UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS

PRECIPITACIÓN DE METALES PESADOS CON SULFURO DE HIDRÓGENO BIOGENICO PRODUCIDO A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN ANAERÓBICA DE MATERIAL CELULÓSICO Y XILANÓSICO

Elaborado por : Lic. Georgina Aurelia Chávez Lizárraga

Asesores: **María Teresa Alvarez Aliaga Ph.D.**
Alberto Giménez Turba Ph.D.

Área: **Biotecnología Microbiana**

Tesis de grado para optar al título de Magister Scientiarum

LA PAZ – BOLIVIA

2006

Tesis de grado
Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas

PRECIPITACIÓN DE METALES PESADOS CON SULFURO DE HIDRÓGENO BIOGÉNICO PRODUCIDO A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN ANAERÓBICA DE MATERIAL CELULÓSICO Y XILANÓSICO

Investigación realizada dentro del proyecto "Biodiversidad Microbiana del programa UMSA-SAREC" con cooperación del departamento de Biotecnología de la Universidad de Lund – Suecia"

Desarrollada en la unidad de Biotecnología Ambiental del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas –IIFB, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.

Asesores: María Teresa Alvarez Aliaga Ph.D
Alberto Giménez Turba Ph.D

Autor: Lic. Georgina Aurelia Chávez Lizárraga

Enero 2006

ABREVIATURAS

Abs	absorbancia
AGVs	ácidos grasos volátiles
BSR	bacterias sulfato reductoras
D	dilución
DAM	drenaje ácido de minas
DNS	Dinitro salisílico
HPLC	high performance liquid cromatography (cromatografía líquida de alto rendimiento)
IIFB	Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
MDSMA	Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente
mL	mililitro
mM	milimolar
MNMC	metal nivel máximo contaminante
mV	milivoltios
NMC	nivel máximo contaminante
ORP	potencial oxido-reducción
TRH	tiempo de retención hidráulica
USEPA	United States Environmental Protection Agency (Agencia de Protecciòn al Medio Ambiente (Estados Unidos)
µL	microlitro
H_2S	Sulfuro de hidrógeno
SO_4^{2-}	Sulfato

"Cuando se aspira a la realización de grandes cosas, las pequeñas se hacen con facilidad, pero cuando se aspira solo a realizar las pequeñas, aún éstas se hacen difíciles"

Esta tesis es un regalo para mis padres Jorge y Angélica, cuyo amor es el impulso que me permite continuar y sin cuyo esfuerzo difícilmente hubiera llegado hasta aquí.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN
ABSTRACT
ABREVIACIONES

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Introducción 1
1.2 Antecedentes 3
1.3 Justificación 7

CAPITULO 2

EL PROBLEMA AMBIENTAL CAUSADO POR LA CONTAMINACIÓN CON METALES PESADOS Y LA CONTAMINACION DEBIDA A RESIDUOS AGRÍCOLAS

2.1 Toxicidad de los metales pesados 9
2.2 Drenaje ácido de minas 12
2.2.1 Origen del DAM 13
2.3 Contaminación por efluentes mineros en Bolivia 14
2.3.1 Ubicación y recursos minerales de la mina Bolívar 14
2.4 Contaminación debida a residuos agrícolas 16

CAPITULO 3

SULFURO DE HIDRÓGENO BIOGÉNICO: UNA ALTERNATIVA PARA LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS

3.1 Ciclo biogeoquímico del azufre 17
3.2 Bacterias sulfato reductoras o sulfurogénicas 18
3.2.1 Clasificación 19
3.2.2 Metabolismo 20

3.2.3 Papel de las BSR en procesos de remediación 21
3.3 Precipitación de metales pesados con sulfuro biogénico 22
3.3.1 Reducción microbiana de sulfato 23

CAPITULO 4

DIGESTIÓN ANAERÓBICA COMO MÉTODO DE TRATAMIENTO DE RESIDUOS AGRÍCOLAS

4.1 Digestión anaeróbica 25
4.2 Desechos agrícolas 26
4.2.1 Composición de los desechos agrícolas 26
4.2.1.1 Celulosa 26
4.2.1.2 Xilano 27
4.2.1.3 Lignina 28

CAPITULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general 29
5.2 Objetivos específicos 29

CAPITULO 6

DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Material y métodos 30
6.1.1 Material biológico 30
6.1.1.1 Consorcio microbiano 30
6.1.1.2 Material celulósico y xilanósico 30
6.2 Preparación del inóculo 30
6.3 Condiciones de cultivo 31
6.3.1 Cultivo batch 31
6.3.2 Cultivo continuo 31
6.4 Trampa de precipitación de metales pesados 32
6.5 Toma de muestras 33
6.6 Determinaciones analíticas 34
6.6.1 Determinación de sulfuro de hidrógeno 34
6.6.1.1 Precipitación con acetato de plomo 34

6.6.1.2 Método turbidimétrico 34
6.6.2 Determinación de sulfato 34
6.6.3 Análisis de ácidos grasos volátiles 35
6.6.3.1 Determinación de AGVs por HPLC 35
6.6.4 Determinación de la actividad enzimática 35
6.6.5 Determinación de la concentración de metales pesados 36

CAPITULO 7

RESULTADOS

7.1 Cultivos batch 37
7.1.1 Actividad enzimática 37
7.1.2 Producción de sulfuro de hidrógeno y reducción de sulfato 39
7.2 Cultivo continuo 40
7.2.1 Producción de sulfuro de hidrógeno y reducción de sulfato 41
7.2.2 Producción de AGVs 43
7.2.3 Actividad enzimática 43
7.2.4 pH y producción de sulfuro de hidrógeno 44
7.3 Precipitación de metales pesados 45
7.3.1 Precipitación de metales en efluente artificial de un solo metal 46
7.3.1.1 Precipitación de cobre 46
7.3.1.2 Precipitación de plomo 47
7.3.1.3 Precipitación de zinc 48
7.3.2 Precipitación de Cu(II), Pb(II) y Zn(II) en efluente artificial 49
7.3.3 Precipitación de Cu(II), Pb(II) y Zn(II) en efluente natural 51
7.3.4 Precipitación de metales, potencial redox y pH 54
7.3.4.1 Relación del potencial redox, pH y precipitación de Cu(II), Pb(II) y Zn(II) en efluente artificial 54
7.3.4.2 Relación del potencial redox, pH y precipitación de Cu(II), Pb(II) y Zn(II) en efluente natural 55

CAPITULO 8

DISCUSIÓN

8.1 Cultivos batch 56
8.1.1 Actividad enzimática 56
8.1.2 Producción de sulfuro de hidrógeno y reducción de sulfato 57

8.1.3 Soporte de la biomasa y desarrollo de la biopelícula 58
8.2 Cultivo continuo 58
8.2.1 Hidrólisis enzimática y producción de AGVs 59
8.2.2 Producción de sulfuro de hidrógeno 60
8.2.2.1 Influencia del pH 61
8.2.2.2 Influencia del soporte de la biomasa 62
8.3 Precipitación de metales pesados 62
8.3.1 Potencial redox, pH y precipitación de metales 64

CAPITULO 9

CONCLUSIONES Y PLANES FUTUROS

9.1 Conclusiones 66
9.2 Recomendaciones 69

AGRADECIMIENTOS
REFERENCIAS
ANEXOS

FIGURAS

Figura 1.	Ciclo del azufre en el que se hallan involucradas las bacterias sulfato reductoras.	18
Figura 2.	Principales interacciones de las bacterias sulfato reductoras.	19
Figura 3.	Esquema de la reducción asimilatoria y desasimilatoria de sulfato.	24
Figura 4.	Esquema de la degradación anaerobia de polisácaridos constituyentes de la pared celular de plantas y producción de H_2S.	25
Figura 5.	Esquema del sistema anaeróbico utilizado para la activación, establecimiento de las cepas y en los cultivos batch iniciales del presente estudio.	31
Figura 6.	Diagrama esquemático del biorreactor anaeróbico de lecho empacado usado en el estudio.	32
Figura 7.	Trampa de precipitación de metales pesados para el tratamiento con sulfuro de hidrógeno de origen biogénico.	33
Figura 8.a.	Actividad enzimática de Endoxilanasa en los cultivos batch montados con los diferentes materiales celulósicos y xilanósicos	37
Figura 8.b.	Actividad enzimática de β-xilosidasa en los cultivos batch montados con los diferentes materiales celulósicos y xilanósicos.	37
Figura 9.a.	Actividad enzimática de Endoglucanasa en los cultivos batch montados con los diferentes materiales celulósicos y xilanósicos.	38
Figura 9.b.	Actividad enzimática de β-glucosidasa en los cultivos batch montados con los diferentes materiales celulósicos y xilanósicos.	38
Figura10.a.	Producción de sulfuro de hidrógeno por el consorcio A10 en los cultivos batch montados con los diferentes materiales celulósicos y xilanósicos.	39
Figura10.b.	Reducción de sulfato por el consorcio A10 en los cultivos batch montados con los diferentes materiales celulósicos y xilanósicos.	39
Figura 11.	Producción de sulfuro de hidrógeno biogénico a partir de material xilanósico -paja de trigo usando consorcio bacteriano A10 y concentración de sulfato reducido en biorreactor 1.	41
Figura 12.	Producción de sulfuro de hidrógeno biogénico a partir de material xilanósico-paja de trigo usando consorcio bacteriano A10 y concentración de sulfato reducido en biorreactores 2 y 3.	42
Figura 13.	Relación entre la producción de àcidos grasos volátiles y la producción de sulfuro biogénico en el biorreactor 1.	43

Figura 14. Relación entre la producción de sulfuro y el pH del medio en los Biorreactores 1,2 y 3. 44

Figura 15. Concentración de Cu (II) en efluente artificial antes y después tratamiento con H2S biogénico. 46

Figura 16. Porcentaje de remoción de las diferentes concentraciones de Cu (II) en efluente artificial. 46

Figura 17. Concentración de Pb (II) en efluente artificial antes y después del tratamiento con H2S biogénico. 47

Figura 18. Porcentaje de remoción de las diferentes concentraciones de Pb (II) en efluente artificial. 47

Figura 19. Concentración de Zn (II) en efluente artificial antes y después del tratamiento con H2S biogénico. 48

Figura 20. Porcentaje de remoción de las diferentes concentraciones de Zn (II) en efluente artificial. 48

Figura 21. Precipitación de metales de efluente artificial con diferentes concentraciones después del tratamiento con sulfuro biogénico de los 3 biorreactores. 49

Figura 22. Porcentaje de precipitación de Cu (II), Pb (II) y Zn (II) de efluentes artificiales en trampa de precipitación. 50

