horn, 2011; McCauley, O'Sullivan, Milke, Weber, & Trumm, 2009; Natarajan, Subramanian, & Braun, 2006; Steed et al., 2000).

En Bolivia, algunas empresas privadas (ejemplo: Sinchi Wayra S.A.) cuentan con plantas de tratamiento de aguas donde se emplea cal para precipitar metales y sulfatos, para así mejorar la calidad de agua (López et al., 2010). El tratamiento de aguas con cal, aunque es de fácil aplicación implica un gasto económico constante para la empresa, y el problema de la disposición de los lodos que se generan, que son mayores a los lodos generados al emplear sulfuro para precipitar metales (Hashim et al., 2011), representa un gran desventaja. Además, el tratamiento debe ir acompañado de coagulantes para mejorar el proceso de tratamiento y poder tratar todo el volumen de agua generado al día. Por lo cual, se necesita buscar la factibilidad de tratamientos alternativos que puedan disminuir los costos de aplicación y mantenimiento, y además sean amigables al medio ambiente. Una de éstas técnicas es la precipitación con sulfuro biogénico producido por bacterias sulfato reductoras (BSR), que cuenta con importantes ventajas como ser: (i) el sulfuro es producido a partir de la reducción de sulfato a H_2S , que precipita a los metales, (ii) la fuente de carbono que necesitan se puede obtener a través de desechos orgánicos y, (iii) el incremento del pH por la generación de bicarbonato a partir de la oxidación de la materia orgánica.

Esta tecnología ya ha sido ampliamente estudiada a nivel de escala laboratorio y planta piloto (Degens, 2012; Dvorak, Hedin, Edenborn, & McIntire, 1992), pero la mayoría de las pruebas a escala laboratorio enfrentan los reactores de BSR a drenajes artificiales y

en el caso de usar drenajes reales, éstos últimos tienen baja concentración en metales, adicionalmente existe la desventaja de remover bajas concentraciones de hierro, aluminio y manganeso (Degens, 2012; McCauley et al., 2009).

Por tanto, en éste trabajo se ha tomado como modelo la realidad de las minas del altiplano Boliviano: Huanuni, Bolívar y Colquiri, que cuentan con drenajes ácidos de mina (DAM), para proponer un modelo a escala laboratorio que emplee la bioprecipitación (precipitación de metales con H_2S) y la bio-reducción (reducción biológica de hierro férrico a ferroso, Fe^{3+} a Fe^{2+}) como tratamiento de sus aguas ácidas, además donde las condiciones de tratamiento se acerquen a la realidad de una Planta de tratamiento de una Operación Minera activa. Por último, se detectó a los géneros de especies presentes en las comunidades sulfato reductoras como contribución para conocer la biodiversidad microbiana en Bolivia.

2. Antecedentes

La contaminación de aguas por metales pesados, sea por fuentes de suelo natural o por actividad antropogénica es un problema de salud pública. Su tratamiento es de alta prioridad por el hecho de que todo el mundo lo emplea como agua potable. Todas las tecnologías hasta ahora descritas de tratamiento de metales, pueden clasificarse de distintas maneras y una de ellas las divide de la siguiente forma: química, bioquímica/biológica/bioadsorción y fisicoquímica. La selección de la mejor tecnología para un caso particular es desafiante debido a la alta complejidad química y las características del acuífero a tratar y no existe una regla específica para tal elección. En la pasada década, tecnologías basadas en hierro, remediación microbiológica, reducción biológica de sulfato y varios adsorbentes jugaron roles versátiles y eficientes para la remediación. Teniendo en mente los factores de sostenibilidad y ética ambiental, se recomienda las tecnologías que abarcan la química natural, biorremediación y biosorción a ser aplicadas en los casos apropiados. En muchos lugares, dos o más técnicas pueden trabajar sinérgicamente para mejores resultados. Los procesos como extracción por quelación y lavados químicos de suelos son aconsejables solo para la recuperación de metales preciosos en sitios altamente contaminados dependiendo de la factibilidad económica (Hashim et al., 2011).

Los métodos más conocidos, como ser: precipitación, absorción, intercambio iónico y formación de complejos, además de ser caros, generan grandes cantidades de lodo residual. Por eso, la inmovilización de metales pesados a través de la reducción de sulfato y precipitación de sulfuros, tiene ahora considerable interés y sobre todo si se puede aminorar los costos, al generar sulfuro biogénico a partir de la degradación de desechos. La reducción bacteriana de sulfato ha sido identificada como una manera de disminuir sulfatos potencialmente de manera rentable desde el año 1990 (Dvorak et al., 1992). Varios biorreactores sulfato reductores han sido construidos con el principio de inmovilizar biomasa bacteriana, como el *Up flow anaerobic fixed film reactor* (UAFFR) y reactores de lecho empacado. Diferentes tipos de soportes han sido empleados para fijar la biomasa de bacterias sulfato reductoras (BSR), ejemplo: cerámica, sílice, espuma de vidrio, poraver, etc.(Kieu et al., 2011)

En el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés, se lleva estudiando el proceso de bioprecipitación con sulfuro de hidrógeno desde el año 2000 con datos publicados desde el año 2005 (Alvarez et al., 2006). Seguidamente se optimizó la producción biogénica de sulfuro a partir de ácidos grasos volátiles (donador de electrones y fuente de carbono), obtenidos de la hidrólisis enzimática de vegetales y frutas en descomposición (Crespo, Alvarez, & Gimenez, 2005). También se evaluó el uso de sustratos xilanósicos y celulósicos como ser: paja de trigo, paja de avena, paja de quinua, paja brava, cascarilla de arroz y hojas secas para establecer cuál de ellas presentaba la más alta producción de sulfuro. La paja de trigo (donador de electrones) fue el sustrato de elección para el escalado del proceso (Chavez & Alvarez, 2005). En el año 2009, se evaluó el uso de papel en desuso y ácidos grasos volátiles (AGVs) como fuente de carbono, donde los cultivos en batch presentaron concentraciones de sulfuro de hidrogeno mayores a 10 mM y en cultivo continuo se obtuvo concentraciones de sulfuro de hidrógeno constantes, cercanas a 3 mM para una primera etapa que consistió en la utilización de medio Postgate C modificado. En una segunda etapa se utilizó un mix 1:1 de medio Postgate C modificado y el efluente a tratar, obteniendo una producción de sulfuro de hidrogeno

alrededor de 7 mM donde el mejor soporte resultó ser papel bond en desuso (Gutierrez Rojas, Terrazas Siles, & Álvarez Aliaga, 2009).

Finalmente, el año 2010, se aisló consorcios de bacterias hierro reductoras capaces de degradar compuestos aromáticos, fenantreno y alifáticos, hexadecano en cultivos batch, experimentación que tuvo un seguimiento de 30 días (Quiroga Flores, 2011). Es por lo que, contando ahora con consorcios sulfato y hierro reductores nació la idea de combinarlos para optimizar un tratamiento de drenajes ácidos de mina.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Establecer procesos a escala de laboratorio de bioprecipitación de metales pesados y bio-reducción de hierro (III) como modelo de tratamiento de drenajes ácidos de mina.

3.2 Objetivos Específicos

Para el 2014, en el IIFB se pretende:

- Aislar y seleccionar consorcios de bacterias sulfato reductoras y de bacterias hierro reductoras provenientes del cepario del instituto de investigaciones Fármaco Bioquímicas-UMSA y de muestras ambientales.
- Comparar y evaluar la eficiencia de remoción de metales pesados y sulfatos presentes en aguas ácidas de mina empleando bacterias sulfato reductoras y hierro reductoras, en biorreactores de lecho empacado con modos de operación batch y continuo.
- Evaluar y comparar la eficiencia del tratamiento biológico con una previa y parcial precipitación química de metales con cal muerta.
- Caracterizar poblaciones de bacterias sulfato reductoras presentes en los consorcios mediante detección por Hibridación fluorescente *in situ*.

4. Justificación

La industria minera consume aproximadamente 31.5 millones de m³ de agua por año. Esto representa alrededor del 2% de los recursos totales del agua de Altiplano donde están ubicadas la mayoría de las minas. Aunque este parezca un porcentaje modesto, implica mucha competencia debido a la escasez de agua en muchas áreas mineras. La recirculación de este elemento en las plantas de procesamiento es de solo el 10-20%, promedio. Los efluentes de las operaciones mineras causan una amplia contaminación en suelos y aguas. Estas aguas por lo general contienen elevadísimas cantidades de metales pesados y productos químicos del procesamiento, como ser xantato y cianuro. La frecuente falta de diques de colas adecuados o las deficiencias en su manejo, dan como resultado que un 30-50% de toda el agua residual contaminada, sea descargada en la naturaleza. Todas estas fuentes de contaminación implican amenazas potenciales para la flora y la fauna. También afectan directamente a la actividad humana disminuyendo la calidad del agua utilizada para consumo humano, para agricultura y recreación; además causan corrosión del acero y de las estructuras de concreto, como las tuberías. La actual producción anual de residuos sólidos proveniente de la minería se ha visto incrementada con la mecanización y/o ampliación de muchas operaciones de explotación e ingenios mineros que procesan el mineral (Bocángel Jerez, 2007).

Los yacimientos explotados tradicionalmente en Bolivia son generalmente depósitos polimetálicos, que contienen relativamente elevadas cantidades de sulfuro de hierro (pirita o pirrotina). Por la oxidación del azufre se genera aguas ácidas, las que lixivian los metales del mineral (plomo, cobre, arsénico, cadmio, plata, etc.), generando el DAM. Estas aguas, son llevadas a la superficie por bombeo o flujo natural, constituyendo los efluentes de las operaciones mineras, los que causan una amplia contaminación de suelos y aguas. Estos problemas de contaminación provienen principalmente por el uso del agua, por ejemplo en el caso de altiplano boliviano, que ocupa el 13% de la superficie del país, sólo posee el 0.5% de los recursos hídricos (Extraído de: *Secretaría Nacional de Medio Ambiente, Ministerio de Minería y Metalurgia, Sistemas Ambientales de Suecia (1993)*). El uso alternativo de estas aguas está en la irrigación de campos de cultivo y para el consumo humano, especialmente de las poblaciones cercanas (Evia & Morales, 1995).

La contaminación por metales pesados, genera desnaturalización de enzimas y disrupción de la integridad de organelos celulares. Y, a diferencia de contaminantes orgánicos, que pueden ser degradados a especies menos tóxicas, los metales pesados no pueden ser degradados. Sin embargo, pueden ser transformados de formas móviles y tóxicas a formas estables inmóviles y menos tóxicas. Es por eso, que es muy importante poder plantear alternativas para disminuir los impactos ambientales de la explotación minera y remover los metales pesados de cualquier forma de contacto con los seres vivos.

Paralelamente, en los últimos años, la biotecnología a través de la biorremediación emerge como una opción interesante para la remoción y recuperación de metales pesados contaminantes de drenajes ácidos de mina. En este tipo de tecnologías se emplea sistemas microbianos que se aíslan de ambientes donde la contaminación crónica ha seleccionado microorganismos que sirven como herramientas útiles para combatir éstos problemas ambientales.

Es por eso que, en el presente trabajo, debido a la necesidad de plantear un tratamiento barato y efectivo de drenajes ácidos de mina, se evaluó un sistema de tratamiento a escala laboratorio de éstos drenajes, aprovechando los productos del metabolismo de bacterias sulfato reductoras, como ser: el sulfuro de hidrogeno para precipitar metales pesados (bioprecipitación), y bicarbonatos para la alcalinización de aguas, este tratamiento también se verá acompañado por la reducción de hierro (bio-reducción) por bacterias anaerobias hierro reductoras, siendo el hierro divalente más susceptible a precipitar y por tanto hacer posible su remoción. Para llevar a cabo éste proceso, paralelamente se analizará y comparará cultivos batch y continuo en reactores de lecho empacado, para así poder proponer el sistema final de tratamiento.

MARCO TEÓRICO

*“The greatest enemy of knowledge is not ignorance,
it is the illusion of knowledge”*

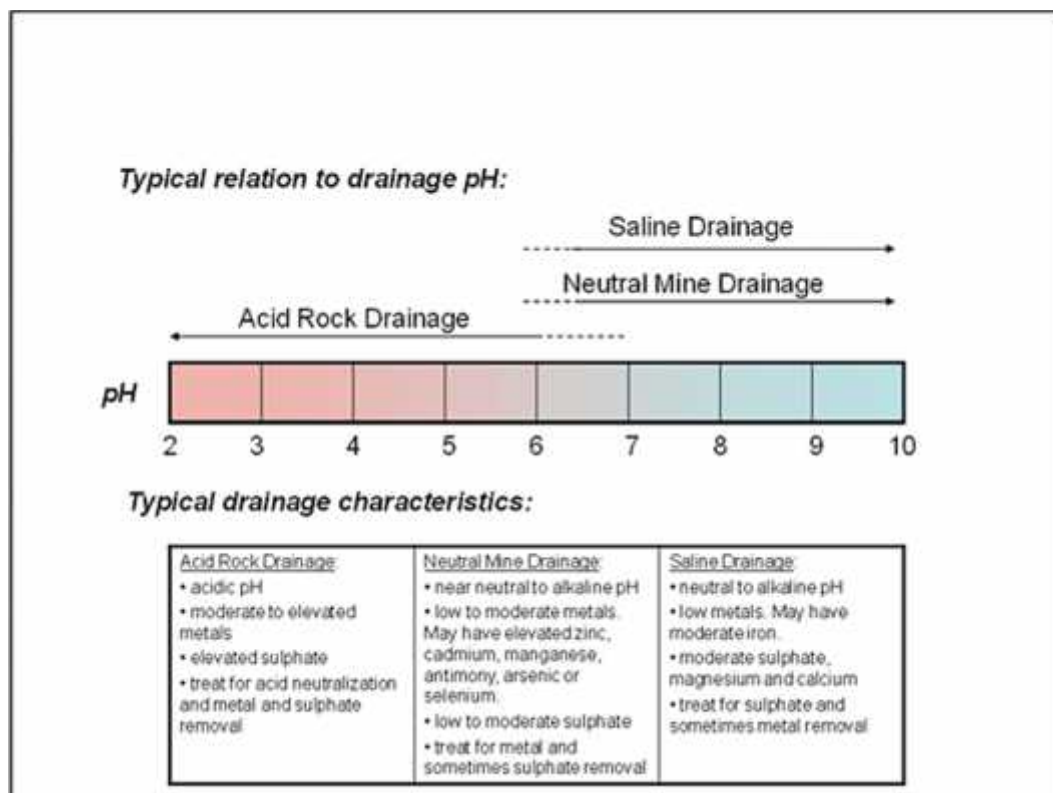
Stephen Hawking

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Drenaje Acido de Mina

El drenaje ácido de roca (DAR) o también conocido como drenaje ácido de mina (DAM) se forma por la oxidación natural de minerales sulfurosos cuando son expuestos al aire y al agua. Las actividades que involucran la excavación de rocas con minerales sulfurosos, tales como la minería de metal y carbón, aceleran el proceso. El drenaje resultante del proceso de oxidación puede ser de neutro a ácido, con o sin metales pesados disueltos, pero siempre con contenido de sulfatos. El DAM resulta de una serie de reacciones y etapas que típicamente proceden de condiciones de pH casi neutras a más ácidas. Cuando los suficientes minerales están presentes para neutralizar el DAM, se puede presentar un drenaje neutro de mina (DNM) o drenaje salino (DS) del proceso de oxidación. El DNM se caracteriza por metales con concentraciones elevadas en solución con pH casi neutro, mientras que el DS contiene altos niveles de sulfatos en pH neutro sin importantes concentraciones de metales disueltos. La Figura 1 presenta los diversos tipos de drenaje de manera esquemática.

Figura 1. Tipos de Drenajes producidos por oxidación de sulfuros



5.1.1 Formación del Drenaje Acido de mina

El proceso de oxidación de sulfuros y la formación del DAM, DMN y DS es muy complejo e involucra a una multitud de procesos químicos y biológicos que pueden variar significativamente dependiendo de las condiciones ambientales, geológicas y climáticas. Los minerales sulfurosos en los depósitos de mineral se forman bajo condiciones reductoras en la ausencia de oxígeno. Cuando se exponen al oxígeno atmosférico o a aguas oxigenadas debido a la minería, el procesamiento del mineral, excavación u otros procesos de movimiento de tierras, los minerales sulfurosos pueden volverse inestables y oxidarse. La Figura 2 presenta un modelo simplificado que describe la oxidación de la pirita, la cual es el mineral sulfuroso responsable de una gran mayoría de DAM (Mußmann, Ishii, Rabus, & Amann, 2005). Las reacciones mostradas son esquemáticas y pueden no presentar los mecanismos exactos, pero la ilustración es una útil ayuda visual para entender la oxidación sulfurosa.

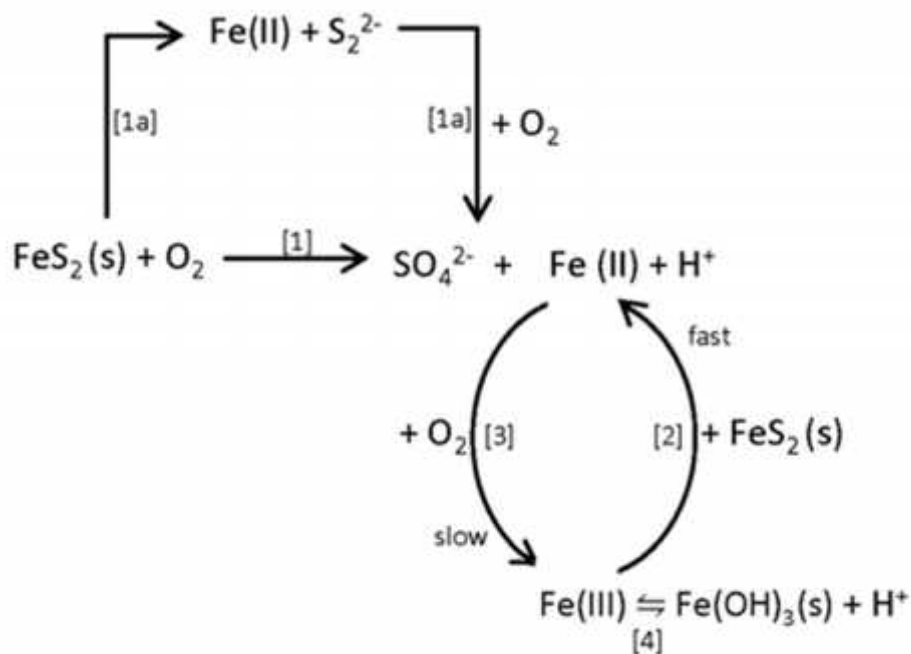


Figura 2. Modelo de oxidación de la pirita (Stumm & Morgan, 1981)

De la figura 2, la reacción química [1] que representa la oxidación de la pirita requiere tres ingredientes básicos: pirita, oxígeno y agua. Esta reacción puede ocurrir tanto abióticamente como bióticamente (mediada a través de microorganismos). En este

caso, la bacteria como el *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que deriva su energía metabólica de oxidación ferrosa a férrica, puede acelerar la velocidad de reacción por muchos órdenes de magnitud respecto a los índices abióticos. Además de la oxidación directa, la pirita puede ser disuelta y luego oxidada (reacción [1a]).

En la mayoría de las circunstancias, el oxígeno atmosférico actúa como oxidante. Sin embargo, el hierro férrico acuoso puede oxidar pirita de acuerdo a la reacción [2]. Esta reacción es considerablemente más rápida (2 a 3 órdenes de magnitud) que la reacción con oxígeno y genera substancialmente más acidez por mol de pirita oxidada. Sin embargo, esta reacción está limitada a condiciones en las que se encuentren cantidades significativas de hierro férrico disuelto. La oxidación del hierro ferroso por oxígeno (reacción [3]) se requiere para generar y reponer al hierro férrico y se requieren condiciones ácidas para que ésta permanezca en la solución y participe en el proceso de producción del DAM. Como se muestra en esta reacción, se necesita oxígeno para generar hierro férrico del hierro ferroso. También, las bacterias que pueden catalizar esta reacción demandan oxígeno para la respiración aeróbica celular. Así, se necesita de alguna cantidad nominal de oxígeno para que este proceso sea efectivo cuando se catalice por la bacteria, aunque los requerimientos de oxígeno son considerablemente menores que para la oxidación abiótica.

Un proceso de importancia ambiental relacionado con la generación del DAM, está relacionado con el destino del hierro ferroso resultante de la reacción [1]. El hierro ferroso puede ser removido de la solución en condiciones de ligeramente ácidas a alcalinas mediante oxidación, subsiguiente hidrólisis y formación de un relativamente insoluble hidróxido de hierro (reacción [4]). Cuando las reacciones [1] y [4] se combinan, como generalmente es el caso cuando las condiciones no son ácidas (ejemplo: pH > 4.5), la oxidación de la pirita produce el doble de la cantidad de acidez en comparación con la reacción [1] de la siguiente manera (Stumm & Morgan, 1981):

$$\text{FeS}_2 + 15/4\text{O}_2 + 7/2\text{H}_2\text{O} = \text{Fe}(\text{OH})_3 + 2\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}^+$$
, que es la reacción global más comúnmente utilizada para describir la oxidación de pirita.

Aunque la pirita es por mucho, el sulfuro dominante responsable de la generación de acidez, diferentes depósitos de mineral contienen diferentes tipos de minerales de

sulfuro. No todos estos minerales de sulfuro generan acidez cuando se oxidan. Como regla general, los sulfuros de hierro (pirita, marcasita, pirrotita), sulfuros con proporción molar metal/sulfuro < 1 , y sulfosales (ejemplo: enargita) generan ácido cuando reaccionan con oxígeno y agua. Los sulfuros con proporción metal/sulfuro $= 1$ (ejemplo: esfalerita, galena, calcopirita) tienden a no producir acidez cuando el oxígeno es el oxidante. Por ello, la generación potencial de ácido de un depósito de mineral o un desecho de mina, generalmente depende de la cantidad de sulfuro de hierro presente.

Las reacciones de neutralización también juegan un papel importante en la determinación de las características de composición del drenaje originado de la oxidación de sulfuros. En cuanto a minerales sulfurosos, la reactividad, y en consecuencia la eficacia con que los minerales neutralizantes puedan estabilizar cualquier ácido que esté siendo generado, puede variar mucho. La mayoría de los minerales de carbonato son capaces de disolverse rápidamente, haciéndolos efectivos consumidores de ácido. Sin embargo, la hidrólisis de Fe o Mn disueltos tras la disolución de sus respectivos carbonatos y posterior precipitación de un mineral secundario, puede generar acidez (Stumm & Morgan, 1981).

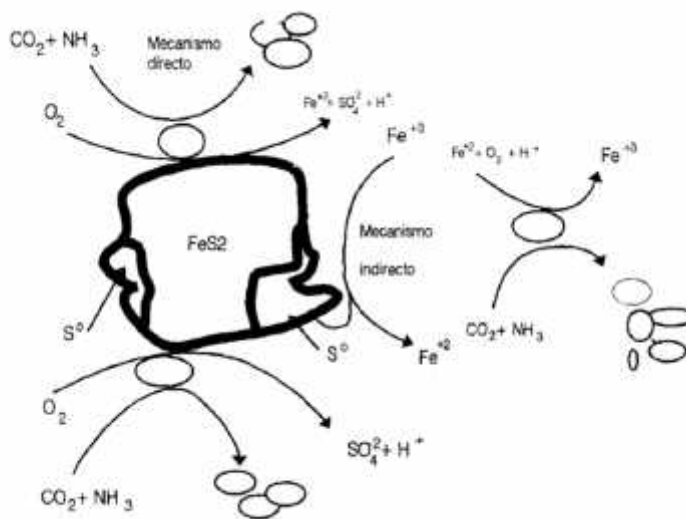
Pasando a la lixiviación biológica, se ha estudiado principalmente a la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*, bacteria quimiolitótrofa que utiliza la oxidación de Fe^{2+} y de compuestos de azufre. Como el resto de las eubacterias autótrofas, el mecanismo de fijación de carbono se realiza a través del ciclo de Calvin en una reacción catalizada por la ribulosa difosfato carboxilasa, con un gasto energético de 3 moléculas de ATP y 2 de NADPH por mol de CO_2 fijado. En las bacterias termófilas no se conoce bien este mecanismo, pero si se sabe que las arqueobacterias (todos los termófilos extremos conocidos pertenecen a este reino) no utilizan el ciclo de Calvin. También existe en los *Thiobacillus* un mecanismo para la fijación de nitrógeno (Gómez Rodríguez, 2002).

La obtención de la energía necesaria para la fijación del CO_2 y del N_2 la obtienen de la oxidación de hierro reducido o de la oxidación de compuestos de azufre reducidos. Los electrones resultantes de la oxidación son transferidos desde esta enzima a la cadena de transporte electrónico hasta llegar a una citocromo oxidasa terminal situada en la membrana citoplasmática. El aceptor final de los electrones, al tratarse de

microorganismos aerobios, es el oxígeno, que se combina con los protones para dar H_2O .

El papel de los microorganismos es catalizar la reacción de disolución del sulfuro metálico, ya sea de forma directa o indirecta, aunque actualmente se acepta que ambos mecanismos influyen de manera simultánea en la solubilización de los minerales (figura 3). Estos procesos suponen complejas interacciones entre los microorganismos, los sustratos y el medio. La lixiviación directa, se produce probablemente mediante un contacto físico entre el mineral y el microorganismo lixivante. Las bacterias tienen que fijarse a la superficie del mineral donde se produce el ataque de los sulfuros metálicos. En la lixiviación indirecta, el verdadero agente oxidante son los metabolitos procedentes de la acción bacteriana y especialmente el ion férrico que oxida a los sulfuros metálicos reduciéndose a su vez al estado de ion ferroso. Así mismo, tiene gran importancia el ácido sulfúrico creado por las bacterias y que contribuye a acidificar el medio generando las adecuadas condiciones lixiviantes (Gómez Rodríguez, 2002)

Figura 3. Diagrama de la lixiviación directa e indirecta



Óvalos representan a las bacterias. (Gómez Rodríguez, 2002)

5.2 Situación actual de la contaminación por metales pesados en Bolivia

El costo ecológico de la explotación minera en Huanuni y Bolívar, trata un tema que va cobrando un gran interés en la sociedad, sobre todo en personas que promueven

acciones de protección del medio ambiente. Se destaca la importancia del capital natural o valor de nuestros recursos naturales y el impacto que se genera a partir de los procesos antropogénicos de utilización de estos recursos. Si bien los recursos naturales son considerados como soporte para el desarrollo socioeconómico, es evidente también que los procesos de extracción y procesamiento de los mismos pueden generar impactos negativos a nivel local o global si no se toman las medidas de prevención y control, oportunas y adecuadas.

La Empresa Minera Huanuni se localiza en el mismo nombre, provincia Pantaleón Dalence, a 47 kilómetros al este de la ciudad de Oruro. La operación está dedicada a la extracción de estaño (Sn), cuyo principal yacimiento está depositado en el cerro denominado Pozokoni.

La explotación industrial del yacimiento se inició a finales del siglo XIX con varias compañías inglesas, como Penny Duncan, Harrison y otras. En la década de los 20 pasó a ser controlado por la Patiño Mines, que realizó su explotación intensiva hasta 1952, año de la revolución nacional en el que es nacionalizada y pasa a formar parte de las operaciones estatales de la Corporación Minera de Bolivia (COMIBOL). Se mantiene bajo esta administración hasta el año 1999, cuando nuevamente es transferida a la administración privada mediante la suscripción de un contrato de Riesgo Compartido (Joint Venture) entre COMIBOL y la compañía inglesa Allied Deals. Sin embargo, ésta última administración fue corta. El año 2006 en medio de un violento conflicto entre mineros asalariados de la empresa y del sector de las cooperativas por la posesión del yacimiento, la empresa retorna a la administración absoluta de la COMIBOL. Se incorporó a los mineros cooperativistas como trabajadores regulares incrementándose desde entonces su fuerza laboral de algo más de 700 a cerca de 4560 trabajadores. El repentino crecimiento de su fuerza laboral forzó a la Empresa a incrementar volúmenes de extracción, pasando de un promedio de 400 Tn/día, a cerca de 1000 Tn/día. Actualmente, se toman las previsiones para alcanzar las 1400 Tn/día y las proyecciones futuras a mediano plazo plantean alcanzar 3000 Tn/día.

El proceso de explotación del yacimiento se inicia con las labores propias de preparación y posterior explotación del rajo en interior mina. La carga mineral extraída se procesa para su concentración en dos ingenios. El primero, el de Santa Elena,

funciona desde hace aproximadamente 64 años, con una capacidad nominal de 1000 Tn/día, que ahora ha sido ampliada y modificada para incrementar su capacidad a 1200 Tn/día. El segundo ingenio es el de Machacamarca, distante a unos 15 km del distrito minero donde se procesan cerca de 200 Tn/día. Una vez procesado el mineral, se obtiene entre 500 y 850 Tn/mes de concentrados de estaño con una ley promedio de 43.8 %, el mismo que es comercializado en el Complejo Metalúrgico Vinto en la Ciudad de Oruro.

A diferencia de otras empresas mineras, en la Empresa Minera Huanuni se tiene la unidad de control social que cuenta con resolución Ministerial de 2002. Tiene como principal objetivo controlar la economía de la empresa y vigilar todo el movimiento económico. De esta manera, se hace el control de adquisición de las compras, ventas, etc. La empresa cuenta con un proyecto, dique de colas, realizado el año 2006 (que no fue implementado), con Manifiesto Ambiental, auditoría de la línea base ambiental y licencia para actividades con sustancias peligrosas aprobadas por la Autoridad Ambiental Competente el 6 de julio de 2000. Todos estos documentos fueron elaborados por la empresa Allied Deals Minera Huanuni S.A a través de la consultora Ecología y Empresa.

Otra información importante está contenida en el reporte de Auditoría Ambiental de 1994, realizado por la Corporación Minera de Bolivia a través de la consultora Swedish Geological AB, con el objetivo de realizar una evaluación de estado del medio ambiente externo. Ambientalmente, el mayor problema es la contaminación de las aguas por el vertido de las colas de los ingenios Santa Elena y Machacamarca, afectando las fuentes de agua superficiales y subterráneas, además de suelos a los largo de la microcuenca.

Por otro lado, la Empresa minera Bolívar está localizada en el municipio de Antequera, provincia Poopó, a 75 km de la ciudad de Oruro. La explotación de la mina Bolívar tiene antecedentes que datan de la colonia española y que continúan durante más de la mitad del siglo XX por operadores privados, hasta marzo de 1971. En esta fecha fue revertida por el estado a la COMIBOL. En agosto de 1993 fue transferida a la administración privada de la Compañía minera del sur (COMSUR), a través de un contrato de riesgo Compartido suscrito con la COMIBOL, vigente hasta hoy. Hubo, no

obstante, un cambio de razón social de COMSUR, el año 2006, a Sinchi Wayra S.A., subsidiaria de la compañía Glencore de Suiza.

La operación se dedica a la explotación subterránea de concentrados de zinc (Zn) y plomo (Pb) acompañados de plata (Ag), mediante el sistema de vetas, subniveles y taladros largos, culminando con la concentración por flotación diferencial. Paralelamente, se tiene el sistema convencional de corte y relleno hidráulico, utilizándose las colas de planta de concentradora. Se pueden distinguir dos momentos importantes de la operación. Un primer momento, el año 1997, fecha de su Manifiesto Ambiental, en el cual el volumen de producción declarado es de 1400 Tn/día para la obtención de 5400 toneladas de concentrado de zinc y 100 toneladas de concentrado de plomo. El segundo momento, el año 2006, fecha en la que requiere la actualización de su licencia ambiental debido al incremento de los volúmenes de producción a 2000 Tn/día. Incorpora modificaciones en el proceso de molienda, flotación, pesado y filtrado y cuentan con una planta concentradora de capacidad para tratamiento aproximado de 330 000 000 Tn/año. Igualmente, cuentan con un separador de las colas, que constituyen aproximadamente el 80% del tonelaje mencionado. El producto final no comercial es depositado en el dique de colas de la operación.

El proceso de operación consiste en que el mineral extraído de interior mina, una vez depositados en cancha mina, es transportado mediante una correa a un buzón tipo parrilla para su selección. Posteriormente, llega a la planta donde se realiza la molienda e ingresa a la etapa de flotación diferenciada de donde se obtienen los concentrados de plomo, plata y zinc. Las colas son bombeadas desde la planta de concentración hacia el depósito de colas. Cuentan con dos diques de colas: el antiguo, que actualmente tiene instaladas bombas por las que se efectúa el reciclaje de agua a la planta de tratamientos y el nuevo dique, que tiene una capacidad de 1877100 m³, en el cual se depositan todas las colas.

La licencia ambiental de la operación fue otorgada mediante Declaratoria de Adecuación Ambiental el 31 de julio de 1997. La misma fue actualizada en tres oportunidades: la primera el 2001 y dos últimas el 2006; una por cambio de razón social y la otra por incremento de producción. El último enfoque anual entregado a la Autoridad Ambiental Competente corresponde a la gestión 2007. Entre otros

documentos, cuenta con estudios de evaluación de Calidad de aire, por la consultora SGS Bolivia; Proyecto Nueva Presa de Colas Queaqueani y Manual de Operaciones Plan de Emergencia, por la consultora AMEC; Estudio Sísmico Proyecto Dique de colas Mina Bolívar, por el Observatorio San Calixto y Proyecto Planta de Tratamiento de agua, por la consultora *Sanitary Environmental Engineering Consulting* SRL.

Respecto a los conflictos ambientales: la empresa atraviesa un conflicto con los comunarios de la microcuenca Antequera por la escasez de agua en la zona y las comunidades aledañas. Las poblaciones atribuyen que el secado de vertientes y la disminución de caudales se deben a la profundización de la operación minera. Por ello, existen varios compromisos, entre ellos la dotación de agua en épocas secas y la realización de un estudio hidrogeológico independiente. Otro conflicto se suscitó en febrero de 2008 con el derrame en el río Antequera de cerca de 30 mil litros de colas de la mina Bolívar operada por Sinchi Wayra S.A. Según el informe que presentó la empresa, éste tercer incidente se produjo por fisura de las tuberías que canalizan las colas al dique (López et al., 2010).

El número de trabajadores regulares ocupados por la empresa, según sus declaraciones, alcanza cerca de 513 empleados, entre obreros y técnicos, distribuidos en tres turnos de trabajo. Sin embargo, ante la caída de precios internacionales de los minerales en el segundo semestre del 2008, se produjo el anuncio de recorte de personal, el aumento de la jornada laboral de 8 a 12 horas y reducción de salarios en un 15%.

El contrato de Riesgo compartido entre COMSUR y COMIBOL, establece la participación del 50% en las utilidades del proyecto minero Bolívar para cada socio. Así, el año 2006, por ejemplo, las utilidades netas que tocó a cada uno fueron de \$us 15520647 por la venta de concentrados de zinc-plata y plomo-plata. El valor total exportado el año 2008 fue \$us 90 665 814. El impuesto a las utilidades (incluye el impuesto Complementario Minero o ICM) fue de \$us 5 066 762, que representa 5.59% del valor exportado, cuyo importe significa ingreso para el Tesoro General de la Nación (López et al., 2010).

Los yacimientos explotados tradicionalmente en Bolivia son generalmente depósitos polimetálicos, que contienen relativamente elevadas cantidades de sulfuro de hierro (pirita o pirrotina). La pirita al descomponerse facilita la generación de aguas ácidas, las que lixivian los metales del mineral (plomo, cobre, arsénico, cadmio, plata, etc.). Estas aguas, de bajo pH, y enriquecidas con metales pesados, son llevadas a la superficie por bombeo o flujo natural, constituyendo los efluentes de las operaciones mineras, los que causan una amplia contaminación de suelos y aguas. Generalmente estas aguas son descargadas directamente a los ríos cercanos, sin ser tratadas convenientemente (Evia & Morales, 1995).

La tabla 1 muestra los resultados del análisis del agua de mina llevado a cabo por la misión sueca de 1993. Este cuadro incluye también los parámetros máximos para el contenido de algunos elementos en aguas de inferior calidad que aparece en el proyecto de reglamentación del medio ambiente, al que nos referiremos más adelante. Las aguas de mina examinadas muestran niveles de contaminación mucho más altos que los parámetros fijados en el proyecto de reglamentación de la ley del Medio Ambiente.

El agua de lluvia mediante la oxidación de sulfuros puede también formar aguas ácidas que lixivian los metales pesados en las colas y desmontes. Si las colas y desmontes se depositaran en diques adecuadamente mantenidos, estas aguas no fluirían directamente a la naturaleza. Lamentablemente, según la estimación de la misión sueca, de la producción actual de residuos sólidos (que llegaría a 5 millones de toneladas), solo la mitad es descargada en diques de adecuada construcción y manejo ambiental (Evia & Morales, 1995).

Tabla 1. Parámetros en agua de Minas de Bolivia

	Siglo XX	Bolivar	Unificada	H. Huari	Colquiri	Japo	Matilde	Reglamento Clase "D"
PH	2.8	2.9	2.3	2.9	2.6	3	7.8	6-9
Sólidos	452	210	3.529	99	729	0	172	
Suspens.	5.931	1.987	44.690	4.660	21.190	2.493	720	1.500
Sólidos disuel.	0.05	0.02	0.03	0.01	0.02	0	0	0.05
Ag	0	0.04	0.35	0.05	0	1.03	0	0.1
Ad	9	1.1	14	1.06	5.5	10.4	0.02	0.005
Ad	0.04	0	0.2	0.04	0.06	0.02	0	0.05
Cd	5.5	0.14	252	0.03	5.75	8.38	0	1
Cr	600	129	5.294	2.020	1.882	458	1.2	1
Cu	0	0	0	0	0	0.001	0	0.001
Fe	15.8	4.33	24.8	22.6	361	2.85	14.5	1
Hg	1.25	0.08	1.3	0.4	2.06	0.28	0.09	0.5
Mn	0.1	0.28	0.18	0.1	0.23	0.1	0	0.1
Ni	0.1	0.26	0.85	0	0.15	0.12	0.55	0.01
Pb	224	356	2.942	461	1.330	30	24	5
Sb	3.311	-	7.504	2.629	7.992	1.486	400	400
Zn								
SO4								

Fuente : Secretaría Nacional de Medio Ambiente, Ministerio de Minería y Metalurgia.
Sistemas Ambientales de Suecia (1993)

Hay además una gran cantidad de depósitos de colas y desmontes, sin ningún control, provenientes de explotaciones mineras del pasado. Se estima que la cantidad de este tipo de colas que pertenecen a COMIBOL es de 86 millones de toneladas, y que la cantidad total de estos residuos en el país estaría entre los 130 y 160 millones de toneladas. Estos desechos mineros, además de potenciales generadores de aguas ácidas, deterioran el paisaje y afectan su uso recreacional cuando la explotación minera está cerca de ciudades relativamente grandes, como en el caso de Oruro, Potosí y Tupiza. Una medida que podría tener un importante impacto sobre la contaminación que producen estas colas, es su eventual reprocesamiento.

Los procedimientos de concentración producen tanto daño ambiental como la actividad extractiva. Al desplazarse la minería del estaño hacia los complejos Pb/Zn/Ag, se han cambiado también los métodos de concentración. Los métodos de concentración gravimétrica, tradicionales en la minería del estaño, han sido reemplazados por sistemas que emplean reactivos químicos (xantatos y cianuro). Muchas plantas de beneficiación han incorporado en sus procesos los métodos de flotación y lixiviación. El

sistema de flotación utiliza, entre otros, cianuro de sodio, sulfato de cobre, sulfato de zinc, xantatos, y espumantes. En la lixiviación se utiliza cianuro. Si el proceso de concentración es eficiente, con reciclaje de reactivos, la cantidad de estos últimos en los efluentes no debería ser grande.

En el sistema de flotación el pH en la parte final del proceso es elevado (10-12), lo que limita la solubilidad de los metales pesados, por lo que estos quedan en los residuos sólidos, o en los lodos, que son descargados directamente en los ríos si no existen diques de colas. En algunas operaciones se agrega cal a los efluentes del proceso para neutralizar los ácidos y precipitar los metales pesados, posteriormente el agua se descarga en la naturaleza, o se recicla. Según la estimación de la misión sueca, la falta de diques adecuados ocasiona que entre el 30-50% de las aguas residuales sean descargadas directamente en la naturaleza. El único proceso de beneficiación por medio de flotación en Bolivia que cuenta con equipos para el tratamiento de los efluentes es el de la mina Bolívar, y aun así solo en forma experimental.

Por último, la mina Colquiri, es un depósito polimetálico de estaño y zinc. Este centro ha estado en producción desde 1940, primero explotando sobre todo estaño, y posteriormente zinc. El mineral de Colquiri se procesa en la planta de concentración "Hornuni", modernizada en 1987, y que posee una capacidad de 1000 toneladas por día. Esta planta utiliza procesos de flotación para la obtención de concentrados de zinc y estaño. El estaño es luego tratado en Vinto, mientras que los concentrados de zinc se exportan a fundiciones en el exterior, a través del puerto de Arica (Evia & Morales, 1995).

5.3 Métodos de remediación de aguas contaminadas por metales pesados

Existe una variedad de técnicas empleadas para descontaminar aguas con metales pesados, se pueden clasificar de varias maneras, una de ellas las clasifica en 3: química, biológica y fisicoquímica. Dicha clasificación junto a la variedad de técnicas existentes se muestra en la Figura 5. A continuación, se describe brevemente sólo algunas de ellas.

5.3.1 Precipitación química

Es muy efectiva y es la más empleada en la industria porque es relativamente simple y barata de operar. En procesos de precipitación, los químicos reaccionan con iones metales para formar precipitados insolubles. El precipitado formado puede ser separado del agua por sedimentación o filtración. Y el agua tratada es decantada y apropiadamente descargada o reusada. El proceso convencional de precipitación incluye precipitación con hidróxidos y con sulfuros (Fu & Wang, 2011).

5.3.1.1 Precipitación con hidróxidos

Es el más empleado debido a su relativa simplicidad, bajo costo y fácil control de pH. Las solubilidades de varios metales son minimizadas en el rango de pH de 8.0-10.0. Los hidróxidos de metal pueden ser removidos por floculación y sedimentación. Una variedad de hidróxidos puede ser empleada, la cal es la opción preferida en la industria.

En procesos de precipitación con hidróxidos, la adición de coagulantes como sales de aluminio y polímeros orgánicos pueden mejorar la remoción de metales de aguas.

La precipitación con hidróxidos tiene algunas limitaciones. Primeramente, la generación de grandes volúmenes de lodo y/o lodos relativamente de baja densidad, que pueden traer problemas de disposición. Segundo, algunos hidróxidos metálicos con anfóteros, y el metal mezclado crea problemas empleado precipitación debido a que el pH ideal para que uno metal precipite puede poner a otro en solución (Fu & Wang, 2011)

5.3.1.2 Precipitación con sulfuros

Una de las principales ventajas de emplear sulfuros es que las solubilidades de los sulfuros metálicos son dramáticamente más bajas que los precipitados con hidróxidos y, los precipitados de sulfuro no son anfóteros. Por tanto, la precipitación con sulfuro pueden llegar a altos grados de remoción de metales sobre un rango amplio de pH comparado a la precipitación con hidróxidos.

Sin embargo, existe potencial riesgo en el uso de sulfuros, como conocemos, los iones metálicos se encuentran en medios ácidos y el sulfuro en estas condiciones puede resultar en la formación de humos de H_2S tóxicos. Es esencial que la precipitación pueda ser realizada en un medio neutral o básico. Más aún, la precipitación con sulfuros tiende a formar precipitados coloidales que causa problemas de separación en el asentamiento o en el proceso de filtración (Fu & Wang, 2011)

5.3.1.3 Precipitación de metales pesados quelados

Los procesos de precipitación química convencionales tienen muchas limitaciones y es difícil satisfacer las estrictas crecientes regulaciones ambientales mediante la aplicación de procesos de precipitación, especialmente si contienen agentes coordinados. Como una alternativa, muchas compañías usan precipitantes quelantes para precipitar metales de sistemas acuosos. En un estudio se revisó y examinó la efectividad de 3 precipitantes ampliamente usados: trimercaptotriazina, tiocarbonato de sodio/potasio y dimetilditiocarbamato de sodio (Matlock, Henke, & Atwood, 2002), debido a la necesidad de nuevos o más efectivos precipitantes para satisfacer los requerimientos de descarga.

5.3.2 Intercambio Iónico

Los procesos de intercambio iónico han sido ampliamente usados para remover metales debido a ventajas como alta capacidad de tratamiento, alta eficiencia y cinéticas rápidas. Las resinas de intercambio iónico, sean sintéticas o de sólido natural tiene la habilidad específica de intercambiar sus cationes con los metales en el agua. Dentro de los materiales empleados para usar procesos de intercambio iónico, las resinas sintéticas son las más comúnmente preferidas por ser las más efectivas al remover metales de solución.

Los más comunes intercambiadores de cationes son resinas fuertemente ácidas con grupos de ácido sulfónico ($-SO_3H$), y resinas débilmente ácidas con grupos carboxílicos ($-COOH$). Los iones de hidrógeno del grupo sulfónico o carboxílico pueden servir como iones intercambiables con los cationes metálicos. Mientras el agua que contiene metales pesados pasa a través de una columna con cationes, los iones metálicos son

intercambiados por iones hidrógeno en la resina (Fu & Wang, 2011) como se esquematiza en la figura 4:

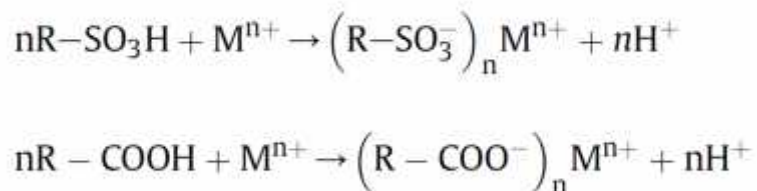


Figura 4. Proceso de remoción de metales mediante intercambio iónico

La fijación/captación de iones metálicos es afectada por ciertas variables como pH, temperatura, concentración de metal inicial y tiempo de contacto. La carga iónica también juega un papel importante. Un ejemplo de resina sintética es la purolita C100 que fue empleada para remover Ce^{4+} , Fe^{3+} y Pb^{2+} . Además de resinas sintéticas, las zeolitas que naturalmente se las encuentran como minerales de silicatos, han sido empleados para remover metales debido a su bajo costo y abundancia.

Muchos investigadores han demostrado que las zeolitas exhiben buena capacidad para intercambiar metales pesados bajo diferentes condiciones experimentales. La clinoptilolita es una de las zeolitas más frecuentemente usadas. Aunque existen muchos reportes en el uso de zeolitas, son más los reportes existentes sobre resinas sintéticas. Y, la aplicación de zeolitas es a escala laboratorio, por tanto existe la necesidad de realizar más trabajo para la aplicación de las mismas a escala industrial.

5.3.3 Adsorción

La adsorción es ahora reconocida como un método efectivo y económico para remover metales pesados. El proceso brinda flexibilidad en el diseño y operación, y en muchos casos produce un efluente de alta calidad. Adicionalmente, debido a que la adsorción es a veces reversible, los adsorbentes pueden ser regenerados mediante un adecuado proceso de desorción (Fu & Wang, 2011; Reddy & Lee, 2013).

5.3.3.1 Carbón activado

El carbón activado (CA) es ampliamente usado en la remoción de metales pesados. Su utilidad deriva principalmente por sus grandes volúmenes de microporos y mesoporos resultando en superficie de área alta. En estos días, la fuente agotada del producto comercial CA basado en carbón resulta en la elevación de su precio. Para poder adsorber la misma cantidad de metales como lo hace el CA, se puede añadir aditivos como ser: alginato, ácido tánico, magnesio, surfactantes y el compuesto final CA-aditivo puede ser efectivo para adsorber metales. Buscar una alternativa para el CA es de alta importancia.

5.3.3.2 Nanotubos de carbón

Los nanotubos de carbón (NTC) fueron descubiertos en 1991 (Iijima, 1991), y han sido empleados y estudiados por sus excelentes propiedades y aplicaciones. Al ser, relativamente nuevos adsorbentes han probado de tener un gran potencial removiendo metales como ser: plomo, cadmio, cromo, cobre y níquel. Los NTC son divididos en dos tipos: (1) NTC de una sola pared (2) NTC de múltiples paredes. El mecanismo por el cual los metales son adsorbidos sobre los NTC es complicado y parece ser atribuible a atracción electrostática, sorción-precipitación e interacción química entre el metal y los grupos funcionales en la superficie de los NTC.

5.3.3.3 Bioadsorbentes

La bioadsorción de metales es relativamente nueva. Las ventajas son: alta efectividad en disminuir la concentración de metales y el uso de bioadsorbentes baratos. Es un proceso adecuado para tratar aguas diluidas con metales pesados. Los típicos sorbentes pueden ser derivados de distintas fuentes: (1) biomasa no viva, como ser: cortezas, lignina, camarones, calamar, concha de cangrejo, etc.; (2) biomasa de algas, (3) biomasa microbiana, como ser: bacteria, hongos, levaduras. Diferentes formas de material de plantas barato como: cáscara de papa, aserrín, cáscara de huevo, cáscaras de semilla, cáscara de café, geles de pectina de remolacha y cáscaras de cítricos, han sido investigados como biosorbentes potenciales.

Las algas, son biomasa natural renovable que prolifera ubicuamente y abundantemente en zonas del litoral y ha atraído la atención de muchos investigadores. Muchas ventajas en la aplicación de algas como biosorbentes incluyen su amplia disponibilidad, bajo costo, alta capacidad de adsorción y calidad regularmente razonable. Algunas algas

que han sido estudiadas son: la macroalga verde *Chaetomorpha linum*, macroalga verde *Caulerpa lentillifera* y la alga verde *Cladophora fascicularis*. La remoción de metales con biomasa microbiana, incluye trabajos empleando *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. Hongos y levaduras son fáciles de cultivar y producen altos niveles de biomasa y al mismo tiempo pueden ser manipulados genéticamente y morfológicamente. Los sorbentes en base a hongos son en base a: *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lentinus edodes*, etc. La desventaja, es que la separación de metales será dificultosa luego de la adsorción (Karunasagar, Arunachalam, Rashmi, Naveena Lavanya Latha, & Maruthi Mohan, 2003).

5.3.4 Filtración con membranas

Las tecnologías de filtración con membrana con diferentes tipos de membrana muestran gran futuro para la remoción de metales pesados por su alta eficiencia, fácil operación y por ocupar poco espacio. Los procesos que emplean membranas son: ultrafiltración, osmosis reversa, nanofiltración y electrodiálisis (Fu & Wang, 2011)

5.3.4.1 Ultrafiltración

La ultrafiltración (UF) es una técnica que trabaja a bajas presiones en la transmembrana, para la remoción de material disuelto y coloidal. Debido que los tamaños de los poros de las membranas UF son más grandes que los metales disueltos en su forma de iones hidratados o como complejos de bajo peso molecular, estos iones podrían pasar fácilmente a través de las membranas. Para obtener alta eficiencia en la remoción de iones metálicos, la ultrafiltración micelar mejorada (UFM) y la ultrafiltración potenciada con polímeros (UFP) fueron propuestas. La primera está basada en la adición de surfactantes al agua. Cuando la concentración de los surfactantes en soluciones acuosas es más bajo que la concentración crítica micelar, las moléculas surfactantes se agregaran en micelas que puedan unirse a iones metálicos para formar grandes estructuras metal-surfactantes. Estas micelas que contienen iones metálicos pueden ser retenidas por una membrana de UF con poros más pequeños que el tamaño de las micelas, donde las especies no atrapadas pasaran fácilmente a través de la membrana. Para obtener alta retención, los surfactantes con carga eléctrica opuesta a la de los iones a ser removidos tienen que ser removidos. El dodecil sulfato de sodio

(DSS), es un surfactante aniónico, y es frecuentemente seleccionado para la remoción selectiva de iones metálicos en UFM. La eficiencia depende de las características y concentraciones de metales y surfactantes, pH de la solución, fuerza iónica y parámetros relacionados a la operación de la membrana.

La UFP también ha sido propuesta como un método factible para separar una gran variedad de iones metálicos de corrientes acuosas. La UFP usa polímeros solubles en agua para acomplejar iones metálicos y formar una macromolécula, teniendo un peso molecular alto que el corte de la membrana. La macromolécula será retenida cuando son bombeadas a través de la membrana. Luego de eso, lo retenido puede ser tratado de manera de recuperar iones metálicos y poder reusar el polímero. El principal interés es encontrar adecuados polímeros para poder lograr la unión con los iones metálicos. Agentes como el ácido poliacrílico (APA), polietilenimina (PEI), dietilaminoetil celulosa y ácido húmico, etc. han sido probados para lograr separación selectiva y recuperación de metales pesados con bajo requerimiento de energía. Los principales parámetros que afectan UFP son el tipo de metal y el tipo de polímero, la proporción de ambos, pH y la existencia de otros metales en solución. Las ventajas de UFP incluyen, alta eficiencia de remoción, alta selectividad de unión y alta recuperación de metales para re-uso (Fu & Wang, 2011).

5.3.4.2 Ósmosis inversa

La ósmosis inversa (OI) es un proceso que usa una membrana semi-permeable, permitiendo que el fluido que está siendo purificado pase a través de ella, mientras que no deja pasar los contaminantes. La OI es una técnica que permite remover un amplio rango de especies disueltas de agua y es un tratamiento que cada vez se hace más conocido. El mayor inconveniente es el alto consumo de energía debido a las altas presiones empleadas y la restauración de membranas.

5.3.4.3 Nanofiltración

La nanofiltración (NF) es un proceso intermediario entre UF y OI. La nanofiltración es una tecnología prometedora para los metales como el níquel, cromo, cobre y arsénico. Tiene beneficios como ser: fácil operación, confiabilidad y relativamente menor consumo de energía así como alta eficiencia de remoción.

5.3.4.4 Electrodialisis

La electrodiálisis (ED) es otro proceso que emplea membranas para la separación de iones a través de membranas cargadas de una solución a otra usando campo eléctrico como la fuerza motriz. En la mayoría de las ED, membranas de intercambio iónico son usadas. Estas membranas son de dos tipos: intercambio catiónico e intercambio aniónico. El proceso ha sido ampliamente usado para la producción de agua potable de océanos y agua salobre, tratamiento de efluentes industriales, recuperación de materiales útiles de efluentes y producción de sal (Fu & Wang, 2011; Hashim et al., 2011).

5.3.5 Coagulación y floculación

La coagulación y floculación seguida de sedimentación y filtración son también empleadas para remover metales. La coagulación es la desestabilización de coloides por neutralización de fuerzas que las mantienen separadas. Muchos coagulantes son ampliamente usados en los tratamientos convencionales como el aluminio, sulfato ferroso y cloruro férrico resultando en la efectiva remoción de partículas e impurezas por la neutralización de carga de las partículas y por enredamiento de las impurezas sobre los precipitados de hidróxidos de metal amorfo. Dos coagulantes comerciales son cloruro férrico y cloruro de polialuminio. La coagulación es uno de los más importantes métodos de aguas pero los principales objetos de la coagulación son coloides hidrofóbicos y partículas suspendidas.

La floculación es la acción de polímeros para formar puentes entre flóculos y unir partículas en grandes aglomerados o grumos. Una vez las partículas están suspendidas son floculadas en partículas más grandes, estas puede usualmente ser removidas o separadas por filtración o flotación. Hoy, muchas clases de floculantes, como ser PAC (Cadorin, Carissimi, & Rubio, 2007), sulfato poliferrico (SPF) y poliacrilamida son ampliamente usadas en el tratamiento de aguas, sin embargo, no es viable poder separar bien los metales solo por el uso de los mencionado floculantes. Generalmente, la coagulación y floculación no pueden tratar aguas contaminadas con metales completamente. Por tanto, deben seguir a otro tipo de técnicas (Fu & Wang, 2011).

5.3.6 Flotación

En estos días, la flotación encontró un amplio uso en el tratamiento de aguas. Ha sido empleada para separar metales de fases líquidas usando fijación en burbujas, originado en el proceso de minerales. La flotación por aire disuelto (FAD), flotación de iones y flotación – precipitación son los principales procesos de flotación para la remoción de iones metálicos de solución. La FAD permite que las micro-burbujas del aire se fijen a las partículas suspendidas en agua, desarrollando aglomerados con densidad más baja que el agua causando que los flocs emerjan a través del agua y se acumulen en la superficie donde pueden ser removidas como lodo. La FAD ha sido ampliamente para remover metales en la década de 1990.

5.3.7 Tratamiento electroquímico

Los métodos electroquímicos incluyen el recubrimiento de metales sobre la superficie del cátodo y poder recuperar los metales en el estado elemental. Estas técnicas requieren un alto capital de inversión y alto consumo de electricidad, por eso, no ha sido ampliamente usado. Sin embargo, con regulaciones ambientales cada vez más estrictas, tecnologías electroquímicas han ganado importancia en las últimas dos décadas. La electrocoagulación (EC), electroflotación (EF) y electrodeposición (ED) son tres de ellas. La EC involucra la regeneración de coagulantes *in situ* por disolución eléctrica de aluminio o hierro de los electrodos de Al o Fe. La regeneración del metal ión toma lugar en el ánodo, y el gas hidrogeno es liberado del cátodo. El gas hidrógeno puede ayudar a flotar las partículas floculadas fuera del agua. La EF es una separación sólida/líquida que flota contaminantes a la superficie de un cuerpo acuoso por pequeñas burbujas de hidrogeno y oxígeno en la remoción de metales pesados de efluentes industriales. La ED es una tecnología “limpia” con ausencia de residuos permanentes para la separación de metales pesados. Se emplea agentes quelantes como el EDTA (etilendiaminotetraacetico), ácido nitrilotriacetico y citrato en dos cámaras separadas por una membrana de intercambio de cationes.

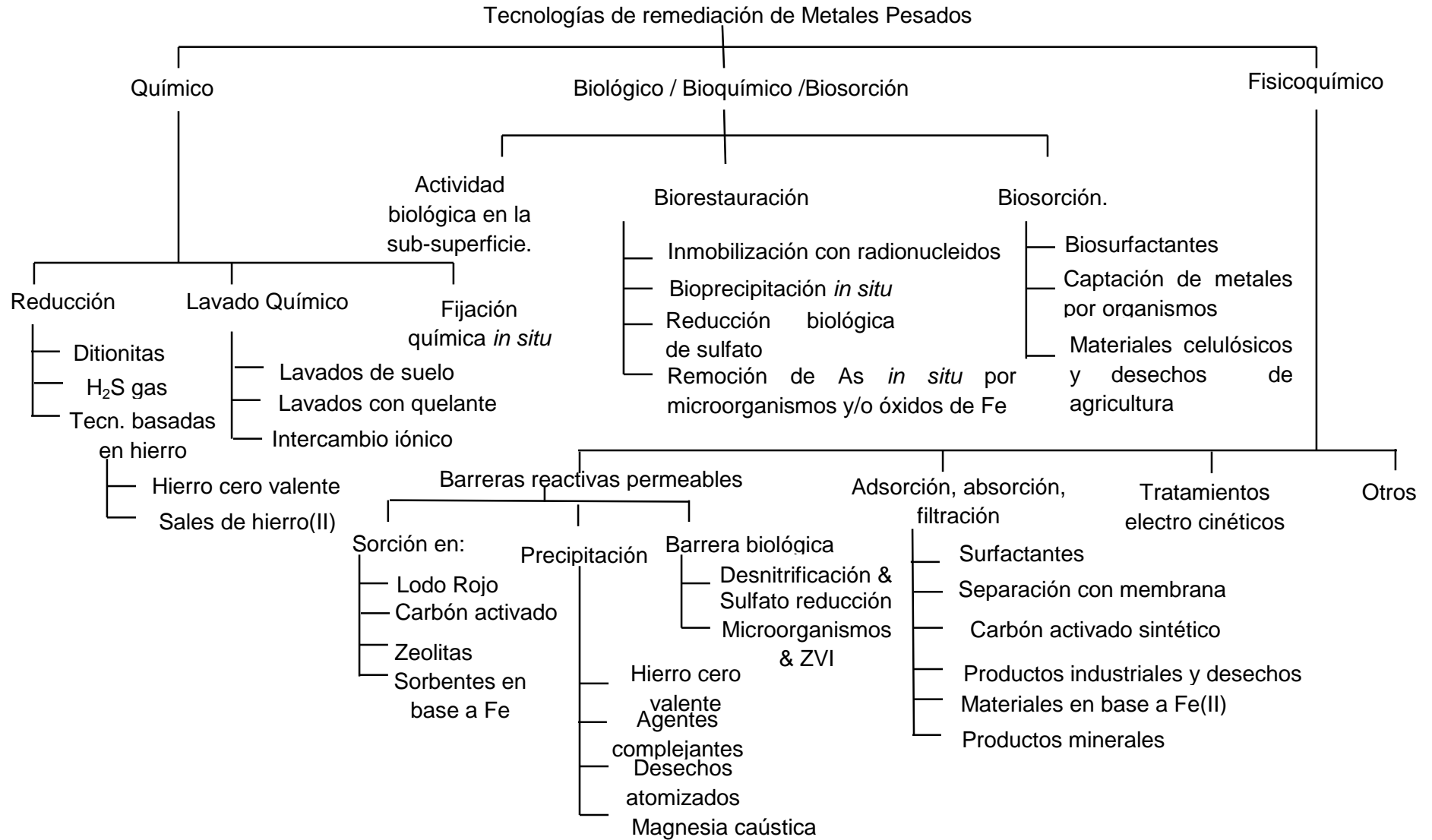


Figura 5. Clasificación de Tecnologías de remediación de metales pesados (Hashim et al., 2011)

5.4 Bacterias sulfato reductoras (BSR)

5.4.1 Definición

Los sulfato reductores son microorganismos procariotas (*Archaea* o *Bacteria*) que usan sulfato como aceptor de electrones de un proceso de respiración anaeróbico (Cypionka, 2011)

Debido a que miembros de *Bacteria* y *Archaea* pueden usar sulfato como aceptor terminal de electrones, algunos investigadores emplean el término procariotas/bacterias sulfato reductores o microorganismos sulfato reductores. En este trabajo, por fines prácticos de ahora adelante nos referiremos a ambos dominios como Bacterias sulfato reductoras (BSR).

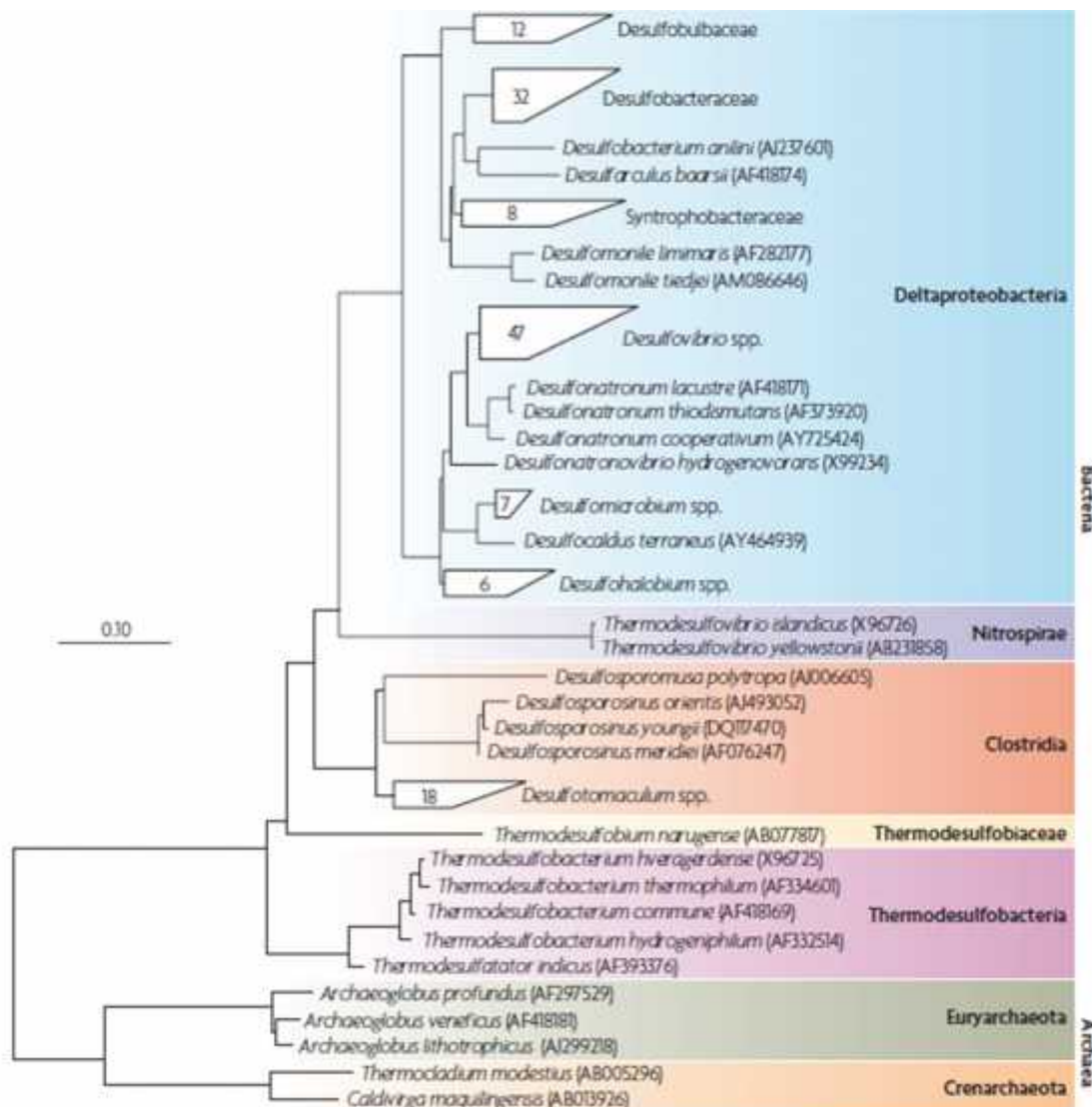
5.4.2 Filogenia

Más de 120 especies de procariotas sulfato reductores (PSR) que pertenecen a 4 filo bacteriales y 2 filo archaea son conocidos hasta el día de hoy. Los grupos son (Barton & Fauque, 2009; Cypionka, 2011; Muyzer & Stams, 2008):

- (1) Mesófilo *delta-proteobacteria* (ejemplo: *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*)
- (2) Termófilos, bacterias gram negativas (ejemplo: *Thermodesulfovibrio*)
- (3) Dentro de la división Nitrospira: *Desulfobium*, recientemente ha sido caracterizado como un género termófilo no relacionado a otras bacterias.
- (4) Bacterias gram positivas con el género formador de esporas *Desulfotomaculum*
- (5) *Thermodesulfobacteria* (ejemplo: *Thermodesulfobacterium*)
- (6) *Euryarcheota* con hipertermófilos (ejemplo: *Archaeoglobus*) y,
- (7) *Crenarcheota* con los hipertermófilos: *Caldivirga* y *Thermocladium*

La mayoría de los reductores de sulfato pertenecen a 28 géneros dentro de *Deltaproteobacteria*, seguidos de BSR gram positivas dentro de *Clostridia* (Géneros: *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* y *Desulfisporomusa*); tres linajes contienen BSR termófilos: Nitrospira (Género *Thermodesulfovibrio*), *Thermodesulfobacteria* (Género *Thermodesulfobacterium*) y *Thermodesulfobiaceae* (Género *Thermodesulfobium*).

Figura 6. Árbol filogenético basado en secuencias del ARN ribosomal 16S de especies de bacterias sulfato reductoras.



Note que de los 7 filogenéticos linajes de BSR, dos son Archaea y 5 son de Bacteria. El número dentro de los “cluster” colapsados indican el número de diferentes especies dentro de un grupo particular. La escala indica 10% de diferencia entre secuencias. (Muyzer & Stams, 2008)

5.4.3 Diversidad de BSR

5.4.3.1 Distribución en el medio ambiente

Las bacterias sulfato reductoras están ampliamente distribuidas y son de alta de importancia funcional en muchos ecosistemas incluyendo sedimentos marinos, ambientes contaminados como plantas de purificación anaeróbicas, red de cianobacterias, suelos contaminados con petróleo, campos de arroz, respiraderos

hidrotermales del océano e incluso enfermedades humanas. Las BSR son filogenéticamente y metabólicamente versátiles y representan los primeros microorganismos respirantes con un rol subsecuente en la biogeoquímica de varios ambientes que habitan. Las BSR se han adaptado a casi todos los ecosistemas del planeta, incluyendo los nichos profundos del océano y los pozos de petróleo. En estos ecosistemas, las bacterias tienen que adaptarse a condiciones fisicoquímicas drásticas, como ser: alta temperatura y presión. Las BSR contribuyen a la completa oxidación de la materia orgánica y participan a través de la producción de sulfuro y/o reducción de metal a biogeoquímica de estos ambientes extremos (Barton & Fauque, 2009).

Un buen enfoque para la detección de BSR es el uso de los llamados genes: *dsrAB* y *aprBA*, el primero codifica la enzima sulfito reductasa que juega un papel importante en la vía de reducción de sulfato. El segundo codifica a la adenosina-5'-fosfosulfato reductasa. Ambos genes son empleados para determinar la diversidad de BSR en diferentes hábitats. Éste método tiene cierta desventaja al no proveer el número de células presentes. Pero, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (QT-PCR) es una técnica altamente sensible que puede cuantificar el número de células y ha sido empleada para el análisis de suelos, lagos y agua de desechos industriales. Más aún, ésta técnica puede ser empleada para estudiar la expresión de genes funcionales, como el *dsrAR*. Otra técnica que puede ser empleada para cuantificar BSR es la Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH), que permite la visualización espacial de la distribución de BSR. Muchas sondas han sido desarrolladas en función al ARNr (ácido ribonucleico ribosomal) de diferentes grupos taxonómicos (Muyzer & Stams, 2008).

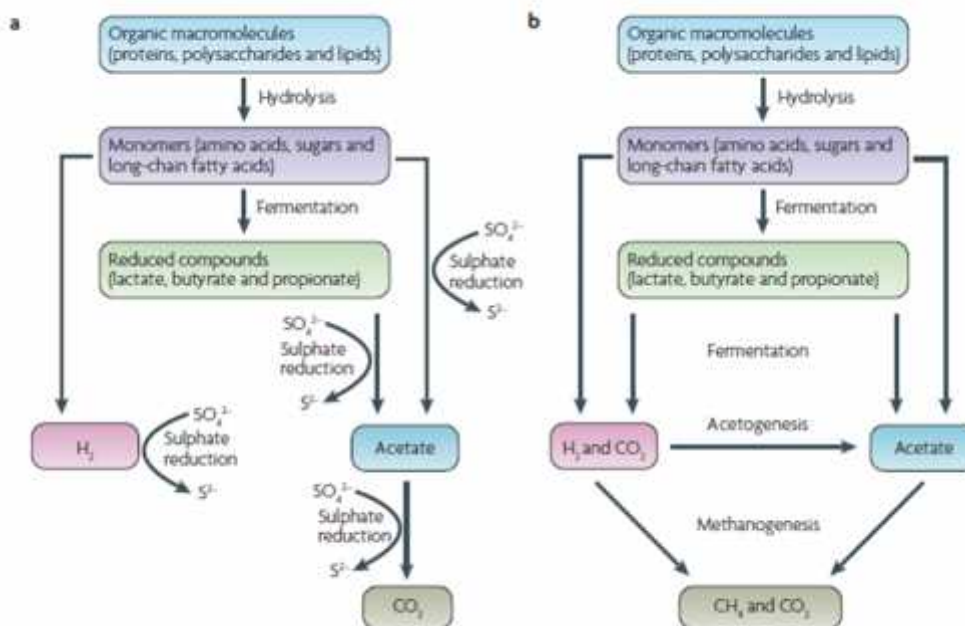
5.4.3.2 Características Principales

Inicialmente, se creía que las BSR utilizaban un limitado rango de sustratos como fuente de energía, ejemplo: lactato, hidrogeno molecular, piruvato, etanol, etc. Pero, recientes estudios microbiológicos y bioquímicos han descubierto y extendido el número de aceptores y donadores de electrones conocidos de ser usados por BSR, éstas pueden ser heterótrofas, autótrofas, litoautótrofas bajo anaerobiosis y su posible naturaleza microaerofílica ha sido discutida también recientemente. Algunas especies de BSR consideradas como anaerobios estrictos fueron capaces de realizar respiración

microaérobica acoplada a la conservación de la energía. Más de cien compuestos incluyendo azúcares, como ser: fructosa, glucosa, también aminoácidos (glicina, serina, alanina, etc.), ácidos monocarboxílicos (acetato, propionato, butirato), ácidos dicarboxílicos (fumarato, succinato, malato, etc.) alcoholes (metanol, etanol, etc.) y compuestos aromáticos (benzoato, fenol, etc.) son donadores de electrones potenciales para las BSR (Figura 7).

Las BSR son microorganismos que reducen un gran número de aceptores de electrones terminales incluyendo compuestos de sulfuro inorgánico y varios otros compuestos orgánicos e inorgánicos. Esto sugiere que su función ecológica y metabólica en la naturaleza es de gran importancia. Las BSR están ampliamente distribuidas en ecosistemas terrestres, subterrestres y marinos. Su contribución al proceso total de mineralización del carbón en sedimentos marinos, donde el sulfato no es limitante, fue estimada de ser hasta el 50%. Pueden también crecer en condiciones fisicoquímicas diferentes, así pueden habitar los ambientes más extremos de nuestro planeta como ser: salinos, calientes, fríos y/o alcalinos. Desasimilatoriamente, la sulfato reducción ha evolucionado por 3.5 billones de años, indicado por isotopos de azufre estables. Las BSR deberían ser considerados como microorganismos ancestrales, que han contribuido al ciclo primordial biogeoquímico para azufre apenas la vida emergió del planeta. (Cypionka, 2011).

Figura 7. Patrón secuencia de la degradación microbiana de materia orgánica compleja (Muyzer & Stams, 2008)



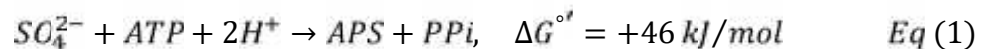
5.4.3.3 Metabolismo del azufre

Ya se ha mencionado que sulfato reductores usan sulfato como último aceptor de electrones para su crecimiento. Sin embargo, desde un punto de vista químico, el sulfato es un aceptor de electrones no favorable para microorganismos. El E_0 del par redox sulfato/sulfuro es -516 mV, que es muy negativo para permitir la reducción por los mediadores intracelulares como ferredoxina o Nicotidamin adenin dinucleótido reducido (NADH), cuyo E_0 es -398 mV y -314 mV, respectivamente. Es por eso que, antes de la reducción, el sulfato es activado por una ATP sulfurilasa, resultando en la formación de adenosina-fosfosulfato (APS) y pirofosfato, que es hidrolizado por pirofosfatasas a 2-fosfato. El E_0 del par APS-sulfuro/AMP es -60 mV, que permite la reducción de APS con ferredoxina o NADH. El AMP es formado por la reducción de sulfato y es convertido por una adenilato quinasa dependiente de ATP a dos moléculas de ADP. Así, la activación de sulfato ocurre a expensas de dos moléculas de ATP. El sulfuro es luego reducido a sulfuro: el E_0 del par redox sulfuro/sulfuro es -116 mV, pero aún no está claro como el sulfuro es reducido a sulfuro. Una vía a través de tritronato y tiosulfato podría permitir la

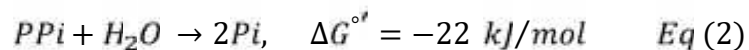
reducción de dos electrones en 3 pasos, pero una reducción en un paso de 6 electrones aun no puede ser concluida. Como muchos BSR son capaces de crecer en hidrógeno y sulfato como únicos sustratos, es claro que la sulfato reducción resulta en transporte de electrones por fosforilación para compensar la pérdida de ATP que es empleado para la activación de sulfato (Muyzer & Stams, 2008). Los pasos son los siguientes:

1. Activación de sulfato y reducción de sulfato a sulfito

Debido a la inercia química, sulfato necesita ser activado a APS (adenilil sulfato) por consumo de ATP. La ATP sulfurilasa (EC 2.7.7.4; ATP sulfato adenililtransferasa) forma pirofostato inorgánico (PPi) y APS de sulfato y ATP:



La ATP sulfurilasa ha sido purificada y caracterizada de *Desulfovibrio gigas* y *D. desulfuricans* ATCC 27774; es una nueva metaloproteína que contiene cobalto y zinc. La formación de PPi siendo termodinámicamente no favorable, la reacción necesita una segunda enzima para completar la reacción, una pirofosfatasa (EC 3.6.1.1; pirofosfato fosfohidrolasa) que hidroliza el PPi, como se indica a continuación:



La reducción de APS a bisulfito y AMP, catalizada por la APS reductasa es la primera reacción redox y es más exergónica que el clivaje de pirofosfato:



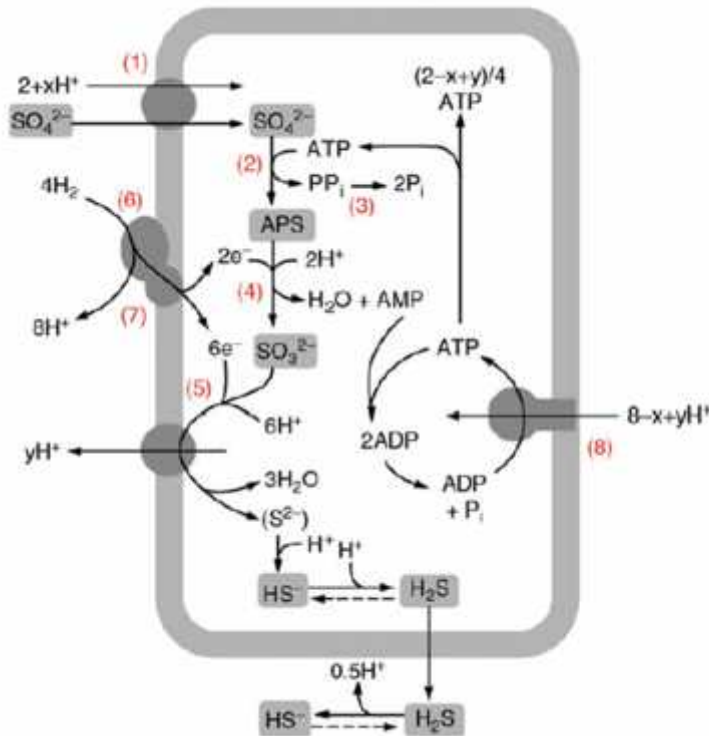
La APS reductasa (EC 1.8.99.2) ha sido purificada y caracterizada de varias especies de *Desulfovibrio*. La APS reductasa es una flavoproteína Fe-S que contiene un FAD y ocho átomos de hierro ubicados como dos centros [4Fe-4S]. El específico donador de electrón requerido para la reducción de APS a bisulfito es aún desconocido.

2. Reducción de sulfito a sulfuro

La reducción de 6 electrones de sulfito a sulfuro que es catalizada por la sulfito reductasa (EC 1.8.99.1) debe compensar la energía invertida para la activación de sulfato y rendimiento adicional de ATP para el crecimiento. El cambio de la energía libre

estándar al reducirse el sulfito a sulfuro con hidrogeno como donador de electrones es - 174 kJ/mol, y podría permitir la regeneración de al menos dos ATP. La vía de la reducción de bisulfito a sulfuro hidrógeno es un tanto controversial y dos mecanismos han sido propuestos. El primero es también llamado la vía del tritionato, donde el bisulfito es reducido a sulfuro en 3 pasos vía intermediarios libres. El segundo mecanismo es la reducción directa de 6 electrones de bisulfito a sulfuro en un paso, catalizado por la desasimilatoria sulfito reductasa (dsr) sin la formación de intermediarios libres. Argumentos a favor y en contra de la vía del tritionato han sido discutidos, pero solo el aislamiento de mutantes que serán alterados con respecto a la actividad de una o ambas reductasas proveerá información definitiva sobre el verdadero mecanismo de reducción de bisulfito.

Figura 8. Pasos de la reducción de sulfato por desasimilación y la conservación de la energía quimiosmótica con H₂ como el donador de electrones.



- (1) Captación por simporte con protones, (2) ATP sulfurilasa, (3) pirofosfatas, (4) APS reductasa, (5) sulfito reductasa, (6) Hidrogenasa, (7) citocromo c, (8) ATP sintasa (Cypionka, 2011).

5.4.4 Biotecnología de las BSR

La aplicación de las BSR en biotecnología es amplia, pero principalmente son: biorremediación de compuestos orgánicos e inmovilización de metales tóxicos. La inmovilización de metales pesados incluye la precipitación de sulfuros metálicos y la reducción de metales tóxicos. El último emplea a los organismos llamados bacterias reductoras de metal desasimilatorias (BRMD). Debido al contexto del trabajo, a continuación se describe la inmovilización de metales por precipitación de sulfuros metálicos:

5.4.4.1 Precipitación de sulfuros metálicos

Se ha estimado que billones de toneladas de desechos peligrosos orgánicos e inorgánicos son producidos anualmente alrededor del mundo. Alrededor de miles de libras de metales (Pb, Cd, As y Zn) pueden ser liberados al ambiente de una planta metalúrgica; la industria de refinamiento del petróleo contribuye con toneladas de plomo y cromo al ambiente anualmente y agua acida de una mina de carbón libera cientos de toneladas de metales al ambiente. El sulfuro de hidrogeno producido por las bacterias reacciona con los metales catiónicos resultando en metales altamente insolubles. Las BSR son importantes como catalistas para remediar aguas porque la remediación con sulfuro de hidrógeno es relativamente barata. El proceso microbiano de remediación de suelos contaminados con metales tóxicos ha sido discutido en previos reportes. Varios ejemplos de remediación *in situ* en minas con remoción de metales esta detallada en la Tabla 2. Varios tipos de biorreactores han sido empleados y generalmente se adiciona una fuente de energía para BSR. Uno de los sistemas de inmovilización de metales tóxicos es el uso de barreras reactivas permeables, ésta última ha evolucionado desde el año 1970 a un proceso de mitigación pasivo *in situ* diseñado para agua subterránea contaminada.