Figura 23. Precipitación de metales de efluente de la mina Bolívar después del tratamiento con sulfuro biogénico. 51

Figura 24. Porcentaje de precipitación de Cu (II), Pb (II) y Zn (II) de efluente de la mina Bolívar. 52

Figura 25. Control. Comportamiento del efluente de la mina Bolívar. 53

Figura 26. Control. Porcentaje de remoción de Cu (II), Pb (II) y Zn (II) en el efluente de la mina Bolívar. 53

Figura 27. Variación del pH y potencial redox (mV), durante la precipitación de metales (Cu (II), Pb (II) y Zn (II)) del efluente minero artificial y concentración de H_2S en el biorreactor de hidrólisis-sulfurogénesis. 54

Figura 28. Variación del potencial redox durante la precipitación de metales del efluente de la mina Bolívar y concentración de sulfuro de hidrógeno en el biorreactor de hidrólisis-sulfurogénesis y en la trampa de precipitación. 55

TABLAS

Tabla 1.	Producción de sulfuro en sistemas de cultivo establecidos con diferentes materiales crudos usados como sustratos.	4
Tabla 2.	Estándares del Reglamento Nacional Primario de Agua Potable.	11
Tabla 3.	Cargas de metales en el agua evacuada de la mina Bolívar. Estación de monitoreo BSC-1.	12
Tabla 4.	Géneros comunes de BSR, de acuerdo a la utilización de fuente de carbono.	20
Tabla 5.	Solubilidades de iones metálicos divalentes como sulfuros.	25
Tabla 6.	Composición de algunoa materiales lignocelulósicos.	26
Tabla 7.	Condiciones de los biorreactores durante el tiempo de cultivo.	40
Tabla 8.	Precipitación de Cu(II), Pb(II) y Zn(II) con sulfuro biogénico producido a partir de la hidrólisis anaeróbica de material xilanósico y celulósico.	45

HEAVY METAL PRECIPITATION USING BIOGENIC SULFIDE FROM THE ANAEROBIC HYDROLYSIS OF CELLULOSIC AND XILANOSIC MATERIAL

ABSTRACT

This study is part of the project "Microbial Diversity of the program UMSA-SAREC" in cooperation with the Biotechnology Department in Lund University, and pretend to establish a hydrogen sulfide reactor in remote areas in the Bolivian Andean region.

Sulfate Reducing Bacteria (SRB) are responsible for the production of H_2S from sulfates and an electron donor in anaerobic conditions. The sulfide produced could be used to precipitate divalent metals, allowing the bioremediation of metal-contaminated effluents.

In this work, different cellulosic and xylanosic substrates such as: wheat straw, quinua straw, paja brava, husk rice and dry leaves were tested in order to select the one that shows the highest sulfide production. Wheat straw was the substrate selected for the scale up of the process. Three bioreactors were stablished using this substrate and inoculated with the microbial consortia A10 obtained from the Chalviri lake, Potosí. During the batch culture, H_2S concentration between 5 and 8 mM were obtained, while during the continuous culture concentrations of 20 mM were attained at 50 days of incubation.

The sulfide produced and either, an artificial efluent with concentrations of Cu (II) (4.33 - 12.11 mg/L), Pb (II) (0.89 – 8.30 mg/L) and Zn (II) (3.16 -14.05 mg/L) or an acid mine drainage from Bolivar mine (located in Oruro) containing Cu (II) (0.36-0.53 mg/L), Pb (II) (0.22-1.94 mg/L) and Zn (II) (7.2-85.06 mg/L), were mixed and directed to a metal precipitation trap, where then, the metal sulfides precipitated. The sulfide concentrations during the precipitation tests were in the range of 0.3 to 20 mM and the metal sulfide precipitation for Cu (II), Pb (II) and Zn (II) were 68 to 89 %, 57-100 % and 87 to 100 %, respectively. The measurements were carried out by atomic absorption spectrophotometer for each metal ion.

PRECIPITACION DE METALES PESADOS CON SULFURO DE HIDRÓGENO BIOGENICO PRODUCIDO A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN ANAEROBICA DE MATERIAL CELULOSICO Y XILANOSICO

RESUMEN

El presente estudio forma parte del proyecto: "Biodiversidad Microbiana del programa UMSA-SAREC" con cooperación del departamento de Biotecnología de la Universidad de Lund y establece la posibilidad de montar biorreactores para generar H_2S en la región andina boliviana.

Las bacterias sulfato reductoras (BSR) son responsables de la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) en anaerobiosis a partir de sulfatos y un donador de electrones. El sulfuro producido podría utilizarse para precipitar metales catiónicos divalentes, permitiendo la biorremediación de efluentes contaminados.

En el presente trabajo, se probaron distintos 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 cual presentaba la más alta producción de sulfuro. La paja de trigo (donador de electrones) fue el sustrato de elección para el escalado del proceso.Se montaron tres biorreactores con este sustrato, los cuales fueron inoculados con el consorcio bacteriano A10 obtenido de la laguna Chalviri en Potosí. Bajo condiciones de cultivo batch, se obtuvo una concentración de H_2S entre 5 y 8 mM, y en condiciones de cultivo continuo a una concentración de 20 mM a los 50 días de incubación.

El sulfuro de hidrógeno y ya sea, un efluente artificial con concentraciones de Cu (II) (4.33 - 12.11 mg/L), Pb (II) (0.89 – 8.30 mg/L) y Zn (II) (3.16 -14.05), o el efluente de la mina Bolívar (localizada en Oruro) conteniendo Cu (II) (0.36-0.53 mg/L), Pb (II) (0.22-1.94 mg/L) y Zn (II) (7.2-85.06 mg/L) fueron mezclados y dirigidos a una trampa de precipitación donde el sulfuro metálico precipita. Las concentraciones de H_2S durante las pruebas de precipitación estuvieron en un rango de 0.3 a 20 mM las precipitaciones de sulfuros metálicos para Cu (II), Pb (II) y Zn (II) fueron de 68 a 89 %, 57 a 100 % y de 87 a 100 %, respectivamente. Las mediciones de cada cation furon determinadas por espectrofotmetría de absorción atómica.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Introducción

Proteger la calidad del agua es una premisa fundamental en nuestros días, debido a que el agua dulce es un elemento imprescindible para la supervivencia del hombre. De esta manera, existe una fuerza política de protección al medio ambiente que se ve reflejada en la promulgación de leyes y lineamientos que van a evaluar el impacto ambiental.

En Bolivia la ley N° 1331 del Ministerio de desarrollo sostenible y medio ambiente (MDSMA) Reglamento a la ley del medio ambiente) creada el 27 de abril de 1992, surge con el objeto de proteger y conservar el medio ambiente, regulando las acciones del hombre con relación a la naturaleza. Determinándose de esta manera las concentraciones máximas permisibles de metales pesados, según el cuerpo de agua (ver anexos).

Debido al desarrollo de la industria minera y metalúrgica en Bolivia, problemas de contaminación ambiental con metales pesados en ríos y otros cuerpos de agua fresca incluyendo ciertos acuíferos subterráneos fueron determinados, especialmente aquellos pertenecientes a la zona andina. La contaminación de estos cuerpos de agua se debe fundamentalmente a la explotación de sulfuros minerales, que generan altas concentraciones de iones metálicos y sulfato, comúnmente conocidos como drenaje ácido de minas (DAM) (van Houten & Lettinga, 1995; Foucher *et al*., 2001). La contaminación es especialmente evidente en las zonas de Potosí y Oruro y en los cuerpos de agua presentes en estas zonas, teniendo efecto contaminante en regiones lejanas de las fuentes originales de contaminación.

Existen numerosos métodos para el tratamiento de DAM, pero solo pocos han sido aplicados. Los métodos más comunes son métodos químicos, como la neutralización usando cal u otros componentes alcalinos causando la precipitación de metales en forma de óxidos e hidróxidos. Sin embargo este es un proceso caro y los resultados desaparecen a corto término.

En los últimos años la biotecnología a través de la biorremediación emerge como una opción interesante para la remoción y recuperación de metales pesados de los efluentes. Un importante componente de los sistemas de biorremediación son las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR). La importancia de las BSR en el ambiente se enmarca dentro del ciclo global del azufre y sus derivados. En consorcio con otros grupos microbianos, las BSR son responsables de mantener los niveles naturales de sulfitos, sulfatos y sulfuros, produciendo H_2S en condiciones anaeróbicas., Los sulfuros pueden ser combinados con metales catiónicos divalentes. De esta forma, se forman sulfuros de metal de baja solubilidad que precipitan y esto permite la remoción de metales de los DAMs.

Por otro lado, la zona andina en sus zonas urbanas y rurales presenta contaminación por residuos sólidos municipales y agrícolas, siendo los últimos difíciles de disponer. Alrededor del mundo se generan toneladas de residuos agrícolas cada año, y solo un pequeño porcentaje es usado como forraje o en la producción de energía (Panthapulakkal *et al.*, 2005). La aplicación del uso de desechos agrícolas como donador de electrones para el metabolismo de las BSRs constituye una vía útil para el aprovechamiento de estos residuos en sistemas biológicos de precipitación de metales pesados.

En este sentido, en nuestro país se han llevado a cabo estudios con diferentes sustratos orgánicos provenientes de la degradación de desechos sólidos municipales como fuente de carbono para BSRs (Arnsdorff *et al.*, 2005; Crespo *et al.*, 2005). En otras partes del mundo, estudios con diferentes materiales celulósicos y xilanósicos tales como: paja de trigo (*Triticum graminae*), paja brava (*Festuca orthophylla*) y hojas secas (Alvarez *et al*, articulo submitido), paja (Koschorreck *et al.,* 2002), paja y alfalfa (Béchard *et al.*, 1994), trozos de madera (Waybrant *et al.*, 1998), y pedazos de roble (Chang *et al.*, 2000) han demostrado su utilidad como sustratos para BSR en el proceso de remoción de metales pesados por precipitación con sulfuro biogénicamente producido.

El texto a continuación describe brevemente algunos de los estudios más sobresalientes de sistemas microbianos usados en la remoción de metales, seguida de las razones que nos llevaron a la realización del presente trabajo. El capítulo 2 describe los problemas de contaminación debidos a los metales pesados y los desechos agrícolas, con especial énfasis a la problemática en nuestro país. El capítulo

3 muestra el potencial del sulfuro biogénico como una alternativa en el tratamiento de DAMs. El capítulo 4 se enfoca en la digestión anaeróbica como una vía para el tratamiento de residuos agrícolas. Se expone luego, la metodología usada para la producción de sulfuro de hidrógeno y posterior remoción de metales, para concluir con una discusión fundamentada en los resultados.