Los sulfuros de metales pesados son inmovilizados por BSR y la barrera permeable puede retener los contaminantes sin alterar significativamente el gradiente hidráulico. Un proceso comercial importante desarrollado por PAQUES BV es usado en Balk, Holanda, para tratar agua subterránea de la Refinería de zinc. La fase inicial del tratamiento usa H_2 como fuente de electrones para precipitar Zn^{2+} como ZnS. En la

segunda fase, el exceso de sulfuro es oxidado a azufre elemental por proceso aerobio. Este proceso puede manejar grandes volúmenes de agua de 400 m³/h de agua subterránea contaminada que puede ser tratada como rutina diaria.

Tabla 2. Casos estudios de remediación de drenajes ácidos de mina empleando BSR

Tecnología	Ubicación	Sitio	Metales removidos	Referencia
1. Biorreactor Compost	Yellow Creek, Pensilvania	Mina abandonada subterránea de carbón	Fe, Al	(Doshi, 2006)
2. Biorreactor Compost	Valle de Carnon, Cornwall, Inglaterra	Wheal Jean Estaño mina	Zn, Fe	(Whitehead, Hall, Neal, & Prior, 2005)
3. Biorreactor Compost	Condado Reynolds, Misscuri	Doe Run West Fork Mine (Mina subterránea de Pb-Zn)	Pb, Zn	(Doshi, 2006)
4. Biorreactor in situ	Elliston, Montana	Mina Lilly/Orphan boy	Al, As, Cd, Cu, Zn	(Doshi, 2006)
5. Compost Biorreactor	Elliston, Montana	Mina abandonada	Al, As, Cd, Cu, Zn, Fe, Pb, Mn, Zn	(Bless et al., 2008)
6. Biorreactor libre de compost	Markleeville, California	Mina abandonada de Ni-Cu	Al, Cu, Fe, Ni, Cd, Cr, Pb, Se, Zn	(Bless et al., 2008)
7. Barrera Permeable activa	Sudbery, Ontario, Canadá	Mina "Éxito" y molino	Al, Cu, Ni, Zn	(Benner, Blowes, Ptacek, & Mayer, 2002)
8. Barrera permeable activa	Condado Shoshone, Idaho	Ancher Hill Pit Lake	Cd, Pb, Zn	(Conca & Wright, 2006)

9. Tratamiento de un lago	Black hills, south Dakota	Refinería de Zn Budelco	Al, As, Cd, Cu, Fe, Se, Zn	(Doshi, 2006)
10. THIOPAQ®	Black, The Netherlands		Zn	(Hockin & Gadd, 2007)

5.5 Bacterias hierro reductoras (BHR)

A lo largo de estos años, el conocimiento de los tipos de minerales que contienen hierro, que puede servir como aceptores de electrones de microorganismos y los factores que controlan la velocidad o el grado de reducción se ha expandido. Recientes estudios incluyen el acoplamiento, indirecto o directo, del metabolismo de bacterias hierro reductoras desasimiladoras (BHRD) para la degradación de compuestos orgánicos y, la movilización e inmovilización de metales y radionucleidos. Así, las BHRD tienen potencial para la remediación de ambientes contaminados por un rango amplio de compuestos (Fredrickson & Gorby, 1996). De ahora en adelante, se hará referencia a estas bacterias como BHR.

5.5.1 Diversidad Filogenética

Un gran número de estudios se han enfocado en el aislamiento y caracterización taxonómica de BHRD. Los géneros de bacterias que pertenecen a este grupo han probado que obtienen energía al usar el Fe(III) como aceptor de electrones. Mediante análisis de genes ARNr 16S de estos microorganismos muestran que las BHR están ampliamente distribuidas filogenéticamente. *Geobacter fertireducens* es el primer representante de un nuevo género bacteriano. Esta bacteria pertenece a la subdivisión *deltaproteobacteria*. Por otro lado *Geobacter acetoxidans* está estrechamente relacionado a la bacteria que reduce azufre *Desulfuromonas acetoxidans*.

Se creía que las bacterias que perteneces al género *Pelobacter* tenían un metabolismo estrictamente fermentativo y eran raras en muchos ambientes anaerobios. Aun así, estas bacterias tienen una relación filogenética muy cercana a *Geobacter* and *Desulfuromonas*, ambos conocidos como reductores de Fe(III) (Fredrickson & Gorby, 1996).

5.5.2 BHR en la biorremediación

El catabolismo de contaminantes orgánicos acoplado a la reducción de hierro puede ocurrir naturalmente. Como se mencionó antes, la remediación intrínseca es significativa considerando que, en condiciones anóxicas, el Fe(III) presente en forma de óxidos en muchos minerales y en forma de silicatos en arcillas, representa >90% de la capacidad oxidativa de muchos ambientes. En la mayoría de los casos, sin embargo, la velocidad de degradación intrínseca de contaminantes orgánicos es limitado por la velocidad de la reducción enzimática de los minerales de Fe(III). En un estudio, las velocidades de degradación de hidrocarburos se aceleró significativamente con el quelante ácido nitrilotriacético, ésta estimulación es atribuida al incremento de la disponibilidad del Fe(III) por la disolución de óxidos del mismo y también alternativamente, la estimulación de la oxidación de compuestos aromáticos.

Recientes estudios también han demostrado que BHR pueden degradar compuestos orgánicos clorados: como ser: fenoles monoclorados, benzoatos, anilinas acoplados a la reducción de hierro, donde dichos compuestos fueron mineralizados. Las BHR y sus enzimas que reducen metales también han sido propuestas para remediar aguas y sedimentos contaminados con metales o radionúclidos. Por ejemplo, el uranio ha sido reducido de su forma móvil oxidada U(VI) a U(IV) que fácilmente puede precipitar como uraninito por las BHR: *G. metallireducens* ó *S. Putrefaciens* (Fredrickson & Gorby, 1996).

5.5.2.1 BHR en la remediación de drenajes ácidos de mina

Un ejemplo de la reducción de hierro (III) en la remediación de drenajes de mina, fue estudiado en escala piloto en el lago Lusatia en Alemania que recibe influentes de DAM. Las propiedades metabólicas de estas bacterias son importantes para el resultado de un proceso de remediación biológica, como la reducción quimiolitótrofa de Fe(III) puede contrarrestar el incremento de pH deseado, pero bacterias hierro reductoras heterótrofas proveerán el Fe(II) necesario para la precipitación de sulfuros metálicos precedido por la sulfato reducción. Entonces, parámetros de perfiles verticales de sedimentos relacionados al ciclo de hierro y azufre fueron determinados

en conjunción con recuento de microorganismos viables reductores de hierro empleado medios selectivos.

La adición de materia orgánica estimuló la reducción de hierro, sulfato y elevó el pH y la acumulación de hierro ferroso y compuestos reducidos de azufre. La cantidad de heterótrofos neutrófilos de hierro incrementaron durante el tratamiento, aquellos heterótrofos acidófilos reductores se mantuvieron en cantidad similar, y aquellos quimolitótrofos acidófilos disminuyeron. Cuando los sólidos férricos son reducidos, la acidez disminuye y por la precipitación de Fe en forma de carbonatos y fosfatos, este efecto es estabilizado y la re-oxidación de Fe(II) en columnas de aguas oxigenadas es prevenida. Además, donde la sulfato reducción puede ser inhibida por bajo pH, la hierro reducción es bien conocida de tener lugar en condiciones acidas. La reducción de hierro puede crear condiciones factibles para la sulfato reducción, pero al mismo tiempo ambos procesos compiten por donadores de electrones.

5.5.2.2 Filogenia

Las bacterias que son capaces de reducir hierro (III) son filogenéticamente y fisiológicamente diversas. El microorganismo reductor de hierro más conocido pertenece al género *Geobacteraceae*. Estas bacterias son generalmente neutrófilas, anaerobios obligados y utilizan acetato y otros ácidos orgánicos, alcoholes, algunos compuestos aromáticos o donadores de electrones hidrogenasa molecular. Su actividad hierro reductora es baja a pH 5.5. Ellos han sido detectados mediante DNA extraído de sedimentos de lagos próximos a minas, especialmente en zonas con elevado pH, pero su relevancia general es estos hábitat aún no es claro.

Un segundo grupo de bien estudiados neutrófilos reductores de hierro está compuesto de anaerobios facultativos del género *Shewanella*. Tienen un restringido espectro de donadores de electrones, empleado hidrógeno, algunos azúcares y ácidos orgánicos. Hasta la fecha, no se ha reportado acerca de estos organismos en minas.

Otro grupo de bacterias Fe(III) reductoras que pueden tener importancia en la minería es el género *Ferribacterium*, que engloba a anaerobios estrictos que utilizan ácidos

orgánicos. Existen también dos grupos de bacterias lyaacidofilas que reducen hierro. Primeramente, lyaanerobichetrotrofos facultativos del género *Acidiphilum* han sido encontrados en ambientes mineros. El rango de pH de hierro reducción es 3-5, y emplean glucosa y otros azúcares, etanol y donadores de electrones de tipo hidrogenasa, pero son inhibidos por acetato y otros ácidos orgánicos. Interesantemente, pueden llevar a cabo reducción de hierro bajo condiciones microaeróbicas (Porsch, Meier, Kleinsteuber, & Wendt-Potthoff, 2009; Wendt-Potthoff, Bozau, Frömmichen, Meier, & Koschorreck, 2010).

Finalmente, el *Acidithiobacillus ferroxidans* es un organismo autótrofo bien conocido por oxidar hierro ferroso y pirita, sin embargo se ha reportado que es también capaz de reducir de hierro bajo condiciones anóxicas con suficiente azufre disponible como donador de electrones. El rango de pH en el que éste organismo crece está entre 1.3-4.5. Si bien es capaz de reducir hierro, aun así es una reacción no deseada en términos de neutralización de pH, debido a que el pH desciende durante éste proceso. Cabe mencionar que pocos estudios existen sobre tratamientos de aguas de mina empleado hierro reducción así como sus propiedades fisiológicas como pH óptimo y donadores de electrones de preferencia (Wendt-Potthoff et al., 2010).

MATERIAL Y MÉTODOS

"Intelligence without ambition,

is a bird without wings"

Salvador Dali

6. MATERIAL Y MÉTODOS

En la figura 9 se detalla el esquema general de la fase experimental de éste trabajo:

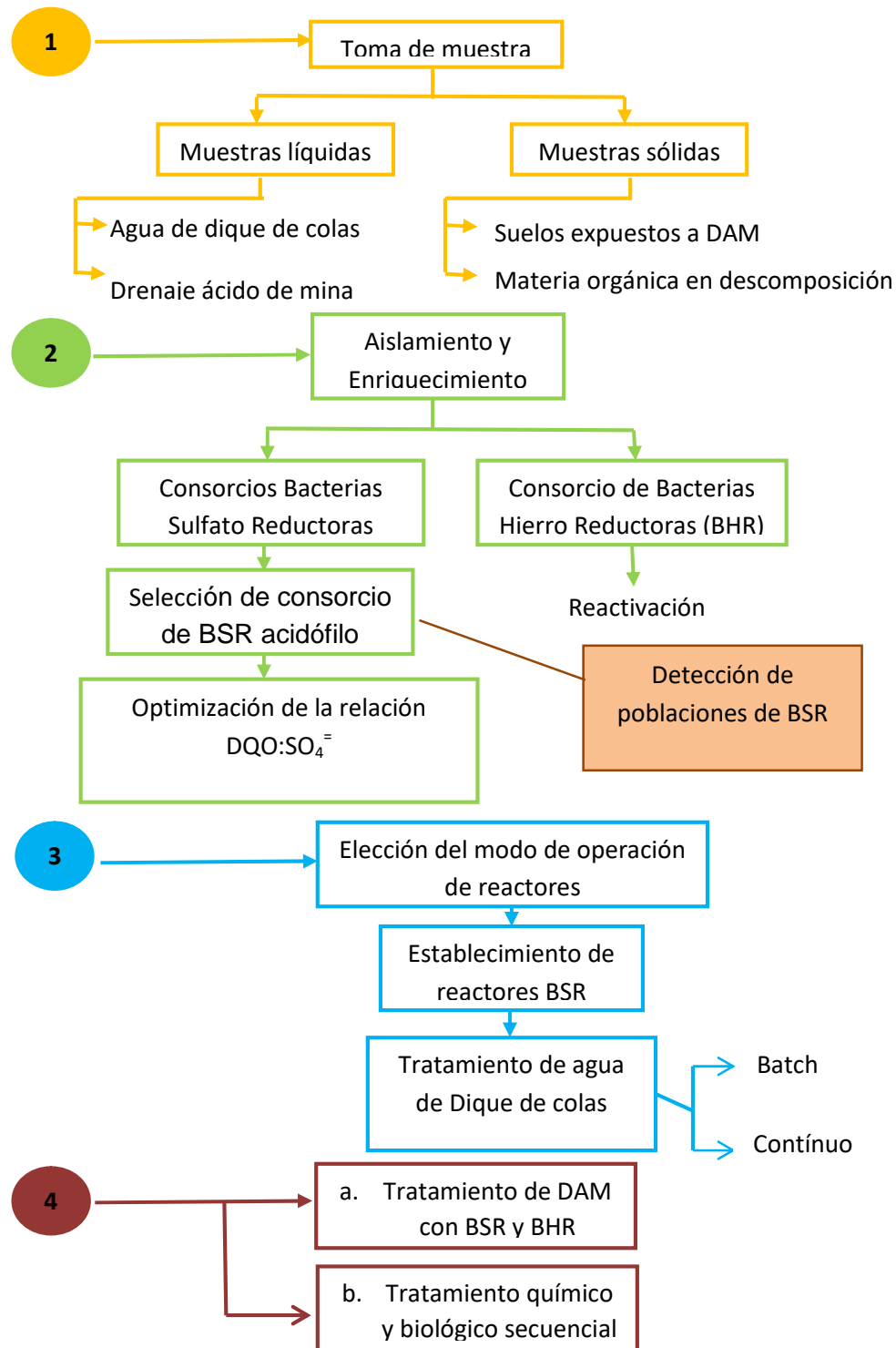


Figura 9. Esquema General de la Fase Experimental. Fuente: Propia**6.1 Material Biológico, enriquecimiento y selección****6.1.1 Reactivación de consorcios de bacterias sulfato reductoras**

Se reactivaron 27 consorcios de bacterias sulfato reductoras mesófilas y neutrófilas pertenecientes al cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, las cuales fueron aisladas de distintos puntos del altiplano en zonas contaminadas con actividad minera. Los 27 consorcios tienen los siguientes códigos: R-1, R1B1, R1B2, R-2, R2C1, R2C2, R-3, R3CC-1, R3CC-2, BA, SI2M, SI5M, SSHM, SSHP-II, SSHP-I, CD-I, CD-II, CD-III, CD-IV, CU-II, CU-III, CU-IV, CD-V, CD-VI, CU-I, CU-V y CU-VI. De éste grupo se seleccionó a uno de ellos para poder realizar las pruebas de remoción de metales y sulfatos en reactores.

Por otro lado, se reactivó al consorcio hierro reductor cuyo código es SMA2. Fue aislado de muestras de suelo contaminado con crudo de petróleo de Sanandita-Tarija-Bolivia, y es capaz de degradar fenantreno (Quiroga Flores, 2011). La reducción de Fe(III) junto a la degradación de fenantreno se puede observar en el Anexo 2. Los detalles del tipo de fuente de carbono y medio de cultivo se mencionan en la sección 6.1.3

6.1.2 Muestras de suelo y líquidas

Paralelamente, se colectó 3 muestras de lodo del Rio Huanuni ubicado en el Departamento de Oruro, Bolivia. El criterio de muestreo fue basado en la apariencia del lodo, la proximidad al río y el contacto con materia orgánica.

Las coordenadas de las muestras y temperatura se midieron *in situ*, para éste último se empleó una sonda multiparamétrica (PCSTestr35, OAKTON) cuyos valores se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Características de muestras de lodo tomadas en Huanuni

Parámetro	Unidad	MH-1	MH-2	MH-3
Coordenadas		18°17'11.07"S	18°17'13.56"S	18°17'9.88"S

		66°50'3.70"O	66°50'14.30"O	66°49'56.16"O
Temperatura	°C	12-16°C		

Fuente: Propia

El enriquecimiento de las muestras se realizó construyendo columnas de Winogradsky, las cuales fueron enriquecidas con las soluciones 2 y 3 de elementos traza del medio mineral Pfennig (Pfennig, Widdel, & Trüper, 1981). La composición de dichas soluciones está detallada en el Anexo Nro. 1b. Adicionalmente, el agua empleada fue la misma tomada del río Huanuni para así tratar de mantener las mismas condiciones de exposición a metales pesados. Finalmente, como fuente de carbono se empleó papel bond en desuso.

Como muestras líquidas, se muestreó aguas ácidas de Dique de colas y drenaje de mina (DAM), de las minas Colquiri y Bolivar, respectivamente. Ambas muestras fueron provistas por la Empresa Minera Sinchi Wayra S.A. Se midieron ciertos parámetros como ser: pH, sulfatos y metales pesados: Zn, Fe, Pb y Cu.

6.1.3 Aislamiento de bacterias sulfato reductoras y hierro reductoras

Como ya se mencionó, los consorcios de bacterias sulfato reductoras (BSR) fueron aislados de las muestras colectadas de Huanuni, a partir del enriquecimiento de microorganismos en las columnas de Winogradsky. Para lo cual, se tomó una pequeña cantidad de muestra lodosa del fondo de la columna, donde se asume que existen condiciones anaeróbicas de crecimiento. Ésta muestra fue inoculada en medio mineral Postgate C modificado (Widdel & Bak, 1992) (ver Anexo 1) y como fuente de carbono se empleó una mezcla de papel bond (10 g/L), hidrolizado de fruta (papaya y plátano, DQO = 1.5 g/L) y cascarilla de arroz (1 g/L), el pH fue ajustado a 4. El medio no fue esterilizado debido a su condición ácida y con la idea que las bacterias puedan ser empleadas en plantas pilotos de operación minera, donde el ambiente no es estéril. De las 3 muestras ambientales tomadas, múltiples consorcios fueron aislados y antes de su optimización se seleccionó al mejor consorcio de 9 de ellos. La selección se hizo en base a la disminución de la concentración de sulfato en el tiempo y se validó los

resultados mediante ANOVA de 1 vía empleando el programa R (The R program for statistical computing, versión 2.15.2).

Para el caso de BHR el medio de activación fue en el medio mineral Pfenning que fue modificado, donde se reemplazó el sulfato de sodio (Na_2SO_4 , 3 g/L, TELCHI) por cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L, ANEDRA). La fuente de carbono fue el filtrado de un hidrolizado de frutas con una concentración final de ácidos grasos volátiles de 2 g/L y el pH fue ajustado a 5.5.

La razón por la cual se aisló un nuevo consorcio sulfato reductor adicionalmente al ya reactivado del cepario fue porque era de mucha importancia obtener un consorcio sulfato reductor acidófilo nativo, adaptado a los constantes cambios del lugar.

6.1.4 Preparación de fuente de carbono para las BSR y BHR

Se empleó 3 tipos de fuentes de carbono: papel bond, fruta (papaya y plátano) y cascarilla de arroz.

El papel bond empleado fue aquel en desuso, el criterio de selección fue el empleo de tinta o lápiz en el papel. Todo aquel papel bond rayado con tinta fue excluido. La razón por la que se seleccionó papel bond en desuso fue porque se reportó anteriormente que con éste sustrato se genera mayor cantidad de sulfuro de hidrógeno (19 mM) que en el caso de ácidos grasos volátiles. En éste trabajo también se experimentó con papel higiénico y una mezcla de ambos (Gutierrez Rojas et al., 2009). Para el presente estudio, el papel fue cortado en pedazos de aproximadamente 3 cm x 5 cm.

Las dos frutas con las que se trabajaron fueron: papaya y plátano, en total 1243 g del primero y 345 g del segundo. Las frutas se encontraban en estado de descomposición y se las recolectó del Mercado Rodríguez de la Ciudad de La Paz, fueron licuadas y mezcladas. Por último, la cascarilla de arroz fue colectada de Palos Blancos, Yungas – La Paz.

Es muy importante aclarar que para las pruebas de: aislamiento, reactivación, enriquecimiento y selección la selección de modo operacional de reactor se empleó sólo el filtrado del hidrolizado de fruta. Para éste último se experimentó con el agua de Dique de colas. Brevemente, para obtener el hidrolizado de fruta, se construyó reactores de hidrólisis empleando un inóculo del lixiviado de Alpacoma, el proceso duró 5 días y al finalizar se determinó la cantidad de ácidos grasos volátiles (AGVs). Por otro lado, para la optimización de la relación DQO:sulfato (descrita más adelante), se eliminó el paso de hidrólisis de fruta y sólo se empleó materia orgánica en estado semi-sólido.

6.1.5 Diseño Factorial para optimizar las proporciones de materia orgánica en cultivos de BSR

Se tomó en cuenta dos variables: demanda química de oxígeno (DQO) y tipo de fuente de carbono. Debido a que se trabajó con 3 diferentes fuentes de carbono y cada una presenta tres niveles, el diseño factorial fue de: 3^3 haciendo un total de 27 experimentos. La concentración inicial de sulfato fue constante, 10 g/L. Del mencionado diseño, las variables independientes son el tipo de fuente de carbono y su concentración, las dependientes son: concentración de sulfatos y sulfuro de hidrógeno.

Los niveles de cada fuente de carbono fueron (g/L): 0, 10 y 40, para papel bond; 0, 3.03 y 12, para cascarilla de arroz; y 0, 3.75 y 15, para la mezcla de frutas. El nivel inferior, medio y superior se denominó: -1, 0, +1 y a continuación se detalla el diseño factorial de 27 experimentos (Tabla 4).

Tabla 4. Diseño factorial 3³ para la optimización de la relación DQO:sulfato

Nro.	Concentración sulfato (g/L)	Tipo de materia orgánica*		
		Papel	Mezcla de fruta	Cascarilla
1	10	-1	-1	-1
2	10	-1	0	-1
3	10	-1	+1	-1
4	10	-1	-1	0
5	10	-1	0	0
6	10	-1	+1	0
7	10	-1	-1	+1
8	10	-1	0	+1
9	10	-1	+1	+1
10	10	0	-1	-1
11	10	0	0	-1
12	10	0	+1	-1
13	10	0	-1	0
14	10	0	0	0
15	10	0	+1	0
16	10	0	-1	+1
17	10	0	0	+1
18	10	0	+1	+1
19	10	+1	-1	-1
20	10	+1	0	-1
21	10	+1	+1	-1
22	10	+1	-1	0
23	10	+1	0	0
24	10	+1	+1	0
25	10	+1	-1	+1
26	10	+1	0	+1
27	10	+1	+1	+1

*El nivel inferior, medio y superior (-1,0 y +1) corresponde a (g/L): 0,10 y 40 para Papel bond; 0,3.75 y 15 para el hidrolizado de fruta y, 0,3.03 y 12 para cascarilla de arroz. Fuente: Propia

Durante 21 días y con un intervalo de 24 horas, se tomó muestras donde se analizó sulfato y sulfuro de hidrogeno. Finalmente se evaluó los resultados mediante regresión múltiple y se graficó la superficie de respuesta de las variables empleado el programa Estadística versión 6.0

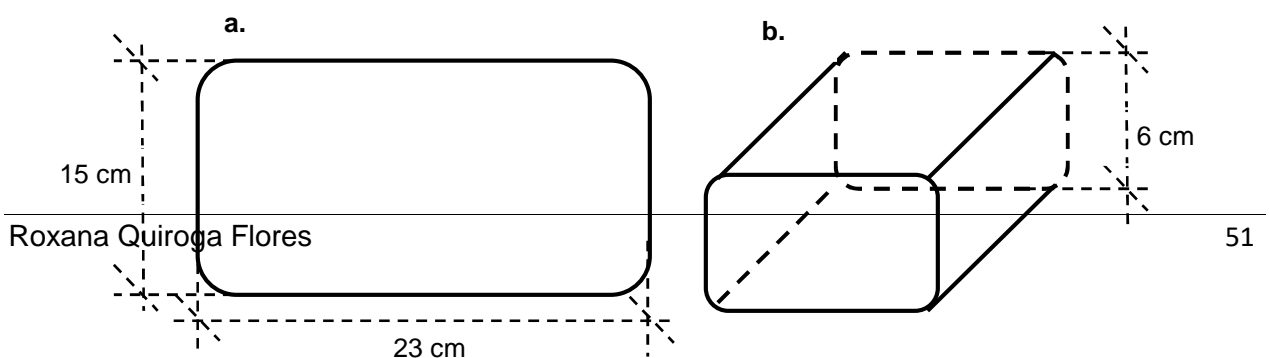
6.2 Diseño experimental para el tratamiento de aguas ácidas

6.2.1 Tratamiento de aguas de Dique de colas

Una vez seleccionado el mejor consorcio de BSR, se partió a realizar pruebas preliminares para la selección del modo operacional del biorreactor y para tal caso, se empleó agua de dique de colas, donde las concentraciones de sulfato y metales son menores alas del DAM.

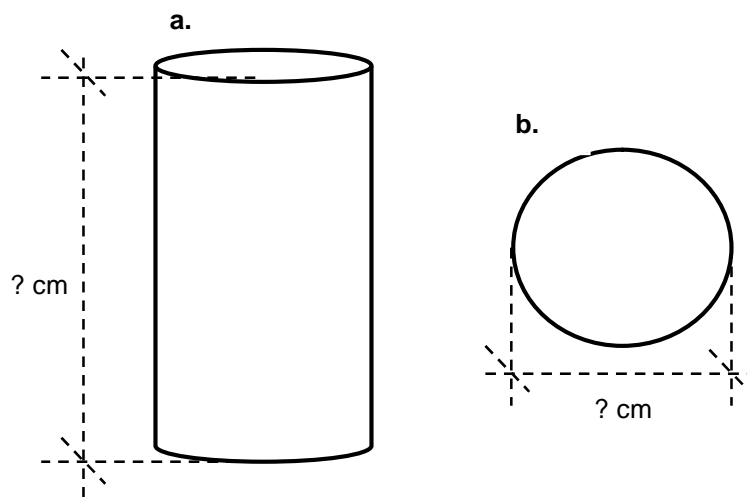
Se estableció 3 sistemas, llamados R1, R2 y R3. El primero consistió en un reactor rectangular de polietileno con flujo de agua en sentido horizontal, sus dimensiones son las siguientes (cm): 30 x 20 x 10, ver figura 10. El sistema R2 y R3 consistió en reactores de vidrio cilíndricos con flujo en sentido vertical, las dimensiones son: diámetro 7 cm y altura, 36 cm ver figura 11. La diferencia entre el segundo y el tercero fue la cantidad de soporte (piedra pómez) que se depositó en el reactor, el segundo reactor fue saturado con un 60 % de piedra y el reactor R3 con 75 %. La hipótesis para éste caso se basó en el hecho que se supone que con mayor biomasa se espera mayor eficiencia de remoción. El soporte que se empleó para todos fue piedra pómez. Por otro lado, el reactor R1 trabajó con un sistema batch – continuo, R2 y R3 trabajaron con sistema continuo con flujos de (mL/min): 0.72, 0.95 y 1.31.

Figura 10. Dimensiones de reactor R1



a. Vista superior y b. vista isométrica

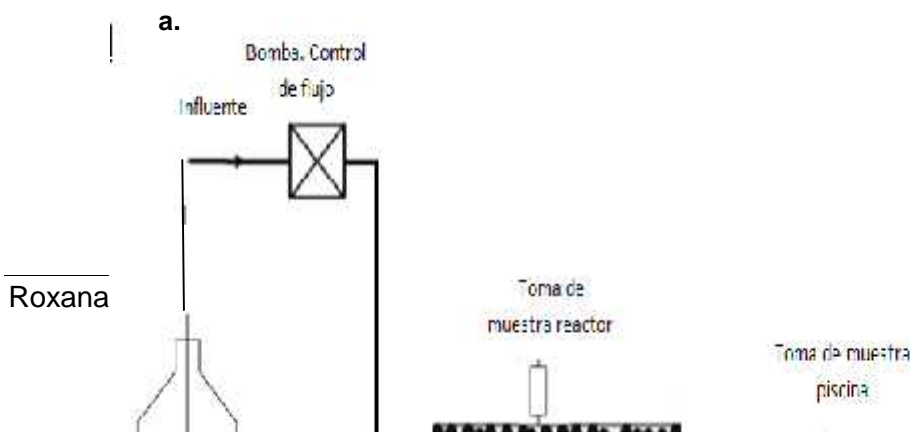
Figura 11. Dimensiones reactor R2 y R3

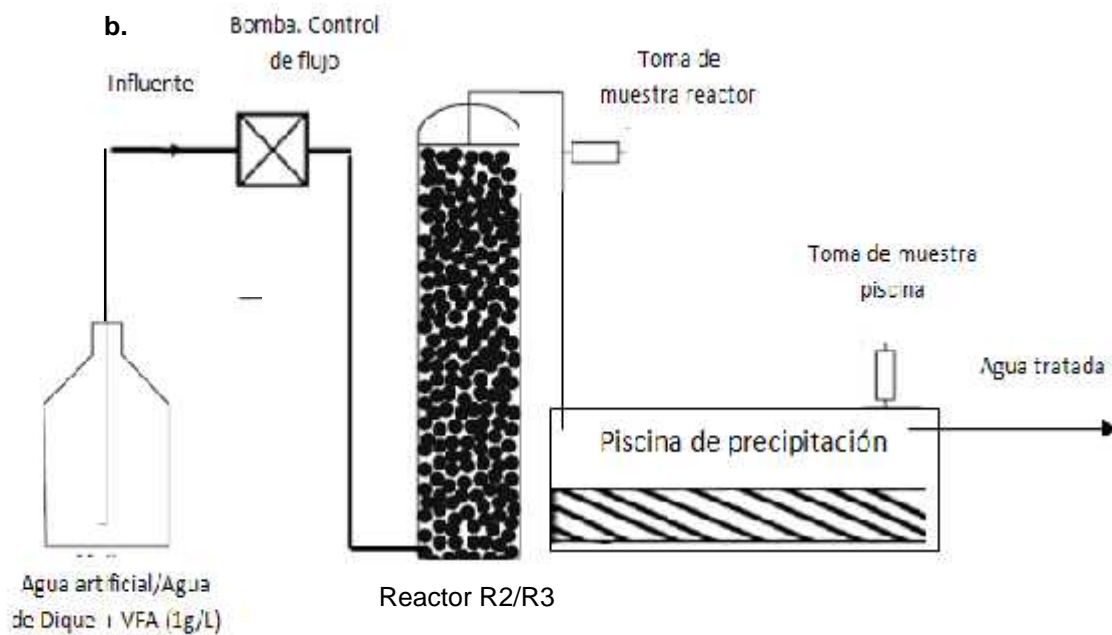


a. Vista frontal de reactor y b. Vista plano inferior

El agua que fue alimentada a los reactores fue agua de dique con adición de hidrolizado de frutas con un valor final de AGVs de 2 g/L, el pH no fue ajustado y se realizó el control de la concentración de sulfato del agua a tratar a lo largo del tratamiento, ya que ésta contiene hidróxido de calcio, añadida en la planta de tratamiento de aguas de la Operación minera. El sistema de tratamiento se presenta en la figura 12.

Figura 12. Esquema de Sistema de Tratamiento de reactores para el agua de Dique





a. Sistema con reactor R1 y b. Sistema con reactor R2 ó R3. Fuente: Propia

En esta fase no se empleó a las BHR, debido a que en ésta fase solo se pretendió elegir el modo operacional óptimo.

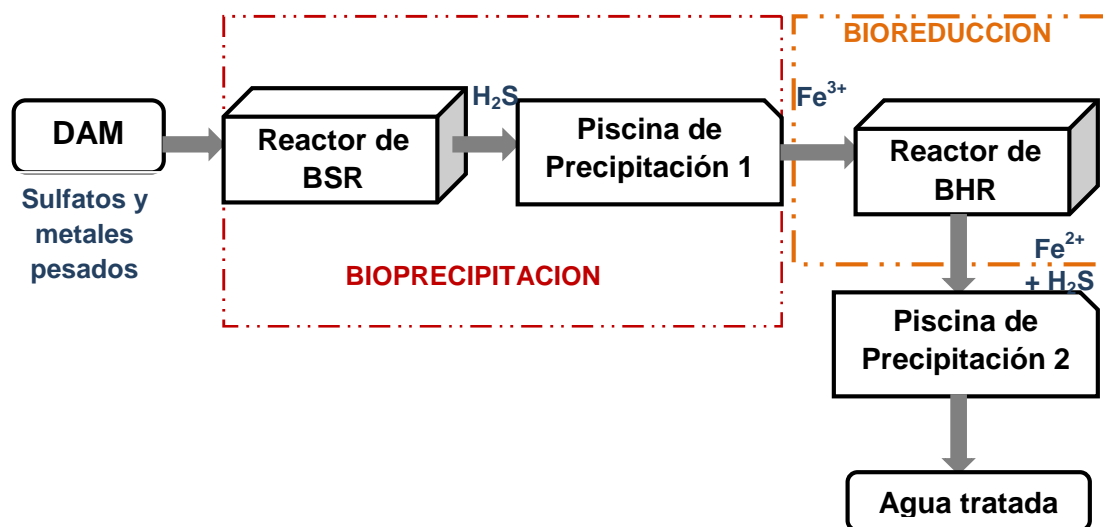
6.2.2 Tratamiento de Drenaje Ácido de Mina (DAM)

Una vez seleccionado el modo de operación del sistema de tratamiento de drenajes ácidos de mina, se inició el tratamiento final en el que se combina el uso de BSR con BHR. La hipótesis partió gracias a previos a estudios donde se demostró que Fe es el

metal con más baja eficiencia de remoción en sistemas de precipitación con sulfuro. Por tanto, el hierro férrico será reducido gracias a las BHR y una vez convertido a hierro ferroso, éste será precipitado por sulfuro de hidrógeno.

La descripción del sistema señalando los procesos de bioprecipitación y bio-reducción en un diagrama de bloques se detalla en la figura 13 y los puntos de muestreo en la figura 14. Fotos del sistema de tratamiento se muestra en el anexo 9 y 10

Figura 13. Descripción del sistema de tratamiento de DAM.



Las flechas indican la dirección del flujo.

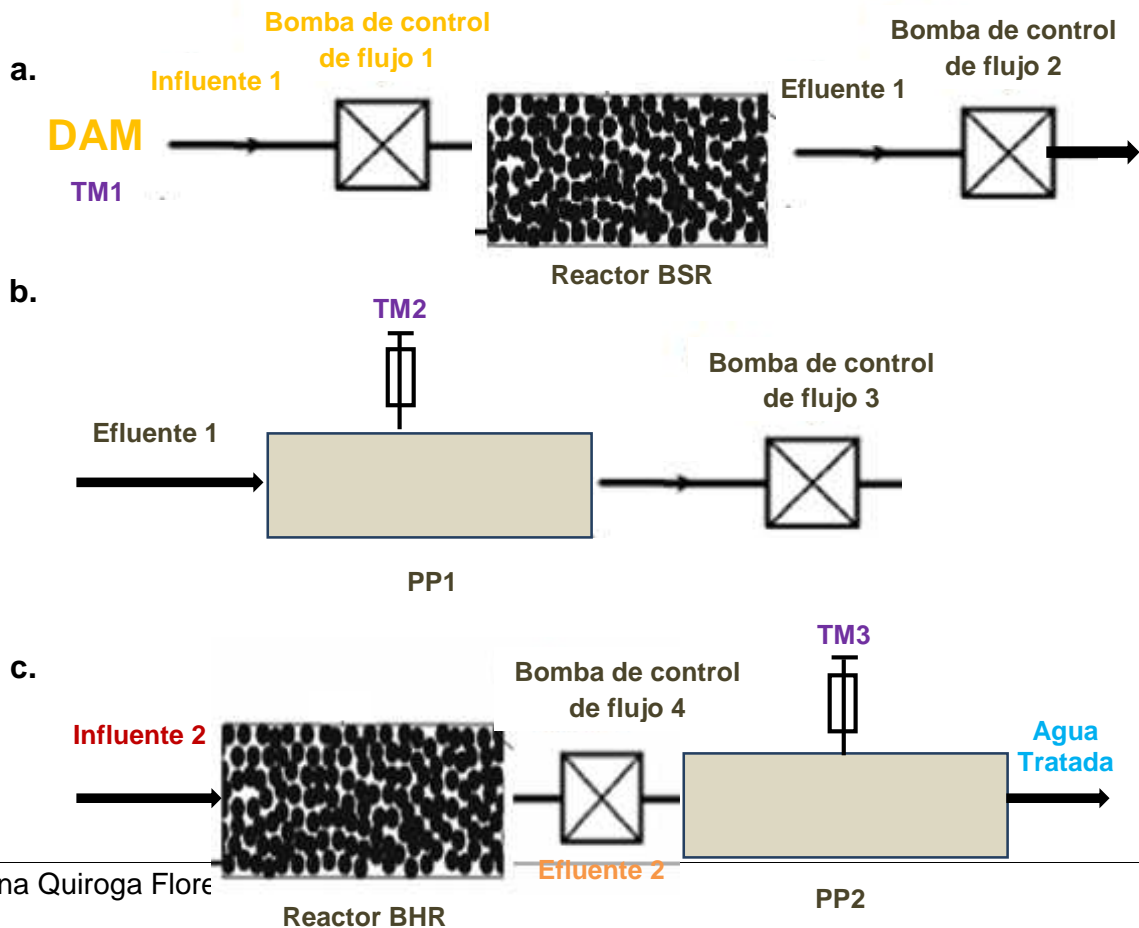
Los puntos de muestreo se denominaron TM y fueron los siguientes (Figura 14):

- TM1- DAM: Se midió pH y analizó concentración de sulfatos y metales pesados, como ser: Fe, Zn, Cu y Cd.
- TM2 - Piscina de Precipitación 1: Se midió pH y analizó concentración de sulfatos y sulfuro de hidrógeno; metales (Fe, Zn, Cu y Cd) y especiación del hierro.

- c) TM3 - Piscina de Precipitación 2 (sobrenadante agua tratada): Se midió pH y analizó concentración de sulfatos y sulfuro de hidrógeno; metales (Fe, Zn, Cu y Cd) y especiación del hierro.

El esquema secuencial del tratamiento junto a los puntos de muestreo se detalla a continuación:

Figura 14. Descripción del tratamiento secuencial de DAM por BSR y BHR.



El DAM es alimentado al reactor de BSR y luego es extraído a PP1 (Piscina de Precipitación 1). Los sulfuros metálicos precipitan y nuevamente el efluente (ahora influente) es alimentado al reactor de BHR. Finalmente, el agua es bombeada a la PP2 (Piscina de Precipitación 2), más sulfuros metálicos precipitan (principalmente FeS) y el sobrenadante constituye el agua tratada. TM1, TM2 y TM3, corresponden a los puntos de toma de muestra. Otras muestras analizadas son mencionadas en otras secciones. Fuente: Propia.

6.3 Determinaciones Analíticas

La composición de soluciones empleadas en cada punto es detallada en el Anexo 1. Las curvas de calibración se encuentran en el Anexo 8.

6.3.1 Determinación del Potencial de Hidrogeniones, Salinidad, Conductividad y sólidos totales disueltos (STD)

Las lecturas de pH se realizó con un pHmetro (OAKTON) y para las muestras de campo fue empleado un pHmetro multiparamétrico (OAKTON).

6.3.2 Determinación de Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Las muestras fueron filtradas previamente al análisis (se empleó filtro de nitrocelulosa de 0.45 μm , ADVANTEC). A 2.5 mL de muestra se adicionó 1.5 mL de Reactivo A (4.193g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 167 mL H_2SO_4 y 33.3 g HgSO_4 , para 1 L de solución) seguido de 3.5 mL de solución B (10 g $\text{Ag}_2\text{SO}_4/\text{L H}_2\text{SO}_4$). Las muestras fueron digeridas a 150°C durante 120 min en un digestor (Thermo MBT250, Alemania). Terminada la digestión, las muestras se enfriaron y dos gotas del indicador Ferroína (1 % v/v, SIGMA) fueron añadidas. La titulación se realizó con solución FAS (39.2g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mL de H_2SO_4 para 1 L de solución) y se procedió a calcular el valor de DQO en g O_2/L . Paralelamente al procesado de muestras, se analizó dos muestras blanco (agua destilada), una digerida y otra sin digerir. Ambas, fueron tituladas de la misma manera que muestras (APHA, 1985) y el análisis se realizó por duplicado.

6.3.3 Determinación de Sulfato

Se empleó el método Turbidimétrico de Kolmert (Kolmert, Wikström, & Hallberg, 2000), donde a 1 mL del reactivo condicionante se añadió 1 mL de la muestra (previamente filtrada en un filtro de nitrocelulosa de 0,45 μm de poro, ADVANTEC) junto a 60 mg de

$BaCl_2$, se agitó en un vortex (Vortex mixer, L-VM100) durante 1 minuto, para la lectura posterior a 420 nm, en un Espectrofotómetro UV-Visible (Cary50 Bio Varian, Australia). La curva de calibración se realizó con Na_2SO_4 . Muestras y estándares se trataron de la misma manera y se realizaron lecturas por triplicado.

6.3.4 Determinación de Sulfuro de hidrógeno

Se empleó el método Turbidimétrico de Cord-Ruwish (Cord-Ruwisch, 1985). El procedimiento consistió en añadir 50 μ L de la muestra a analizar (previamente filtrada en un filtro de Nitrocelulosa de 0.45 μ m de poro, ADVANTEC) a 1,95 mL del reactivo de cobre, se mezcló por inversión para su lectura inmediata a 480 nm, en un espectrofotómetro UV-Visible (Cary50 Bio Varian, Australia). La curva de calibración del método se realizó con $Na_2S \cdot H_2O$. Muestras y estándares se trataron de la misma manera y se realizaron lecturas por triplicado.

6.3.5 Determinación de Hierro (III)/(II)

Se empleó el método de la Ferrozina (Viollier, Inglett, Hunter, Roychoudhury, & Van Cappellen, 2000), donde a 1 ml de la muestra (previamente filtrada en un filtro de Nitrocelulosa de 0.45 μ m de poro, ADVANTEC) se añadió 100 μ L de este reactivo, se reportó A_1 (Absorbancia 1) a 562 nm en un espectrofotómetro lector placas ELISA (Biotek, modelo ELx800) seguido de la adición de 150 μ L de Hidroxilamina (NH_2OH , Sigma USA), al formarse un color magenta, se esperó 10 min hasta el desarrollo del color y por último se adicionó 50 μ L de Acetato de sodio (Sigma), pH 9.5, para proceder a una nueva lectura a 562 nm y obtener A_2 (Absorbancia 2). El color formado es indicativo de la presencia de hierro.

La curva de calibración fue realizada con $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. En el caso de estándares, el paso 2 y 3 se realizó dos veces para poder sacar el factor , necesario para los cálculos finales. Las muestras y estándares fueron analizadas por triplicado.

6.3.6 Determinación de Hierro, Zinc, Cadmio y Cobre total

Los metales pesados fueron analizados mediante Espectroscopia de Absorción Atómica a la llama (AAS, PERKIN ELMER AAnalyst100). Las muestras fueron acidificadas con

HNO₃ o HCl (según al metal) al 1 % v/v previamente al análisis. Los materiales a ser empleados fueron lavados con la misma solución y enjuagados con agua ultrapura (Millipore, Bartsnted, 18 M cm⁻¹). La misma fue empleada para la preparación de curvas de calibración y diluciones de muestras. Como estándares se emplearon las siguientes sales: FeSO₄·6H₂O (Merck, Alemania), ZnSO₄·8H₂O (Merck, Alemania), CuSO₄·4H₂O (Biopack, Argentina) y 3Cd(SO₄)₂·8H₂O (J.T. Baker chemical, USA), para Fe, Zn, Cu y Cd, respectivamente. La lectura de muestras y estándares se realizaron por triplicado.

6.3.7 Determinación de compuestos orgánicos por Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Se determinó los siguientes compuestos del filtrado de fruta que se empleó como fuente de carbono: Glucosa, ácido succínico, ácido láctico, glicerol, ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico.

Cada muestra se acidificó con H₂SO₄ al 20 % agregando 20 µL por 1 mL de muestra que posteriormente se filtró (0.45 µm de diámetro de poro). Se empleó un cromatógrafo (Waters 510 HPLC bomba; Waters Autosampler 717 plus) con columna Bio- Rad Aminex de intercambio iónico a 55 °C acoplado a un detector de índice de refracción (Detector Waters 2414 RI) utilizando H₂SO₄ 50 mM como fase móvil a un flujo de 0.6 µL/min. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

6.4 Detección de la biodiversidad de BSR mediante Hibridación in situ fluorescente

El método empleado se divide en los siguientes pasos (Moter & Göbel, 2000):

6.4.1 Fijación de la muestra

Para Gram (-): A cada muestra se añadió 3 volúmenes de paraformaldehído (Telchi, 40 % vol) en relación 3:1 y mantuvo a 4°C por 1-3 horas. Para bacterias Gram (+): Se añadió un volumen de etanol 98 % (Sigma, USA) a un volumen de muestra y mantuvo a 4°C durante 4-16 horas. En ambos casos, las células fueron centrifugadas y la solución fijante fue desechada. Las células fueron lavadas con tampón PBS (del inglés, *Phosphate-buffered saline*). Finalmente se añadió etanol absoluto frío y fueron almacenadas a -20°C.

6.4.2 Aplicación de las muestras a las placas y deshidratación

Ochomicrolitros de la suspensión fue aplicada a una placa de vidrio de 32 pozos. Las placas que contiene la muestra fue deshidratada en una serie de soluciones de etanol al 50, 80 y 98 %, tres minutos en cada uno. Las placas pueden ser almacenadas indefinidamente en un lugar seco, oscuro y a -20°C.

6.4.3 Hibridación con sondas

Previamente a la hibridación, se preparó un tampón por cada placa en tubos de 2 mL. La composición del tampón es detallada en Anexo 6, con la variante del volumen de formamida (Promega) empleada, que depende a la sonda a hibridar. Una vez preparadas las diferentes soluciones de hibridación, 8 µL de las mismas son añadidas en cada pozo de la plaza. El remanente fue empleado para humedecer un pañuelo que es depositado dentro de un tubo Falcon de 50 mL que contenía a la placa correspondiente. Como ultimo paso, se añadió 1 µL de la sonda a emplear y se procedió a la hibridación por 1-2 horas en un horno (BINDER) a temperaturas definidas por cada sonda. Las sondas (Integrated DNA technologies, IDT. USA) que se emplearon cubrieron a los grupos principales de BSR y algunas sondas específicas de especie, como control se empleó la sonda EUB que cubre a todo el grupo Eubacteria. Las características de las sondas se detallan en la Tabla 5.

6.4.4 Lavado

Luego de la hibridación, las placas fueron retiradas cuidadosamente de los tubos y enjuagadas inmediatamente con el tampón de lavado, que fue preparado durante las dos horas de hibridación y atemperado a 48 °C en un baño maría. El lavado se realizó por el pipeteo de pequeñas cantidades de tampón muy gentilmente sobre la placa. La composición del tampón del lavado se detalla en Anexo 5.

6.4.5 Montaje y observación

A cada placa, se aplicó una delgada capa de Citifluor (Sigma). Se montó la placa al microscopio y se procedió a la observación empleado el filtro adecuado. La observación

se realizó con un microscopio de Fluorescencia. (OLYMPUS EX41, Cámara XM10, USA).

Tabla 5. Características de las sondas de FISH empleadas

Sonda	Sitio Blanco	Secuencia 5'→ 3'	Marcaje	% FA	Referencia
EUB338	Most Bacteria	5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'	6FAM	50 %	(Amann et al., 1990)
SRB385	Most <i>Desulfovibrionales</i> and other Bacteria	5'- CGG CGT CGC TGC GTC AGG -3'	Cy3	35 %	(Amann et al., 1990; Manz, Eisenbrecher, Neu, & Szewzyk, 1998)
DFM228	Grupo 1. <i>Desulfotomaculum</i>	5'- GGG ACG CGG AYC CAT -3'	Cy3	40%	(Daly, Sharp, & McCarthy, 2000), éste estudio
DBB660	GRUPO 2. <i>Desulfobulbus</i>	5'- GAA TTC CAC TTT CCC CTC TG -3'	Cy3	60%	(Devereux, Kane, Winfrey, & Stahl, 1992; Manz et al., 1998)
DBM221	GRUPO 3. <i>Desulfobacterium</i>	5'- TGC GCG GAC TCA TCT TCA AA -3'	Cy3	35%	(Devereux et al., 1992; Manz et al., 1998)
DSB623	GRUPO 4. <i>Desulfobacter</i>	5'- TGT TTC AAG TGC WCT TCC GGG G -3'	Cy3		(Daly et al., 2000)
DSB985	<i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfobacula</i> , <i>Desulfospira</i> , and <i>Desulfotignum</i>	5'- CAC AGG ATG TCA AAC CCA G -3'	Cy3	20 %	(Manz et al., 1998)
DCC868	GRUPO 5. <i>Desulfosarcina</i> sp., <i>Desulfonema</i> spp., <i>Desulfococcus</i> sp., <i>Desulfobacterium</i> spp., <i>Desulfobotulus</i> sp., <i>Desulfostipes</i> sp., <i>Desulfomusa</i> sp.	5'- CAG GCG GAT CAC TTA ATG -3'	Cy3	40%	(Daly et al., 2000), éste estudio
DSS658	<i>Desulfosarcina</i> , <i>Desulfococcus</i>	5'- TCC ACT TCC CTC TCC CAT -3'	Cy3	60 %	(Manz et al., 1998; Mußmann et al., 2005)
DSV687	GRUPO 6. <i>Desulfovibrio</i>	5'- TAC GGA TTT CAC TCC T -3'	Cy3	15 %	(Devereux et al., 1992; Ramsing, Fossing, Ferdelman, Andersen, & Thamdrup, 1996)
DSV214	<i>Desulfomicrobium</i>	5'-CATCCTCGGACGAATGC-3'	Cy3	10 %	(Manz et al., 1998)
DSBO224	<i>Desulfobotulus sapovorans</i> y <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i>	5'-GGGACGCGGACTCATCCTC-3'	Cy3	60 %	(Manz et al., 1998)
DSF672	<i>Desulfofrigus</i> y <i>Desulfofaba</i> spp.	5'-CCT CTA CAC CTG GAA TTC-3'	6FAM	45 %	(Mußmann et al., 2005; Ravenschlag, Sahm, Knoblauch, Jørgensen, & Amann, 2000)
DRM432	<i>Desulphuromonas</i> spp.	5'- CTT CCC CTC TGA CAG AGC -3'	6FAM	40 %	(Ravenschlag et al., 2000)
DSMA488	<i>Desulfarculus baarsii</i> , <i>Desulfomonile tiedjei</i> , and <i>Syntrophus</i>	5'-GCC GGT GCT TCC TTT GGC GG-3'	Cy3	60 %	(Manz et al., 1998)
SRB385Db	<i>Desulfobacteraceae</i> , <i>Desulfomicrobiaceae</i> , <i>Desulfonatronumaceae</i> , <i>Geobacteraceae</i> , <i>Syntrophaceae</i> ,	5'- CGG CGT TGC TGC GTC AGG -3'	6FAM	30 %	(Rabus, Fukui, Wilkes, & Widdle, 1996)
DNMA657	<i>Desulfonema</i> spp.	5'- TTC CGC TTC CCT CTC CCA TA -3'	Cy3	30 %	(Fukui, Teske, Aßmus, Muyzer, & Widdel, 1999)
DSB706	Most <i>Desulfobulbaceae</i> , <i>Thermodesulforhabdus</i> (<i>desulfobulbus propionicus</i> , <i>Desulfofustis glycolicus</i>)	5'- ACC GGT ATT CCT CCC GAT -3'	6FAM	40 %	(Loy et al., 2002; Lückner et al., 2007)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*“The ones who are crazy enough to think
that they can change the world,
are the ones who do”*

Steve Jobs

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se detallaran los resultados en el siguiente orden: características de agua de mina, selección del consorcio sulfato reductor y el uso del mismo para el tratamiento de agua de Dique de colas (donde se seleccionó el modo de operación de reactores), la optimización de la relación DQO: sulfato, para luego pasar a los resultados del tratamiento de DAM, donde se empleó a las BSR junto a las BHR, y finalmente el pre-tratamiento químico acoplado al tratamiento biológico con BSR.

7.1 Características de aguas de mina

Las características del agua de dique de colas como de drenaje de mina, se detallan en la tabla 6.

Tabla 6. Características de las aguas ácidas a tratar

Muestra	Cantidad
Dique de colas. Mina Colquiri	
Sulfatos (mg/L)	3603 ±318
pH	6.2
Metales:	
Fe (mg/L)	131 ± 5
Zn (mg/L)	410 ± 10
Conductividad (mS)	4.27
STD (ppt)	3.04
Sales (ppt)	2.58

Drenaje ácido de mina.	
Boca mina San Cayetano, mina Bolivar	
Sulfatos (mg/L)	
pH	16716.7 ± 477
Metales:	2.96
Fe (mg/L)	2933 ±145
Fe(III) %	25
Fe(II) %	75
Zn (mg/L)	6659 ± 30
Cd (mg/L)	26.9±0.5
Cu (mg/L)	7.2 ± 0.15
Conductividad (mS)	9.18
STD (ppt)	6.54
Sales (ppt)	5.85

Las mediciones se hicieron a una temperatura ambiente de ~18.1-18.6°C.Fuente: Propia.

De acuerdo a los valores presentados en la tabla 6 y contrastando con la Ley Boliviana del Medio Ambiente Nro. 1333 (Anexo 3), tanto el agua de Dique y DAM no son aguas

salinas y los sólidos disueltos totales están por debajo del límite permisible de agua de tipo clase "A" para cuerpos receptores. Por otro lado, el pH del agua de dique entra ligeramente al límite establecido para descargas, pero el pH del DAM es sumamente ácido. Respecto a la cantidad de sulfatos, el valor en el agua dique es 9 veces más de lo establecido para la clase "D" de calidad de agua (la más baja) y 42 veces más en el caso de DAM. En el caso de los metales, la concentración sobrepasa excesivamente los valores permisibles de descargas, 131 y 2933 veces más para el caso del hierro en agua de Dique y DAM, respectivamente y en el caso del Zn, 137 y 2220 veces más de éste metal en agua de dique y DAM, respectivamente. Por tanto, la remoción de sulfatos y metales (principalmente Zn y Fe) son los principales blancos para el tratamiento de estas aguas acidas.

En el contexto Boliviano y en comparación al agua de Huanuni o Colquiri, el DAM de la mina Bolívar presenta significante elevada concentración de sulfatos, y en ambas minas (Huanuni y Colquiri) los metales que se encuentran en mayor concentración también son: hierro y zinc. Brevemente, el DAM de Colquiri contiene (mg/L): 4800 de sulfatos, 960 (Fe), 99.4 (Cu), 2638 (Zn) y 3.5 (Cd) (Quiroga Flores & Alvarez Aliaga, 2011). En el caso de Huanuni se tiene (mg/L): ~6920 de sulfatos y ~4150 (Fe), ~4590 (Zn) y ~25 (Cu) (Alave Padilla, 2011). Se conoce que Bolívar, Huanuni y Colquiri, son operaciones mineras grandes que explotan entre 1200-2000 Tn/día de concentrados de metales hacia las refinерías (López et al., 2010). Pero la realidad en lugares de explotación por cooperativas mineras, la composición de sulfatos y metales en DAM es mucho más baja. Tal es el caso de Milluni-La Paz, donde las concentraciones son (mg/L): 1123 de sulfatos, 381 (Fe), 137 (Zn) y 4.32 (Cu) (Herrera Garay & Vargas Mercado, 2014). Otro ejemplo es la Mina Matilde, donde se tiene (mg/L): 810 de sulfatos, 113 (Zn), 292 (Fe), 111.8 (Cu) y 0.32 (Cd) (Agramont Carpio, 2011).

En cuanto a los drenajes artificiales que se han preparado para la evaluación de las BSR en reactores, se ha reportado muchos estudios donde las concentraciones presentes son muy bajas en comparación a las grandes operaciones mineras ya descritas. Ejemplo 1: 5000 mg/L sulfato y metales (mg/L): 840 de Fe, 650 de Zn, 127 de Cu y 2.3 de Cd, el reactor trabajó con control de pH empleando tampones que lo ajustaron a la neutralidad (Steed et al., 2000). Ejemplo 2: 3700 mg/L de sulfatos y

metales(mg/L): 30 de Cu, 60 de Zn, 90 de Ni y120 de Cr, donde el reactor se ajustó a pH a 6.0 (Kieu et al., 2011).Pasando a los drenajes de minas en otros países, éstos no presentan una situación tan crítica como la nuestra, algunos ejemplos son: En Estados Unidos, Arizona se tiene (mg/L) 1800 de sulfatos, 13 (Cu), 0.04 (Cd), 3.5 (Zn), 49 (Fe) y 63 (Al) (Hammack, De Vegt, & Schoeneman, 1998); En Alemania se aplicó la bioaumentación para el tratamiento de aguas ácidas del lago ML y las concentraciones de sulfatos y hierro eran (mg/L): 1300 y 150, respectivamente (Wendt-Potthoff et al., 2010). Este hecho hace que el problema de contaminación en nuestro país es mucho más alarmante que en otros.

7.2 Selección de consorcios de BSR

De los 27 consorcios sulfato reductores se seleccionó uno con el cual se trabajó en las siguientes pruebas del tratamiento de agua de Dique de colas (sección 7.3). La selección se hizo en función a la disminución de la concentración de sulfato en un tiempo determinado. Adicionalmente se empleó un análisis ANOVA de dos vías, para elegir al mejor consorcio. Los valores de significancia (p) fueron: $2 \cdot 10^{-6}$, 0.0904 y 0.8455 para las variables: día, consorcio e intercepto, respectivamente Para un nivel de confianza del 95 % ($p < 0.05$), la única variable con significancia estadística fue el tiempo, ya que la concentración de sulfato fue decreciendo al pasar el mismo. También indica que el/los consorcio(s) empleados no tienen una alta significancia en el resultado y que no existe una diferencia significativa en la eficiencia de cada uno comparada con el resto. Más adelante se empleó el test comparativo Tukey a partir del ANOVA ya ejecutado. Este test permite hacer comparaciones entre los consorcios y el control (medio de cultivo abiótico), así como también entre ellos mismos. Tres consorcios tuvieron una alta significancia en comparación al control. Los valores p , fueron 0.01628, 0.00429, 0.0074 para los consorcios CU-III, R-1 y SI5M, respectivamente. En función a este análisis se seleccionó trabajar con el consorcio R-1.Los datos de las concentraciones de sulfato en función a 25 días de experimentación, junto al reporte del análisis estadístico se encuentran en el Anexo 4.

Cabe recalcar que los consorcios aislados de las muestras de Huanuni se detallaran en la sección del tratamiento de DAM.

7.3 Tratamiento de agua de Dique y selección del modo de operación de reactores

Es importante mencionar que el objetivo de esta fase fue poder elegir el mejor sistema de operación de reactor y aquél que pueda tratar el mayor volumen posible de agua, para que así pueda ajustarse a la realidad de muchas operaciones mineras de Bolivia. Por tanto todas las decisiones tomadas tuvieron como centro la posibilidad de ser ejecutadas en plantas de operación minera de Empresas grandes y sólo se empleó el reactor sulfato reductor.

Como ya fue mencionado, a partir del consorcio seleccionado R-1 se estableció 3 reactores siguiendo la descripción en la sección de materiales y métodos. El R1 fue un reactor donde la dirección de flujo era en sentido horizontal y dos reactores en sentido vertical, R2 y R3.

En primera instancia se evaluó la eficiencia de remoción en sistema continuo, para los tres sistemas con agua artificial (datos y gráficas mostradas en anexo 5). Los flujos empleados se detallan en la tabla 7. La remoción de sulfato del agua artificial fue mayor en el caso del flujo 0.72 mL/min y fue decreciendo a medida que el flujo aumentó.

La tabla 7 muestra también el tiempo de retención hidráulica (TRH) para cada caso y el flujo que debería haberse empleado en función al tiempo de duplicación bacteriana. Este último es un valor estimado ya que debido a que es un consorcio, cada bacteria con distinto género y especie tiene su propia velocidad de crecimiento (μ) y el valor obtenido es un aproximado del conjunto de bacterias que se tiene en el consorcio. Los valores presentados fueron calculados a partir de:

$$\mu (h^{-1}) = \frac{F (mL/min)}{V (mL)} \quad Ec. (1)$$

Donde, μ es la velocidad de crecimiento bacteriano; F es el flujo con el cual el reactor es alimentado y V, es el volumen intercambiable del reactor. A partir de μ se puede calcular el TRH, tiempo de retención hidráulica que equivale a $\bar{\tau}$:

$$TRH(h) = \tau(h) = \frac{1}{\mu} \quad Ec. (2)$$

Este valor expresa el tiempo en el cual un volumen de agua ha sido retenido en el reactor (Degens, 2012). Las bombas peristálticas con las que se trabajó fueron calibradas y los menores flujos alcanzados fueron seleccionados para trabajar. Como dato adicional, el flujo que se emplea en el agua de Dique en la operación minera Colquiri es aproximadamente 50L/s, por lo que (pensando en evaluar la eficiencia a flujos altos al requerido según μ obtenida por el curvas de crecimiento bacteriano), para el agua de dique se trabajó con los flujos: 0.95 y 1.31 mL/min y para R1 se trabajó en modo de operación batch. Cabe resaltar que 0.95 y 1.31 mL/min son 5 y 7 veces más del que se debería emplear (0.18 mL/min)

Tabla 7. Características de los parámetros evaluados del sistema continuo para el tratamiento de agua de Dique de colas.

Graduación Bomba	Flujo mL/min	TRH* (horas)	**Tiempo estimado de duplicación bacterias real (horas)	Flujo (mL/min) acorde a la tiempo de duplicación real
3	0.72	15.7		
4	0.95	11.9	64	0.18
5	1.31	8.6		

TRH: Tiempo de residencia Hidráulica para un volumen efectivo del reactor de 680 mL

(*): Para este caso, TRH también indica el tiempo de duplicación bacteriana esperada para cada flujo respectivo.

(**): Valor calculado a partir de curvas de crecimiento bacteriano

Otros estudios reportaron valores más altos de TRH. En el caso de Steed et al.(2000) el TRH fue de 8.4 días con una alimentación de 2L/día; en el caso de Alvarez et al.(2006) se empleó un flujo de 1.8 mL/hora con un tiempo de retención de 100 horas. Y en otro caso, el tiempo de retención fue 20 días empleando un reactor de tipo CSTR (del inglés, *continuous stirred tank reactor*) para un volumen de 2 L (Kieu et al., 2011). Los datos mencionados corroboran la importancia de trabajar con flujos acorde a la velocidad de crecimiento.

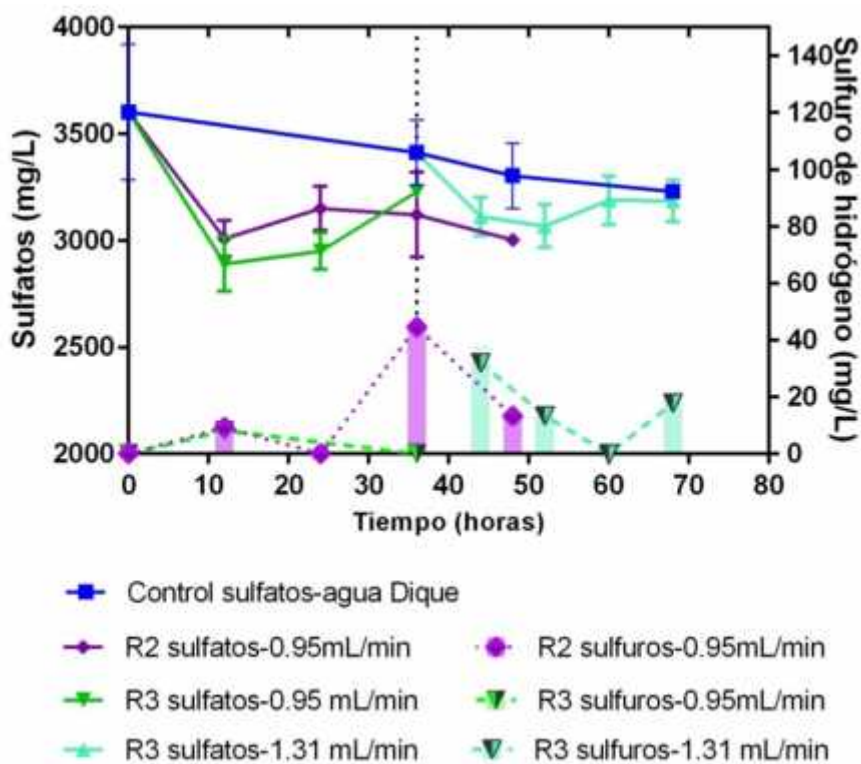
7.3.1 Sistema R2 y R3 para el tratamiento de agua de Dique en modo continuo

La tabla 8 muestra los valores de sulfatos y sulfuros a lo largo del tratamiento que se monitoreó por 68 horas. El sistema R2 solo trató el agua con un flujo de 0.95 mL/min. La meta fue evaluar si el sistema R3 al tener mayor biomasa por tener mayor soporte, podía compensar un mayor flujo, pero no fue así. Como se puede observar en la Tabla 8 y la gráfica 1, la remoción de sulfatos en ambos sistemas no tiene una diferencia significativa y en el caso de R3, ligeramente menos sulfato fue removido a pesar de lo esperado.

Paralelamente también se hizo un control del agua a tratar y se puede observar que el sulfato del agua de dique también disminuye en concentración a lo largo del tiempo. Esto se debe a que contiene cal, que fue empleada en la Planta de Tratamiento para precipitar metales, pero también para precipitar sulfato en forma de sulfato de calcio (Cadorin et al., 2007; Potgieter-Vermaak, Potgieter, Monama, & Van Grieken, 2006). Debido a que el agua de Dique no fue pre-tratada desde su llegada al laboratorio, estaba contemplado que en el transcurso del tiempo, dicha concentración disminuiría. Los datos obtenidos confirman que las bacterias necesitan un tiempo de contacto necesario con el agua a tratar pero por otro lado, y mirando con proyección de aplicación a nivel planta piloto, emplear un flujo tan bajo es irreal y no aplicable. Apoyando aún más a los resultados alcanzados, se ha reportado que a velocidades mayores a 1.5 m/h las bacterias pueden ser fácilmente lavadas del reactor debido a la baja densidad y a su falta de capacidad de formar gránulos densos y firmes (Shayegan, Ghavipankeh, & Mirjafari, 2005) donde a 2.5 m/h de velocidad la remoción de sulfato fue <20%.

de sulfuro disuelto o también a la precipitación de los mismos por el incremento del pH. Se ha reportado que la presencia de bicarbonato, al elevar el pH, puede precipitar metales como hidróxidos de una manera no mediada por sulfuros

Gráfica 1. Disminución de Sulfatos y generación de sulfuros en Sistemas R2 y R3 para el tratamiento de agua de Dique de colas



7.3.2 Sistema R1 para el tratamiento de agua de Dique en modo batch

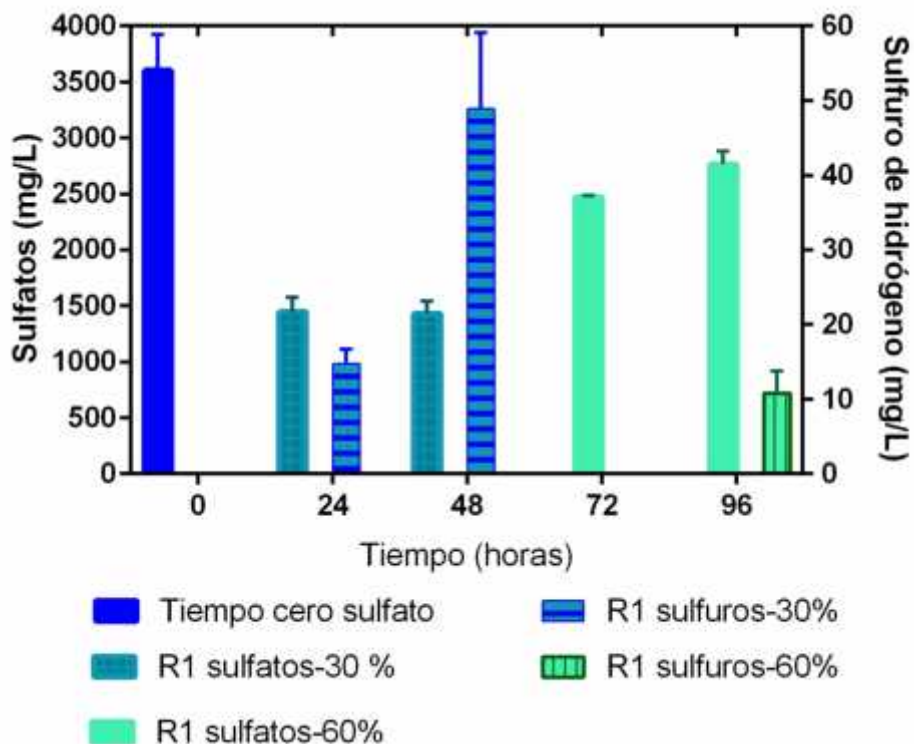
En el caso del Sistema R1 se obtuvieron resultados más alentadores. La Tabla 9 y gráfica 2 muestra las concentraciones de sulfatos a lo largo del tratamiento que duró 90 horas divididos en dos tipos de recambio del volumen efectivo: 30% y 60%. Se alcanzó a una mayor remoción en el primer caso llegando a remover casi el 50 % de sulfato presente. En el segundo caso se removió menos sulfato que en el primero debido a que mayor volumen de agua fue tratada por día.

Tabla 9. Parámetros monitoreados en Sistema R1 para el tratamiento de agua de Dique de colas

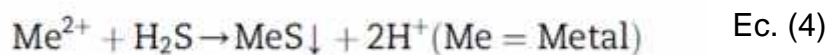
Tiempo	R1			
	% Recambio	Sulfato mg/L	H ₂ S mg/L	pH
0	-	3412±150	10 ± 2.3	4,3
24	31	1445 ± 129	14.7 ± 1.96	4,69
48	31	1430 ± 109	48.9 ± 10.2	4,53
72	62	2473 ± 93	0	4,37
96	62	2764 ± 118	10.8 ± 2.98	4

El pH alcanzado fue mayor en comparación a los sistemas R2 y R3, haciendo posible también detectar mayor sulfuro disuelto, sobre todo cuando se empleó el recambio del 30%.

Gráfica 2. Parámetros monitoreados en Sistema R1 para el tratamiento de agua de Dique de colas



La Tabla 10 resume los porcentajes de remoción alcanzados por los 3 sistemas, donde el mejor fue el R1 con remociones mayores al 70% en la mayoría de los casos, el metal que menos fue removido para los 3 casos fue el hierro, los metales precipitan según a las reacciones (Kieu et al., 2011):



En la Ec(3): las BSR en condiciones anaeróbicas, oxidan compuestos simples orgánicos como lactato, propionato, butirato, etc. mediante el empleo del sulfato como aceptor de electrones y generando sulfuro de hidrógeno más bicarbonato para que luego, Ec(4) el sulfuro biogénico reaccione con metales divalentes disueltos y forme sulfuros metálicos insolubles.

Por otro lado, se puede observar que el sistema que menos precipitó metales fue el R3, lo cual nuevamente corrobora que flujos mucho más altos al adecuado conllevan a una disminución pronunciada de la remoción de sulfatos, metales y neutralización de aguas ácidas.

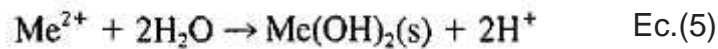
Tabla 10. Eficiencia en la remoción de metales pesados de los sistemas R1, R2 y R3 para el tratamiento de agua de Dique

Sistema	Tiempo (horas)	% remoción metales	
		Zn	Fe
R1	48	93	66

	72	83	70
	96	95	74
R2	48	40	29
	36	47	61
R3	48	56	59
	68	46	54

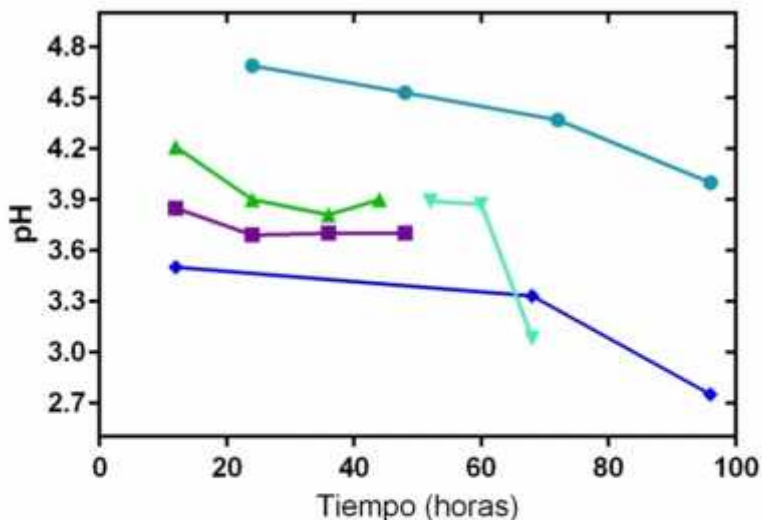
Los cambios de pH en los 3 sistemas fueron también monitoreados (Gráfica 3). El sistema que alcanzo elevar el pH más que los otros fue el R1. El pH del agua de Dique disminuyó también a lo largo del tratamiento, debido a la precipitación de hidróxidos por la cal que fue adicionada al agua. Esto también generó un ambiente más ácido y pudo afectar la eficiencia de tratamiento para el caso del sistema R3 con flujo de 1.31 mL/min.

La razón por la que el pH del agua de Dique bajara en el tiempo fue por la precipitación de metales en forma de hidróxidos que generan protones H⁺ y acidifican el medio, según la reacción (Drury, 1999):



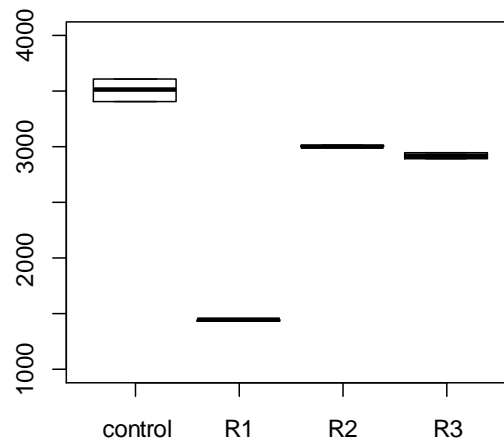
Gráfica 3.
en el
tratada

Cambios de pH
agua de Dique



Finalmente, se realizó un análisis ANOVA (Mediante el programa “The R Project for Statistical Computing” versión 2.15.2). Los resultados se muestran en la gráfica 4 y la diferencia entre la capacidad de reducir sulfato respecto al control es altamente significativa para el sistema R1 ($p < 0.05$, $3.32 \cdot 10^{-05}$) y no significativa para los reactores R2 y R3.

Gráfica 4. Análisis estadístico del tratamiento de agua de Dique por los sistemas R1, R2 y R3.



En líneas generales se conoce que el agua de dique presenta menores concentraciones al que presenta el DAM, es por eso que se partió tratando este tipo de agua primero antes de tratar el DAM, para así detectar las fallas y ventajas de los modos de operación experimentados y se llegó a las siguientes conclusiones parciales:

- El mejor sistema de tratamiento fue R1 (batch) donde el tiempo de retención es de 24 horas y recambio del 30% de agua.
- A pesar que hubo remoción parcial de metales y sulfatos en los sistemas R2 y R3, no fue estadísticamente significativo y emplear flujos más altos que vayan acorde a la realidad, sólo disminuirá más la eficiencia de tratamiento convirtiéndolo en una opción no factible.

- c. Los 3 sistemas emplearon bacterias que fueron adaptadas a ambientes ácidos, pero nativamente crecían en medios neutros (provenientes del cepario del IIFB). Adicionalmente, la relación DQO:Sulfato no fue ajustada para esta parte de experimentación.

Los resultados de esta sección sirvieron para optimizar estos dos últimos puntos que se detallan en las siguientes secciones.

7.4 Caracterización de la materia orgánica a emplear

Se seleccionó 3 tipos de fuente de carbono, como ser: papel bond en desuso, una mezcla de frutas (papaya y plátano) y por último, cascarilla de arroz. La Tabla 11 detalla el DQO de cada uno de los sustratos.

Tabla 11. Demanda Química de oxígeno de las fuentes de carbono a ser empleadas

Materia orgánica	DQO (g O ₂ /L)
Papel bond	326.93 ± 40
Mezcla de frutas (papaya y plátano)	122.43 ± 28
Cascarilla de arroz	404 ± 35

Se ha reportado el empleo de sustratos celulósicos sobre los no-celulósicos con ciertas ventajas, por ejemplo: paja de trigo (Degens, 2012), aserrín (Drury, 1999) y trigo (Porsch et al., 2009). En éste caso la mineralización de compuestos celulósicos, ocurre gracias a la interacción de varias comunidades de microorganismos. Primeramente, bacterias fermentadoras realizan el clivaje e hidrolizan a la celulosa, fermentadores secundarios también fermentan los productos de hidrólisis. Cuando el sulfato está disponible en el medio, las BSR emplean los productos de fermentación como fuente de

carbono y energía. A la vez y dependiendo de las condiciones externas, puede haber competición con las bacterias metanogénicas (BMs) ya que también pueden emplear los sustratos que son productos de la fermentación. Los genes involucrados en la fermentación de sustratos celulósicos seguido de la reducción biológica de sulfato se ha reportado previamente, evidenciando tal interacción (Pereyra, Hiibel, Riquelme, Reardon, & Pruden, 2010).

Adicionalmente, se realizó una caracterización de la mezcla de frutas, del cual se esperó que contenga la mayor cantidad de ácidos grasos volátiles que son conocidos por ser sustratos de las BSR. Según otros reportes, las BSR que usan como donador de electrones a los AGVs emplean: al ácido láctico, piruvato, formato, etc. y muy pocas especies consumen ácido acético, por lo que es común encontrarlo en efluentes de este tipo de tratamiento

Tabla 12. Contenido de AGVs en mezcla de frutas

Parámetro	Unidad	Valor
Nitrógeno Total*	mg N/L	460
Fósforo Total*	mg P - PO ₄ /L	119
DQO	g/L	80.84
Glucosa	g/L	10.726
Ac. Succínico	g/L	0
Ac láctico	g/L	5.98
Glicerol	g/L	0.69
Ac Acético	g/L	5.88
Ac propiónico	g/L	0
Ac butírico	g/L	1.29

***Análisis obtenido como servicio de análisis externo en el Laboratorio de Calidad Ambiental – UMSA, ver anexo 10.**

El análisis de caracterización de la mezcla de frutas (Tabla 12) muestra que las cantidades de los diferentes sustratos están en el siguiente orden: Glucosa>> ácido

láctico, ácido acético>ácido butírico>glicerol. Por tanto, el sustrato de primera opción sería el lactato y luego el butirato, finalmente el glicerol. La actividad de las BSR consume protones H^+ por mol de sulfato reducido. El número de protones consumidos y la alcalinidad generada depende del donador de electores, como ejemplo se cita al acetato, lactato, propionato e hidrógeno (Drury, 1999):

Ec. (6)

Ec. (7)

Ec. (8)

Ec. (9)

Las ecuaciones 6-9 describen la neutralización de 2 a 3 equivalente de acidez por mol de sulfato reducido, las reacciones están escritas para un pH de 6-7, en condiciones de pH <5.5 no se genera bicarbonato, sino CO_2 , pero de igual manera de consumen protones y se eleva el pH (Drury, 1999).

7.5 Diseño factorial para la optimización de la fuente de carbono para BSR

Se ha reportado la importancia de la relación DQO:Sulfato para el tratamiento de drenajes ácidos de mina y por tanto se ajustó las concentraciones necesarias de la materia orgánica a emplear en el tratamiento del DAM.

La tabla 13 muestra que los experimentos 19-25 tuvieron las más altas producciones de sulfuro de hidrogeno (>338 mg/L), en comparación a las más bajas alcanzadas por los experimentos 2-9 (<80 mg/L) y un intermedio (80 mg/L< H_2S <338 mg/L) que contempla a los restantes experimentos menos el control (experimento 1), éstos valores coinciden con el incremento en la cantidad de papel bond en el medio de cultivo.

Por otro lado, observando las tasas de disminución de sulfato, éstas no muestran una gran diferencia entre ellas como en el caso de la producción de H_2S y tampoco (por simple análisis) se puede relacionar directamente con la presencia o cantidad de ninguno de los 3 sustratos seleccionados. Las más altas tasas de reducción de sulfatos fueron alcanzados en los experimentos 20-26 (104< tasa de reducción de sulfato <162).