1.2 Antecedentes

Aunque la remoción de metales pesados se ha practicado por varias décadas, la mayoría de los métodos físicoquímicos presentan limitaciones debidos al costo y eficacia. Otras desventajas son el uso de altas concentraciones de reactivos contaminantes causando graves daños al medio ambiente. Este punto es de especial importancia cuando este tipo de tratamientos se aplica en grandes volúmenes como las colas de desmonte de las minas.

Dentro de la biotecnología microbiana, la microbiología ambiental ha cobrado enorme importancia debido a que en los últimos años nuestro planeta viene sufriendo las consecuencias de los daños causados por distintos tipos de contaminantes y se hacen necesarias soluciones que frenen este problema.

Los métodos biológicos para la remoción de metales pesados comprenden procesos como transporte a través de la membrana celular, biosorción a la pared celular y atropamiento en cápsulas extracelulares, precipitación por inducción metabólica, complejación y reacciones de óxido reducción (Rai *et al*., 1991; Macaskie & Dean, 1989; Huang & Morehart, 1990; Avery & Tobin, 1993; Brady & Duncan, 1994; Krauter *et al*., 1996, Veglio *et al*., 1997, Kosolapov *et al*., 2004).

A finales de la década de los sesenta se planteó la posibilidad del uso de BSR's para la remediación de DAMs (Tuttle *et al*., 1969). Desde entonces muchos estudios han demostrado la eficiencia del tratamiento del drenaje ácido de minas con BSR.

Todos los sistemas de reactores microbianos requieren una fuente de carbono y un soporte que permita el crecimiento bacteriano, puesto que se han encontrado relaciones cuantificables entre la actividad de BSRs y los parámetros físicos del soporte (Lyew & Sheppard, 1997). A la fecha no existe consenso en la literatura sobre cual es el sustrato óptimo para el crecimiento bacteriano, sin embargo, la mayoría de

los investigadores han intentado el uso de diferentes desechos agrícolas como fuente de carbono y energía (Tabla 1). Una de las ventajas del uso de material celulósico y xilanósico (paja) es que constituyen un nutriente a largo tiempo para bacterias sulfurogénicas, (Koschorreck *et al.,* 2002) Un reciente estudio en el que se utilizó paja de trigo (*Triticum graminae*) como sustrato, demostró que la paja de trigo es un excelente sustrato para bacterias sulfurogénicas, alcanzándose producciones de H_2S de 5 mM (Alvarez *et al*., 2005). En otro estudio se utilizó paja y alfalfa, lográndose una remoción de sulfato del 10 y del 34 % respectivamente (Béchard *et al*., 1994).

Tabla 1. Producción de sulfuro en sistemas de cultivo establecidos con diferentes materiales crudos usados como sustratos (Adaptado de Alvarez, 2005).

Sistema	Material	SO_4^{-2} inicial mM	SO_4^{-2} removido mM	Sulfuro mM	Referencia
Batch	Papel filtro, consorcio L1a	31	18	5.4	Alvarez, 2005
Batch	Periódico, consorcio L1a	31	4	1.6	Alvarez, 2005
Batch	Hojas, consorcio L1a	31	6	2.7	Alvarez, 2005
Batch	Paja de trigo, consorcio L1a	31	16	5.1	Alvarez, 2005
Batch	Paja Brava, consorcio L1a	31	7	2.6	Alvarez, 2005
Batch	Papel filtro, consorcio A10a	31	14	3.7	Alvarez, 2005
Batch	Periódico, consorcio A10a	31	2	0.8	Alvarez, 2005
Batch	Hojas, consorcio A10a	31	5	2.2	Alvarez, 2005
Batc	Paja de trigo, consorcio A10a	31	18	5.9	Alvarez, 2005
Batch	Paja Brava, consorcio A10a	31	11	2.6	Alvarez, 2005
Biorreactor	Paja de trigo, consorcio A10a	31	5	5	Alvarez, 2005
Biorreactor	Paja de trigo, consorcio A10b	46	10	2	Alvarez, 2005
Batch	Aguas residuales, hojas, trozos de madera, excremento de oveja, aserrín, celulosa, sedimento de ríos, piedra caliza, arena	12.5-47.9	28.9-30.2	n.a	Waybrant e*t al.,* 1998
Biorreactor	Abono de champiñones, estiércol, paja, heno, mazorcas de maíz, piedra caliza, yeso.	10.4	10.2	0.13	Dvorak *et al*., 1992
Biorreactor	Alfalfa fresca	10.3	8.6-10	n.a	Béchard *et al*., 1994
Columna	Pedazos de roble, abono de hongos, papel y lodo	26.9	20	26	Chang *et al*., 2000

[a] Medio Pfenning **[b] Medio Postgate** **n.a.: no disponible**

Desde 1980 el tratamiento anaeróbico de aguas de desecho, ha demostrado ser una alternativa al tratamiento aeróbico. A finales de los años ochenta, se desarrolló un nuevo proceso biotecnológico, produciendo azufre elemental a partir de sulfuro, con esta tecnología se estableció la primera planta piloto para el tratamiento biológico de aguas de desechos de origen industrial (Buissman *et al*, 1990).

Las ventajas del uso de estos sistemas son: 1) la producción de biomasa es 1/3-1/5 a la requerida en los procesos aeróbicos, 2) requieren baja cantidad de nutrientes, 3) no

requieren aereación, disminuyendo así los costos de operación, 4) sino se alimenta el sistema, éste permanece durmiente, y cuando se restaura la alimentación el sistema retorna a la operación en un corto período de tiempo. (Kuo & Shu, 2004). Por otro lado la precipitación de metales con sulfuro biogénico presenta ventajas adicionales en el tratamiento de los DAM's como la remoción de de sulfatos y la alcalinidad del agua (García *et al*., 2001; Alvarez, 2005; Costa & Duarte, 2005; Sheoran & Sheoran, 2005).

Numerosos estudios han sido desarrollados para el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados tanto a escala de laboratorio como a escala piloto en campo, utilizando bacterias sulfato reductoras en cultivos estacionarios y continuos, mediante la instalación de biorreactores. Algunos de los estudios más sobresalientes son citados a continuación.

A principios de los 90 se desarrolló un nuevo proceso para la remoción microbiana de sulfatos y metales pesados de aguas contaminadas extraídas por un sistema de control geohidrológico (Barnes *et al*., 1991). Como un primer paso para la mejora de este proceso, un estudio en 1997 se enfocó en la optimización de la producción de Sulfuro de hidrógeno en un proceso anaeróbico continuo utilizando consorcios de bacterias sulfato reductoras inmovilizadas, para la remediación de aguas ácidas, el mismo demostró que el pH óptimo para la producción de H_2S se encontraba entre 7 y 8 a una concentración de sulfato en el medio de 15 mM (Kolmert *et al*., 1997).

Para evaluar la capacidad del sulfuro producido en estos sistemas, se determinó la remoción de metales y sulfato tanto en efluentes naturales como artificiales. Así, un estudio en Sudáfrica alcanzó una remoción de sulfatos del 89% mientras que la precipitación de metales fue del 62.9 % en el caso del zinc y del 92.18% de plomo (Maree *et al*., 1988). Con el uso de un sistema integrado por algas y bacterias sulfato reductoras se logró una remoción de plomo del 99% y de zinc del 90% (Rose *et al*., 1998). El cobre y el zinc disminuyeron sus concentraciones iniciales entre 15 y 50 veces en un estudio realizado en Australia (Harris & Ragusa, 2000). En Egipto un biorreactor anaeróbico de película fija montado tuvo una eficiencia del 100% en la remoción de Cu, Ni, Zn, Cr, Cd y Pb (El Bayoumy *et al*., 1999).

Los estudios prosiguieron a comienzos del nuevo milenio. Así, se logró una remoción del 99% Fe, Zn, Cu, Cd, As y Pb en un efluente artificial (Steed, *et al*., 2000). Las BSR lograron la disminución de la concentración de metales en un efluente que contenía

150 mgL^{-1} a menos de 0.1 mgL^{-1} (Jalali & Baldwin, 2000). En otro estudio una remoción de cobre entre el 61.6% y el 95.8% fue establecida en un biorreactor de lecho empacado fluidizado (fluidized packed bed reactor) (van Hille, *et al.*, 2001) Usando un biorreactor de membrana a escala de laboratorio montado en Cincinatti, Estados Unidos se logró una precipitación de Cu del 99.8% y un 98% de Zn (Tabak & Govind, 2003). En Australia la remoción de sulfatos y metales pesados por BSR en reactores anaeróbicos de lecho empacado (packed bed reactor) en escala de laboratorio alcanzó niveles de remoción de más del 82% en el caso de sulfatos y más del 97% de remoción de Cu, Zn y Ni (Jong *et al.*, 2003). Usando bacterias sulfato reductoras en el pretratamiento de aguas con alto contenido de sulfato, se logró una remoción mayor al 93% de sulfatos (Kuo & Shu, 2004).

Los sistemas de tratamiento de DAMs con BSRs no han permanecido a escala laboratorio, desde 1990 se han puesto en marcha varias plantas piloto en distintas partes del mundo (Buisman *et al.*, 1996). Una de las primeras fue montada en Budelco, Holanda; esta planta contaba con una capacidad de 9 m^3 y funcionó por 2 años, demostrando que los metales presentes en concentraciones de hasta 1 g/L podían ser efectivamente removidos (Barnes *et al.*, 1991). En Pensilvania, Estados Unidos, una planta piloto, cuyos reactores fueron llenados con una mezcla de abono, heno, paja, mazorcas de maíz y trozos de madera, logró una remoción de Al, Cd, Fe, Mn, Ni y Zn del 95% (Dvorak *et al.*, 1992). Sin embargo, es importante hacer notar que el rendimiento de las plantas piloto puede estar influenciado por las características ambientales del lugar en que este sea instalado (Kilborn Inc. ,1996).

Para minimizar los costos de operación de las plantas piloto es importante el uso de materiales de bajo costo, siendo así los desechos agrícolas se constituyen en una opción interesante. Varios desechos celulósicos y hemicelulósicos han sido utilizados como donadores de electrones para la producción de sulfuro biogénico, incluyendo paja y heno (Béchard *et al.,* 1994), aserrín (Wakao *et al.,* 1979), abono de champiñones (Dvorak *et al.*, 1992), hojas y lodo de aguas residuales (Prasad *et al.,* 1999), abono de champiñones, trozos de roble, periódico y lodo (Chang *et al.*, 2000), hojas, trozos de madera y aserrín (Waybrant *et al.*, 1998; Waybrant *et al.,* 2002) hojas, trozos de madera y excremento de aves de corral (Cocos *et al.*, 2002), trozos de madera, y desechos de papel y pulpa (Hulshof *et al.*, 2003), y paja de trigo (Frommichen *et al.,* 2003).