Tabla 13. Diseño factorial de 3 fuentes de carbono, producción de sulfuro y tasa de remoción reducción de sulfato

Exp.	Papel (g/L)	Mezcla de Frutas (g/L)	Cascarilla de arroz (g/L)	Producción de H ₂ S (mg/L)	Tasa de remoción de sulfatos (mg·L ⁻¹ ·día ⁻¹)	DQO:SO ₄ X:1
1	0	0	0	9.89	0.1073	9.794:1
2	0	3.75	0	12.67	97.528	39.177:1
3	0	15	0	38.33	116.4	9.7944:1
4	0	0	3.03	67	116.44	19.588:1
5	0	3.75	3.03	42.89	106.98	48.972:1
6	0	15	3.03	70.89	107.73	39.177:1
7	0	0	12.12	84.11	55.191	48.972:1
8	0	3.75	12.12	59.67	97.95	88.149:1
9	10	15	12.12	78.78	109.83	9.794:1
10	10	0	0	153.89	96.322	19.588:1
11	10	3.75	0	213.78	62.417	48.972:1
12	10	15	0	274.89	115.55	19.589:1
13	10	0	3.03	337.67	121.86	29.383:1
14	10	3.75	3.03	277.44	50.47	58.766:1
15	10	15	3.03	300.89	21.252	48.972:1
16	10	0	12.12	309.56	118.68	58.766:1
17	10	3.75	12.12	233	69.897	88.149:1
18	10	15	12.12	146.33	103.09	39.177:1
19	40	0	0	414.22	31.549	48.972:1
20	40	3.75	0	338.67	122.58	78.355:1
21	40	15	0	412	117.64	48.972:1
22	40	0	3.03	426.56	162.11	58.766:1
23	40	3.75	3.03	415.22	104.01	88.149:1
24	40	15	3.03	366.11	158.96	78.355:1
25	40	0	12.12	363.44	162.11	88.150:1
26	40	3.75	12.12	287.56	150.45	117.533:1
27	40	15	12.12	236.78	34.844	9.794:1

^aRepresenta al valor máximo producido en 30 días

^bCalculado a partir de las pendientes de la disminución concentración de sulfato en función al tiempo

^cRelación DQO:sulfato expresado en gramos por litro (g/L), es decir: DQO (g/L): 1g/L Sulfato

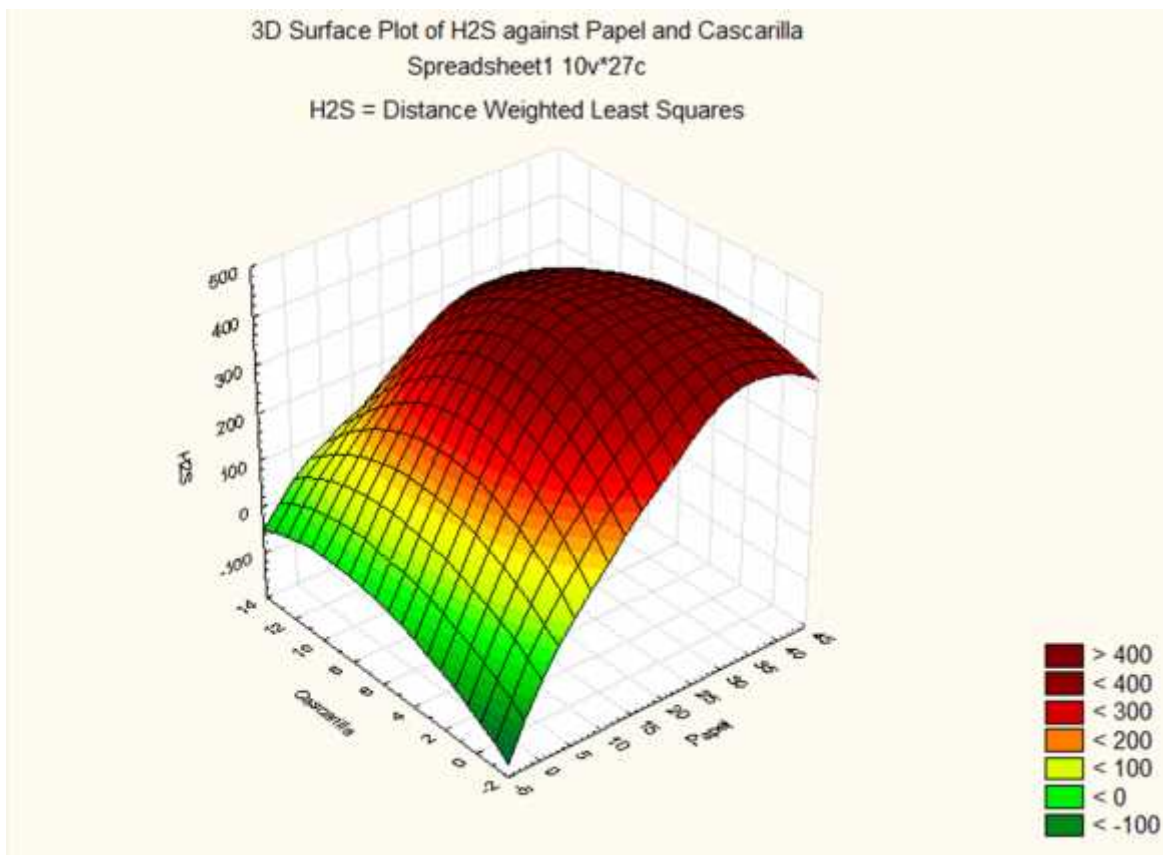
Para evaluar el efecto de la presencia de un solo sustrato (con los 3 niveles), también fueron incluidos experimentos con una sola fuente de carbono existente. Para el caso del papel bond, fueron los experimentos 10 y 19 con 10g/L y 40 g/L, respectivamente; si por un lado el H₂S fue mayor al subir la concentración de papel (153.89 mg/L y 414.22 mg/L), las tasa de reducción ($96.322\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ y $31.459\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$) de sulfato disminuyó.

En el caso de la mezcla de frutas, lo experimentos 2 y 3 tuvieron 3.75 g/L y 15 g/L, respectivamente. La producción de sulfuro fue baja en ambos (12.67mg/L y 38.33 mg/L) pero si aumentó al aumentar la concentración, lo propio ocurrió con la tasa de reducción de sulfato siendo relativamente altas ($97.528\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ y $116.4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$), en este caso si se cumple el principio de que a mayor cantidad de donador de electrones, mayor reducción de sulfato y por tanto, mayor sulfuro se producirá como producto de la reducción.

Por último, para la cascarilla de arroz, los experimentos 4 y 7 contienen 3.03 g/L y 12.12 g/L, respectivamente. La producción de sulfuro aumentó con una mayor concentración del sustrato, pero al igual que en el caso del papel bond, la tasa de reducción de sulfato disminuyó ($116.44\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ y $55.191\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$). Al parecer, sustratos celulósicos al no contener una fuente directa de ácidos grasos volátiles, al aumentar su concentración la reducción de sulfato se ve inhibida (Dvorak et al., 1992).

Adicionalmente al análisis mencionado, se realizó un análisis estadístico de análisis de varianza multivariado (MANOVA), en función a las variables dependientes (producción de sulfuro de hidrógeno y tasa de reducción de sulfato) junto a gráficas de superficie de respuesta. Para el primer caso, en función a la producción de sulfuro de hidrógeno, el papel tuvo significancia ($p < 0.05$, $7.47 \cdot 10^{-5}$) no así para el caso de fruta o cascarilla de arroz, con valores de p de 0.436 y 0.233, respectivamente. En el análisis en función a la velocidad de disminución de sulfato en el tiempo, el intercepto (papel, fruta y cascarilla) tiene alta significancia en la reducción de sulfato ($p < 0.05$, $p = 0.00281$). Este análisis refuerza los resultados descritos en los párrafos anteriores. Detalles del análisis pueden ser encontrados en el Anexo 7.

Gráfica 5. Superficie de respuesta para la producción de sulfuro de hidrogeno del diseño factorial



La gráfica 5 muestra la superficie de respuesta para la producción de H₂S, donde se observa la respuesta de la formación de sulfuro de hidrogeno a las crecientes concentraciones de cascarilla de arroz y papel bond en el medio de cultivo. La variable

que tiene mayor influencia en la cantidad de sulfuro producido es el papel bond, a medida que aumenta la concentración en el medio, también lo hace el sulfuro de hidrogeno. Sin embargo, para el caso de la cascarilla de arroz, a bajas como altas concentraciones, la producción de sulfuro de hidrogeno es baja. El pico máximo de producción parece ser a medianas concentraciones de cascarilla y papel.



Foto 1 y 2. Cultivos en batch de BSR. Experimento 21,22 y 23 del diseño factorial

En las fotos 1 y 2 se observa el crecimiento de las bacterias con las 3 diferentes fuentes de carbono. De manera cualitativa, se observa al oscurecimiento del vial, debido a la formación de sulfuro y su precipitación con (en éste caso hierro) en forma de FeS. Cabe resaltar que el papel y la cascarilla de arroz se almacenaron a temperatura ambiente, pero la mezcla de frutas se almacenó necesariamente a 4°C debido ya que es de fácil contaminación teniendo como consecuencia el crecimiento de hongos en el mismo.

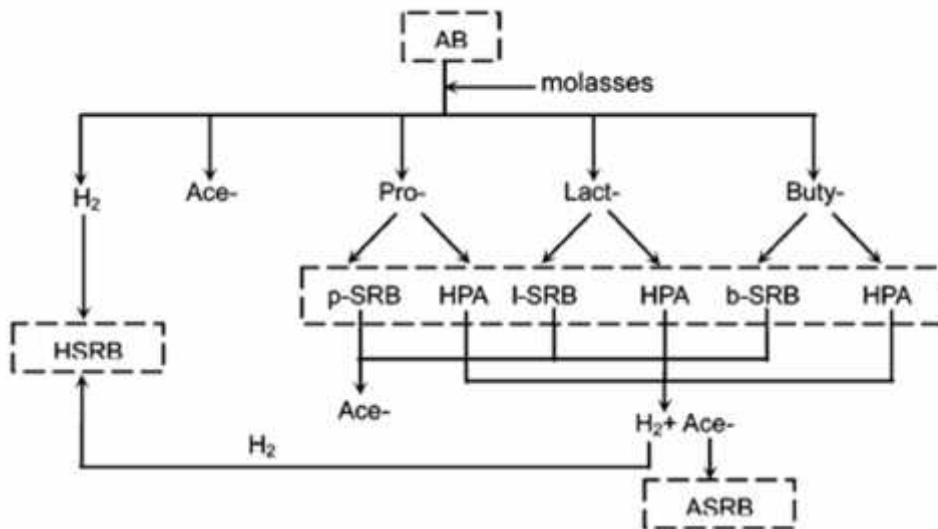
Sumando todos los análisis se eligió al experimento 22 como el que presenta las cantidades óptimas respecto a las fuentes de carbono a emplear y sus concentraciones. Si bien el experimento 25 también presenta una alta tasa de reducción de sulfato, la producción de sulfuro fue menor. Además que en el experimento 22 se emplea menor

cantidad de sustratos al que se emplean en el experimento 25, alcanzando resultados también óptimos. A partir de esta optimización, se descartó trabajar con la mezcla de frutas y con estas proporciones en las fuentes de carbono se alimentó al reactor que trató el DAM. Descartar la mezcla de frutas presenta una adecuada conveniencia en términos prácticos, al no emplearlo reduce los costos de almacenamiento del mismo.

Cabe aclarar que, inicialmente se pensó que la mezcla de frutas sería un sustrato el cual no se descartaría, sin embargo, los resultados demostraron lo contrario. La razón de éste resultado puede deberse a la composición del mismo, en la tabla 12 se mostró el detalle de algunos compuestos que fueron detectados en el filtrado de la mezcla, que se los ordenó (en términos de concentración) como: Glucosa >> ácido láctico, ácido acético > ácido butírico > glicerol. En contraste, se reportó que el acetato es comúnmente acumulado en los efluentes donde se emplea BSR y sustratos no celulósicos (Alvarez et al., 2006; Steed et al., 2000), donde además la acumulación de propionato puede ser un indicador de estrés (Steed et al., 2000). La razón de la acumulación de acetato en efluentes de este tipo de tratamiento se debe a la interacción y al co-metabolismo que existe entre las comunidades reductoras de sulfato y otras más. A pesar que se indicó que se trata de un consorcio de BSR (por la forma como se lo aisló), éstas bacterias también crecen con otros tipos de microorganismos (no reductores de sulfato), como ser bacterias acetogénicas (BAs), metanogénicas (BMs) e hidrolíticas (BHs). La fuente de ellas puede haber venido del sustrato que se empleó o del mismo consorcio sulfato reductor. Existe una relación entre ellas que es muy importante mencionar, la cual se presenta en la figura 16. Se conoce que el sustrato de elección es el hidrógeno, probablemente porque la enzima hidrogenasa que está en el citoplasma y el K_s para este sustrato es más bajo que para otros (Kristjansson, Schönheit, & Thauer, 1982). Este es generado por las BAs, que además generan los ácidos grasos volátiles (AGVs), éstos últimos pueden ser empleados por las BSR que consumen AGVs o los acetógenos productores de hidrógeno (APHs), cuyo resultado es acetato e hidrogeno. Estas dos fuentes de hidrógeno sirven de sustrato de BSR consumidoras de hidrógeno, lo cual explica por qué el acetato es acumulado (Ren, Chua, Chan, Tsang, & Sin, 2007).

En el presente caso, la glucosa no es un compuesto de elección para BSR, pero si lo es el lactato, y, habiendo acetato en similar concentración, las bacterias pueden haber empleado el lactato y luego butirato, generando más acetato del que ya había presente. Pocas especies de bacterias pueden metabolizar el acetato (Ejemplo: *Desulfobacter halotolerans*, (Lens, Vallerol, Esposito, & Zandvoort, 2002)), por lo cual hubo crecimiento, pero solo hasta donde la depleción de donadores de electrones lo permitió.

Figura 16. Relación de bacterias acetógenas y sulfato reductoras



AB: Bacterias acetógenas; molasses: melazas; Ace-: Acetato; Pro-: Propionato; Lact-: Lactato y Buty-: Butirato. HSRB: Bacterias sulfato reductoras consumidoras de hidrógeno. P-SRB, I-SRB y b-SRB, BSR que consumen propionato, lactato y butirato, respectivamente. HPA: Acetógenos productores de hidrógeno y finalmente, ASRB: BSR consumidoras de acetato (Ren et al., 2007).

Adicionalmente y con respecto a la relación DQO: SO₄²⁻, otros estudio ha reportado también la importancia de la optimización de la relación DQO:N:P a 500:5:1 (Ren et al., 2007), donde se ha observado que a medida que la relación aumenta existe mayor porcentaje de remoción de sulfato. En otro estudio al aumentar la relación DQO:sulfato también repercutió en la prevalencia de las comunidades de BSR y BMs proliferando más las últimas, pero al aumentar la materia orgánica la remoción de sulfato también

fue mayor (Shayegan et al., 2005). Otro caso, probó tasas de 40:1 y 8:1, la materia orgánica estaba compuesta de sacarosa y peptona (Barber & Stuckey, 2000).

Los estudios donde se emplearon sustratos no-celulósicos presentaron altos niveles de DQO y STD en sus efluentes, por lo cual su ausencia tiene la ventaja de la omisión de un post-tratamiento de efluentes con altos valores de DQO (Sarti et al., 2009). La Ley del medio ambiente en Bolivia (anexo 3) tiene como límites (clase D): 12 mg N total/L y 0.1mg P-ortofosfato/L de nitrógeno total y fósforo total para cuerpos receptores, respectivamente. La tabla 12 muestra que la mezcla de frutas tenía 460 mg N/L y 119 mg P-PO₄/L, por lo que es muy probable que los efluentes de nuestro tratamiento hubieran presentado elevadas concentraciones de P y N de haber continuado trabajado con este sustrato. Comparando con un estudio piloto, éste presentó elevada cantidad de P y N en sus efluentes, y tuvo como consecuencia el crecimiento de bacterias y algas en aquellas zonas donde fue descargado el efluente (Degens, 2012).

Una vez optimizada la relación DQO:Sulfato, se partió a establecer los reactores empleando la respectiva carga orgánica para iniciar el tratamiento de DAM. Los resultados del tratamiento del DAM se muestran en la siguiente sección.

7.6 Tratamiento de DAM

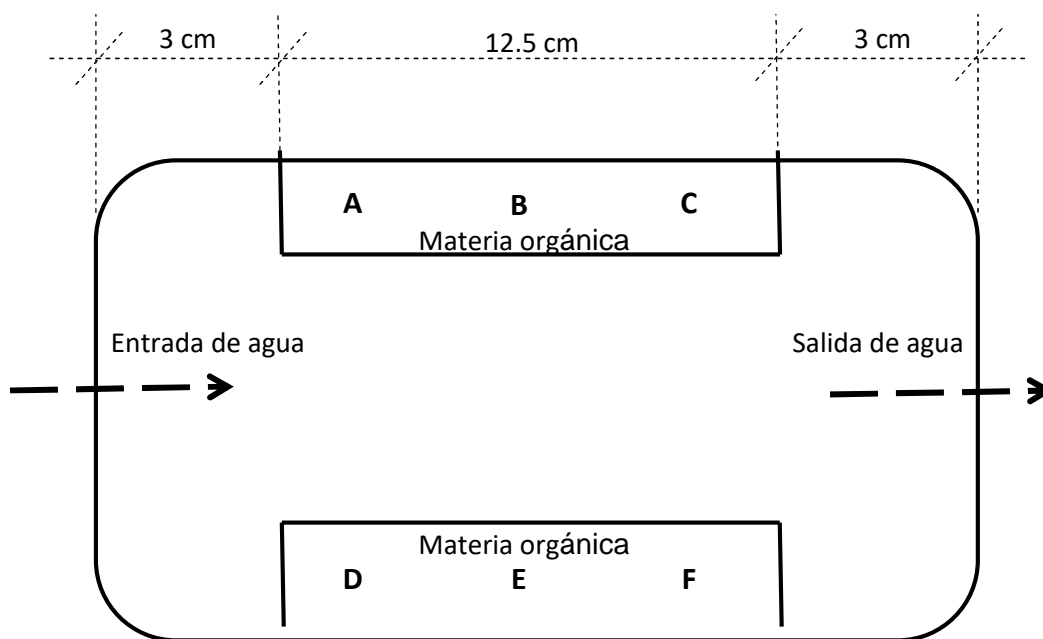
7.6.1 Tratamiento DAM recambio 70 % de volumen efectivo y tiempo de retención de 12 horas

Ésta fue la primera prueba de tratamiento de DAM (ver composición en Tabla 6), donde se intercambió el 70% del volumen efectivo del reactor cada 12 horas. De ahora en adelante se hará referencia a esta sección como 1ra prueba de DAM. El 70% del volumen corresponde a 680 mL que equivale a un carga de sulfato por día (del inglés *sulfate loading rate*, SLR) de 11.7 g SO₄/L-día, que fue bombeado al reactor mediante bombas peristálticas durante media hora a un flujo de 22.7 mL/min. Previamente al 1er día de análisis, se hizo un recambio del agua 24 horas antes para retirar el agua del reactor, el cual no fue analizado. Se preparó la materia orgánica en 6 paquetes que fueron depositados 3 en dos lados paralelos del reactor como lo indica la figura 17. El flujo mencionado fue empleado también para extraer el agua del reactor BSR (R-BSR)

hacia la piscina de precipitación 1 (PP1), así como también para alimentar al reactor BHR (R-BHR), y extraer de éste último el agua finalmente tratada a la piscina de precipitación 2 (PP2).

En contraste, las cargas de sulfato por día de otros estudios fueron: 5.3 g $\text{SO}_4/\text{L-día}$ (Alvarez et al., 2006), en otro caso fue entre 2.11-6.35 g $\text{SO}_4/\text{L-día}$ (Hammack et al., 1998) que en comparación al presente trabajo, fueron 2-5 veces menos.

Figura 17. Vista plano superior del reactor R-BSR. Ubicación de la materia orgánica sólida en reactor



Las letras A-F representan los 6 paquetes de papel y cascarilla de arroz

La Tabla 14 y la gráfica 6 muestran los resultados de la 1ra prueba de tratamiento de DAM. Los datos corresponden a los puntos de toma de muestra (TM) que fueron especificados en la figura 14 de la sección Materiales y métodos. El porcentaje de remoción de sulfato medido a la salida del reactor R-BSR fue disminuyendo al pasar los días teniendo como máximo 56% el día 2 y el más bajo, 31% el día 7 (último día de monitoreo y la razón por la cual se detuvo el tratamiento en ese momento). Las

cantidades detectadas de sulfuro eran menores al límite de detección que puede atribuirse al pH ó a la sensibilidad del método empleado. Debido a que los recambios de agua tenían un intervalo de 12 horas, no se midió el tiempo de sedimentación de los precipitados de sulfuros metálicos, ya que 12 horas fue tiempo suficiente para que los sulfuros insolubles sedimenten, la muestra de PP1 fue tomada en el momento donde se realizó el recambio de agua en el reactor.

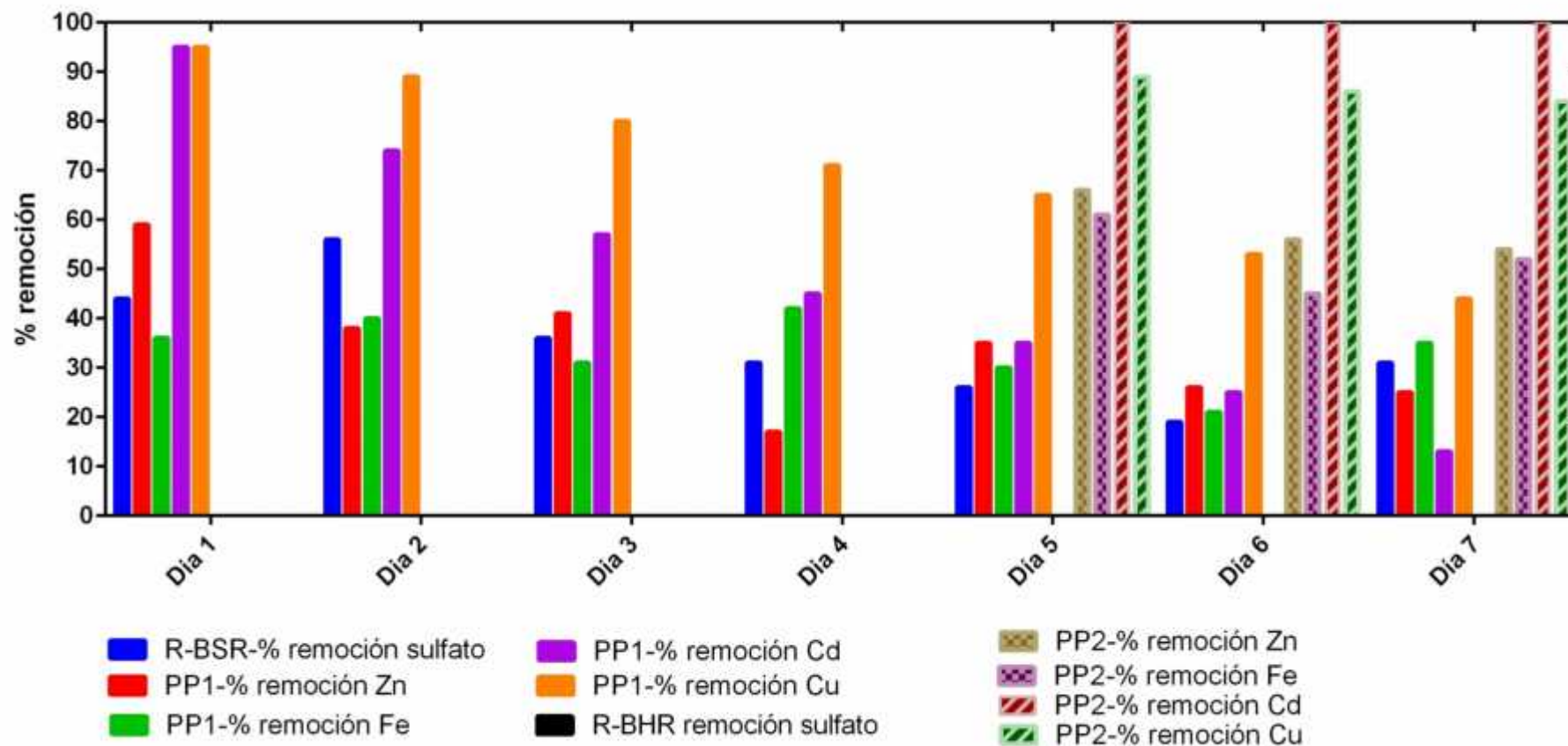
Tabla 14. Resultados 1ra prueba de tratamiento de DAM con 70% volumen de recambio cada 12 horas

Día	Reactor BSR ^a				Piscina de Precipitación 1												
	H ₂ S mg/L	Sulfatos mg/L	% Rm sulfatos	DQO (gO ₂ /L)	Metales										DQO (gO ₂ /L)	Sulfatos mg/L	pH
					Zn		Fe				Cd		Cu				
					mg/L	% Rm	mg/L	% Rm	% Fe(II)	% Fe(III)	mg/L	% Rm	mg/L	% Rm			
1	<7	9351.6± 490	44	292.7	2742	59	1884	36	88	12	1.462	95	0.34	95	292.68	9351.6 ± 490	4.76
2	<7	7432.7±493	56	409.7	4114	38	1753	40	85	15	7.044	74	0.78	89	234.14	4973.7 ± 644	3.85
3	<7	10624 ± 212	36	234.1	3950	41	2014	31	91	9	11.53	57	1.41	80	760.97	7618.5 ± 366	3.53
4	<7	11468.9 ± 1394	31	234.14	5510	17	1713	42	91	9	14.71	45	2.09	71	702.43	9111.9 ± 239	3.46
5	<7	12299.07± 1743	26	58.5	4322	35	2064	30	89	11	17.51	35	2.54	65		10787 ± 835	3.36
6	<7	13500.5±1745	19	526.8	4906	26	2326	21	92	8	20.28	25	3.40	53	409.75	10321 ± 827	3.35
7	<7	11542.3±1670	31	468.3	4978	25	1900	35	89	11	23.46	13	4.00	44	585.36	9024.2 ± 246	3.25
8	<7	11596 ±867	31	58.5													

^a Los datos corresponden a la muestra tomada de la salida del reactor BSR ó BHR. Rm: Remoción (para cada caso respectivo). Los % de remoción fueron calculados en función a las concentraciones iniciales de DAM de la tabla 6 (Continúa abajo)

Día	Reactor BHR ^a				Piscina de Precipitación 2													
	H ₂ S mg/L	Sulfatos mg/L	% Rm sulfatos	DQO (gO ₂ /L)	Metales										DQO (gO ₂ /L)	Sulfatos mg/L	% Rm sulfatos	pH
					Zn		Fe				Cd		Cu					
					mg/L	% Rm	mg/L	% Rm	% Fe(II)	% Fe(III)	mg/L	% Rm	mg/L	% Rm				
1	<7																	
2	<7																	
3	<7																	
4	<7																	
5	<7	22408 ± 168	0	995.12	2248	66	1150.4	61	95	5	0	100	0.77	89	995.1	22408 ± 168	0	4.49
6	<7	19022 ± 486	0	1287.8	2910	56	1611	45	93	7	0	100	0.97	86	1170.7	16780 ± 877	0	4.46
7	<7	18627.6 ± 374	0	819.51	3040	54	1410.6	52	92	8	0	100	1.16	84	1053.6	16713 ± 976	0	4.22

Gráfica 6. Tratamiento de DAM con 70% de recambio de volumen de reactor cada 12 horas



R-BSR: Reactor de Bacterias sulfato reductoras; R-BHR: Reactor de Bacterias hierro reductoras; PP1: Piscina de Precipitación 1; PP2: Piscina de Precipitación 2.

En PP1, los resultados indican que hubo una buena remoción de Cd y Cu, debido también a que se encuentran en bajas concentraciones. En el R-BHR, de los dos metales blanco a remover: Zn y Fe, se alcanzaron a remover 59% del primero (en el mejor de los casos), este valor fue decreciendo al pasar los días. En el caso del segundo, se alcanzó a remover un 40% en el mejor de los casos y su remoción fue fluctuante a lo largo del total de los días de tratamiento. El pH tuvo un ligero incremento en comparación al pH del DAM hasta el último día de tratamiento. El agua tratada hasta este punto fue acumulada hasta que se tuvo una altura adecuada en la PP1 para poder bombearla al R-BHR sin que los precipitados se suspendan por el movimiento del fluido al usar la bomba. Es por lo que, el R-BHR fue alimentado con el agua de PP1 el día 5 con la composición de agua del día 4 y así sucesivamente.

Para una mejor comprensión del tratamiento efectuado en el reactor R-BHR, es importante mencionar que en el DAM existe más hierro soluble (II) que hierro soluble (III), un ejemplo es el caso del río en el sudeste de Ohio (EE.UU) donde se los encontró en la proporción 95 % y 5 %, respectivamente. (Bigham, Tuovinen, Brady, & Logan, 1984). Esto se debe a que la primera constante de hidrólisis del Fe (III) es 2.2, a éste pH el hierro se hidroliza y precipita en forma de hidróxidos férricos (España, 2007), consecuentemente estos hidróxidos se polimerizan, generando la ferrihidrita ($\text{Fe}_5(\text{OH})_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) que junto a los óxidos de hierro hidratados (del inglés, *hydrous ferric oxides*, HFO) dan la coloración característica del DAM (Peretyazhko et al., 2009), además la presencia de sulfatos hace que se generen otros minerales como la goethita ($-\text{FeOOH}$) y la schwertmannita ($\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_{8-2x}(\text{SO}_4)_x \cdot n\text{H}_2\text{O}$) (Bigham et al., 1984; Peretyazhko et al., 2009).

El porcentaje presente de Fe(II) y Fe(III) en el DAM del presente trabajo fue 75 y 25, respectivamente y en la PP1 ya se observó un ligero aumento en la concentración de hierro (II), posiblemente debido al potencial redox dentro del reactor que también es un factor importante en la especiación del hierro, como se puede observar en la figura 18. Adicionalmente, la figura 19 muestra las especies iónicas de Fe(III) con sulfatos en función al pH, donde se observa que el Fe(III) soluble sólo existe en condiciones extremas de acidez ($\text{pH} < 1$).

Figura 18. Diagrama Eh-pH (potencial redox – pH) de hierro en la presencia de azufre disuelto (Bigham et al., 1984)

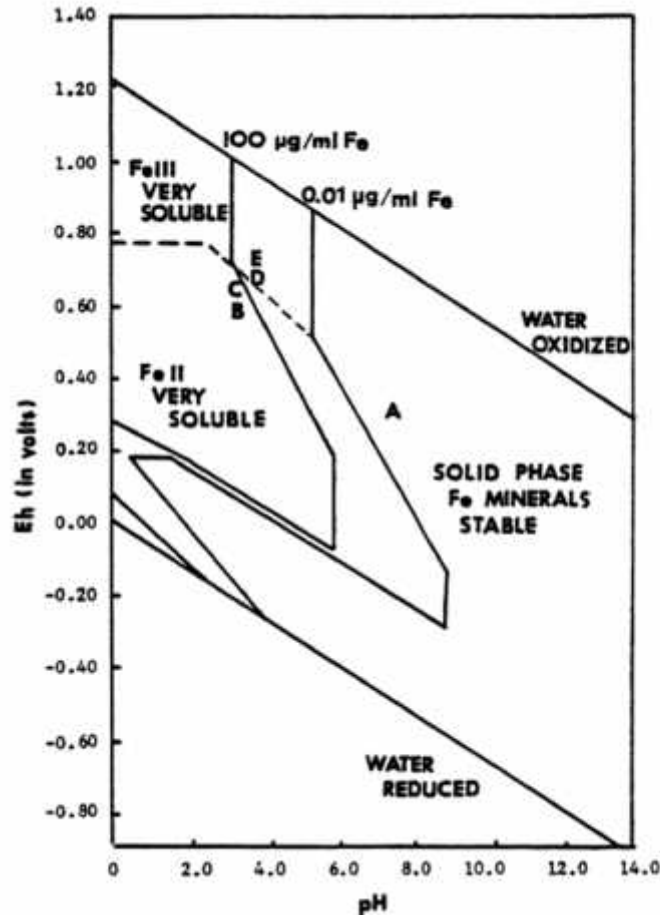
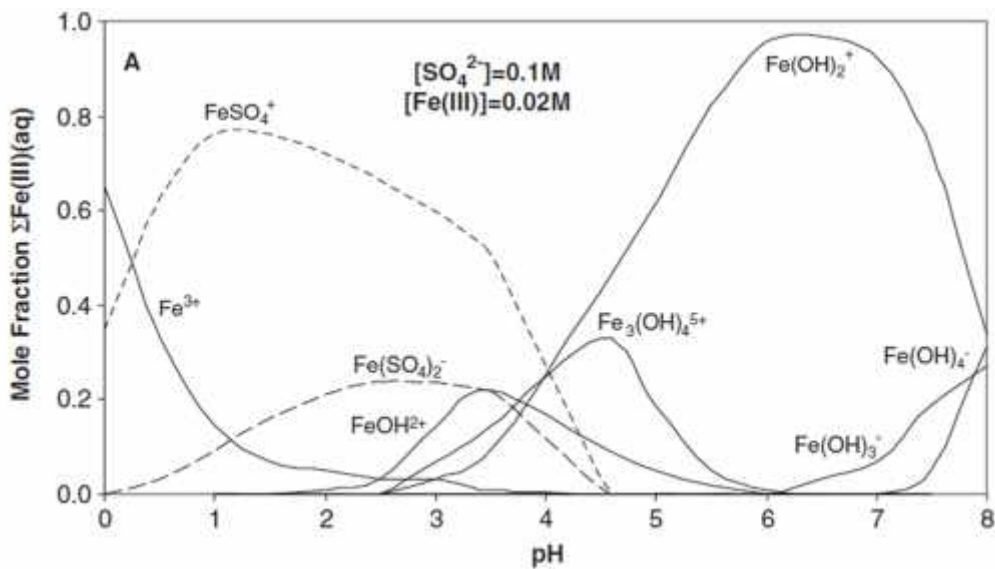
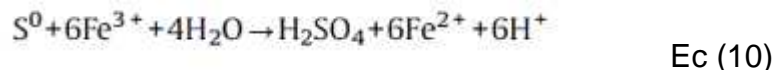


Figura 19. Especiación de Fe(III) en función al pH (España, 2007).



Según bibliografía, existen 3 tipos grandes de bacterias hierro reductoras y considerando el pH del influente que entró al reactor R-BHR, probablemente se potenció a las bacterias *Acidithiobacillus ferroxidans* (3er grupo) que pueden reducir hierro en condiciones anaerobias, empleado compuestos reducidos de azufre como aceptor de electrones, según la siguiente reacción (Wendt-Potthoff et al., 2010):



No es ideal que este tipo de bacteria predomine debido a que genera acidez, como se ve en la ecuación 10 y también sulfatos, resultados que son corroborados por los valores de remoción de sulfato en el balance general en PP2 (0%); el pH del efluente del reactor R-BHR es ligeramente más alcalino que el pH del efluente del R-BSR, por lo que sugiere que también otro grupo de hierro reductoras del género *Acidiphilium spp.* pueden haber estado presentes, éstas pueden vivir en ambientes moderadamente ácidos y al reducir el hierro (III) aumentan la alcalinidad del medio (Küsel, Dorsch, Acker, & Stackebrandt, 1999; Vile & Wieder, 1993).

Se descarta que los primeros dos grupos de bacterias hierro reductoras más conocidas hayan estado presentes: *Geobacter* y *Shewanella*, debido a que reducen hierro en condiciones de pH neutras (Wendt-Potthoff et al., 2010). Debido a que no se monitoreó las poblaciones bacterianas durante el tratamiento, no se puede afirmar lo mencionado necesita ser posteriormente estudiado.

Aun no habiéndose reducido todo el hierro férrico en R-BHR, en PP2 los porcentajes de remoción de Zn y Fe fueron mayores en términos de un balance general. Si en este caso particular, no hubo producción de H₂S, estos metales precipitaron en forma de hidróxidos y/o por el incremento del pH (Dvorak et al., 1992), parte del metabolismo de BHR y no por necesariamente por H₂S. El Cu se solubilizó debido al cambio de pH. Se ha visto anteriormente que a cambios ligeros de pH algunos metales pueden precipitar pero otros pueden disolverse haciendo que el proceso de precipitación de metales sea complejo y muy dependiente del pH (Green, Waite, Melville, & Macdonald, 2008; Sierra-Alvarez, Hollingsworth, & Zhou, 2007).

Pasando a los valores de DQO, éstos no muestran una relación directa con el resto de los parámetros. Es importante resaltar que el R-BHR no contó con alimentación adicional de fuente de carbono. Debido a que el DQO puede a ciertas concentraciones considerarse como un contaminante, se esperó que el remanente del reactor R-BSR fuera empleado por el R-BHR, sobre todo la glucosa que se ha reportado es sustrato de primera elección para el caso de *Acidiphilium* (Küsel et al., 1999). Sin embargo, los valores de DQO en el agua tratada son más altos de los que ingresaron, la razón para que aumente el DQO puede ser deberse a la cantidad de sólidos suspendidos totales (SST, indicadores de biomasa) por pérdida de biomasa del R-BSR o R-BHR, caso que ya se reportó antes (Shayegan et al., 2005).

En general, se puede observar que la eficiencia del tratamiento disminuyó al pasar los días. Muchos factores pueden influenciar en la eficiencia como ser: (a) el flujo (22.7 mL/min) que pudo haber traído dos tipos de consecuencias: a', la pérdida de biomasa del R-BSR. Para corroborar, se ha reportado que las BSR tienen pobre capacidad en formar gránulos y éstos son mucho menos densos en comparación a las BMs, entonces el lavado y pérdida de biomasa es una posibilidad. En vez de gránulos, las BSR forman flóculos que fácilmente pueden romperse a altas velocidades de flujo y en consecuencia los valores de SST en los efluentes es mayor (Shayegan et al., 2005); la segunda posible consecuencia: a'', que los precipitados de sulfuro no fueron eficientemente removidos de la superficie del soporte y hayan bloqueado el intercambio de nutrientes (Steed et al., 2000), este fenómeno se ha observado antes cuando se emplea el sulfato del mismo agua a tratar (Steed et al., 2000), donde además se empleó un clarificante para así remover los precipitados de sulfuro, sin embargo el material de empaque tuvo que ser reemplazado en un 40% para remover los precipitados. Mismo bloqueo de intercambio de nutrientes fue observado cuando se empleó arena como soporte (Utgikar et al., 2004). Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción por rayos X (XRD) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX) se detectó la formación de precipitados de Zn y Fe en la superficie de las paredes celulares de BSR de un reactor donde el soporte eran perlas de vidrio (Remoundaki et al., 2008). Adicionalmente, se ha reportado que a bajas concentraciones de metales las bacterias enlazan sus paredes celulares a metales o a sustancias poliméricas extracelulares

(Azabou, Mechichi, Patel, & Sayadi, 2007); otro factor que haya afectado a la eficiencia puede haber sido: (b) elevada carga de sulfato por día, que implica que las condiciones cambien drásticamente de un día para el otro y las bacterias entren en condiciones altas de estrés y su crecimiento sea inhibido. En otro estudio se reportó que al aumento de carga de sulfato y metales al día, la abundancia de BSR (determinada por DAPI-FISH) decreció (Kieu et al., 2011) y en es escaso, con 7.5 g $\text{SO}_4/\text{L}\cdot\text{día}$ se observó inhibición del crecimiento, previamente a este cambio, la remoción de metales fue entre el 96-100 % para Cu, Ni, Cr y Zn. Sin embargo al pasar este valor, la remoción de sulfato varió entre 46-67% (Kieu et al., 2011); finalmente, (c) el diseño de reactor pudo haber afectado creando una mala homogenización del DAM y DQO disuelto en los macro y micro espacios dentro del reactor. También pudo influenciar la naturaleza del soporte y que, al cambiar la materia orgánica el día 6, se notó que había una biopelícula adherida al papel bond. Esto indica que al hacer el recambio de materia orgánica se perdió biomasa.

Como se acaba de mencionar, hay muchos factores que pueden haber influenciado en la eficiencia del sistema de tratamiento en general. Por tal razón, con el objetivo de aún mejorar la eficiencia del tratamiento o que se prologue el tiempo de eficiencia, se re-estableció nuevamente a los dos reactores y se inició otra prueba donde el recambio fue del 30 % del volumen cada 24 horas, resultados que se muestran a continuación.

7.6.2 Tratamiento DAM recambio 30 % de volumen efectivo y tiempo de retención de 24 horas

La Tabla 15 y las grafica 7 muestran los resultados de la segunda prueba de tratamiento de DAM, de la misma manera que la anterior sección, se hará referencia a ésta como: 2da Prueba de DAM.

En este caso la carga de sulfato al día fue 5.03 g $\text{SO}_4/\text{L}\cdot\text{día}$. Se alcanzó mayores porcentajes de remoción de sulfato en R-BSR, en el mejor de los casos (días 1-3) alrededor del 70%, sin embargo fue decreciendo de igual manera que la primera vez (53% el valor más bajo), aunque se esperaba que esto ocurra, se partió con la hipótesis que al realizar un recambio de sólo el 30% se prolongaría el tiempo de eficiencia, como

esto no fue así, los resultados sugieren que además de una inhibición en el crecimiento o pérdida de biomasa, también existe una falla en el modo de operación del sistema que hizo que la eficiencia disminuya, donde tiempos de retención mayores a 24 horas son necesarios. El pH incrementó mucho más que en el primer caso, lo que permitió detectar el sulfuro de hidrógeno disuelto, y que el reactor R-BHR sea alimentado con un agua menos ácida que en la 1ra prueba de DAM. La precipitación de metales también fue mayor, para el caso del Zn, la remoción en PP1 fue del 82% en el mejor de los casos y se mantuvo relativamente constante en PP2 (~73%); el Fe tuvo una remoción del 89 % en PP1 y aumentó en PP2, sobre todo en aquellos días donde la remoción en PP1 fue baja (61%) pero en PP2 fue ~80%. Las remociones de Cd y Cu fueron entre 98-100% en ambas piscinas, una ligera solubilización de estos metales fue observada en PP2.

En lo que respecta a la eficiencia de la remoción de hierro específicamente. En PP1 luego de pasar por el reactor R-BSR se obtuvo una significativa precipitación de Fe(II) lo que se evidencia en la especiación donde se detectó 31% de Fe(II) y 69% de Fe(III) que corrobora la Ecuación 4 que indica que (en este caso) la especie férrica no precipitará como la ferrosa, sin embargo ésta figura solo se mantuvo por los dos primeros días. Las cantidades de Fe(II) y Fe(III) para el resto de los días en PP1 mostró el mismo comportamiento que en la 1ra prueba de DAM. En PP2, luego de pasar por el R-BHR el porcentaje de Fe(II) en función al total de cada día ligeramente aumentó, y a la vez existió mayor precipitación de hierro. Por último la remoción de sulfato en el balance general fue ésta vez positiva (~40%), pero cabe resaltar que aún las concentraciones de sulfato fueron mayores a las que ingresaron a R-BHR. Estos datos corroboran la posible presencia de la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* y el género *Acidiphilium* proliferaron y no los reductores de hierro neutrófilos.

En el caso de la DQO, el consumo de materia orgánica en R-BSR fue mayor que en el primer caso e indirectamente comprueba que la inhibición bacteriana no fue tan pronunciada. Aun así, las mediciones de DQO a la salida del R-BHR fueron ligeramente más altas, nuevamente debido a lisis celular ó al lavado de biomasa del R-BSR.

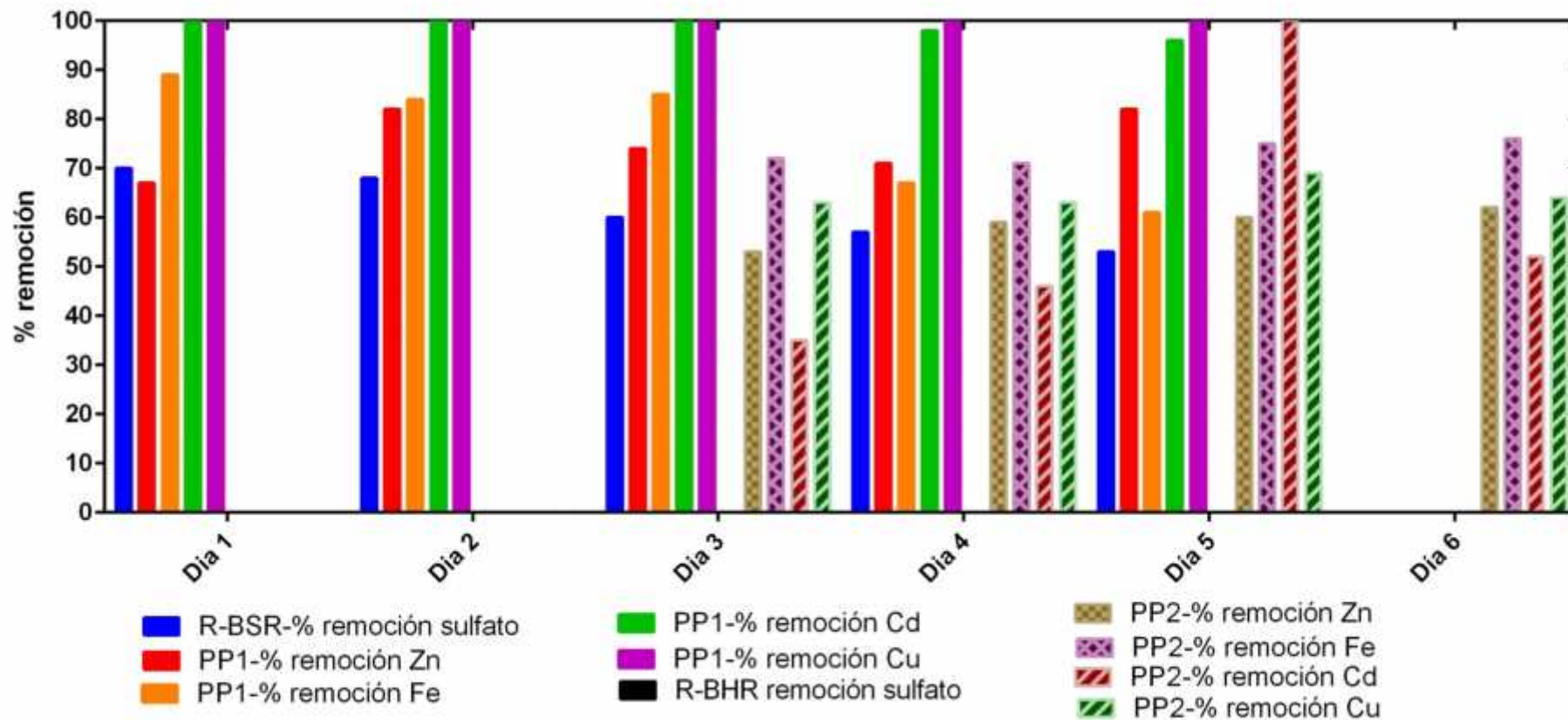
Tabla 15. Resultados 2da prueba de tratamiento de DAM con 30% volumen de recambio cada 24 horas

Día	Reactor BSR ^a				Piscina de Precipitación 1												
	H ₂ S mg/L	Sulfatos mg/L	% Rm sulfatos	DQO (gO ₂ /L)	Metales								DQO (gO ₂ /L)	Sulfatos mg/L	pH		
					Zn		Fe				Cd					Cu	
					mg/L	% Rm	mg/L	% Rm	% Fe(II)	% Fe(III)	mg/L	% Rm				mg/L	% Rm
1	17.1±0.77	5031.8 ± 460	70	125.5	2199	67	324	89	31	69	0	100	0.00	100	94.1	5031.8 ± 460	5.67
2	42.7 ± 0.3	5365 ± 637	68	188.2	1171	82	472	84	69	31	0	100	0.00	100	376.5	5209 ± 137	5.2
3	42.7 ± 1.15	6740 ± 163	60	235.2	1707	74	445	85	86	14	0	100	0.00	100	329.4	5880 ± 996	5.1
4	49.5 ± 0.4	7188 ± 236	57	266.7	1962	71	956	67	83	17	0.55	98	0.00	100	125.5	8455 ± 327	4.39
5	17.1±0.77	7809 ± 137	53	156.8	1181	82	1139	61	86	14	0.99	96	0.00	100	298.	7899 ± 266	4.35

^aLos datos corresponden a la muestra tomada de la salida del reactor BSR ó BHR. Rm: Remoción (para cada caso respectivo). Los % de remoción fueron calculados en función a las concentraciones iniciales de DAM de la tabla 6. (Continúa abajo)

Día	Reactor BHR ^a				Piscina de Precipitación 2													
	H ₂ Sm g/L	Sulfatos mg/L	% Rm sulfatos	DQO (gO ₂ /L)	Metales								DQO (gO ₂ /L)	Sulfatos mg/L	% Rm sulfatos	pH		
					Zn		Fe				Cd						Cu	
					mg/L	% Rm	mg/L	% Rm	% Fe(II)	% Fe(III)	mg/L	% Rm					mg /L	% Rm
1																		
2																		
3	13.9 ± 0.2	9819 ± 216	0	196.4	2101	68	556.9	81	88	12	0.57	98	0.7	91	196.4	9819.6 ± 216	41	4
4	52.3 ± 3.1	9658 ± 212	0	368.1	1798	73	566.4	81	89	11	0.64	98	0.6	91	310.9	10280 ± 843	39	4.2
5	55.2 ± 1.9	9386 ± 758	0	400.9	1771	73	483	84	87	13	0	100	0.2	97	417.3	8751 ± 624	48	4.12
6	79 ± 0.6	8345 ± 362	0	417.2	1709	74	463.4	84	84	16	0.88	97	0.6	92				

Gráfica 7. Tratamiento de DAM con 30% de recambio de volumen reactor cada 24 horas



R-BSR: Reactor de Bacterias sulfato reductoras; R-BHR: Reactor de Bacterias hierro reductoras; PP1: Piscina de precipitación 1; PP2: Piscina de precipitación 2

En general se pudo remover mayor cantidad de sulfatos y metales pesados, la disminución en el volumen de recambio y el tiempo de retención en el reactor sólo mejoró la eficiencia del R-BSR y R-BHR pero no que el sistema se mantenga así por más tiempo.

Contrastando con otros estudios, no se ha reportado casos de BSR acopladas a BHR a escala laboratorio, pero sí en pruebas pilotos, como ser: en Alemania se delimitó un área circular con 30 m de diámetro y se adicionó trigo y Carbokalk (un subproducto de la industria del azúcar). En los sedimentos se identificaron 3 capas, en las 3 hubo reducción de hierro férrico, pero no homogéneamente. En la 1ra y la más superficial se detectó a la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, y fue la que capa en la que menor hierro (II) se detectó, las otras dos presentaron mayor alcalinidad y se detectaron a los géneros *Sulfobacillus* (3ra capa) y *Geobacter* con *Shewanella* (2da capa), éste proceso se acopló a sulfato reducción, por tanto se observó precipitados de sulfuros metálicos en sedimentos (Porsch et al., 2009; Wendt-Potthoff et al., 2010).

Para finalizar, se optó realizar una última prueba de un sistema en el cual se pre-trató el DAM con cal, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, para poder precipitar cierta cantidad de metales y conectarlo con el sistema de tratamiento biológico. Estos resultados se muestran en la siguiente sección.

7.6.3 Tratamiento secuencial de DAM: precipitación química acoplada a precipitación biológica

El tratamiento químico consistió en la adición de cal (1.5 g/L) al DAM como pre-tratamiento químico. De la misma forma, a los resultados de ésta sección se hace referencia como 3ra prueba de DAM. Los valores de la remoción de sulfatos y los metales pesados en estudio que fueron alcanzados con el pre tratamiento químico se muestran en la tabla 16 y la gráfica 8. El metal que se precipitó en mayor cantidad fue el hierro (57%) y en el otro extremo, el cadmio (3%). Se removió sulfatos en un 35% y el pH se mantuvo en un valor al del DAM inicial.

Para este caso, el tratamiento biológico consistió en un 30% de recambio cada 24 horas empleando solamente el reactor R-BSR. La carga de sulfato por día fue 3.27 $\text{SO}_4/\text{L}\cdot\text{día}$.

El monitoreo del sistema duró 11 días y claramente se puede observar que la remoción total de sulfatos y metales es similar a la 2da prueba de tratamiento de DAM, también puede observarse que la caída en la eficiencia del sistema del tratamiento en general se observa desde el día 6, reflejado también en la caída del pH.

La eficiencia de remoción de sulfatos alcanzada por el sistema biológico en el mejor de los casos, fue el 1er día con 58 %, y el valor más bajo el día 11vo con 21 %, cabe recalcar que estos valores fueron calculados en función al total de sulfatos presentes en el agua pre-tratada. Respecto a los metales, el pre-tratamiento removió más Fe en comparación al Zn, Cd y Cu. En el caso del Zn el tratamiento biológico removió un 91 % en el mejor de los casos y 0 % en el peor; en el balance general se removió entre 32-93% de Zn, eficiencia mayor a la alcanzada por la 2da prueba de DAM. En el caso del Fe el tratamiento biológico removió un 73% en el mejor de los casos y 3% en el peor. Debido a que el pre-tratamiento ya removió un 57% de hierro del total, el aporte en remoción por el sistema de tratamiento biológico fue menor en comparación a la 2da prueba de DAM. Estos datos resaltan la importancia de las BHR en las otras dos pruebas ya descritas. El Cd y Cu fueron eficientemente removidos del DAM con valores de remoción de 95-100% y en los últimos días de tratamiento existió una ligera solubilización del Cd, que se correlaciona con una mayor acidez de agua obtenida en estos días.

Tabla 16. Resultados 3ra prueba de tratamiento de DAM: combinación tratamiento químico + biológico

Día	Pre-tratamiento químico		Reactor BSR ^a					Piscina de precipitación 1							
	Cantidad (mg/L)	% Rm _{PT} [*]	H ₂ S mg/L	Sulfatos mg/L	% Rm _{TB} ^{**} sulfatos	% Rm _T ^{***} sulfatos	DQO (gO ₂ /L)	Metales							
								Zn			Fe				
								mg/L	% Rm _{TB} ^{**}	% Rm _T ^{***}	mg/L	% Rm _{TB} ^{**}	% Rm _T ^{***}	Fe(II)	Fe(III)
1	Sulfatos:		90.3± 3.3	4573 ± 286	58	73	20	622.35	86	91	616.9	51	79	54	46
2	10892 ± 177	35	19.1± 0.2	5393 ± 363	50	68	280	464.55	89	93	527.7	58	82	51	49
3			138.6±11	5223 ± 500	52	69	80	753.45	83	89	578.4	54	80	61	39
4	Metales:		58 ± 3	5652 ± 435	48	66	420	1987.5	55	70	338.2	73	88	63	37
5	Zn: 4374 ± 12	34	9.8 ± 0.9	5920 ± 613	46	65	340	373.5	91	94	1229	3	58	53	47
6	Fe: 1261 ± 20	57	7.7 ± 1.04	7597 ± 413	30	55	220	1239.9	72	81	950.1	25	68	58	42
7	Cd: 26.12 ± 6	3	10.1± 0.4	6726 ± 561	38	60	460	1590	64	76	984.7	22	66	52	48
8	Cu: 5.52 ± 1.2	23	17.4 0.51	6784 ± 323	38	59	20	2101.5	52	68	817.3	35	72	52	48
9			10.8 ± 0.2	9133 ± 139	16	45	380	1506	66	77	980.5	22	67	60	40
10	pH: 2.3		22.2 ± 0.7	9278 ± 582	15	44	880	4495.5	0	32	902.7	28	69	57	43
11			17.7 ± 2.3	8577 ± 191	21	49	80								

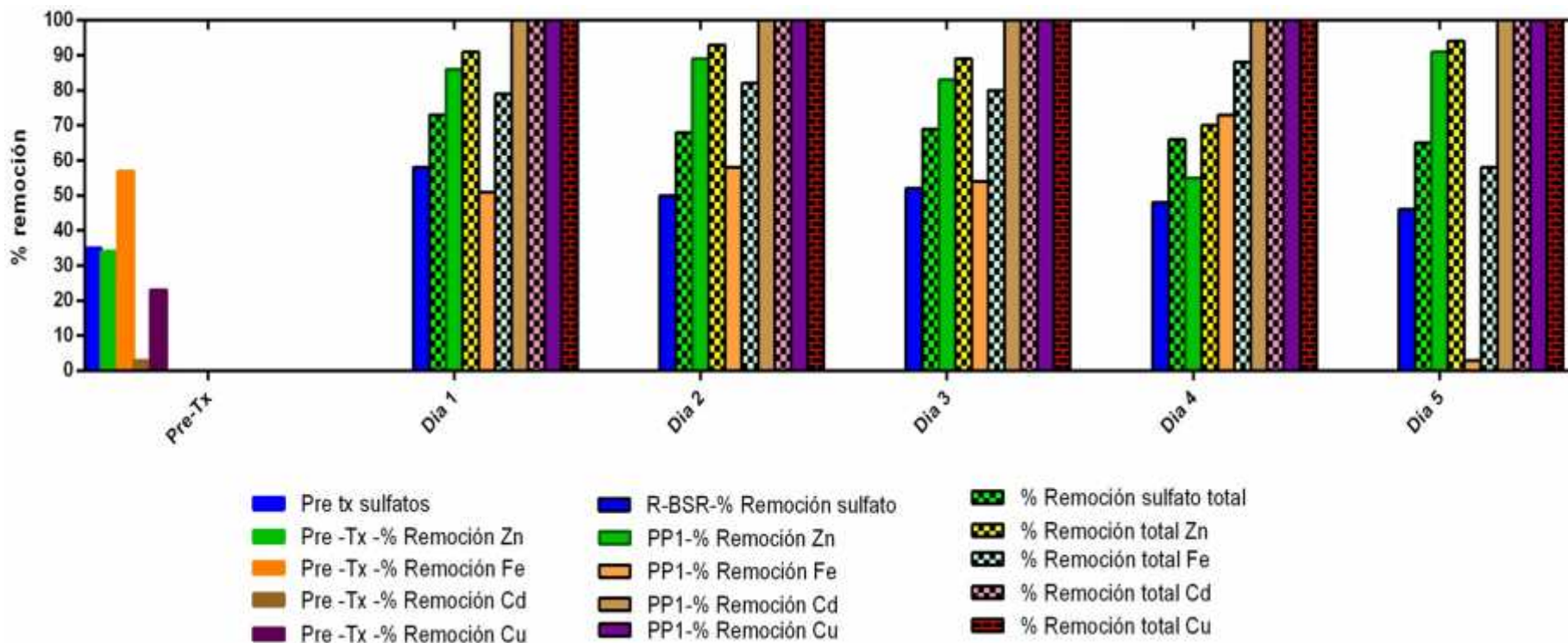
(^a) Los datos corresponden al agua de salida del reactor BSR. (*) % Rm_{PT}: Remoción alcanzada con el pre-tratamiento químico (para cada caso respectivo). (**) % Rm_{TB}: Remoción alcanzada con el tratamiento biológico calculado en función a las concentraciones del agua pre – tratada (***) Rm_T: El subíndice “T” hace referencia al porcentaje de remoción total calculado en función a las concentraciones de DAM sin tratamiento expresado en la tabla 6.

Continúa →

Día	Piscina de Precipitación 1							
	Metales						DQO (gO ₂ /L)	pH
	Cd			Cu				
	mg/L	% Rm _{TB} **	% Rm _T ***	mg/L	% Rm _{TB} **	% Rm _T ***		
1	0.052	100	100	0.00	100	100	20	4.5
2	0.072	100	100	0.00	100	100	780	4.6
3	0	100	100	0.00	100	100	860	4.2
4	0	100	100	0.00	100	100	220	4.3
5	0	100	100	0.00	100	100	280	4.6
6	0.042	100	100	0.00	100	100	220	4.4
7	0.818	97	97	0.00	100	100	460	4.16
8	0.849	97	97	0.00	100	100	120	3.77
9	0.784	97	97	0.00	100	100	40	3.49
10	1.328	95	95	0.00	100	100	260	4.5
11								

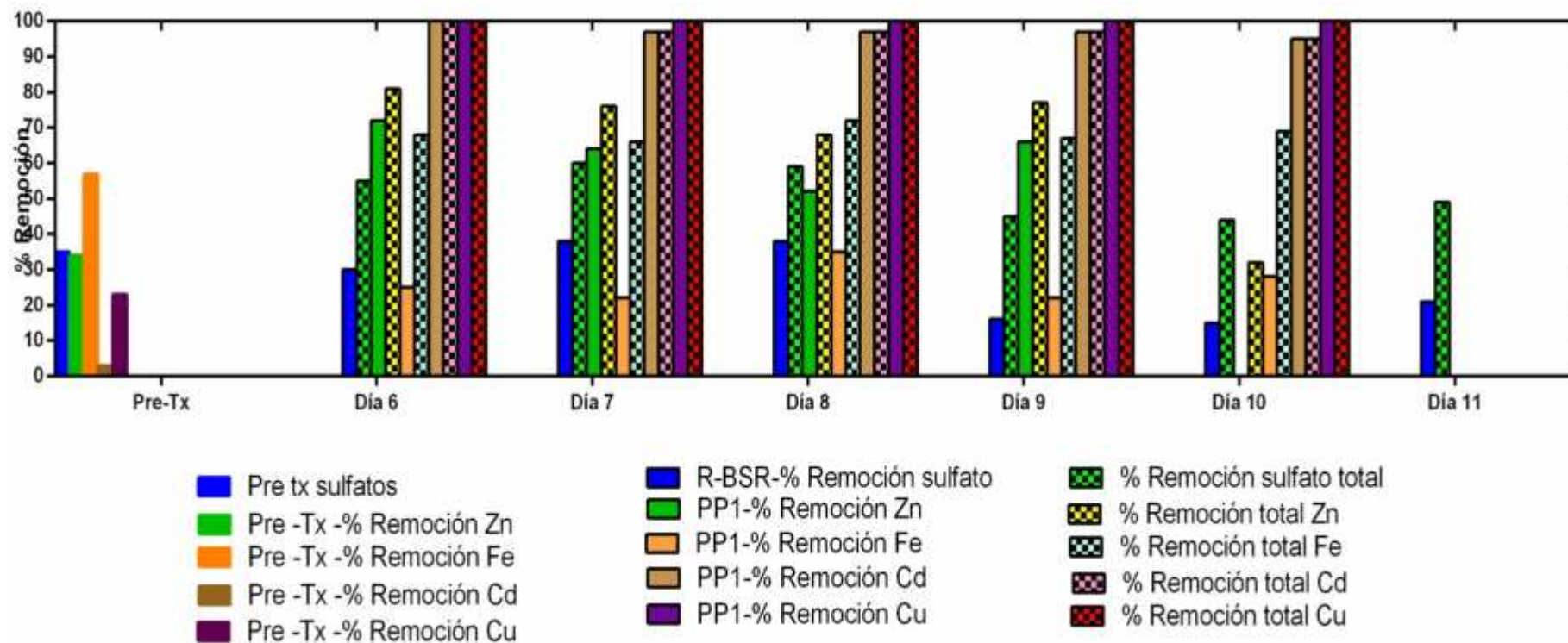
Rm: Remoción; (**) % Rm_{TB}: Remoción alcanzada con el tratamiento biológico calculado en función a las concentraciones del agua pre – tratada. (***) Rm_T: El subíndice “T” hace referencia al porcentaje de remoción total calculado en función a las concentraciones de DAM sin tratamiento (para cada caso respectivo)

Gráfica 8. Resultados 3ra prueba de tratamiento de DAM: combinación tratamiento químico + biológico (recambio 30% volumen c/24 horas)



R-BSR: Reactor de Bacterias sulfato reductoras; PP1: Piscina de Precipitación 1

Continúa →



R-BSR: Reactor Bacterias sulfato reductoras; PP1: Piscina de Precipitación 1

A continuación se detallan ciertos datos importantes de estudios de sistemas de tratamiento piloto o a escala laboratorio, donde se remedió aguas de mina y no drenajes artificiales (que generan resultados ideales). En el caso de humedales, un estudio de escala piloto duró aproximadamente dos años donde el tamaño del reactor en forma horizontal, fue de 202 m. La fuente de carbono que se empleó fue estiércol de oveja y paja de trigo, y se empleó tiempos de retención variables (desde 11 a 90 días), el pH del agua inicial fue de 3.2 pero con bajas concentraciones de hierro en comparación al trabajo actual (17 mg/L hierro). El pH fluctuó y fue dividido en dos rangos: <5.5 a >5.5 y dependiendo a este valor, los metales predominantes (Fe y Al) fueron removidos o no, los metales traza se removieron en casi 100% para todos los casos. El único metal que no se removió fue Mn. A pH<5.5 la remoción de hierro fue pobre y precipitó en las capas superficiales como hidroxisulfato o oxihidróxidos. (Degens, 2012); en otro estudio piloto, con un reactor de 42.5 L de tipo UASB, se empleó etanol como fuente de carbono y se trabajó con flujo entre 50-150 L/día y tiempos de retención de 6.9, 7.2 y 7 días. Las concentraciones iniciales fueron (mg/L): 1800 de sulfato, 13 de Cu, 0.04 de Cd, 3.5 de Zn, 49 de Fe, 21 de Mn y 63 de Al. Con el tratamiento se llegó a niveles de 250 mg/L de sulfato y todos los metales excepto el Mn, entraron en el reglamento de contaminación hídrica del lugar. El acetato se acumuló en el efluente (300 mg/L) y la carga de sulfato al día fue 3 g SO₄/L·día (Hammack et al., 1998); finalmente, otro estudio reportó el empleo de estiércol de vaca y aserrín como materia orgánica, el cual se suplementó con suero de leche por motivos comparativos. Los componentes de éste último elevaron la alcalinidad del sistema haciendo posible que la eficiencia no disminuya tan rápidamente en el tiempo como cuando este no estaba presente, fue un seguimiento de reactor a escala laboratorio por 23 meses (Drury, 1999). El Mn tampoco fue eficientemente removido y es importante mencionar que la disposición de la materia orgánica era de una manera que cubría completamente el soporte donde crecían las BSR, de manera que no haya contacto directo entre DAM y microorganismos.

Habiendo ejemplificado estos estudios, se puede concluir que la carga de sulfato en el presente trabajo por día fue más alta en comparación a los resultados ya publicados,

también que el contacto del DAM con las BSR genera “hotspots” dentro del reactor, inhibiendo el crecimiento de las bacterias, además de la pérdida de biomasa en cada recambio de agua. En las 3 pruebas de tratamiento, tras haber variado los volúmenes de recambio, el tiempo de retención y haber removido con precipitación química el metal hierro, el cual se asumía era el más inhibidor de crecimiento, la eficiencia de tratamiento de las 3 pruebas ejecutadas disminuyó de manera general entre 4to-6to día de tratamiento. Esto indica que existe una falla en el diseño del reactor respecto a la ubicación de la materia orgánica y en el modo de operación, donde mayores tiempos de retención son requeridos. Corroborando, estas afirmaciones, se ha reportado el efecto tóxico e inhibitorio de elevadas concentraciones de metales pesados en BSR influenciado por muchos factores como las propiedades fisicoquímicas el ambiente alrededor, la composición de especies de la comunidad microbiana y el diseño del reactor (Gonçalves, Da Costa, Leite, & Sant’Anna, 2007; Kieu et al., 2011).

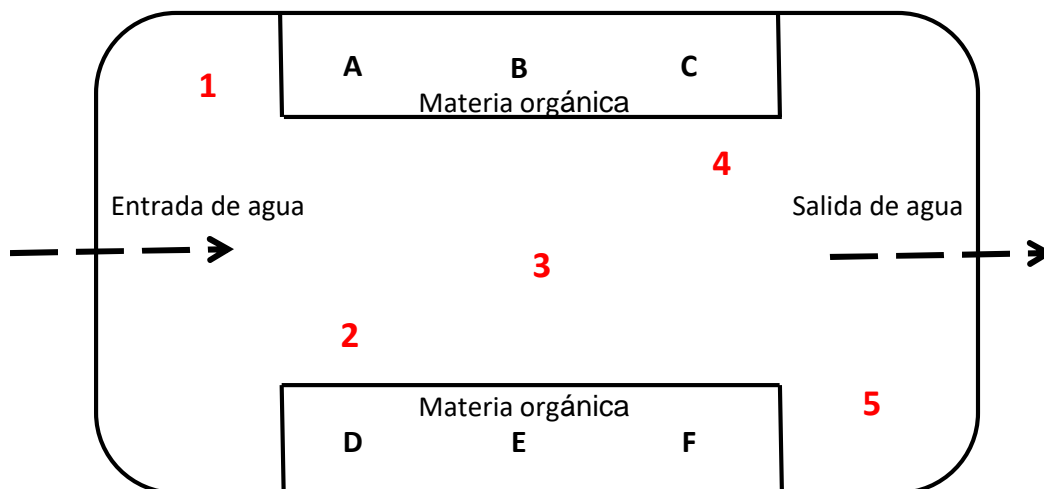
Por último y para poder confirmar esto, se evaluó la difusión de la DQO de la materia orgánica dentro del reactor mediante una prueba simple de medición de la DQO en el tiempo que se detalla a continuación.

7.7 Medición de la distribución de materia orgánica dentro del reactor BSR

7.7.1 Demanda química de oxígeno en distintos puntos del reactor

Para evaluar la difusión de la materia orgánica disuelta luego de haber depositado los 6 paquetes de materia orgánica dentro del reactor, se escogió 5 puntos de muestro dentro de un reactor abiótico, con soporte en un medio líquido ácido preparado artificialmente. Se tomó muestras en los siguientes tiempos (horas): 0, 0.5 (tiempo de llenado de reactor), 4, 7, 11 y 24. Los puntos de los cuales se tomó muestras se muestran en la figura 20. Las muestras tomadas fueron analizadas para conocer la DQO y evaluar la difusión de la materia orgánica dentro del reactor en función del tiempo.

Figura 20. Puntos de muestreo para evaluar la difusión de materia orgánica disuelta.

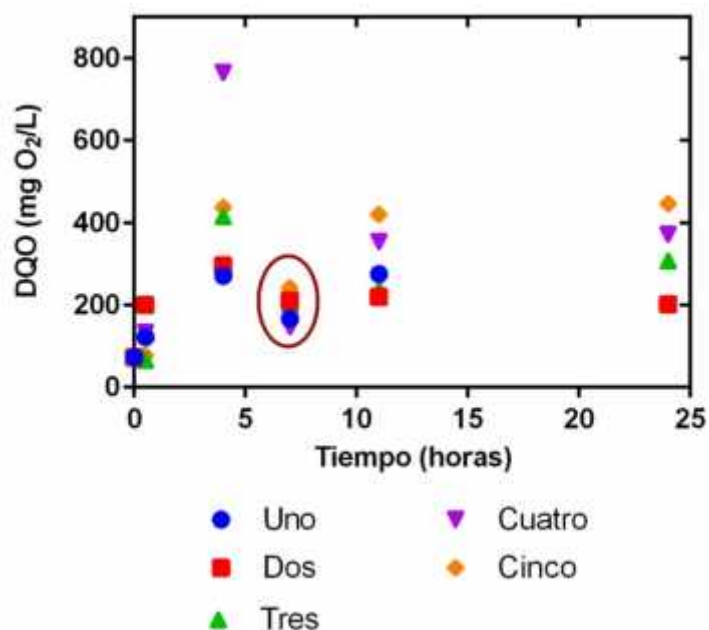


Los resultados se presentan en la tabla 17 y gráfica 9. Aproximadamente a las 7 horas, el valor de DQO fue homogéneo dentro del reactor, la figura evidencia muy claramente que tanto antes como después de éste tiempo, las bacterias no llegarían a recibir la misma cantidad de materia orgánica y por tanto, donadores de electrones. Esta prueba corrobora uno de los factores que tuvo como consecuencia la caída de la eficiencia de tratamiento en los 3 sistemas evaluados y por tanto confirma que el diseño de reactor necesita ser cuidadosamente re-diseñado.

Tabla 17. Demanda Química de oxígeno en diferentes puntos del reactor

Tiempo (horas)	DQO (mg/L) en distintas posiciones				
	1	2	3	4	5
0	0.5	122.22	200	66.7	133.3
0.5	4	271.1	295.6	415.9	764.9
4	7	166.7	211.1	202.2	146.7
7	11	275.6	220	237.9	353.3
11	24		202.2	308.9	371.1
24	0.5	122.2	200	66.7	133.3

Gráfica 9. Demanda Química de oxígeno en diferentes puntos del reactor



7.8 Detección de géneros y especies de consorcios de BSR

La detección de los géneros detectados se detalla a continuación:

Escala Cualitativa:

(++): Abundante cantidad (incontable)

(+): 20-30 bacterias

(+/-): 10 bacterias

(-): 2 bacterias

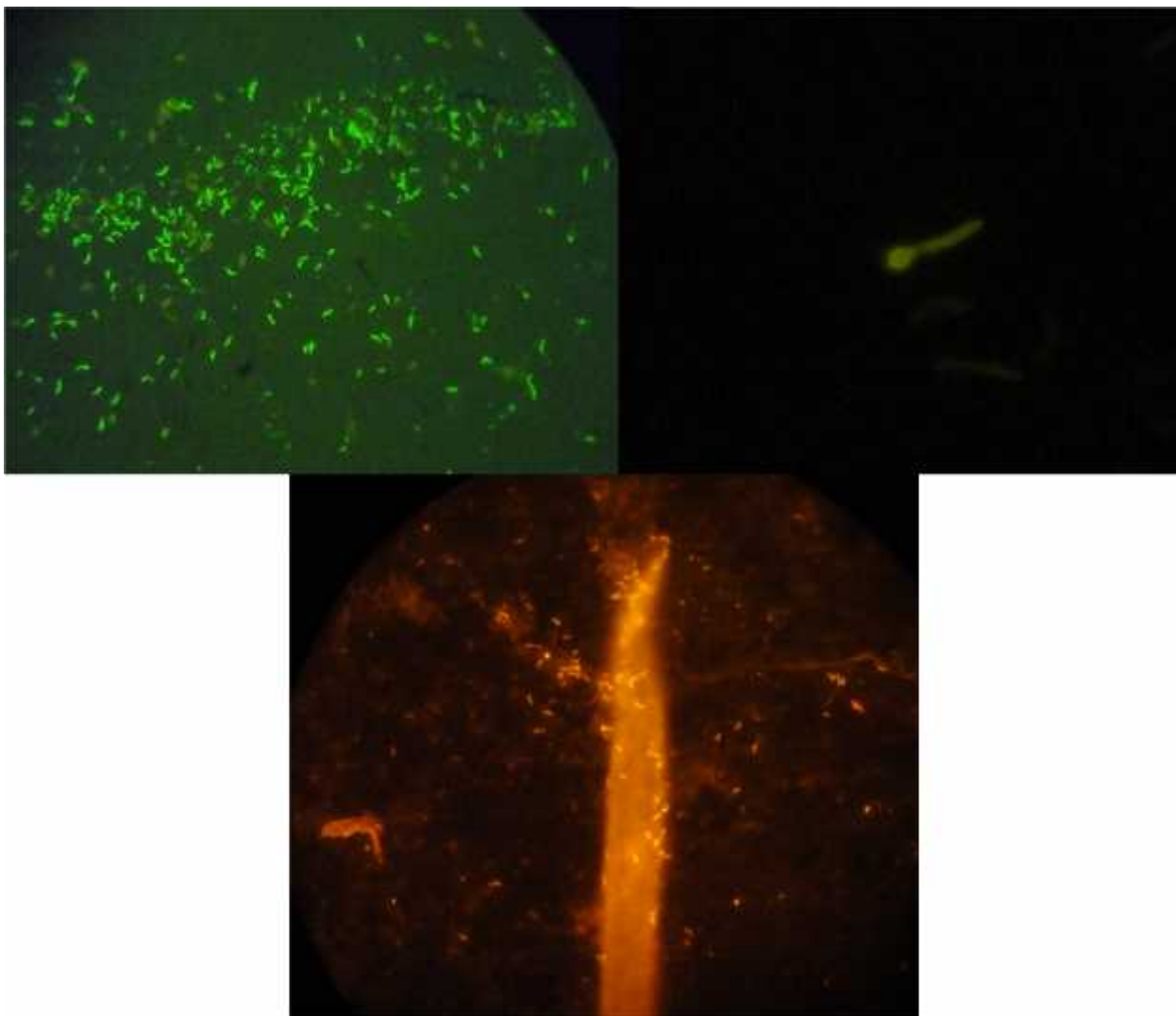
Tabla 18. Géneros de BSR detectados por FISH

Género	Calificación de acuerdo a la escala
Grupo 6. <i>Desulfovibrio spp</i>	(++)
GRUPO 3. <i>Desulfobacterium spp. Desulfobacterium vacuolatum, D. niacini, D. autotrophicum</i>	(+/-)

GRUPO 4. <i>Desulfobacter</i> spp.	(+)
GRUPO 2. <i>Desulfobulbus</i> spp.	(+)
La mayoría de <i>Desulfomicrobium</i> spp.	(+/-)
La mayoría de Desulfovibrionales y otras Bacteria	(++)
GRUPO 5. <i>Desulfosarcina</i> sp., <i>Desulfonema</i> spp., <i>Desulfococcus</i> sp., <i>Desulfobacterium</i> spp., <i>Desulfobotulus</i> sp., <i>Desulfostipes</i> sp., <i>Desulfomusa</i> sp.	(+)
<i>Desulfonema</i> spp.	(-)
<i>Desulfofrigus</i> y <i>Desulfofaba</i> spp.	(+)
<i>Desulfosarcina</i> spp, <i>Desulfococcus</i> spp	(+)
<i>Desulfobotulus sapovorans</i> y <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i>	(++)
<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> , <i>Desulfarculus baarsii</i> , <i>Desulfomonile tiedjei</i> , and <i>Syntrophus</i>	(+/-)
<i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfobacula</i> , <i>Desulfospira</i> , y <i>Desulfotignum</i>	(-)

Existe predominancia de *Desulfovibrio* spp., *Desulfobotulus sapovorans* y *Desulfovibrio fairfieldensis*. Seguidos de: *Desulfobacter* spp., *Desulfobulbus* spp., *Desulfosarcina* sp., *Desulfonema* spp., *Desulfococcus* sp., *Desulfobacterium* spp., *Desulfobotulus* sp., *Desulfostipes* sp., *Desulfomusa* sp. y *Desulfofrigus* y *Desulfofaba* spp. En contraste, en otros estudios se ha reportado a los géneros: *Desulfovibrio*, *Desulfonema*, *Desulfobacteria* y *desulfococcus* en reactores que tratan drenajes de mina (artificial en éste caso) (Ren et al., 2007). *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* y *Desulfobulbus* fueron encontrados por (Alvarez et al., 2006) para el tratamiento de DAM. Mediante la detección de la enzima sulfito reductasa codificada por el gen *dsrABse* detectó a los géneros *Desulfomicrobium*, *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus* y a la bacteria *Desulfobacter postgatei*. (Remoundaki et al., 2008)

En comparación, los géneros y especies: *Desulfobotulus sapovorans* y *Desulfovibrio fairfieldensis* no han sido reportados en ecosistemas donde existe contaminación minera. Técnicas de mayor precisión pueden ser empleadas para la confirmación y detección de estas bacterias



Fotos 3,4 y 5. Observación de las placas FISH mediante Microscopía por fluorescencia. Cy3(color amarillo-naranja) y 6FAM (color verde)

8. CONCLUSIONES

- Se estableció procesos de bioprecipitación de metales pesados como ser: Zn, Fe, Cd y Cu y bioreducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} a escala laboratorio para el tratamiento de aguas ácidas: agua de Dique de colas y drenaje ácido de mina. La evaluación de la eficiencia de ambos procesos fue gradual, comenzando primero con el tratamiento de agua de Dique, que contiene menor cantidad de metales y

sulfatos con la que a la vez se eligió el mejor modo de operación de reactor. Luego, se procedió a tratar el drenaje ácido de mina, el cual tenía significativamente altas concentraciones de metales (Fe y Zn) y sulfatos. Se evidenció que el estrés de las condiciones ácidas y el diseño del reactor (ubicación de la materia orgánica y tiempo de retención), tuvo como consecuencia una corta duración de la eficiencia del tratamiento. En el primer y segundo caso del tratamiento de DAM, donde se empleó BSR y BHR, el tratamiento con BHR aumentó las tasa de remoción de metales, no así de sulfatos (0 en el 1er caso), debido posiblemente a la proliferación de acidófilos autótrofos reductores (Ejemplo: *Acidithiobacillus ferrooxidans*) que hizo que en el efluente haya mayor sulfato del que ingresó a éste reactor. El pH alcanzó valores ~4.5 para todos los casos, pero al pasar los días de tratamiento la eficiencia de remoción de metales, sulfatos y neutralización del pH disminuyó notoriamente desde el día 4-6 dependiendo al tratamiento.

- Respecto a los dos modos de operación empleados, se empleó un sistema batch y continuo para el tratamiento de agua de Dique. El sistema batch empleó cortos tiempos de retención (12 -24 horas), y el sistema continuo empleó los siguientes flujos (mL/min): 0.72, 0.95, 1.31, se evidenció que mientras más aumentó el flujo, la eficiencia de remoción disminuyó, es por lo que se seleccionó el sistema de tratamiento batch.
- El diseño factorial del tipo y cantidad de materia orgánica seleccionada, demostró la factibilidad de emplear sustratos celulósicos (papel bond y cascarilla de arroz) sobre el no-celulósico (en éste caso una mezcla de frutas: papaya y plátano). La mezcla de frutas, a pesar que tiene ciertos ácidos grasos de interés tiene elevada cantidad de acetato que sumado al que se genera por el metabolismo de los otros, no permitió que se lo seleccione para las posteriores pruebas.
- Adicionalmente a los tratamientos de DAM con BSR y BHR, también se evaluó la conexión de un tratamiento secuencial: precipitación química conectada a un sistema de tratamiento biológico, empleando sólo BSR. El pre-tratamiento

removió sobretodo Fe (57%) y parcialmente el sulfato (35%). En la parte biológica del tratamiento, la remoción de hierro fue pobre, la única razón por la que se alcanzó valores similares al tratamiento biológico (2da prueba) fue porque el pre-tratamiento químico removió la mitad del Fe presente. Comparando el balance general de remoción se alcanzó valores de remoción que se asemejan a los alcanzados por la 2da prueba de tratamiento de DAM (30% de recambio cada 24 horas). Lo que refuerza que la presencia del R-BHR fue de alta importancia y dicho hecho se reflejará en los costos de operación en el caso de optar por el escalamiento a planta piloto en comparación a la implementación de un sistema que usa cal + BSR.