Los problemas ambientales no son ajenos a la realidad de nuestro país por ello el desarrollo de grandes proyectos como el Proyecto Piloto Oruro (PPO) del Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, dan cuenta del grado de contaminación, especialmente en los distritos mineros del país. Siendo así, a principios del año 2001 se inicia en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) una nueva línea de investigación en el área de Biotecnología Ambiental cuyo principal enfoque es el estudio de bacterias sulfato reductoras (BSRs), bacterias responsables de la producción de H_2S, cuya combinación con metales pesados facilita su precipitación *in situ*, permitiendo de esta manera la recuperación de cuerpos de agua contaminados con metales.

Los primeros estudios realizados en este campo en el IIFB fueron la cuantificación de metales pesados en aguas superficiales del altiplano boliviano (Pozzo *et al.*, 2002) y la producción de sulfuro de hidrógeno biogénico a diferentes pHs, en esta última se estableció que las BSRs presentan una mejor producción de H_2S a pH 6 a concentraciones de sulfato entre 7 y 11 mM (Mendieta *et al.*, 2002).

Bajo el apoyo del proyecto ASDI SAREC y la Universidad de Lund se han continuado los estudios en esta línea de investigación, los mismos han demostrado que la producción de H_2S puede lograrse con sustratos tan diversos, como la papa y residuos orgánicos municipales (frutas y verduras) , el sulfuro producido con estos sustratos ha demostrado la capacidad de precipitar metales pesados en rangos que oscilan desde 78% en el caso del zinc, hasta el 100% en el caso del plomo (Arnsdorff *et al.*, 2005; Crespo *et al.*, 2005).

3. JUSTIFICACION

La contaminación de aguas en Bolivia es un problema de magnitudes considerables. Los daños producidos por la ingesta de agua contaminada, varían desde problemas de alteraciones subletales para algunos individuos de los ecosistemas afectados en los casos de polución muy débil hasta la desaparición de la fauna, así como la perdida de los recursos hídricos al tornarse inservible el agua para el consumo humano, agrícola o industrial.

Si bien existen numerosos estudios sobre la remoción de metales utilizando sistemas biológicos (microalgas, bacterias, hongos etc.), la gran mayoría de estos han sido

diseñados para ser establecidos en países que pueden acceder a esta tecnología, considerando el alto costo de los sustratos y la puesta en marcha de los biorreactores. Poca atención se ha puesto a países como el nuestro, donde la actividad minera se localiza en sitios remotos. Tanto las minas activas y las cerradas, continúan formando DAMs, constituyéndose en un serio problema ambiental.

Debido a que la región altiplánica de nuestro país ha sido y esta siendo contaminada por efluentes industriales de la industria minera, provocando toxicidad en la cadena trófica afectando gravemente a la flora y fauna cercanas, se considera necesaria la aplicación de sistemas de remediación o remoción de metales pesados del DAM. El establecimiento de un sistema de precipitación de metales con sulfuro biogénicamente producido, hace que el sistema sea económicamente rentable y que no dañe al medio ambiente.

La optimización de la producción de H_2S tiene por objeto ofrecer un sistema robusto y de tecnología sencilla que pueda ser aplicado en regiones de escasos recursos. El presente trabajo esta basado en la producción de H_2S de origen biogénico empleando como únicas fuentes de carbono materiales celulósicos y xilanósicos presentes tanto en la región altiplánica como en otras regiones del país, tales como diferentes tipos de paja: de trigo (*Triticum graminae*), de avena (*Avena sativa*), de quinua (*Chenopodium quinua willdenow*), paja brava (*Festuca orthophylla*, una planta típica de la región andina*)* , cáscarilla de arroz (*Oryza sativa*) y hojas secas de *Ulmus pumila.*

A través de cultivos en batch anaerobios se pretende comprobar la hidrólisis de material celulósico y xilanósico, y a la vez determinar la máxima producción de H_2S, comparando los sustratos anteriormente nombrados. Un cultivo a mayor escala en condiciones continuas nos permitirá el análisis de la producción de sulfuro optimizada y posterior precipitación de metales con el sulfuro biogénico producido. La precipitación de metales pesados será efectuada en efluentes artificiales y naturales verificando así la calidad del proceso de precipitación con sulfuro de hidrógeno biogénicamente producido.

CAPITULO 2

EL PROBLEMA AMBIENTAL CAUSADO POR LA CONTAMINACIÓN CON METALES PESADOS Y LA CONTAMINACIÓN DEBIDA A RESIDUOS AGRÍCOLAS

2.1 Toxicidad de metales pesados

La actividad industrial y minera arroja al ambiente metales tóxicos como plomo, mercurio, cadmio, arsénico y cromo, muy dañinos para la salud humana y para la mayoría de formas de vida. Además, los metales originados en las fuentes de emisión generadas por el hombre (antropogénicas), incluyendo la combustión de nafta con plomo, se encuentran en la atmósfera como material suspendido que respiramos. Por otro lado, las aguas residuales no tratadas, provenientes de minas y fábricas, llegan a los ríos, mientras los desechos contaminan las aguas subterráneas. Cuando se abandonan metales tóxicos en el ambiente, contaminan el suelo y se acumulan en las plantas y los tejidos orgánicos.

Metales pesados son los elementos con peso molecular alto, usualmente tienen una densidad superior a 5 g/cm^3 (Yamamoto & Montero, 2004). La peligrosidad de los metales pesados es mayor al no ser química ni biológicamente degradables. Una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años. Los metales pesados afectan a las cadenas alimenticias, provocando un efecto de bioacumulación debido a la alta persistencia de los metales pesados en el entorno, al no tener, la mayoría de éstos, una función biológica definida (Chicón,2003). El conocimiento del nivel de concentración de elementos tóxicos es objeto de particular interés en el control de la calidad del medio ambiente (Yamamoto & Montero, 2004).

En Bolivia, el Centro de Investigación Minero Industrial (CIMA) reporta que los mineros en Potosí presentan valores de elementos como zinc, cobre, antimonio, plata y manganeso por encima de los valores normales (Yamamoto & Montero, 2004). En tanto, análisis de aguas subterráneas y suelos reportan una seria contaminación con metales como plata, mercurio, plomo, antimonio, estaño, zinc y cadmio, afectando de esta forma al cultivo de diversos granos como la quinua, cebada y trigo tienen niveles de metales mayores en algunos casos a los valores límite recomendados

internacionalmente (MDSMA, 1996, 1997). Estudios sobre el efecto de los metales en la fauna no se han realizado hasta el momento.

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos ha determinado una serie de rangos límite para las concentraciones de metales pesados (Tabla 2); por encima de estos los metales pueden causar graves trastornos en los seres vivos, y finalmente ocasionar la muerte.

Tabla 2. Estándares del Reglamento Nacional Primario de Agua Potable. Agencia de Protección Ambiental, Estados Unidos, Oficina de Agua (4606) EPA 815-F-00-007; 2001.

Contaminante	MNMC[1] (mg/L)	NMC[2] (mg/L)	Posibles efectos sobre la salud por exposición que supere el NMC	Fuentes de contaminación comunes en agua potable
Químicos Inorgánicos				
Antimonio	0.006	0.006	Aumento de colesterol en sangre; descenso de azúcar en sangre (aumento de colesterolhemia; hipoglucemia).	Efluentes de refinerías de petróleo; retardadores de fuego; cerámicas; productos electrónicos; soldaduras.
Arsénico	Ninguno	0.05	Lesiones en la piel; trastornos circulatorios; alto riesgo de cáncer.	Erosión de depósitos naturales; agua de escorrentía de huertos; aguas con residuos de fabricación de vidrio y productos electrónicos.
Bario	2	2	Aumento de presión arterial.	Aguas con residuos de perforaciones; efluentes de refinerías de metales; erosión de depósitos naturales.
Cadmio	0.005	0.005	Lesiones renales.	Corrosión de tubos galvanizados; erosión de depósitos naturales; efluentes de refinerías de metales; líquidos de escorrentía de baterías usadas y de pinturas.

Cromo (total)	0.1	0.1	Dermatitis alérgica.	Efluentes de fábricas de acero y papel; erosión de depósitos naturales.
Cobre	1.3	Nivel de acción=1.3; TT	Exposición a corto plazo: molestias gastrointestinales. Exposición a largo plazo: lesiones hepáticas o renales. Aquellos con enfermedad de Wilson deben consultar a su médico si la cantidad de cobre en el agua superara el nivel de acción.	Corrosión de cañerías en el hogar; erosión de depósitos naturales; percolado de conservantes de madera.
Cianuro (como cianuro libre)	0.2	0.2	Lesiones en sistema nervioso o problemas de tiroides	Efluentes de fábricas de acero y metales; de fábricas de plásticos y fertilizantes
Flúor	4.0	4.0	Enfermedades óseas (dolor y fragilidad ósea) Los niños podrían sufrir de dientes manchados	Aditivo para agua para tener dientes fuertes; erosión de depósitos naturales; efluentes de fábricas de fertilizantes y de aluminio.
Plomo	Cero	Nivel de acción=0.015; TT	Bebés y niños: retardo en desarrollo físico o mental; los niños podrían sufrir leve déficit de atención y de capacidad de aprendizaje. Adultos: trastornos renales; hipertensión	Corrosión de cañerías en el hogar; erosión de depósitos naturales.
Mercurio (Inorgánico)	0.002	0.002	Lesiones renales	Erosión de depósitos naturales; efluentes de refinerías y fábricas; lixiviados de vertederos y tierras de cultivo.
Nitrato (medido como nitrógeno)	10	10	Los bebés de menos de seis meses que tomen agua que contenga mayor concentración de nitratos que el NMC, podrían enfermarse gravemente; si no se los tratara, podrían morir. Entre los síntomas se incluye dificultad respiratoria y síndrome de bebé cianótico (azul).	Aguas contaminadas por el uso de fertilizantes; percolado de tanques sépticos y de redes de alcantarillado; erosión de depósitos naturales.

1. Nivel Máximo del Metal Contaminante (MNMC) Es el nivel de un contaminante en el agua potable por debajo del cual no se conocen o no se esperan riesgos para la salud. Los MNMC permiten contar con un margen de seguridad y no son objetivos de salud pública obligatorios.
2. Nivel Máximo del Contaminante (NMC) - Es el máximo nivel permitido de un contaminante en agua potable. Los NMC se establecen tan próximos a los MNMC como sea posible, usando para ello la mejor tecnología de tratamiento disponible y teniendo en cuenta también los costos. Los NMC son normas obligatorias.