- Respecto del diseño del reactor, la difusión de la materia orgánica en términos de DQO fue evaluada y se evidenció que la distribución no-homogénea de DQO y posiblemente de DAM, creó macro y micro espacios más y menos expuestos a nutrientes y por tanto, aceptor de electrones. Esto tuvo un impacto en la eficiencia de remoción. La mecánica de fluidos dentro del reactor no fue evaluada.
- El soporte que se empleó (piedra pómez) demostró no ser el adecuado, debido a la biomasa bacteriana que se perdió durante el tratamiento.
- Finalmente, como aporte a la diversidad microbiana de nuestro país, se realizó la detección de géneros de bacterias sulfato reductoras en las que se puede resaltar: de *Desulfovibrio spp.*, *Desulfobotulus sapovorans* y *Desulfovibrio fairfieldensis*. Seguidos de: *Desulfobacter spp.*, *Desulfobulbus spp.*, *Desulfosarcina sp.*, *Desulfonema spp.*, *Desulfococcus sp.*, *Desulfobacterium spp.*, *Desulfobotulus sp.*, *Desulfostipes sp.*, *Desulfomusa sp.* y *Desulfofrigus* y *Desulfofaba spp.*

9. RECOMENDACIONES

- El presente sistema de tratamiento no logró remover sulfatos y metales hasta los límites aceptados por la Ley Boliviana del Medio Ambiente N°1333. Si bien no

resultó tener esa eficiencia para tales concentraciones iniciales de sulfatos y metales, el sistema puede ser aplicado en operaciones mineras pequeñas, como ser las operadas por cooperativas. Los valores de sulfatos y metales que éstas presentan son hasta 6-8 veces menos y la aplicación del presente sistema podría ser ideal, además que el volumen de lixiviado generado al día es mucho menor en comparación al caso de operaciones mineras como Bolívar, Colquiri y Huanuni, la primera manejada por Sinchi Wayra S.A y la segunda y tercera por Comibol, por lo que tiempos de retención más largos y el menor volumen a tratar podría traer ventajas en la aplicación de este tratamiento. Una alternativa para estas operaciones mineras grandes es contar con piscinas de acumulación para así poder optar por tiempos de retenciones mayores a 24 horas.

- Respecto al diseño y operación de los reactores, es claro que ciertas modificaciones deben ser hechas. La mecánica de fluidos del reactor debe ser evaluada así como la distribución de nutrientes y agua contaminada. Adicionalmente es necesario un diseño en el cual se evite la muerte de bacterias por los mismos sulfuros producidos dentro del reactor. Por otro lado, una alterna fuente de carbono es el suero de leche, que es un sub-producto de industrias productoras de leche en Bolivia y representa una opción importante, debido a que los mismos componentes de la leche aportan un efecto tampón a la extrema acidez de aguas acidas y además sirve de fuente de carbono. Cabe recalcar que no se debe descartar el empleo de sustratos celulósicos que pueden a la vez ser soporte de crecimiento bacteriano, también que el DAM que ingrese tenga un contacto homogéneo con las bacterias y éstas últimas con la fuente de carbono. Esa fue una de las principales fallas del presente trabajo.
- El aislamiento de bacterias sulfato reductoras debe ser cuidadosamente dirigido al aislamiento de bacterias acidófilas debido a que su tolerancia a ambientes ácidos repercute significativamente en la eficiencia de remoción. Bacterias sulfato reductoras neutrófilas que se adaptaron a pH bajos en el laboratorio no tuvieron resultados óptimos en cuanto a la disminución de sulfato en el tiempo (estos datos no fueron mostrados), las bacterias acidófilas aisladas del lugar contaminado fueron las que se emplearon para el tratamiento de DAM.

- La bioquímica de las bacterias hierro reductoras debe ser cuidadosamente evaluada: fuentes de carbono, pH óptimo, tasas de reducción de hierro, etc. Éste punto quedó pendiente, su optimización puede traer también mayores eficiencias de tratamiento. A la vez la detección de géneros y especies no ha sido determinada, solamente se determinó la reducción de Fe(III) como prueba indirecta de su presencia.
- Por último, se recomienda realizar el escalamiento a planta piloto de la 2da y 3ra prueba de DAM y análisis de costos de construcción/operación/mantenimiento para evaluar la factibilidad de su aplicación. Como datos adicionales de propuestas de escalamiento a planta piloto se tiene: 1) La construcción de una planta piloto en la Empresa minera Huanuni, con la capacidad de tratar 445500 L lixiviado/día ó 445.5 m³/día, con 3 días de tiempo de retención y la necesidad de 770 m³ de H₂S por día, además de 900 m³ medio de cultivo para iniciar operaciones en el reactor, tratamiento posterior con adsorción de metales por biomasa fúngica, contando con piscinas de precipitación, lechos de secado, desarenadores, sedimentador y un reactor de hidrólisis adicional para la obtención de ácidos grasos volátiles, tiene un costo de 1 423 847,41 Bolivianos (Alave Padilla, 2011);2) En el caso del tratamiento de aguas de la Mina Matilde se proyecta el tratamiento de 82.7 m³de lixiviado al día, un volumen reactor de BSR de 558 m³, tiempos de retención de 4 días, alimentado por ácidos grasos volátiles de un reactor hidrolítico, contando con 2 piscinas de precipitación para consumir todo el sulfuro producido tiene un costo de construcción 397346.22 Bolivianos (Agramont Carpio, 2011); 3) El tratamiento de aguas acidas de mina de la cooperativa Milluni, consiste en el tratamiento de 0.42 m³ de lixiviado/día, cuenta con un reactor hidrolítico que genera AGVs para la alimentación del reactor BSR, los lodos son tratados para la recuperación de metales por celdas electrolíticas (32.13 Kg lodo/mes) y tiene un costo de construcción, operación y mantenimiento de 1063 534.89 Bolivianos (Herrera Garay & Vargas Mercado, 2014). En contraste, el presente trabajo no emplea medio de cultivos, reactores hidrolíticos por lo que se espera que los costos de implementación sean más bajos (Sobre todo para el caso de una propuesta de la 2da prueba de DAM).

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agramont Carpio, A. C. (2011). Propuesta de un sistema de Tratamiento de Bioprecipitación de metales pesados en base a bacterias sulfato reductoras del lixiviado de la cooperativa minera Nuevo Potosi Matide Ltda. *Escuela Militar de Ingeniería "Mcal. Antonio Jose de Sucre" - La Paz - Bolivia, Trabajo de grado.*
- Alave Padilla, N. I. (2011). PROPUESTA DE UN SISTEMA DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE LIXIVIADOS DE LA PLANTA DE CONCENTRACION "SANTA ELENA" DE LA EMPRESA MINERA HUANUNI. *Escuela Militar de Ingeniería Mcal. Antonio Jose de Sucre - La Paz - Bolivia, Trabajo de Grado, 339*
- Alvarez, M., Pozzo, T., & Mattiasson, B. (2006). Enhancement of Sulphide Production in Anaerobic Packed Bed Bench-scale Biofilm Reactors by Sulphate Reducing Bacteria. *Biotechnology Letters, 28*(3), 175-181. doi: 10.1007/s10529-005-5332-7
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology, 56*(6), 1919-1925.
- APHA. (1985). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *16th edition,, Washington, D.C.*
- Azabou, S., Mechichi, T., Patel, B. K., & Sayadi, S. (2007). Isolation and characterization of a mesophilic heavy-metals-tolerant sulfate-reducing bacterium *Desulfomicrobium* sp. from an enrichment culture using phosphogypsum as a sulfate source. *Journal of Hazardous Materials, 140*(1), 264-270.
- Barber, W. P., & Stuckey, D. C. (2000). Effect of sulfate reduction on chemical oxygen demand removal in an anaerobic baffled reactor. *Water Environment Research, 593-601.*
- Barton, L. L., & Fauque, G. D. (2009). Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate - reducing bacteria. *Advances in applied microbiology, 68*, 41-98.
- Benner, S. G., Blowes, D. W., Ptacek, C. J., & Mayer, K. U. (2002). Rates of sulfate reduction and metal sulfide precipitation in a permeable reactive barrier. *Applied Geochemistry, 17*(3), 301-320. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0883-2927\(01\)00084-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0883-2927(01)00084-1)

- Bigham, J., Tuovinen, O., Brady, K., & Logan, T. (1984). Iron speciation in acid mine effluents: chemical and microbial controls: Ohio State Univ., Columbus (USA). Water Resources Center.
- Bless, D., Park, B., Nordwick, S., Zaluski, M., Joyce, H., Hiebert, R., & Clavelot, C. (2008). Operational Lessons Learned During Bioreactor Demonstrations for Acid Rock Drainage Treatment. *Mine Water and the Environment*, 27(4), 241-250. doi: 10.1007/s10230-008-0052-6
- Bocángel Jerez, D. (2007). La gestión ambiental minera en Bolivia. *Revista Virtual Redesma*, 1, 75.
- Cadorin, L., Carissimi, E., & Rubio, J. (2007). Avances en el tratamiento de aguas ácidas de minas. *Scientia et Technica*, 1(36).
- Chavez, G., & Alvarez, M. (2005). Precipitación de metales pesados con sulfuro de hidrógeno biogénico producido a partir de la degradación anaerobia de material celulósico y xilanósico. *Universidad Mayor de San Andrés, Instituto de Investigaciones Farmacobiocómicas*.
- Conca, J. L., & Wright, J. (2006). An Apatite II permeable reactive barrier to remediate groundwater containing Zn, Pb and Cd. *Applied Geochemistry*, 21(8), 1288-1300. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.06.008>
- Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 4(1), 33-36. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012\(85\)90005-3](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012(85)90005-3)
- Crespo, C., Alvarez, M., & Gimenez, A. (2005). Biogénesis de sulfuro de hidrógeno empleando ácido grasos volátiles producidos por la hidrólisis de vegetales y frutas en descomposición. *Universidad Mayor de San Andrés. Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas*.
- Cypionka, H. (2011). Sulfate-Reducing Bacteria. In J. Reitner & V. Thiel (Eds.), *Encyclopedia of Geobiology* (pp. 853-855): Springer Netherlands.
- Daly, K., Sharp, R. J., & McCarthy, A. J. (2000). Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology (Reading, England)*, 146 (Pt 7), 1693-1705.

- Degens, B. (2012). Performance of Pilot-Scale Sulfate-Reducing Bioreactors Treating Acidic Saline Water Under Semi-Arid Conditions. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(2), 801-818. doi: 10.1007/s11270-011-0903-9
- Devereux, R., Kane, M. D., Winfrey, J., & Stahl, D. A. (1992). Genus- and Group-Specific Hybridization Probes for Determinative and Environmental Studies of Sulfate-Reducing Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(4), 601-609. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80122-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80122-0)
- Doshi, S. M. (2006). Bioremediation of acid mine drainage using sulfate-reducing bacteria. *US Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response and Office of Superfund Remediation and Technology Innovation*, 65.
- Drury, W. J. (1999). Treatment of acid mine drainage with anaerobic solid-substrate reactors. *Water Environment Research*, 1244-1250.
- Dvorak, D. H., Hedin, R. S., Edenborn, H. M., & McIntire, P. E. (1992). Treatment of metal - contaminated water using bacterial sulfate reduction: Results from pilot - scale reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(5), 609-616.
- Ebeling, J. M., Rishel, K. L., & Sibrell, P. L. (2005). Screening and evaluation of polymers as flocculation aids for the treatment of aquacultural effluents. *Aquacultural engineering*, 33(4), 235-249.
- España, J. S. (2007). The behavior of iron and aluminum in acid mine drainage: speciation, mineralogy, and environmental significance. *Thermodynamics, Solubility and Environmental Issues, Elsevier BV*, 137-150.
- Evia, J., & Morales, J. (1995). Minería y medio ambiente. *Universidad Católica Boliviana/IISEC, Documento de Trabajo*, 4, 95.
- Fredrickson, J. K., & Gorby, Y. A. (1996). Environmental processes mediated by iron-reducing bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(3), 287-294. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80032-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80032-2)
- Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*, 92(3), 407-418. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011>
- Fukui, M., Teske, A., Aßmus, B., Muyzer, G., & Widdel, F. (1999). Physiology, phylogenetic relationships, and ecology of filamentous sulfate-reducing bacteria

(genus *Desulfonema*). *Archives of Microbiology*, 172(4), 193-203. doi: 10.1007/s002030050760

Gómez Rodríguez, E. (2002). *Aislamiento y caracterización de microorganismos de aguas de minas: aplicación a la lixiviación de sulfuros complejos polimetálicos*: Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.

Gonçalves, M., Da Costa, A., Leite, S., & Sant'Anna, G. (2007). Heavy metal removal from synthetic wastewaters in an anaerobic bioreactor using stillage from ethanol distilleries as a carbon source. *Chemosphere*, 69(11), 1815-1820.

Green, R., Waite, T. D., Melville, M. D., & Macdonald, B. C. (2008). Treatment of acid sulfate soil drainage using limestone in a closed tank reactor. *Water, Air, and Soil Pollution*, 191(1-4), 319-330.

Gutierrez Rojas, A. V., Terrazas Siles, L. E., & Álvarez Aliaga, M. T. (2009). Cultivo a escala de laboratorio de bacterias sulfato reductoras acidófilas y su aplicación en procesos de biorremediación utilizadas para la precipitación de metales pesados: Lab-scale culture of acidophilic sulfate reducing bacteria and applications for heavy metal precipitation. *BIOFARBO*, 17, 1-8.

Hammack, R., De Vegt, A., & Schoeneman, A. (1998). The removal of sulfate and metals from mine waters using bacterial sulfate reduction: pilot plant results. *Mine Water and the Environment*, 17(1), 8-27.

Hashim, M. A., Mukhopadhyay, S., Sahu, J. N., & Sengupta, B. (2011). Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. *Journal of Environmental Management*, 92(10), 2355-2388. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.009>

Herrera Garay, C., & Vargas Mercado, C. (2014). Diseño de una planta piloto para el Tratamiento y recuperación de metales pesados de los drenajes ácidos de mina del Complejo Minero Milluni utilizando metodos microbiológicos y fisicoquímicos. *Universidad Mayor de San Andrés - Facultad de Ingeniería - Carrera de Ingeniería química*.

Hickey, R. F., Wu, W., Veiga, M., & Jones, R. (1991). Start-up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic treatment systems. *Water Science & Technology*, 24(8), 207-255.

Hockin, S. L., & Gadd, G. M. (2007). *Bioremediation of metals and metalloids by precipitation and cellular binding*: Cambridge University Press.

- Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *nature*, 354(6348), 56-58.
- Karunasagar, D., Arunachalam, J., Rashmi, K., Naveena Lavanya Latha, J., & Maruthi Mohan, P. (2003). Biosorption of inorganic and methyl mercury by a biosorbent from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(3), 291-295. doi: 10.1023/A:1023610425758
- Kieu, H. T. Q., Müller, E., & Horn, H. (2011). Heavy metal removal in anaerobic semi-continuous stirred tank reactors by a consortium of sulfate-reducing bacteria. *Water Research*, 45(13), 3863-3870. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.043>
- Kolmert, Å., Wikström, P., & Hallberg, K. B. (2000). A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. *Journal of Microbiological Methods*, 41(3), 179-184. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00154-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00154-8)
- Kristjansson, J. K., Schönheit, P., & Thauer, R. K. (1982). Different K_s values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. *Archives of Microbiology*, 131(3), 278-282.
- Küsel, K., Dorsch, T., Acker, G., & Stackebrandt, E. (1999). Microbial reduction of Fe (III) in acidic sediments: isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe (III) to the oxidation of glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3633-3640.
- Lens, P., Vallerol, M., Esposito, G., & Zandvoort, M. (2002). Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1(4), 311-325. doi: 10.1023/A:1023207921156
- López, E., Cuenca, A., Lafuente, S., Madrid, E., & Molina, P. (2010). El costo ecológico de la Política Minera en Huanuni y Bolívar. *Programa de Investigación Estratégica en Bolivia (PIEB)*, Oruro.
- Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., . . . Wagner, M. (2002). Oligonucleotide Microarray for 16S rRNA Gene-Based Detection of All Recognized Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5064-5081. doi: 10.1128/AEM.68.10.5064-5081.2002
- Lücker, S., Steger, D., Kjeldsen, K. U., MacGregor, B. J., Wagner, M., & Loy, A. (2007). Improved 16S rRNA-targeted probe set for analysis of sulfate-reducing bacteria

- by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 69(3), 523-528. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.009>
- Manz, W., Eisenbrecher, M., Neu, T. R., & Szewzyk, U. (1998). *Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides* (Vol. 25).
- Matlock, M. M., Henke, K. R., & Atwood, D. A. (2002). Effectiveness of commercial reagents for heavy metal removal from water with new insights for future chelate designs. *Journal of Hazardous Materials*, 92(2), 129-142.
- McCauley, C. A., O'Sullivan, A. D., Milke, M. W., Weber, P. A., & Trumm, D. A. (2009). Sulfate and metal removal in bioreactors treating acid mine drainage dominated with iron and aluminum. *Water Research*, 43(4), 961-970. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.029>
- Moter, A., & Göbel, U. B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41(2), 85-112.
- Mußmann, M., Ishii, K., Rabus, R., & Amann, R. (2005). Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environmental Microbiology*, 7(3), 405-418. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00708.x
- Muyzer, G., & Stams, A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(6), 441-454.
- Natarajan, K., Subramanian, S., & Braun, J.-J. (2006). Environmental impact of metal mining—biotechnological aspects of water pollution and remediation—an Indian experience. *Journal of Geochemical Exploration*, 88(1), 45-48.
- Peretyazhko, T., Zachara, J. M., Boily, J.-F., Xia, Y., Gassman, P. L., Arey, B. W., & Burgos, W. D. (2009). Mineralogical transformations controlling acid mine drainage chemistry. *Chemical Geology*, 262(3), 169-178.
- Pereyra, L., Hiibel, S., Riquelme, M. P., Reardon, K., & Pruden, A. (2010). Detection and quantification of functional genes of cellulose-degrading, fermentative, and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2192-2202.

- Pfennig, N., Widdel, F., & Trüper, H. G. (1981). The dissimilatory sulfate-reducing bacteria *The prokaryotes* (pp. 926-940): Springer.
- Porsch, K., Meier, J., Kleinstüber, S., & Wendt-Potthoff, K. (2009). Importance of Different Physiological Groups of Iron Reducing Microorganisms in an Acidic Mining Lake Remediation Experiment. *Microbial Ecology*, 57(4), 701-717. doi: 10.1007/s00248-009-9505-0
- Potgieter-Vermaak, S., Potgieter, J., Monama, P., & Van Grieken, R. (2006). Comparison of limestone, dolomite and fly ash as pre-treatment agents for acid mine drainage. *Minerals Engineering*, 19(5), 454-462.
- Quiroga Flores, R. (2011). AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS CAPACES DE DEGRADAR HEXADECANO Y FENANTRENO DE POZOS ABANDONADOS CON PETROLEO MEDIANTE PROCESOS AEROBIOS Y ANAEROBIOS, SANANDITA-TARIJA-BOLIVIA *Universidad Mayor de San Andrés. Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas.*
- Quiroga Flores, R., & Alvarez Aliaga, M. T. (2011). Procesos microbianos para el desarrollo y optimización de tecnologías sostenibles para el procesamiento de minerales y el tratamiento de drenajes ácidos de la mina Colquiri de la Provincia Inquisivi del Departamento de La Paz. *Proyectos concursables ASDI-SAREC. Biominería - Bioremediación.*
- Rabus, R., Fukui, M., Wilkes, H., & Widdle, F. (1996). Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3605-3613.
- Ramsing, N. B., Fossing, H., Ferdelman, T. G., Andersen, F., & Thamdrup, B. (1996). Distribution of Bacterial Populations in a Stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) Quantified by In Situ Hybridization and Related to Chemical Gradients in the Water Column. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3915-3915.
- Ravenschlag, K., Sahm, K., Knoblauch, C., Jørgensen, B. B., & Amann, R. (2000). Community Structure, Cellular rRNA Content, and Activity of Sulfate-Reducing Bacteria in Marine Arctic Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3592-3602.
- Reddy, D. H. K., & Lee, S.-M. (2013). Application of magnetic chitosan composites for the removal of toxic metal and dyes from aqueous solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 201–202(0), 68-93. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2013.10.002>

- Remoundaki, E., Kousi, P., Jouliau, C., Battaglia-Brunet, F., Hatzikioseyan, A., & Tsezos, M. (2008). Characterization, morphology and composition of biofilm and precipitates from a sulphate-reducing fixed-bed reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 153(1), 514-524.
- Ren, N.-Q., Chua, H., Chan, S.-Y., Tsang, Y.-F., & Sin, N. (2007). Effects of COD/SO₄²⁻ Ratios on an Acidogenic Sulfate-Reducing Reactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46(6), 1661-1666. doi: 10.1021/ie060589w
- Sarti, A., Côrtes, R. S., Hirasawa, J. S., Pires, E. C., & Foresti, E. (2009). Post-treatment of effluents from the sulfate reduction process by anaerobic sequencing batch biofilm reactors. *Desalination*, 237(1-3), 243-253. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2007.12.034>
- Shayegan, J., Ghavipankeh, F., & Mirjafari, P. (2005). The effect of influent COD and upward flow velocity on the behaviour of sulphate-reducing bacteria. *Process Biochemistry*, 40(7), 2305-2310.
- Sierra-Alvarez, R., Hollingsworth, J., & Zhou, M. S. (2007). Removal of copper in an integrated sulfate reducing bioreactor-crystallization reactor system. *Environmental science & technology*, 41(4), 1426-1431.
- Steed, V. S., Suidan, M. T., Gupta, M., Miyahara, T., Acheson, C. M., & Sayles, G. D. (2000). Development of a Sulfate-Reducing Biological Process to Remove Heavy Metals from Acid Mine Drainage, 530.
- Stumm, W., & Morgan, J. J. (1981). *Aquatic chemistry: an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*: John Wiley.
- Utgikar, V. P., Chaudhary, N., Koeniger, A., Tabak, H. H., Haines, J. R., & Govind, R. (2004). Toxicity of metals and metal mixtures: analysis of concentration and time dependence for zinc and copper. *Water Research*, 38(17), 3651-3658.
- Vile, M., & Wieder, R. K. (1993). Alkalinity generation by Fe(III) reduction versus sulfate reduction in wetlands constructed for acid mine drainage treatment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 69(3-4), 425-441. doi: 10.1007/BF00478175
- Viollier, E., Inglett, P. W., Hunter, K., Roychoudhury, A. N., & Van Cappellen, P. (2000). The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Applied Geochemistry*, 15(6), 785-790. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0883-2927\(99\)00097-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0883-2927(99)00097-9)

- Wendt-Potthoff, K., Bozau, E., Frömmichen, R., Meier, J., & Koschorreck, M. (2010). Microbial iron reduction during passive in situ remediation of an acidic mine pit lake mesocosm. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, 40(2), 175-181. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2009.10.003>
- Whitehead, P. G., Hall, G., Neal, C., & Prior, H. (2005). Chemical behaviour of the Wheal Jane bioremediation system. *Science of The Total Environment*, 338(1–2), 41-51. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.09.004>
- Widdel, F., & Bak, F. (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria *The prokaryotes* (pp. 3352-3378): Springer.

ANEXOS

Anexo Nro 1:

1a. MEDIO POSTGATE C MODIFICADO

<u>Composición</u>	<u>Cantidad (g/L)</u>	<u>Marca</u>
KH ₂ PO ₄	0,5	Sigma
Na ₂ SO ₄	4,5	Telchi Ltda.
NH ₄ Cl	1	Rieder de Haën
MgSO ₄	0,06	Telchi Ltda.
CaCl ₂	0,06	Sigma
FeSO ₄ ·6H ₂ O	0,001	Merck

Disolver todos los componentes y añadir 30 mL/L de la solución 4 del Medio Pfenning y 3 mL de la solución 5, ajustar el pH a 7,4. Autoclavar 15 min a 121 °C.

1b. MEDIO ANAEROBIO PFENNING

Consta de las siguientes soluciones

Solución 1:

Composición	Cantidad (g/L)
Na ₂ SO ₄ ^a (Telchi)	3
NaCl (Telchi)	1,2
KCl (Telchi)	0,3
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Telchi)	0,4
NH ₄ Cl(R. Haën)	0,3
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	0,2
CaCl ₂ ·2H ₂ O(Aldrich)	0,15

Agua destilada c.s.p 970 mL

^aSe reemplazó FeCl₃·6H₂O (Anedra) para BSR

Solución 2:

Composición	Cantidad (g/L)
FeCl ₂ · 4H ₂ O	1,5
H ₃ BO ₃	0,06
HCl (25%)	6,5 mL
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,120
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,1
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,025
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,025
ZnCl ₂	0,07
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,015

Solución 3

Composición	Cantidad (g/L)
Na ₂ SeO ₃	0,003
NaOH	0,5

Solución 4

Composición	Cantidad
NaHCO ₃ (Riedel Haën)	8,5
H ₂ O destilada	100 mL

Solución 6

Composición	Cantidad
Acetato de Sodio*	20 g
Ac. Propiónico**	7 g
Ac. Butírico**	8 g
Ac. Palmítico**	5 g
Ac. Benzoico**	5 g
H ₂ O destilada	100 mL
*J.T. Baker **Sigma-Aldrich	

Solución 7

Composición	Cantidad
Biotina*	1 mg
Acido p-aminobenzoico*	5 mg
Vitamina B ₁₂ *	5 mg
Tiamina*	10 mg
H ₂ O destilada	100 mL
*Sigma-Aldrich	

Solución 5

Composición	Cantidad
-------------	----------

L-Cys (Sigma)	0,025 g
H ₂ O destilada	100 mL

Autoclavar todas las soluciones, por separado, a 121°C durante 15 min, con excepción de la 6 y 7 que se esterilizan por filtración.

Preparar de la siguiente manera:

1. En un matraz verter 970 mL de la solución 1
2. Añadir 1mL/L de la solución 2 y 3
3. Añadir 30 mL de la solución 4
4. Añadir 10 mL de la solución 6.
5. Añadir 1 mL de la solución 5
6. Añadir 1 mL/L de la solución 7 (después de autoclavado el medio)
7. Si es necesario, ajustar el pH a 7,4

1c. Otras soluciones

A. Reactivo de Cobre: Determinación de sulfuro de hidrógeno

COMPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN	MARCA
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5 mM	Sigma
HCl	50 mM	Sigma

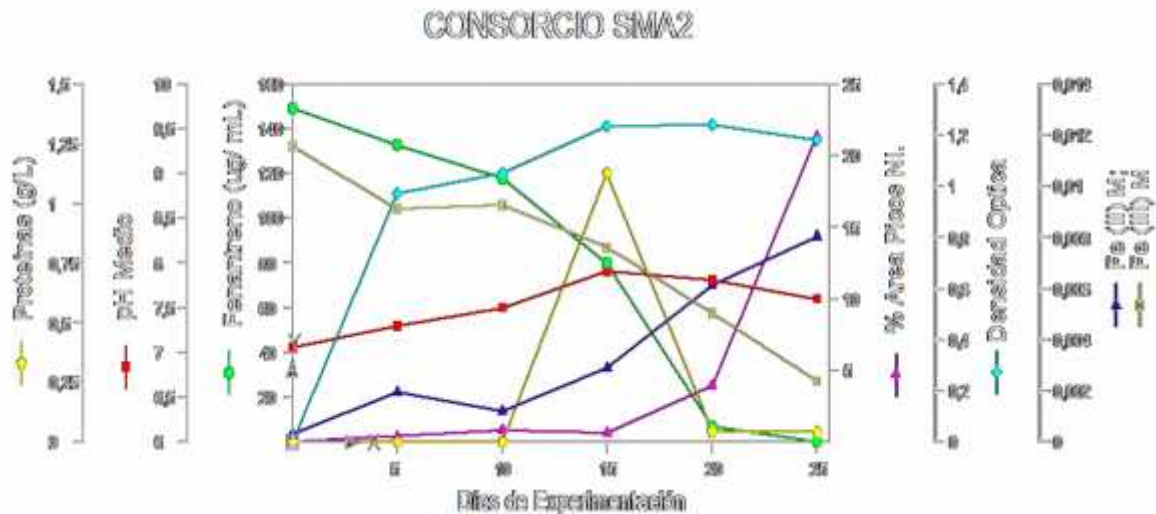
B. Reactivo Condicionante Determinación de sulfato

COMPOSICIÓN	CANTIDAD	MARCA
NaCl	150 g	Telchi Ltda.
Glicerol	100 mL	Promega
HCl conc.	100 mL	Sigma
Etanol 95 %	200 mL	Sigma
c.s.p	1000 mL	

C. Determinación de Fe(III)/Fe (II)

SOLUCIÓN	CONCENTRACIÓN	MARCA
Ferrozina	10^{-2} mM en 10^{-1} mM de Acetato de Sodio.	Sigma
Agente reductor Hidroxilamina (H ₂ NOH.HCl)	1,4 M en 2 M de HCl	Sigma
Buffer Acetato de Sodio	10 M ajustado a pH 9,5	J.T. Baker

Anexo Nro 2:



Reproducido de Quiroga Flores (2011)

Anexo Nro 3:

(Sólo incluye el capítulo 1 y los valores permisibles para cuerpos receptores y descargas)

REGLAMENTO EN MATERIA DE CONTAMINACIÓN HIDRICA

TITULO I

DISPOSICIONES GENERALES

CAPITULO I

DEL OBJETO Y AMBITO DE APLICACION

ARTICULO 1º.

La presente disposición legal reglamenta la Ley del Medio Ambiente Nº 1333 del 27 de abril de 1992 en lo referente a la prevención y control de la contaminación hídrica, en el marco del desarrollo sostenible.

ARTICULO 2º.

El presente reglamento se aplicará a toda persona natural o colectiva, pública o privada, cuyas actividades industriales, comerciales, agropecuarias, domésticas, recreativas y otras, puedan causar contaminación de cualquier recurso hídrico.

CAPITULO II

DE LAS SIGLAS Y DEFINICIONES

ARTICULO 3º.

Para efectos de este reglamento, se adopta las siguientes siglas y definiciones:

a. Siglas:

LEY: Ley del Medio Ambiente 1333, del 27 de abril de 1992.

MDSMA: Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente.

SNRNMA: Secretaría Nacional de Recursos Naturales y Medio Ambiente.

SSMA: Subsecretaría de Medio Ambiente.

DBO5: Demanda Bioquímica de Oxígeno.

DCCA: Dirección de Control de Calidad Ambiental.

DEIA:	Dirección de Evaluación de Impacto Ambiental.
DIA:	Declaratoria de Impacto Ambiental.
DQO:	Demanda Química de Oxígeno.
EEIA:	Estudio de Evaluación de Impacto Ambiental.
EIA:	Evaluación de Impacto Ambiental.
mg/l:	miligramos por litro.
OPS/OMS:	Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud.
DAA:	Declaratoria de Adecuación Ambiental.
MA:	Manifiesto Ambiental.

b. Definiciones

ACUIFERO: Estructura geológica estratigráfica sedimentaria, cuyo volumen de poros está ocupado por agua en movimiento o estática.

AGUAS NATURALES: Aquéllas cuyas propiedades originales no han sido modificadas por la actividad humana; y se clasifican en:

- a) Superficiales, como aguas de lagos, lagunas, pantanos, arroyos con aguas permanentes y/o intermitentes, ríos y sus afluentes, nevados y glaciares;
- b) Subterráneas, en estado líquido o gaseoso que afloren de forma natural o por efecto de métodos artificiales;
- c) Meteóricas o atmosféricas, que provienen de lluvias de precipitación natural o artificial.

Las aguas naturales según su salinidad se clasifican como sigue:

TIPO DE AGUA	Sólidos Disueltos Totales en mg/l
Dulce	menor a 1.500
Salobre	Desde 1.500 hasta 10.000
Salina	Desde 10.000 hasta 34.000
Marina	Desde 34.000 hasta 36.000

Hiperhalina

Desde 36.000 hasta 70.000

AGUAS RESIDUALES CRUDAS: Aguas procedentes de usos domésticos, comerciales, agropecuarios y de procesos industriales, o una combinación de ellas, sin tratamiento posterior a su uso.

AGUAS RESIDUALES TRATADAS: Aguas procesadas en plantas de tratamiento para satisfacer los requisitos de calidad en relación a la clase de cuerpo receptor a que serán descargadas.

AUTORIDAD AMBIENTAL COMPETENTE: Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, MDSMA, a nivel nacional, y la Prefectura a nivel departamental.

AREA DE DESCARGA: Área de influencia directa de la descarga de aguas residuales crudas o tratadas a un cuerpo receptor que incluye a los puntos de descarga y de dilución o al sistema de drenaje o alcantarillado.

CICLO HIDROLOGICO: Sucesión de estados físicos de las aguas naturales: evaporación, condensación, precipitación pluvial, escorrentía superficial, infiltración subterránea, depósito en cuerpos superficiales y nuevamente evaporación.

CLASIFICACION: Establecimiento del nivel de calidad existente o el nivel a ser alcanzado y/o mantenido en un cuerpo de agua.

CONDICION: Calificación del nivel de calidad presentado por un cuerpo de agua, en un determinado momento, en términos de su aptitud de uso en correspondencia a su clase.

CONTAMINACION DE AGUAS: Alteración de las propiedades físico-químicas y/o biológicas del agua por sustancias ajenas, por encima o debajo de los límites máximos o mínimos permisibles, según corresponda, de modo que produzcan daños a la salud del hombre deteriorando su bienestar o su medio ambiente.

CUENCA: Zona geográfica que contribuye con la escorrentía de las aguas pluviales hacia un cauce natural.

CUENCAS DE CURSO SUCESIVO: Cuencas que nacen en un país, cruzan su territorio y continúan su curso a través de uno o más países.

CUERPO DE AGUA: Arroyos, ríos, lagos y acuíferos, que conforman el sistema hidrográfico de una zona geográfica.

CUERPO RECEPTOR: Medio donde se descargan aguas residuales crudas o tratadas.

DBO5: Demanda Bioquímica de Oxígeno (en mg/l). Es la cantidad de oxígeno necesaria para descomponer biológicamente la materia orgánica carbonácea. Se determina en laboratorio a una temperatura de 20º C y en 5 días.

DESCARGA: Vertido de aguas residuales crudas o tratadas en un cuerpo receptor.

DQO: Demanda Química de Oxígeno (en mg/l). Cantidad de oxígeno necesario para descomponer químicamente la materia orgánica e inorgánica. Se determina en laboratorio por un proceso de digestión en un lapso de 3 horas.

EFLUENTE CONTAMINADO: Toda descarga líquida que contenga cualquier forma de materia inorgánica y/u orgánica o energía, que no cumpla los límites establecidos en el presente reglamento.

EFLUENTE INDUSTRIAL: Aguas residuales crudas o tratadas provenientes de procesos industriales.

EFLUENTES HOSPITALARIOS: Descargas de aguas residuales crudas o tratadas procedentes de hospitales, clínicas o morgues.

EFLUENTE SANITARIO: Aguas residuales crudas o tratadas provenientes del uso doméstico.

EMERGENCIA HIDRICA: Aquélla que sobreviene a consecuencia de una situación extraordinaria en la condición de un cuerpo de agua.

FANGOS O LODOS: Parte sólida que se produce, decanta o sedimenta durante el tratamiento de aguas.

INFORME DE CARACTERIZACION: Informe de un laboratorio de servicio autorizado sobre los resultados de los análisis de una muestra de agua.

LABORATORIO AUTORIZADO: Laboratorio que ha obtenido la acreditación del MDSMA para efectuar análisis físico-químicos y biológicos de las aguas naturales, aguas residuales, cuerpos receptores y otros necesarios para el control de la calidad del agua.

LIMITE PERMISIBLE: Concentración máxima o mínima permitida, según corresponda, de un elemento, compuesto o microorganismo en el agua, para preservar la salud y el bienestar humanos y el equilibrio ecológico, en concordancia con las clases establecidas.

LIXIVIADOS: Líquido resultante del proceso de disolución de los metales, por efecto de la lluvia y agentes químicos y/o biológicos.

MEDIDORES INDIRECTOS DE CAUDAL: Escalas con las que se mide el tirante del agua en el canal de sección triangular, trapezoidal o rectangular, permitiendo

definir por cálculo, mediante una fórmula hidráulica previamente establecida, el caudal correspondiente.

MONITOREO: Evaluación sistemática cualitativa y cuantitativa de la calidad del agua.

NAPA FREÁTICA: Acuífero más cercano a la superficie del suelo.

NIVEL PIEZOMETRICO: Profundidad a la que se encuentra el nivel del agua en un pozo.

ORGANISMOS SECTORIALES COMPETENTES: Ministerios vinculados con el medio ambiente que representan a sectores de la actividad nacional.

POZO PROFUNDO: Pozo excavado mecánicamente y luego entubado, del que se extrae agua en forma mecánica desde cualquier profundidad.

POZO SOMERO: Pozo de agua generalmente excavado a mano, que sirve para obtener agua del nivel freático, principalmente para usos domésticos.

PREFECTO: El Ejecutivo a nivel departamental.

PUNTO SIN IMPACTO: Punto fuera del área de descarga en un curso de agua, aguas arriba, donde no existe impacto de la descarga de aguas residuales crudas o tratadas.

RECURSO HIDRICO: Cuerpo de agua que cumple con los límites establecidos para cualesquiera de las clases A, B, C o D.

REPRESENTANTE LEGAL: Persona natural o colectiva, pública o privada, que solicita una autorización relativa a un proyecto, obra o actividad, respecto a todas sus fases, en materia ambiental.

PREVENCION: Disposiciones y medidas anticipadas para evitar el deterioro de la calidad del agua.

REUSO: Utilización de aguas residuales tratadas que cumplan la calidad requerida por el presente Reglamento.

SISTEMA DE ALCANTARILLADO SEPARADO: Sistema de redes en que las aguas residuales son colectadas separadamente de las aguas pluviales.

SISTEMA DE ALCANTARILLADO UNITARIO: Aquél en el que las aguas residuales son colectadas juntamente con las aguas pluviales.

SÓLIDOS SEDIMENTABLES: Volumen que ocupan las partículas sólidas contenidas en un volumen definido de agua, decantadas en dos horas; su valor se mide en mililitros por litro (ml/l).

SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES: Peso de las partículas sólidas suspendidas en un volumen de agua, retenidas en papel filtro N° 42.

TRATAMIENTO: Proceso físico, químico y/o biológico que modifica alguna propiedad física, química y/o biológica del agua residual cruda.

ANEXO A

LIMITES MÁXIMOS ADMISIBLES DE PARAMETROS EN CUERPOS RECEPTORES

ARTICULO 1º.

Los límites de calidad de las Clases A, B, C y D de cuerpos receptores en las que se han clasificado los cuerpos de agua se presentan en el Cuadro N° A-1.

ARTICULO 2º.

Las muestras para control de las descargas de las industrias deberán ser tomadas a la salida de las plantas de tratamiento, inmediatamente después del aforador de descargas, y las destinadas al control de la dilución en el cuerpo receptor, a una distancia entre 50 y 100 m del punto de descarga y dentro del cuerpo receptor.

ARTICULO 3º.

La mezcla de agua producto de una descarga y de un río debe regirse por la ecuación (1). Para cualquier parámetro de calidad, el valor total de la mezcla debe ser siempre menor que el establecido para la clase del río que corresponda.

$$P_{xf} = \frac{P_{xi} Q_i + P_{xr} Q_r}{Q_i + Q_r} \quad (1)$$

$Q_i + Q_r$

donde:

P_{xf} = parámetro de mezcla

P_{xi} = parámetro de la descarga

P_{xr} = parámetro del río, en el punto sin impacto

Q_i = caudal de la descarga

Q_r = caudal del río

CUADRO No 1. CLASIFICACION DE LOS CUERPOS DE AGUA SEGÚN SU APTITUD DE USO

ORDEN	USOS	CLASE "A"	CLASE "B"	CLASE "C"	CLASE "D"
1	Para abastecimiento doméstico de aguas potable después de:				
	a) Sólo una desinfección y ningún tratamiento	SI	NO	NO	NO
	b) Tratamiento solamente físico y desinfección	No necesario	SI	NO	NO
	c) Tratamiento físico-químico completo; coagulación, floculación, filtración y desinfección	No necesario	No necesario	SI	NO
	d) Almacenamiento prolongado o pre-sedimentación; seguidos de tratamiento, al igual que c)	No necesario	No necesario	No necesario	SI
2	Para recreación de contacto primario; natación, esquí, inmersión	SI	SI	SI	NO
3	Para protección de los recursos hidrobiológicos	SI	SI	SI	NO
4	Para riego de hortalizas consumidas crudas y fruta de cáscara delgada, que sean ingeridas crudas sin remoción de ella	SI	SI	NO	NO
5	Para abastecimiento industrial	SI	SI	SI	SI
6	Para la cría natural y/o intensiva (acuicultura) de especies destinadas a la alimentación humana	SI	SI	SI	NO
7	Para abrevadero de animales	NO (*)	SI	SI	NO
8	Para la navegación (***)	NO (**)	SI	SI	SI

(SI) Es aplicable, puede tener todos los usos indicados en las clases correspondientes

(*) No en represas usadas para abastecimiento de agua potable

(**) No a navegación a motor

(***) No aplicable a acuíferos

CUADRO No A-1 VALORES MÁXIMOS ADMISIBLES DE PARÁMETROS EN CUERPOS RECEPTORES

No	PARAMETRO	UNIDAD	CAN-CERI	CLASE "A"	CLASE "B"	CLASE "C"	CLASE "D"
1	2	3	4	5	6	7	8
1	pH		No	6.0 a 8.5	6.0 a 9.0	6.0 a 9.0	6.0 a 9.0
2	Temperatura	°C		± 3 °C de c. receptor	± 3 °C de c. receptor	± 3 °C de c. receptor	± 3 °C de c. receptor
3	Sólidos disueltos totales	mg/l		1000	1000	1500	1500
4	Aceites y Grasas	mg/l	No	Ausentes	Ausentes	0.3	1
5	DBO5	mg/l	No	< 2	<5	<20	<30
6	DQO	mg/l	No	<5	<10	<40	<60
7	NMP Colifecales	N/100ml	No	<50 y <5 en 80% de muestras	<1000 y <200 en 80% de muestras	<5000 y <1000 en 80% de muestras	<50000 y <5000 en 80% de muestras
8	Parásitos	N/l		<1	<1	<1	<1
9	Color mg Pt/l	mg/l	No	<10	<50	<100	<200
10	Oxigeno disuelto	mg/l	No	> 80% sat.	>70% sat.	>60% sat.	50% sat.