2.2 Drenaje ácido de minas

De todas las causas de contaminación de los recursos fluviales y lacustres quizás el drenaje ácido de minas (DAM) sea una de las más graves, por su naturaleza, extensión y dificultad de resolución. Los ríos y lagos afectados por este tipo de contaminación se caracterizan por su acidez, alto contenido en sulfatos y metales pesados de sus aguas y por el contenido metálico de sus sedimentos.

El DAM es uno de los problemas medioambientales más serios ya que los procesos de oxidación continúan mucho tiempo después del cierre de las minas (Akcil & Koldas, 2005), y dado que las minas abandonadas pueden cubrir grandes áreas, es muy difícil impedir la formación del DAM (Hallberg & Jonson, 2005). En 1989 se estimó que cerca de 19300 km de ríos y arroyos, y 72000 hectáreas de lagos y estanques en el mundo estaban seriamente dañados por los efluentes mineros (Johnson & Hallberg, 2005). Es importante hacer notar también que la generación de DAM puede continuar por varias décadas después del cierre de un a mina, (Béchard, *et al*, 1993) y dado que las minas abandonadas pueden cubrir grandes áreas se hace muy complicado el evitar la formación del DAM (Hallberg, *et al*., 2005). Por lo expuesto, hoy en día el tratamiento del DAM es el enfoque principal de muchos estudios.

Las consecuencias del DAM dependiendo del pH y acidez van de moderadas a severas. Las consecuencias medioambientales más severas serán si el pH esta entre 2 y 4 y si la acidez es 100000 o 1000 mg/L (Morin *et al*, 1998).

Los factores primarios que determinan la tasa de generación de ácido son:

- pH
- Temperatura
- Contenido de oxígeno de la fase gaseosa
- Concentración de oxígeno en la ase acuosa
- Grado de saturación con agua
- Actividad química de Fe^{+3}
- Área de superficie de los sulfuros metálicos expuestos.
- Energía de activación química requerida para hincar la generación de ácido , y
- Actividad bacteriana

(Akcil & Koldas, 2005)

2.2.1 Origen del DAM

Hay tres tipos principales de aguas de drenaje de minas (Banks *et al*, 1997): (i) la formación de aguas salinas; (ii) aguas alcalinas pobres en metales pesados que contienen sulfuro de hidrógeno y (iii) aguas acídicas que contienen metales pesados y sulfato derivados de la oxidación de la pirita. De estas solo la tercera constituye un severo problema. El drenaje ácido de minas o DAM (también referido como drenaje ácido de rocas, DAR), es el nombre colectivo para efluentes ricos en metales y sulfatos producto de los residuos de la producción minera (relaves, colas de desmonte, etc). (Cotoras *et al.*, 1996).

El mecanismo puede resumirse en los siguientes puntos:

- Procesos de oxidación, que transforman los sulfuros en sulfatos con producción de ácido sulfúrico; estos procesos pueden ser químicos o catalizados por bacterias como *Thiobacillus ferroxidans, T. thiooxidans, T. thioparus, etc.*

- Reacciones secundarias, en los productos de las reacciones anteriores y los restantes minerales presentes en la roca; así el ácido generado disuelve metales pesados tales como plomo, zinc, cobre, arsénico, mercurio, cadmio, etc.

- Disolución y arrastre de estos productos por el agua de lluvia o de escorrentía, produciéndose un caudal líquido contaminante que se caracteriza por su ácidez y por las altas concentraciones en sulfatos y metales pesados (Cotoras *et al.*, 1996).

Los principales focos productores de DAM en las explotaciones mineras son los drenajes de las minas subterráneas, por bombeo en las minas activas y por gravedad en las abandonadas, las escorrentías de las cortas en la minería a cielo abierto y los lixiviados de las escombreras y residuos mineros. Cuando el DAM formado en estos focos alcanza las aguas limpias de la red hidrográfica las contamina en acidez, sulfatos y metales pesados. Sin embargo, el grado de acidez y las concentraciones en contaminantes de las aguas, río abajo, estarán en función de la envergadura del aporte contaminante de DAM recibido, así como del caudal diluyente que traiga el

curso de agua. De igual forma, la infiltración de DAM puede contaminar suelos y aguas subterráneas (USEPA, 1994).

2.3 Contaminación por efluentes mineros en Bolivia

La generación de drenaje ácido de mina (DAM) en las actividades mineras es un problema ambiental muy preocupante; a finales del siglo pasado y particularmente después de la Cumbre Mundial de Río de Janeiro en 1992, Bolivia ha dado pasos importantes en la consolidación de políticas relacionadas con el desarrollo y el medio ambiente. Las políticas ambientales actualmente están regidas por acciones de prevención de prevención y control dirigidas a problemas de deterioro ambiental apremiantes que se presentan en diversas regiones del territorio nacional (MSDMA, 1997).

Actualmente debido a la subida de las cotizaciones de los minerales pesados se ha incrementado la extracción de los mismos en las minas en funcionamiento, es por ello que se esta manejando una mayor cantidad de rocas y de minerales en bruto, consecuentemente los desechos mineros se han multiplicado enormemente, por ello el aumento importante en al instalación de plantas de tratamiento de minerales complejos

En Bolivia existen 884 depósitos metálicos (Servicio Nacional de Geología y Minería, 2000). La gran mayoría de estos se encuentran en las regiones occidentales de nuestro país. Una de las zonas con mayor actividad minera en Bolivia está situada en la cuenca del lago Poopó, donde es evidente la degradación ambiental, ocasionada por la intensa actividad minera desarrollada durante siglos. En esta región la contaminación proviene de más de 120 minas estatales y privadas, que explotan: plomo, estaño, oro, wolfram y otros metales, desembocando sus desechos directamente al lago Poopó, dejando concentraciones altas de metales pesados, con daños irreversibles para la vida en el lago (MSDMA, 1996).

2.3.1 Ubicación y recursos minerales de la mina Bolívar

La mina Bolívar (66º 54’ 24’’ E - 18º 28’ S) localizada en el departamento de Oruro, provincia Poopó distrito Antequera a una altitud de 4015 m.s.n.m, y tiene una precipitación anual de 633 mm. Es un depósito de plata, plomo y zinc, explotado desde el siglo XIX (Pozzo *et al.*, 2002), en sus efluentes existe un flujo regular de bombeo de

agua de mina de aproximadamente 40 L/s. El uso del agua de mina en el ingenio varía de 0-100% dependiendo de la proporción de reciclado y de las variaciones en la calidad (en particular del pH). Si bien la mina Bolívar y su ingenio están diseñados como una operación sin descargas, el agua de mina no utilizada en el ingenio es descargada sin tratamiento en el lecho del río. Se ha estimado que la descarga promedio asciende aproximadamente a 10 L/s (en base a 24 horas/día) y junto con el agua de alcantarillado del campamento minero de Bolívar es suficiente para mantener un flujo permanente (MSDMA, 1996).

El efluente de la mina Bolívar se caracteriza especialmente por las elevadas cargas de zinc y cadmio que alcanzan 500 y 4.5 toneladas por año respectivamente (Tabla 3). La mayor parte de estos metales disueltos van al dique de colas. Sin embargo, la comparación con el transporte de metales unos 5 km de aguas abajo, en el río Antequera, indica que el agua de mina Bolívar contribuye con un 10% de los metales y con un 30% de SO_4^{2-}.

A continuación se detallan las principales características del DAM del Centro Minero Bolívar del departamento de Oruro – Bolivia.

Tabla 3. Cargas de metales en el agua evacuada de la mina Bolívar. Estación de monitoreo BSC-1. Análisis por Svensk Grudämnesanalys, Suecia, 1996.

	Nº Muestras	Concentración (mg/L)	Flujo mina (Kg/día)	Descarga en el río (Kg/ día)
Ph	3	3.2-3.9		
Cond.(mS/cm)	3	2.14-2.71		
Sulfato	3	820-1300	4100	1000
Zinc	7	5.3-1300	1400	360
Cobre	7	1.6-1300	12	3
Cadmio	7	0.1-0.9	1	0.2
Arsénico	7	2-17	28	7
Plomo	7	0.2-0.4	0.9	0.2

La mina Bolívar se caracteriza por presentar una cola de desmonte con una composición mineral muy sulfurosa (hasta 90%) (MSDMA, 1996).

2.4 Contaminación debida a residuos agrícolas

Cada año se generan toneladas de residuos agrícolas, y solo un pequeño porcentaje es usado como forraje o en la producción de energía (biogas, bioetanol). Existe una gran cantidad de residuos con potencial interés industrial y energético, que localmente pueden tener alguna utilidad, pero cuya eliminación constituye un problema en las labores de explotación agrícola (Quispe *et al*., 2005) afectando el medio ambiente en todas las regiones del mundo (Diorio, *et al*. 2003), especialmente en auqellas regiones con alta actividad en agricultura.

SULFURO DE HIDRÓGENO BIOGÉNICO: UNA ALTERNATIVA PARA LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS

3.1 Ciclo biogeoquímico del azufre

El azufre circula a través de la biosfera de la siguiente manera, por una parte se comprende el paso desde el suelo o bien desde el agua, si hablamos de un sistema acuático, a las plantas, a los animales y regresa nuevamente al suelo o al agua.

Algunos de los compuestos sulfúricos presentes en la tierra son llevados al mar por los ríos. Este azufre es devuelto a la tierra por un mecanismo que consiste en convertirlo en compuestos gaseosos tales como sulfuro de hidrógeno (H_2S) y el dióxido de azufre (SO_2). Estos penetran en la atmósfera y vuelven a tierra firme. Generalmente son lavados por las lluvias, aunque parte del dióxido de azufre puede ser directamente absorbido por las plantas desde la atmósfera.

El azufre reducido en forma de H_2S se encuentra en la biosfera como resultado del metabolismo microbiano y, en una proporción limitada de la actividad volcánica. Sin embargo, excepto bajo condiciones anaeróbicas, su concentración es baja porque resulta rápidamente oxidado en presencia de oxígeno. (Stanier, 1985)

Las bacterias desempeñan un papel crucial en el reciclaje del azufre. Cuando está presente en el aire, la descomposición de los compuestos del azufre (incluyendo la descomposición de las proteínas) produce sulfato (SO_4^{-2}). Bajo condiciones anaeróbicas, el ácido sulfhídrico (gas de olor a huevos en putrefacción) y el sulfuro de dimetilo (CH_3SCH_3) son los productos principales. Cuando estos últimos gases llegan a la atmósfera, son oxidados y se convierten en dióxido de azufre. La oxidación posterior del dióxido de azufre y su disolución en el agua de lluvia produce ácido sulfúrico y sulfatos, formas principalmente bajo las cuales regresa el azufre a los ecosistemas terrestres. El carbón mineral y el petróleo contienen también azufre y su combustión libera bióxido de azufre a la atmósfera (Lenntech).

La reducción de sulfato inorgánico a sulfuro orgánico o inorgánico y la subsecuente oxidación nuevamente a sulfuro es conocida como ciclo del sulfuro (Fauque,1995). (Fig. 1).

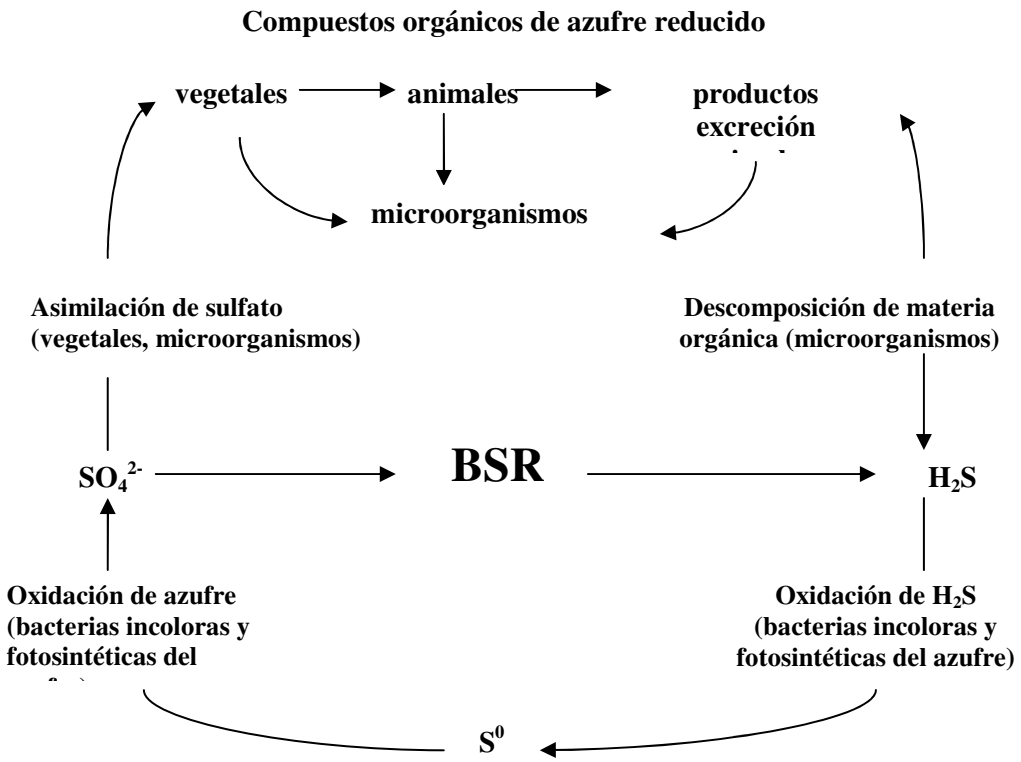


Figura 1. Ciclo del azufre en el que se hallan involucradas las bacterias sulfato reductoras (Stanier, 1985).

3.2 Bacterias sulfato reductoras o sulfurogénicas

Las bacterias sulfato reductoras (BSRs) o sulfurogénicas, descubiertas por Beijerinck en 1895 (Postgate, 1984), comprenden un grupo microbiano de gran importancia en ecosistemas principalmente acuáticos, (Luna *et al.*, 2004) donde juegan un papel principal en la degradación anaeróbica de la materia orgánica (Ingvorsen *et al*, 2003). Hasta 1970 se consideraba que estaban constituidas por un pequeño grupo de bacterias estrictamente anaerobias con una actividad metabólica limitada a oxidar lactato o piruvato, no obstante, ahora se conoce que son capaces de usar una diversidad de compuestos como donadores de electrones, y la lista de sustratos que pueden utilizar para su crecimiento es aproximadamente cien (Barnes & Tomei, 1995).

El nombre de "bacterias sulfato reductoras" se aplica, convencionalmente, a las bacterias anaeróbicas que tienen al SO_4^{-2} como aceptor de electrones con la consiguiente producción de H_2S. (Madigan *et al.*, 2000). Además del sulfato pueden utilizar como aceptores de electrones compuestos inorgánicos (bisulfito, metabisulfito, ditionito, tetrationato, tiosulfato, azufre, nitrato y nitrito), oxígeno y una variedad de compuestos orgánicos (fumarato, malato, aspartato, cistina, glutatión oxidado y

piruvato) (Moura *et al*., 1997; Le Gall & Xavier, 1997). Algunas BSRs pueden usar también hidrógeno (Djurle, 2004). Son ubicuas y tienen vital importancia en los ciclos del carbón y el azufre (Postgate, 1984; Daly *et al*. ,2000). Existen BSRs con la capacidad de reducir Fe (III) a Fe (II) pero ninguna puede vivir usando Fe (III) como único aceptor de electrones (Lovley *et al*., 1993).

Las BSRs además de participar en el ciclo del azufre (Fig. 1), están involucradas en la biodegradación de hidrocarburos, remoción de metales pesados de DAM, reducción de uranio, tratamiento de aguas residuales, en la salud humana y en la metilación del mercurio (Achá *et al*., 2004). Son de interés económico debido a la corrosión que provocan (Iverson, 2001), y sus aplicaciones industriales son diversas. Aunque aún intrigante, su importancia ecológica es indudable, y constantemente se encuentran nuevos papeles ecológicos para representantes de este grupo. (Fig. 2).

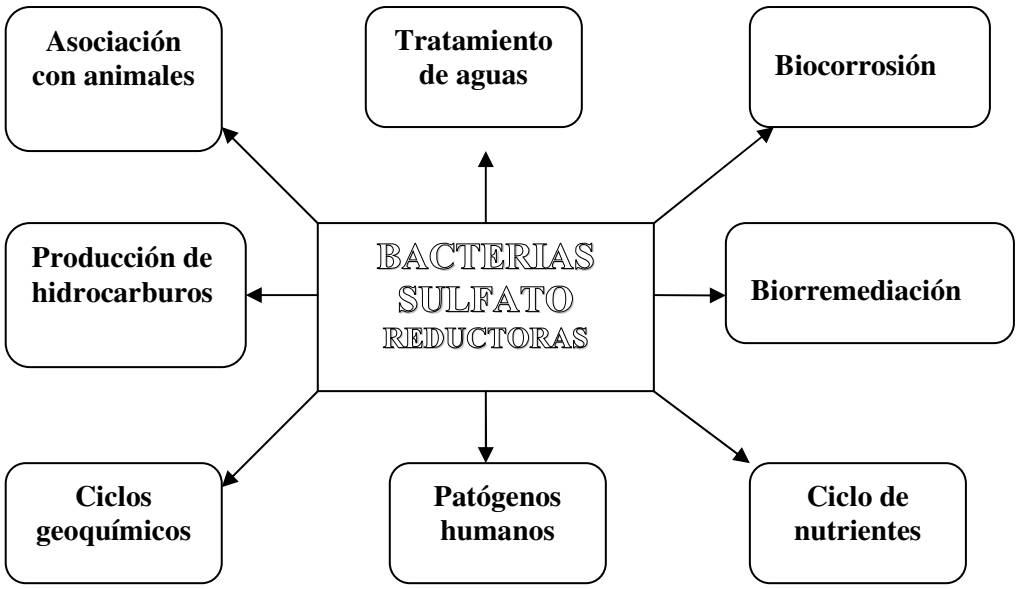


Figura 2. Principales interacciones de las bacterias sulfato reductoras, adaptado de Barton y Tomei, 1995

3.2.1 Clasificación

Las BSRs son un conjunto anaeróbico heterogéneo de Bacteria y Archaea, que llevan a cabo la reducción desasimilatoria de sulfato. Como grupo tienen la capacidad de metabolizar una amplia variedad de compuestos como hidrógeno, compuestos orgánicos de cadena sencilla, como metanol, etanol, ácido acético, ácido láctico, hasta tolueno, hexadecanos e incluso compuestos aromáticos.

De acuerdo a su utilización de fuente de carbono las BSRs estan comprendidas en dos grupos. El grupo I utiliza como sustratos el lactato, piruvato, etanol y ciertos ácidos grasos, como fuente de carbono y energía. Los géneros del grupo II se especializan en la oxidación de ácidos grasos volátiles, particularmente acetato (Kolmert *et al*., 1999).

En ambos grupos hay gran diversidad morfológica, desde cocoides (*Desulfobacula, Desulfacinum*), y ovoides (*Desulfobulbus*), hasta bacilos (*Desulforhabdus, Desulfomicrobium*) y vibrios (*Desulfovibrio, Desulfobacterium, Desulfotomaculum*), incluso fueron encontradas bacterias filamentosas largas (*Desulfonema*), y sarcinas (*Desulfosarcina*). La diversidad es aún mayor si se comparan otros rasgos fenotípicos, como las formas esporuladas (*Desulfotomaculum*), y los termófilos (*Thermodesulfobacterium, Archaeoglobus*) (Kolmert *et al*., 1999).

Tabla 4. Géneros comunes de BSRs, de acuerdo a la utilización de fuente de carbono, adaptado de Kolmert *et al*., 1999.

GRUPO I **Oxidadores de lactato**	*Desulfovibrio, Desulfomicrobium, Desulfobotulus,*	*Desulfotomaculum, Desulfomonile, Desulfobacula,*	*Arachaeoglobus, Desulfobulbus, Thermodesulfocaterium*
GRUPO II **Oxidadores de acetato**	*Desulfobacter, Desulfonema, Desulfacinum,*	*Desulfobacterium, Desulfosarcina, Desulforhabdus,*	*Desulfococcus, Desulfobarculius, Thermodesulforhabdus*

3.2.2 Metabolismo

Metabólicamente las BSRs están estrechamente unidas por su capacidad de reducir sulfatos a sulfuro de hidrógeno, no obstante, el resto de su metabolismo es variado y poco comprendido. Las rutas metabólicas de las BSRs son diversas y van desde la utilización de donadores de electrones simples como el etanol (Tabak *et al*., 2003), hasta compuestos sumamente complejos como hidrocarburos. Los principales productos de las BSRs son el H_2S, y el CO_2 (Barton & Tomei, 1995).