11	Turbidez	UNT	No	<10	<50	<100 - <2000***	<200 – 10000***
12	Sólidos Sedimentables	mg/l - ml/l	No	<10 mg/l	30 mg/l – 0.1 ml/l	<50 mg/l - <1 ml/l	100 - <1 ml/l
13	Aluminio	mg/l		0.2 c. Al	0.5 c. Al	1.0 c. Al	1.0 c. Al
14	Amoniaco	mg/l	No	0.05 c. NH	1.0 c. NH	2 c. NH	4 c. NH
15	Antimonio	mg/l	No	0.01 c. Sb	0.01 c. Sb	0.01 c. Sb	0.01 c. Sb
16	Arsénico total	mg/l	Si	0.05 As	0.05 c. As	0.05 c. As	0.1 c. As
17	Benceno	µg/l	Si	2.0 c. Be	6.0 c: Be	10.0 c. Be	10.0
18	Bario	mg/l	No	1.0 0.05 c. Ba	1.0 c. Ba	2.0 c. Ba	5.0 c. Ba
19	Berilio	mg/l	Si	0.001 c. Be	0.001 c. Be	0.001 c. Be	0.001 c. Be
20	Boro	mg/l		1.0 c. B	1.0 c. B	1.0 c. B	1.0 c. B
21	Calcio	mg/l	No	200	300	300	400
22	Cadmio	mg/l	No	0.005	0.005	0.005	0.005
23	Cianuros	mg/l	No	0.002	0.1	0.2	0.2
24	Cloruros	mg/l	No	250 c. Cl	300 c. Cl	400 c. Cl	500 c. Cl
25	Cobre	mg/l	No	0.05 c. Cu	1.0 c. Cu	1.0 c. Cu	1.0 c. Cu
26	Cobalto	mg/l		0.1 c. Co	0.2 c. Co	0.2 c. Co	0.2 c. Co
27	Cromo	mg/l	Si	0.05 c. Cr total	0.05 c. Cr ⁺⁶	0.05 c. Cr ⁺⁶	0.05 c. Cr ⁺⁶

	Hexavalente						
28	Cromo Trivalente	mg/l	No		0.6c. Cr ⁺³	0.6c. Cr ⁺³	1.1 c. Cr ⁺³
29	1,2 Dicloroetano	µg/l	Si	10.0	10.0	10.0	10.0
30	1,1 Dicloroetileno	µg/l	Si	0.3	0.3	0.3	0.3
31	Estaño	mg/l	No	2.0 c. Sn	2.0 c. Sn	2.0 c. Sn	2.0 c. Sn
32	Fenoles	µg/l	No	1 c. C ₆ H ₅ OH	1 c. C ₆ H ₅ OH	5 c. C ₆ H ₅ OH	10 c. C ₆ H ₅ OH
33	Hierro soluble	mg/l	No	0.3 c. Fe	0.3 c. Fe	0.1 c. Fe	1.0 c. Fe
34	Fluoruros	mg/l	No	0.6 – 1.7 c. F	0.6 – 1.7 c. F	0.6 – 1.7 c. F	0.6 – 1.7 c. F
35	Fosfato total	mg/l	No	0.4 c. Orthofosf.	0.5 c. Orthofosf.	1.0 c. Orthofosf.	1.0 c. Orthofosf.
36	Magnesio	mg/l	No	100 c. Mg	100 c. Mg	150 c. Mg	150 c. Mg
37	Manganeso	mg/l	No	0.5 c. Mn	1.0 c. Mn	1.0 c. Mn	1.0 c. Mn
38	Mercurio	mg/l	No	0.001 Hg	0.001 Hg	0.001 Hg	0.001 Hg
39	Litio	mg/l		2.5 c. Li	2.5 c. Li	2.5 c. Li	5 c. Li
40	Níquel	mg/l	Si	0.05 c. Ni	0.05 c. Ni	0.5 c. Ni	0.5 c. Ni
41	Nitrato	mg/l	No	20.0 c. NO ₃	50.0 c. NO ₃	50.0 c. NO ₃	50.0 c. NO ₃
42	Nitrito	mg/l	No	<1.0 c. N	<1.0 c. N	<1.0 c. N	<1.0 c. N

43	Nitrógeno Total	mg/l	No	5 c. N	12 c. N	12 c. N	12 c. N
44	Plomo	mg/l	No	0.05 c. Pb	0.05 c. Pb	0.05 c. Pb	0.1 c. Pb

No	PARAMETRO	UNIDAD	CAN-CERI	CLASE "A"	CLASE "B"	CLASE "C"	CLASE "D"
1	2	3	4	5	6	7	8
45	Plata	mg/l	No	0.05 c. Ag	0.05 c. Ag	0.05 c. Ag	0.05 c. Ag
46	Pentaclorofenol	µg/l	Si	5.0	10.0	10.0	10.0
47	Selenio	mg/l	No	0.01 c. Se	0.01 c. Se	0.01 c. Se	0.05 c. Se
48	Sodio	mg/l	No	200	200	200	200
49	Sólidos flotantes			Ausentes	Ausentes	Ausentes	< red. malla 1 mm ²
50	Sulfatos	mg/l	No	300 c. SO ₄	400 c. SO ₄	400 c. SO ₄	400 c. SO ₄
51	Sulfuros	mg/l	No	0.1	0.1	0.5	1.0
52	S.A.A.M. (detergentes)	mg/l		0.5	0.5	0.5	0.5

53	Tetracloroetano	µg/l	No	10	10	10	10
54	Tricloroetano	µg/l	Si	30	30	30	30
55	Tetracloruro de carbono	µg/l	Si	3	3	3	3
56	2,4,6 Triclorofenol	µg/l	Si	10	10	10	10
57	Uranio total	mg/l		0.02 c. U	0.02 c. U	0.02 c. U	0.02 c. U
58	Vanadio	mg/l	No	0.1 c. V	0.1 c. V	0.1 c. V	0.1 c. V
59	Zinc	mg/l	No	0.2 c. Zn	0.2 c. Zn	5.0 c. Zn	5.0 c. Zn
	PLAGUICIDAS:						
60	Aldrin-Dieldrin @	µg/l	Si	0.03	0.03	0.03	0.03
61	Clordano @	µg/l	Si	0.3	0.3	0.3	0.3
62	D.D.T. @	µg/l	Si	1.0	1.0	1.0	1.0
63	Endrin @	µg/l	No		@	@	@
64	Endosulfan @	µg/l	No	70	70	70	70
65	Heptacloro y Heptacloripoxido @	µg/l	Si	0.1	0.1	0.1	0.1
66	Lindano (Gama-	µg/l	Si	3.0	3.0	3.0	3.0

	BHC) @						
67	Metoxicloro	µg/l	No	30	30	30	30
68	Bifenilos policlorados	µg/l		2.0			
69	(PCBs)	µg/l	Si		0.001	0.001	0.001
70	Toxafeno	µg/l	Si	0.01	0.01	0.01	0.05
71	Demetón	µg/l	No	0.1	0.1	0.1	0.1
72	Gutión	µg/l	No	0.01	0.01	0.01	0.01
73	Malation	µg/l	No	0.04	0.04	0.04	0.04
74	Paration	µg/l	No	@	@	@	@
75	Carbaril:	µg/l			0.02	0.02	0.02
	Comp. Organofosforados y carbamatos totales:						
76	2,4-D; Herbicida: Chlorophenoxy	µg/l	SI	100	100	100	100
77	2,4,5-TP; Herbicida: Chlorophenoxy	µg/l	Si	10.0	10.0	10.0	10.0

78	2,4,5-T @	μg/l	Si	2.0	2.0	2.0	2.0
	RADIACIÓN:						
79	Radiación alfa global	Bq/l	Si	0.1	0.1	0.1	0.1
80	Radiación beta global	Bq/l	Si	1.0	1.0	1.0	1.0

NE No Establece

@: Insecticidas de importación prohibida, no obstante siguen en uso

*** Río en crecida

ANEXO A - 2**LIMITES PERMISIBLES PARA DESCARGAS LIQUIDAS EN mg/l**

NORMA PARAMETROS	PROPUESTA	
	DIARIO	MES
Cobre	1.0	0.5
Zinc	3.0	1.5
Plomo	0.6	0.3
Cadmio	0.3	0.15
Arsénico	1.0	0.5
Cromo ⁺³	1.0	0.5
Cromo ⁺⁶	0.1	0.05
Mercurio	0.002	0.001
Hierro	1.0	0.5
Antimonio (&)	1.0	
Estaño	2.0	1.0
Cianuro libre (a)	0.2	0.10
Cianuro libre (b)	0.5	0.3
pH	6.9	6.9
Temperatura (*)	±5°c	±5°c
Compuestos fenólicos	1.0	0.5
Sólidos Susp. Totales	60.0	
Colifecales (NMP/100)	1000	
Aceites y grasas (c)	10.0	
Aceites y grasas (d)	20.0	
DBO ₅	80.0	
DQO (e)	250.0	

DQO (f)	300.0	
Amonio como N	4.0	2.0
Sulfuros	2.0	1.0

(*) Rango DE viabilidad en relación a la Temperatura Media de cuerpo receptor.

(a), (c), (e) Aplicable a descargas de procesos mineros e industriales en general.

(b), (d) y (f) Aplicables a descargas de procesos hidrocarburíferos.

(&) En caso de descargas o derrames de antimonio iguales o mayores a 2500 kg, se deberá reportar a la autoridad.

Anexo Nro 4:

Análisis estadístico de la elección del mejor consorcio:

TOTAL 27 consorcios

Día	Control	R-1	R1B1	R1B2	R-2
0	3263.77232				
2	3211.01245				
4	3195.02115	3030.7034	3186.62053	3102.7351	2877.63676
6	3266.16974	2786.10987	2816.21218	2696.34314	2734.77153
8	3020.13171	2773.41763	2760.97469	2772.88259	2815.25847
10	3049.11715	2642.87085	2792.90652	2719.77102	2711.75179
16	3099.18486	2756.86577	2644.42532	2784.38699	2838.69952
21	3184.71619	2617.00174	2535.38431	2797.76355	2757.98558
25	3185.6504	2555.10745	2502.97475	2819.71758	2844.90806
		2471.46826	2646.63077	2720.04864	2669.60633

Día	R2C1	R2C2	R-3	R3CC-1	R3CC-2
2	3072.31551	3148.82138	3131.17135	3180.24015	3116.01737
4	2802.8687	2829.15988	2895.25739	2750.93247	2743.20964
6	3156.19872	2886.46789	2816.10544	2700.181	2841.81877
8	2739.65764	2605.66505	2656.85823	2678.99181	2564.08699
10	2520.06337	2780.23347	2777.51307	2705.70348	2677.47059
16	2711.79608	2507.38465	2740.28358	2864.26968	2905.34012
21	2824.7474	2815.15598	2849.12953	2965.97336	2953.30124
25	2643.95749	2659.92194	2700.63678	2786.14327	2791.83894

Día	BA	SI2M	SI5M	SSHM	SSHP-II
2	3072.96945	3020.93131	3136.03732	3012.09858	3032.53498
4	2650.47676	2725.52196	2737.45755	2839.13416	2777.12839
6	2570.33427	2928.64392	2922.20683	3066.55867	2887.57021
8	2683.17921	2647.17821	2695.77195	2805.87624	2818.06981
10	2666.37249	2885.39523	2680.19142	2716.22508	2633.40584
16	2931.05886	2680.51759	2693.75069	2644.71133	2778.61866
21	3012.84707	2993.21501	2151.12719	2557.83068	2785.73925
25	2686.82319	2589.82398	2729.75414	2651.88572	2738.64171

Día	SSHP-I	CD-I	CD-II	CD-III	CD-IV
2	2957.70909	3085.12471	3181.18853	3236.81075	3224.49693
4	2902.25003	2838.87587	2880.5276	2915.42485	2824.17961
6	2910.8927	2923.57571	2878.3942	2988.1941	2986.42347
8	2591.02844	2720.7103	2806.21462	2938.26495	2645.12053
10	2729.24612	2869.92575	2811.36949	2829.28567	2694.64995
16	2728.29313	2713.89374	2840.58542	2834.29099	2794.74584
21	2863.33973	2794.32326	2753.22773	2767.04782	2789.53076
25	2793.22701	2720.91776	2824.9609	2743.38163	2594.8464

Día	CU-II	CU-III	CU-IV	CD-V	CD-VI
2	3224.49693	3171.05497	3204.4899	2699.47479	3035.71003
4	2958.57018	2687.40748	3021.80573	2877.56417	2825.38429
6	2868.78063	2785.60287	2892.77566	2698.59766	2884.22204
8	2749.58072	2735.03973	2879.15187	2629.53173	2613.32096
10	2769.33704	2486.64866	2786.84568	2490.99167	2526.54325
16	2740.9791	2831.53443	2741.39656	2619.0727	2558.94888
21	2837.13369	2676.30928	2759.57043	2885.0947	2543.9338
25	2682.76714	2543.07898	2584.98221	2907.91978	2565.2066

Día	CU-I	CU-V	CU-VI

2	3172.55185	3365.98338	3322.41845
4	2819.04833	2807.80886	3220.20006
6	2803.25644	2798.59725	2954.77046
8	2748.82217	2852.24714	2147.53788
10	2708.81145	2630.17385	2659.86611
16	2781.38735	2787.77066	2830.64918
21	2803.16	2794.32683	3019.38866
25	2486.36835	2797.63014	2723.97943

> summary(anov)

```
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
dia      1 4229178 4229178 118.017 <2e-16 ***
con      27 1376496 50981 1.423 0.0904 .
dia:con  27 694665 25728 0.718 0.8455
Residuals 196 7023741 35835
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> TukeyHSD(anov)

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

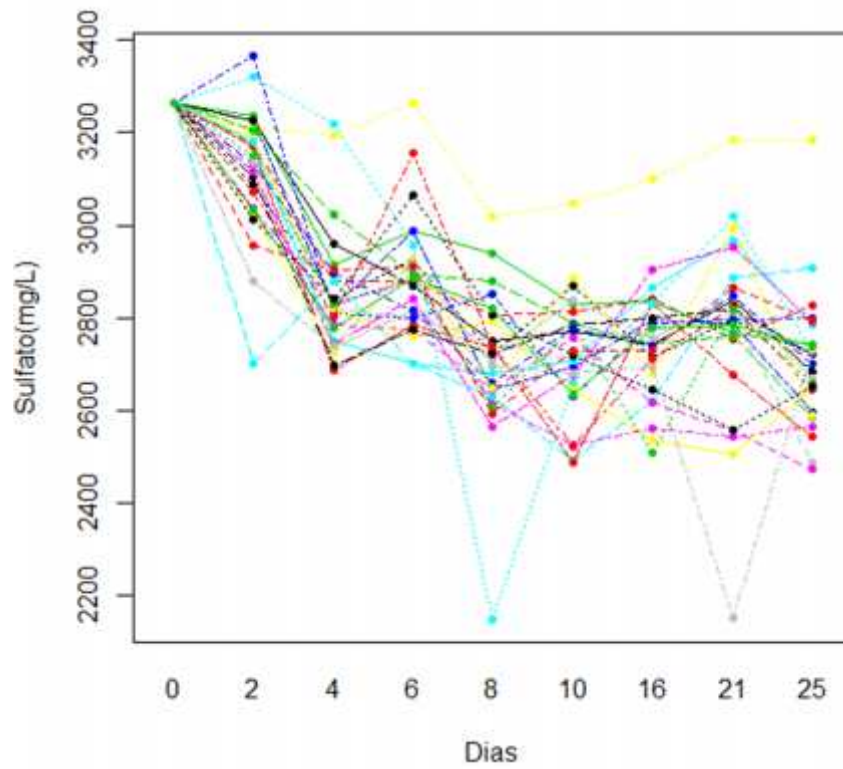
Fit: aov(formula = lm(sulf ~ dia * con, data = as))

\$con

diff	lwr	upr	p adj
CU.I-CONT	-320.84333333	-657.30462	15.617954 0.0852677
CU.II-CONT	-264.37222222	-600.83351	72.089065 0.3919919
CU.III-CONT	-366.03666667	-702.49795	-29.575380 0.0162898
CU.IV-CONT	-259.99666667	-596.45795	76.464620 0.4281503
CU.V-CONT	-264.05111111	-600.51240	72.410176 0.3946008
CU.VI-CONT	-259.13111111	-595.59240	77.330176 0.4354476
R-1-CONT	-397.49444444	-733.95573	-61.033157 0.0042976
R1B1-CONT	-369.43111111	-705.89240	-32.969824 0.0142010
R-2-CONT	-328.93000000	-665.39129	7.531287 0.0650268
R2B2-CONT	-310.81666667	-647.27795	25.644620 0.1173304
R2C1-CONT	-304.37555556	-640.83684	32.085731 0.1425629
R2C2-CONT	-330.91000000	-667.37129	5.551287 0.0607440
R-3-CONT	-293.78222222	-630.24351	42.679065 0.1928327
R3CC.1-CONT	-286.50888889	-622.97018	49.952398 0.2340282
R3CC.2-CONT	-290.87888889	-627.34018	45.582398 0.2086138
SI2M-CONT	-304.41888889	-640.88018	32.042398 0.1423801
SI5M-CONT	-384.96666667	-721.42795	-48.505380 0.0074233
SSHM-CONT	-324.07444444	-660.53573	12.386843 0.0766258
SSHP.I-CONT	-303.89000000	-640.35129	32.571287 0.1446232
SSHP.II-CONT	-306.58777778	-643.04906	29.873509 0.1334612

Información adicional: Las significancias del resto de las comparaciones no fueron incluidas por fines prácticos.

Disminución de la concentración de sulfato vs. Tiempo



Anexo Nro 5:

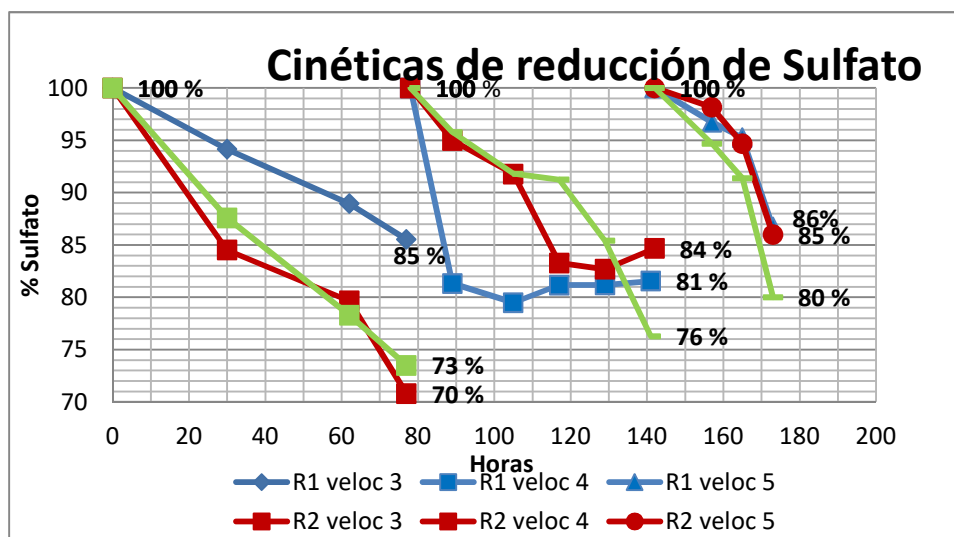
5a.Remoción de sulfato de agua artificial

Las cinéticas de reducción de sulfato de los tres reactores, se detallan a continuación:

Remoción de sulfato en R1,R2 y R3 de agua artificial

	R1		R2		R3	
	Tiempo (horas)	% Reducción sulfato	Tiempo (horas)	% Reducción sulfato	Tiempo (horas)	% Reducción sulfato
	0	100	0	100	0	100
Flujo 0,72 mL/min	30	94	30	84	30	87
	62	88	62	79	62	78
	77	85	77	70	77	73
Flujo 0,95 ml/min	89	81,3	89	94	89	95
	105	79	105	91	105	91,8
	117	81.1	117	83	117	91,2
	129	81.1	129	82	129	85
	141	81.5	141	84	141	76
Flujo 1,31 mL/min	157	96	157	98	157	94
	165	95	165	94	165	91
	173	86	173	85	173	80

Reducción de sulfato de agua Artificial



Anexo Nro 6:

Soluciones para FISH

Tampón hibridación

360 uL de NaCl 5 M
40 uL de Tris/HCl 1 M
2 uL de SDS (sodio docecil sulfato, 10 %), no autoclavado, en el borde del tubo
x uL de Formamida (ver tabla 1)
y uL de Agua mili Q (en función de la cantidad de formamida empleada)

Tabla 1. Cantidades y porcentajes de formamida

Cantidad de formamida (uL) = x	% Formamida en el pozo	Cantidad de H ₂ O MiliQ= y
0	0	1598
100	5	1498
200	10	1398
300	15	1298
400	20	1198
500	25	1098
600	30	998
700	35	898
800	40	798
900	45	698
1000	50	598

Preparación del buffer del lavado: (volumen total, 50 mL)

z uL de NaCl 5 M (Depende de la concentración de formamida, ver tabla 3)

1 mL de Tris/HCl (Promega)

43.8 mL de agua Mili Q

50 uL de SDS 10 % (Promega)

Tabla 3. Buffer de lavado

Hibridacion a 46°C % formamida	NaCl (M)	Z uL 5 M NaCl	uL 0.5 EDTA
0	0.9	9000	-
5	0.636	6300	-
10	0.450	4500	-
15	0.318	3180	-
20	0.225	2150	500
25	0.159	1490	500
30	0.112	1020	500
35	0.080	700	500
40	0.056	460	500
45	0.040	300	500
50	0.028	180	500

Anexo Nro 7:

Análisis MANOVA del diseño factorial

MANOVA, RESPECTO A LA FORMACION DE H₂S

Call:

```
lm(formula = aov(sulf ~ papel * frut * casc, data = fac))
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-86.96	-53.60	-14.31	38.45	166.69

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	69.304490	41.747304	1.660	0.113
papel	8.817242	1.753708	5.028	7.47e-05 ***
frut	3.732116	4.691260	0.796	0.436
casc	7.156318	5.806015	1.233	0.233
papel:frut	-0.079010	0.196970	-0.401	0.693
papel:casc	-0.270161	0.243774	-1.108	0.282
frut:casc	-0.749334	0.710127	-1.055	0.305
papel:frut:casc	-0.002568	0.029427	-0.087	0.931

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

MANOVA, RESPECTO A LA VELOCIDA DE REDUCCION DE SULFATO

Call:

```
lm(formula = aov(sulfa ~ papel * frut * casc, data = fac))
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-52.45	-21.41	-11.30	21.16	80.00

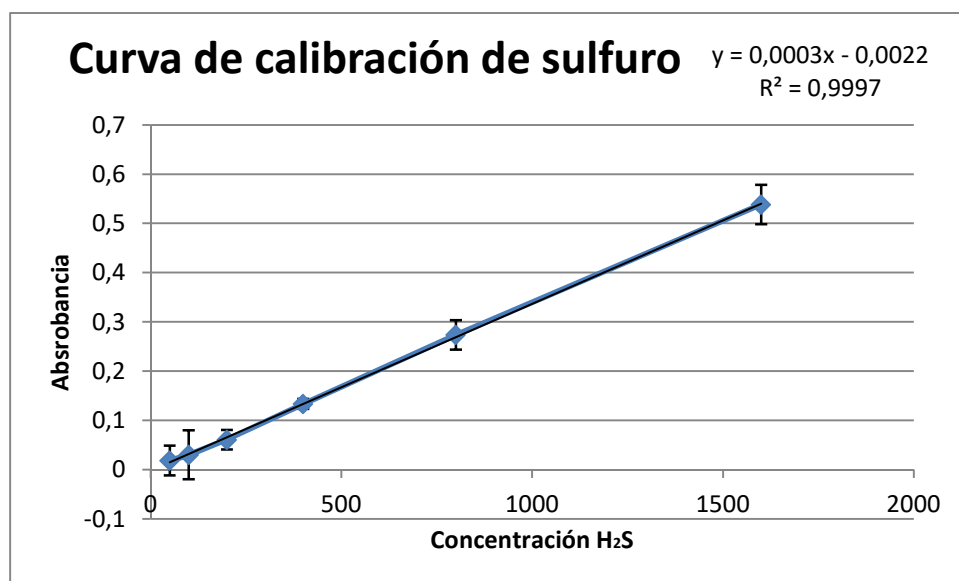
Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	-72.66470	21.19186	-3.429	0.00281	**
papel	-0.35877	0.89022	-0.403	0.69144	
frut	-1.19775	2.38139	-0.503	0.62077	
casc	-0.35929	2.94726	-0.122	0.90425	
papel:frut	-0.05756	0.09999	-0.576	0.57161	
papel:casc	-0.17784	0.12375	-1.437	0.16693	
frut:casc	-0.10366	0.36048	-0.288	0.77680	
papel:frut:casc	0.02814	0.01494	1.884	0.07494	.

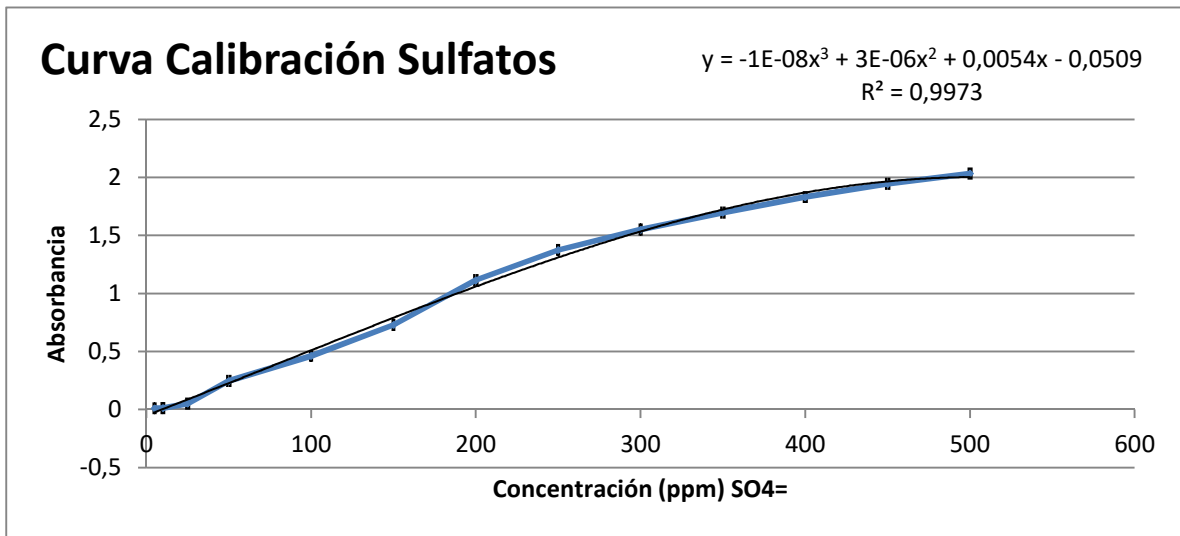
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

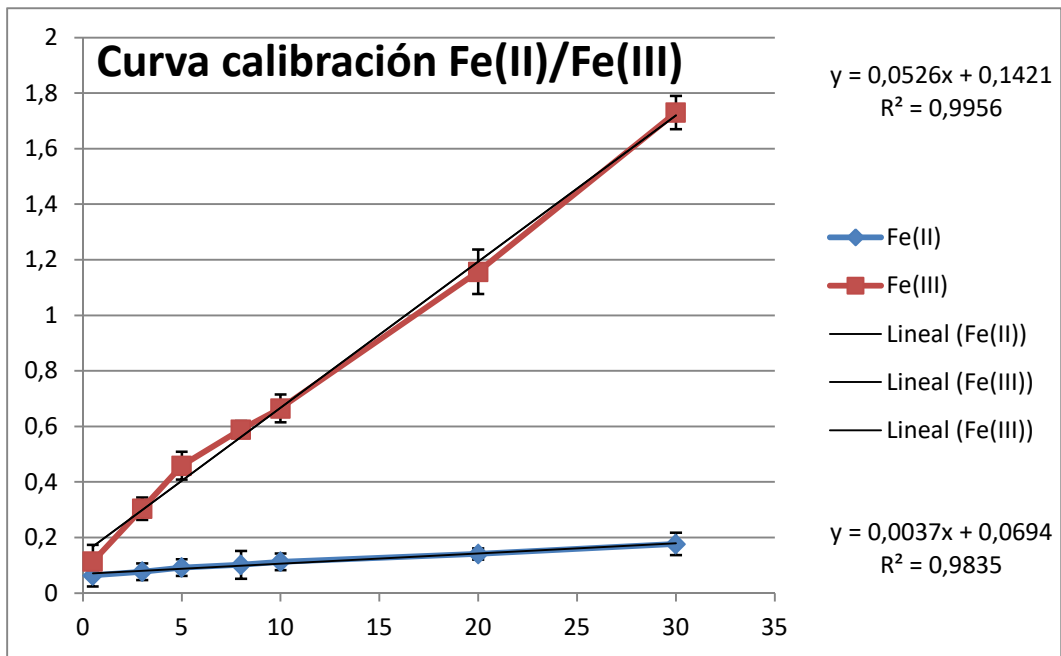
Anexo Nro.8:

A-8a. Curva de Calibración sulfuro de hidrógeno:



A-8b. Curva de Calibración sulfatos:



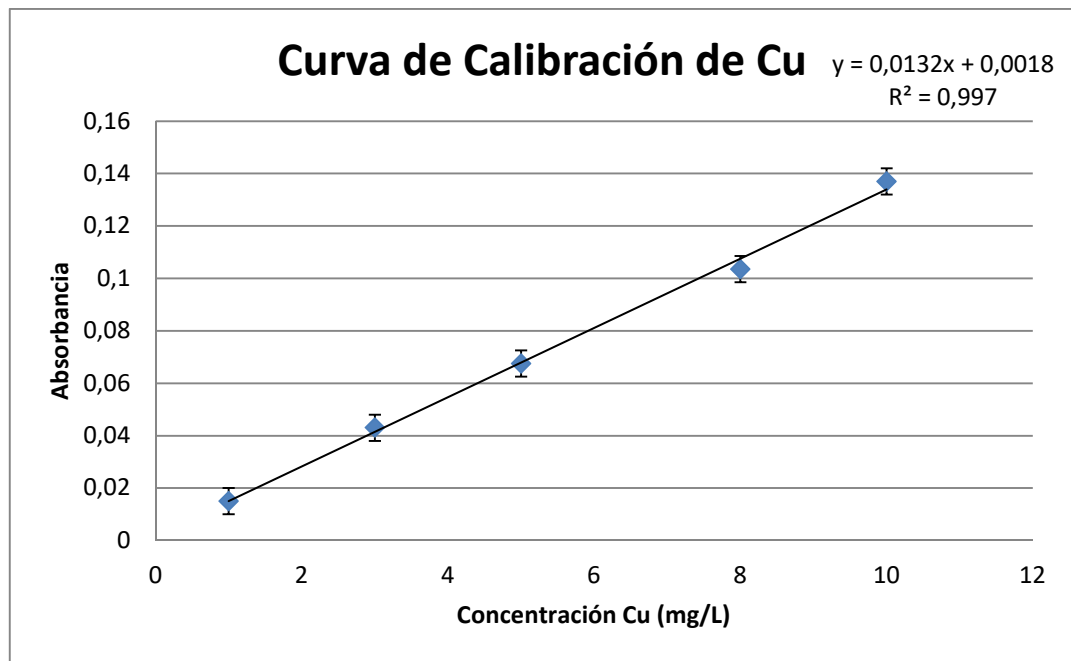


A-8c. Curva de Calibración Fe(III)/Fe(II):

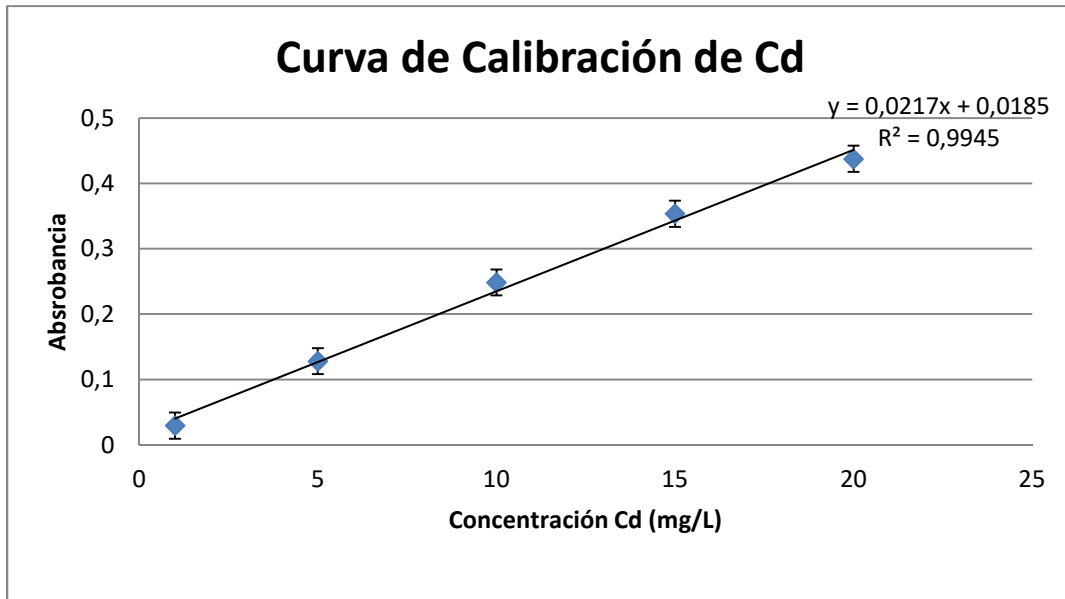
A partir de la regresión lineal se calculó:

Datos:	
	0.8
Fe(II).l	0.0604
Fe(III).l	0.004

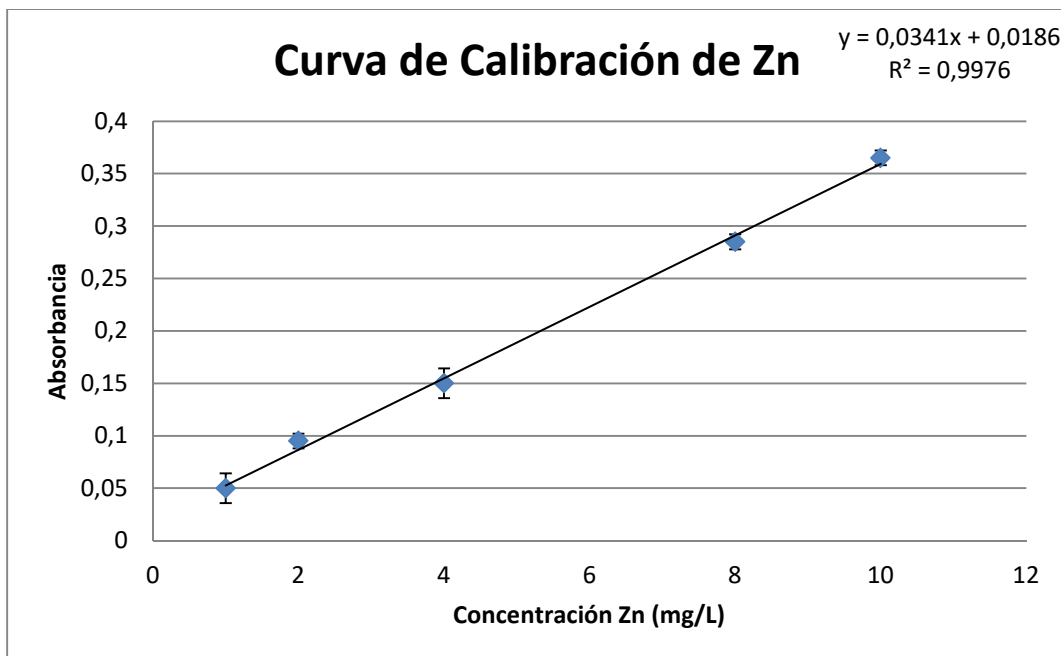
A-8d. Curva de Calibración Cu total:



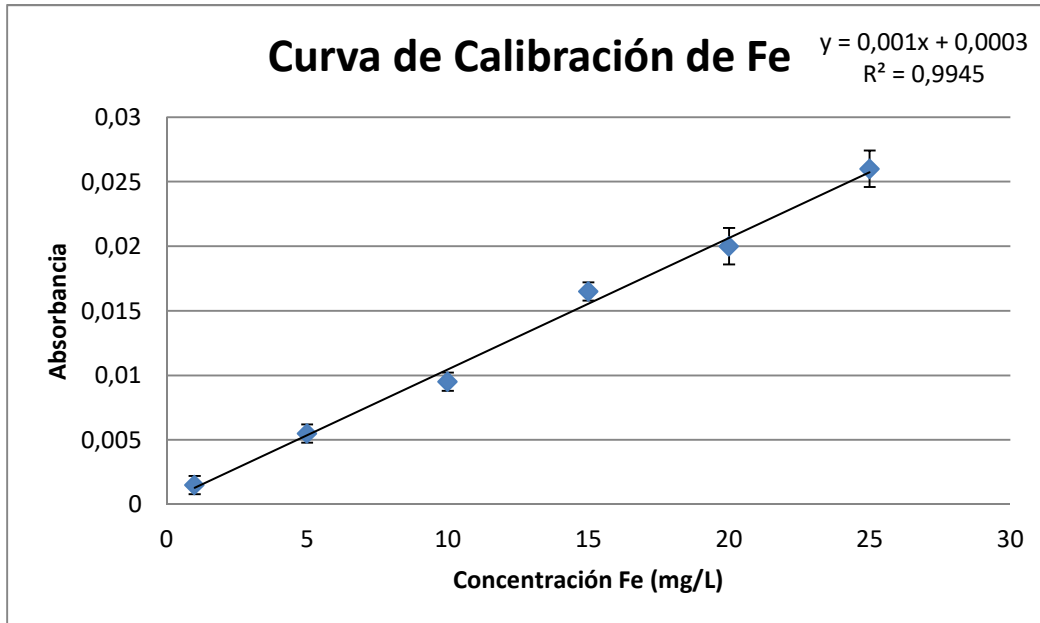
A-8e. Curva de Calibración Cd total:



A-8f. Curva de Calibración Zn total:



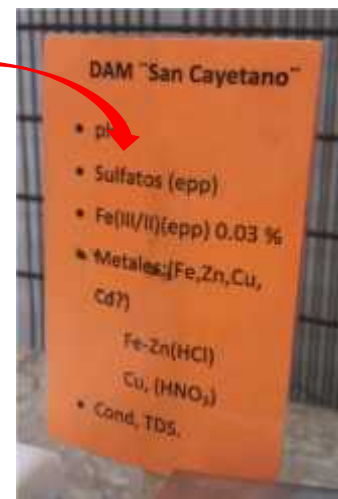
A-8g. Curva de Calibración Fe total:



Anexo Nro. 9:

Fotos del Sistema de Tratamiento:

A-9a: Reactor BSR alimentado con DAM de la bocamina "San Cayetano"-Bolivar





A-9b: Sistema de Tratamiento R-BSR – PP1 – R-BHR – PP2 y puntos de muestreo.



- Piscina 2**
- pH
 - Fe(III/II) epp 0.03 %
 - Sulfatos, sulfuros (epp)
 - Metales (Fe, Zn, Cu, cd?) (1,5)
Fe, Zn (HCl) (5)
Cu(HNO₃) (5)
 - COD, VFAs (epp)
 - Cond, TDS
 - ~~Analisis~~ general de metales, (final)

- Piscina 1.**
- pH
 - Sulfatos, sulfuros (epp)
 - Fe(III/II) epp 0.03 %
 - Metales(Fe,Zn,Cu, Cd?) (1,5)
Fe, Zn (HCl) (5)
Cu (HNO₃) (5)
 - VFA, COD (epp)

Anexo Nro. 11:

A-11a: Toma de muestra de lodo de bocamina, Mina Colquiri



Boca mina "San Juanillo" - Colquiri

A11b: Dique de colas, Mina Colquiri