Algunas características peculiares de ciertos representantes es que muchas cepas pueden fijar N_2 y usan aminoácidos como fuente de nitrógeno. Algunas cepas son capaces de crecer con nitrato como aceptor final de electrones (Moura *et al*., 1997)

En cuanto a su relación con el oxígeno, las BSRs han sido consideradas en primera instancia, como anaerobias estrictas. No obstante, hay pruebas suficientes de que algunas serían aerotolerantes (Hines *et al*., 2002).

La utilización de compuestos inorgánicos, en particular el uso de metales como aceptores finales de electrones no ha sido totalmente estudiado, aunque la evidencia geológica sugiere que la reducción de Fe (III) y otros metales podría ocurrir antes de otros procesos respiratorios como la reducción de oxígeno, nitrato y sulfato (Moura *et al.*, 1997).

Para su crecimiento las BSR requieren de un pH entre 5 a 9, potencial redox de Eh <-100 mV, y nutrientes a disposición (Muller, 2001).Se ha observado que las BSR actúan mejor en consorcio, usando diferentes sustratos para su crecimiento. (Djurle, 2004), donde las especies fermentativas juegan un papel central ya que generan concentraciones de sustrato de los productos de fermentación como por ejemplo los ácidos grasos volátiles (acetato, butirato, etc.). Muchos de estos son metabolizados por bacterias acetógenicas productoras de hidrógeno generando así más acetato e hidrógeno. Los productos de estas dos fermentaciones pueden entonces funcionar como sustratos para las especies oxidantes, siendo así metabolitos pivotes de los consorcios microbianos anaeróbicos. (Hamilton, 1998).

3.2.3 Papel de las BSRs en los procesos de remediación

Recientemente las BSRs han ganado un interés tecnológico considerable, por su uso potencial en sistemas para la remoción de sulfato y metales pesados de aguas contaminadas ricas en metales.

Una ecuación general que describe la reacción entre el sulfuro de hidrógeno producido por las BSRs y los iones metálicos para removerlos de una solución, puede escribirse como sigue:

$$2\ CH_2O + SO_4^{2-} \rightarrow H_2S + 2\ HCO_3^{-1} \quad (1)$$

$$M\ (II) + H_2S + 2HCO_3^{-1} \rightarrow MS + 2H_2O + 2CO_2 \quad (2)$$

Donde la fuente de carbono es CH_2O, el sulfato es el aceptor terminal de electrones y M (II) es el metal de interés (Cheong *et al.,* 1998). El producto de la reducción, el sulfuro, forma complejos insolubles con la mayoría de iones metálicos divalentes, los cuales son la forma más estable de precipitar metales (Zhe-Xue, *et al.*, 2004). Los protones liberados en la disociación del H_2S ($H_2S \rightarrow 2H^+ + S^{2-}$) son neutralizados por una liberación igual de HCO_3^{-1} durante la reducción de sulfato (Sheoran & Sheoran, 2005). La concentración de sulfuro es dependiente del pH (Gallert & Winter, 2005) a pH ácido

sólo aquellos metales con muy baja solubilidad podrán ser precipitados (Tabla 5). La habilidad para reducir concentraciones de metales disueltos de efluentes y neutralizar la acidez del DAM hace de las BSRs útiles catalizadores en el tratamiento del DAM y otros materiales contaminados con metales (Steed *et al.*, 2000).Una característica importante de las BSRs es que si bien son anaeróbicas, presentan tolerancia a ambientes oxigenados, lo que mejora su disponibilidad en propósitos de remediación (Kolmert *et al.*, 1999).

Tabla 5. Solubilidades de iones metálicos divalentes como sulfuros, mg/L, adaptado de Barnes *et al.*, 1991.

Zinc	2×10^{-7}
Cadmio	1×10^{-9}
Cobre	1×10^{-14}
Cobalto	1×10^{-8}
Calcio	110

Las BSRs tienen un papel importante, especialmente en la remoción de metales (Jalali & Baldwin, 1999; Jong & Parry, 2003; Tabak & Govind, 2003, Labrenz & Banfield, 2003). Las siguientes características permiten su uso en la biorremediación:

- El producto de la reducción de sulfato, el sulfuro de hidrógeno, forma complejos insolubles de sulfuros metálicos que son fácilmente removidos de la solución.
- La salinidad del agua se reduce cuando la cantidad de sulfato decrece.
- La alcalinidad producida, da como resultado efluentes menos ácidos.
- La precipitación de sulfuro es efectiva en un amplio rango de pH.

(Kolmert *et al.*, 1999)

3.3 Precipitación de metales pesados con sulfuro biogénico

El sulfuro biogénico es una valiosa herramienta biotecnológica para la remoción de metales contaminantes de los efluentes mineros e industriales (Alvarez, 2005).Este proceso envuelve dos pasos 1) producción de sulfuro por BSRs, y 2) precipitación de metales por el H_2S producido biológicamente (Foucher *et al.*, 2001).

El sulfuro biogénico ha sido usado con éxito en la remoción de sulfatos y metales de los DAM's (Kaksonen *et al.,* 2003), y pueden también ser aplicables a la remoción de metales residuales de aguas de desecho industrial. La reducción de sulfato y la precipitación de metales usando sulfuro biogénico puede ser aplicado en procesos de un solo paso o de dos pasos. El tratamiento en un solo paso es una solución de bajo costo al problema del DAM; sin embargo no es viable si el agua a tratar es muy ácida, lo que puede causar inhibición microbiana (Hao, 2000). Tomando esto en cuenta, los metales pueden ser pre-precipitados antes del paso biológico reciclando el sulfuro contenido en el agua, o el gas conteniendo sulfuro (procesos en dos pasos) (Alvarez, 2005). La separación de los procesos de producción de sulfuro biogénico y la precipitación de metales constituye la base del proceso patentado BioSulphide ®, la misma que ha sido probada en la mina de cobre Britania, en Canadá (Rowley *et al.,* 1997).

El sulfuro de hidrógeno enlaza la mayoría de los iones metálicos pesados para formar precipitados insolubles no tóxicos a los microorganismos (Lyew & Sheppard, 2001). También puede usarse para la precipitación de iones metálicos por burbujeo del gas a una solución contaminada con metales (Vogel, 1996; Hao, 2000). No obstante, el uso de sulfuro soluble mostró una eficiencia más alta en la remoción de metales que la alcanzada con el gas H_2S (Bhagat *et al.,* 2004). Los precipitados producidos son generalmente sulfuros metálicos, pero en el caso de precipitación líquida sobrenadante, también precipitan complejos no identificados los que incluyen nitratos, cloruros o carbonatos (Bhagat *et al.,* 2004).

3.3.1 Reducción microbiana de sulfato

El azufre constituye cerca del 1% de la masa seca de los organismos vivos. El azufre celular se encuentra mayormente en estado reducido (-2), pero la mayoría del azufre en el medio ambiente esta en estado oxidado. Por lo tanto para ser biológicamente activo el sulfato debe ser reducido a sulfuro (H_2S). Las plantas, hongos y la mayoría de las bacterias pueden reducir el sulfato a sulfuro (Roy & Trudinger, 1970). Esta vía metabólica se conoce como reducción asimilatoria del sulfato, proceso que requiere energía. En contraste, la reducción desasimilatoria de sulfato genera energía para el crecimiento y mantenimiento (Postgate, 1984).

La reducción de SO_4^{-2} a H_2S es una reducción de 8 electrones y requiere pasos intermedios. El ion sulfato estable debe activarse por medio del ATP. La enzima ATP sulfurilasa cataliza la unión del ión sulfato al fosfato del ATP, dando lugar a la formación de adenosina fosfosulfato (APS). En la reducción desasimilatoria de sulfato, el sulfato del APS es reducido por la enzima APS reductasa a sulfito (SO_3^{-2}) con la liberación de AMP. En la reducción asimilatoria, otro P es añadido al APS para formar adenosina fosfosulfato (PAPS), y entonces el sulfato es reducido. En ambos casos, el primer producto de la reducción de sulfato es el sulfito (SO_3^{-2}), y el sulfuro se forma por acción de la enzima sulfito reductasa (Fig. 3) (Madigan et al., 2000).

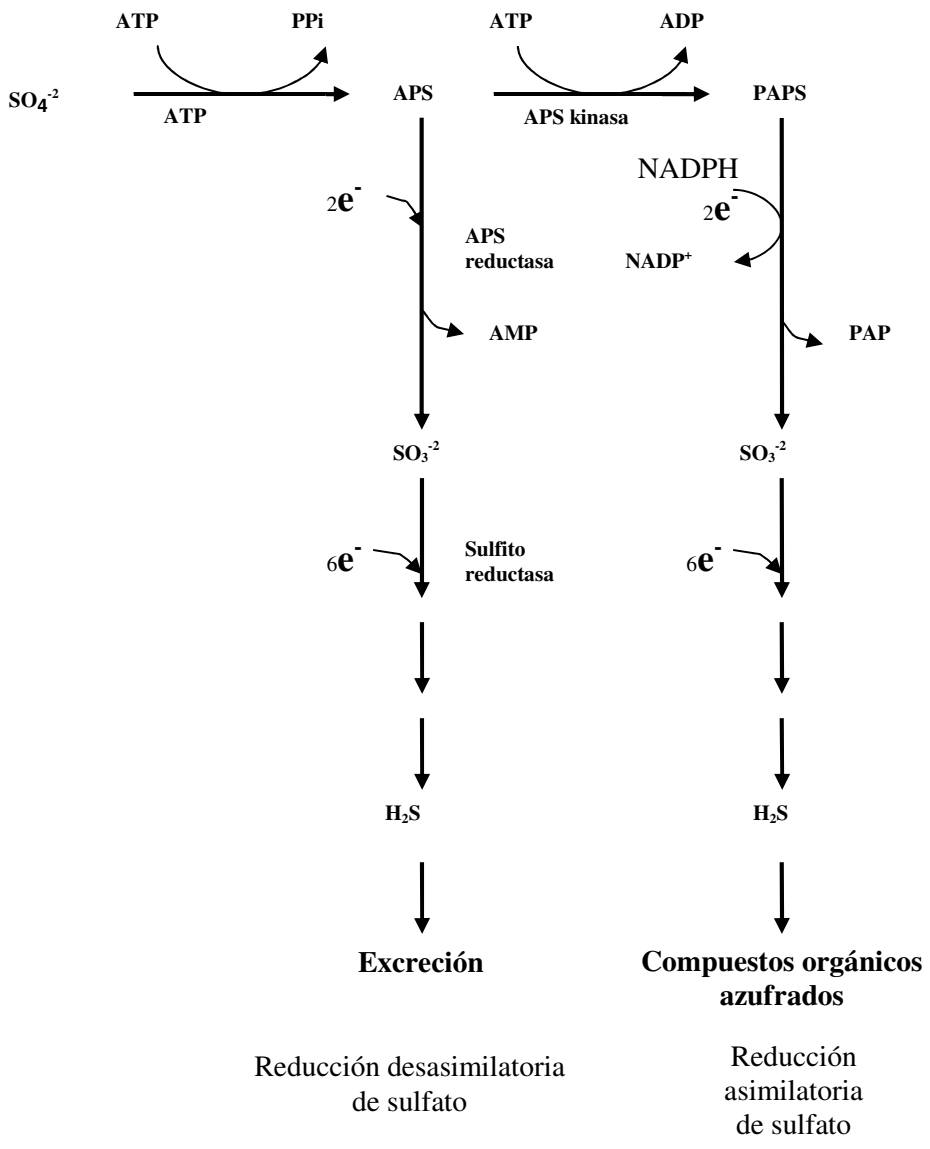


Figura 3. Esquema de la reducción asimilatoria y desasimilatoria de sulfato, adaptado de Madigan *et al.*, 2000.

DIGESTIÓN ANAERÓBICA COMO MÉTODO DE TRATAMIENTO DE RESIDUOS AGRÍCOLAS

4.1 Digestión anaeróbica

La digestión anaeróbica es una fermentación microbiana de oxígeno, da lugar a una mezcla de gases (principalmente metano y dióxido de carbono), conocida como "biogás", y una suspensión acuosa o "lodo" que contiene los componentes difíciles de degradar y los minerales inicialmente presentes en la biomasa (Quispe *et al.,* 2005). El proceso anaerobio ocurre de forma espontánea en la naturaleza para degradar la materia orgánica, produciendo, por ejemplo, el gas de los pantanos, el gas natural de yacimientos subterráneos o el gas metabólico del estómago de los rumiantes.

La materia prima preferentemente utilizable para someterla a este tratamiento es la biomasa residual, con alto contenido en humedad, especialmente los residuos orgánicos municipales, agrícolas y ganaderos.

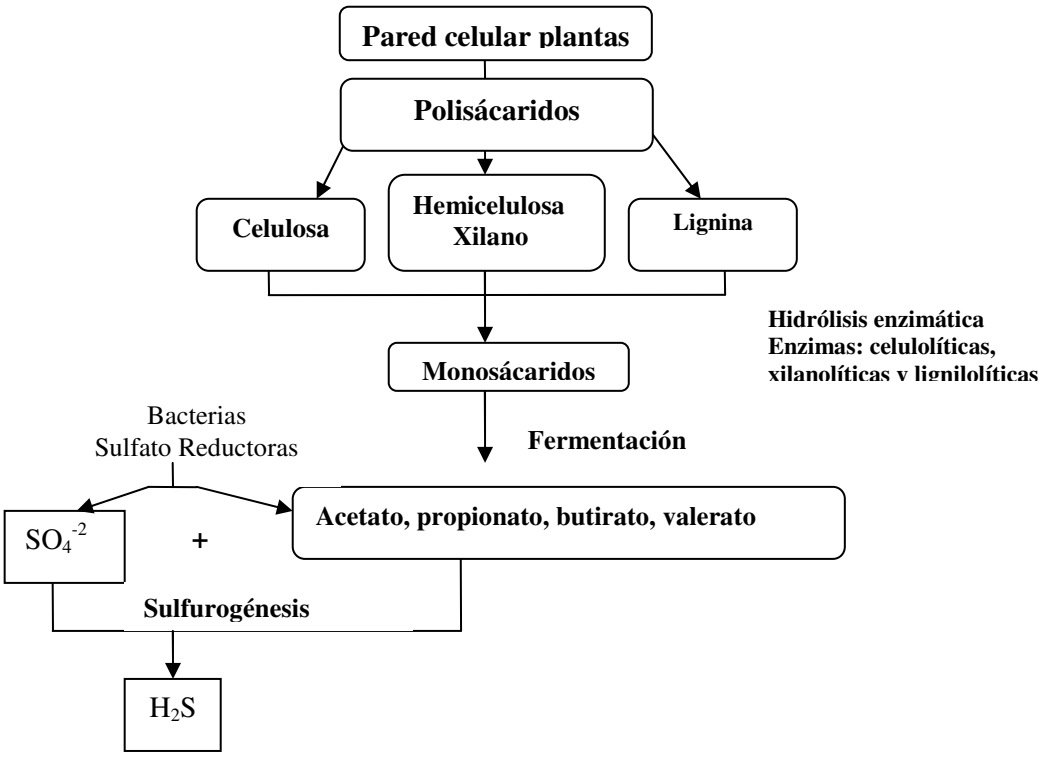


Figura 4. Esquema de la degradación anaerobia de polisácaridos constituyentes de la pared celular de plantas y producción de H_2S.

4.2 Desechos agrícolas

Uno de los principales desechos agrícolas son los diferentes tipos de paja, los mismos son ricos en celulosa, hemicelulosa lignina y xilanos, materiales poliméricos extremadamente abundantes alrededor del mundo (Sun *et al.,* 2005) El uso de estos residuos agrícolas podría abrir nuevos mercados y mejorar la economía basada en la agricultura rural (Panthapulakkal *et al*., 2005).

El uso de material de desecho agrícola tiene muchas ventajas como su abundancia y disponibilidad (Chun *et al*., 2004), baja densidad, propiedades altamente específicas, naturaleza no abrasiva, renovabilidad y no causa daño al medio ambiente (Panthapulakkal *et al*., 2005).

4.2.1 Composición de los desechos agrícolas

Dependiendo de su naturaleza los desechos agrícolas presentarán cantidades variables en el contenido de celulosa, xilano y lignina (Tabla 6).

Tabla 6. Composición de algunos materiales lignocelulósicos (dados en porcentaje sobre la base de materia seca), adaptado de Sánchez (2005).

Biomasa lignocelulósica	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Paja de arroz	40	25	12
Cascarilla de arroz	35	25	20
Paja de trigo	30	50	20
Paja de avena	41	16	11
Madera	40-55	20-35	25-30
Bagazo de caña de azúcar	40	24	25

De una manera más detallada se describen a continuación las sustancias macromoleculares que componen los materiales lignocelulósicos.

4.2.1.1 Celulosa

La celulosa es el polisácarido natural más abundante (Castillo, *et al*., 2002) y el principal carbohidrato sintetizado por las plantas. Es un polímero de glucosa lineal unido por enlaces β-1-4, glucosídicos (Béguin & Aubert, 1994), la longitud de las

cadenas varía entre 100 y 14000 residuos (Hongpattarakere, 2002) y tiene una estructura simple primaria y otra compleja terciaria.

Las propiedades fisicoquímicas de la celulosa son el índice o grado de polimerización, la cristalinidad y la porosidad. En las plantas superiores, la celulosa aparece en forma de microfibrillas en las paredes primarias y secundarias lo cual es el resultado de la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas, que se orientan en dominios cristalinos paralelos altamente ordenados y "salpicados" por regiones amorfas más desordenadas (Béguin & Aubert, 1994). El grado de cristalinidad de las microfibrillas de celulosa depende de la fuente, edad, y pretratamiento del material del que provenga (González *et al.*, 2004).

En la naturaleza la mayoría de la celulosa es degradada aeróbicamente, solo entre un 5-10% se degrada de forma anaeróbica (Galler & Winter, 2005). Su hidrólisis enzimática requiere de la acción de las endo y exoglucanasas.

La endoglucanasa actúa al azar y produce oligosácaridos con cadenas de longitud variable. La celobiobiohidrolasa solo ataca a los polímeros de extremo no reductor. Los disacáridos formados son finalmente hidrolizados a glucosa por la β-glucosidasa (Hongpattarakere, 2002). La celulasa es una enzima compleja que se encarga de la degradación de la celulosa y consta de dos unidades importantes como mínimo: C-1, que rompe los enlaces de hidrógeno, liberando cadenas de glucosa susceptibles a una posterior hidrólisis, y C-X, que hidroliza estas cadenas hasta celobiosa y glucosa. Las celulasas parecen diferir en su capacidad para absorber el factor hidrolítico (González *et al.*, 2004).

4.2.1.2 Xilano

El xilano es el principal constituyente de la hemicelulosa de las paredes celulares de las plantas (Sung-Taik & Lee, 1997) y el segundo polisácarido más abundante en la naturaleza (Hongpattarakere, 2002), y junto a la celulosa forman más del 50% de la biomasa total de las plantas (Sá Pereira *et al.*, 2003). Es abundante en residuos agrícolas como tallos de maíz, vainas y pajas de cereales, pudiendo representar del 15-30% de los residuos. La forma en que se asocia con la celulosa podría ser explicada por su capacidad para ser comprimido entre grupos íntimamente asociados en los que podría ocupar espacios en lugar de la celulosa.

El xilano es un polisácarido que aparece casi en todas las plantas y que es insoluble en agua, soluble en solución alcalina, hidrolizado con facilidad y levógiro. Los xilanos son heteroglicanos ramificados con un esqueleto de residuos de xilanopiranosa unidos por enlaces β. El xilano aparece enredado en la fibra de celulosa aunque no es un componente de la región micelar cristalina (González *et al.*, 2004).

La degradación completa del xilano requiere de la acción de varias enzimas. Las xilanasas ó O-glucosido hidrolasas, son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos entre dos o más carbohidratos, o entre un carbohidrato y un no carbohidrato. Las endo-β-1,4-xilanasas, β-1,4-xilosidasas, y las exoxilanas son enzimas capaces del rompimiento de cadena de los principales grupos glicosilo (Sá Pereira, *et al.*, 2003).

4.2.1.3 Lignina

Después de la celulosa es el polímero más abundante en el mundo vegetal y su función es asegurar protección contra la humedad y los agentes atmosféricos además de actuar como elemento aglomerante de las fibras. La lignina es un polímero tridimensional fenólico (Voet & Voet, 2000). El término lignina no se refiere a un compuesto simple, bien definido, sino es un término colectivo que engloba a una serie de compuestos estrechamente relacionados (González *et al.*, 2004).

Las ligninas han sido clasificadas en lignina nuclear o central y lignina no nuclear (Lapierre, 1993). La lignina nuclear representa el principal polímero de lignina (Van Soest, 1994), y consiste en un polímero fenilpropanoide altamente condensado (Lapierre, 1993). En cambio, la lignina no nuclear consiste en fenoles de bajo peso molecular (p.ej. *p*-coumárico, ácido ferúlico, y sus dímeros). Los ácidos fenólicos pueden estar ligados a la lignina nuclear, a los polisacáridos, o a ambos en la pared celular de las plantas (Lapierre, 1993).

La lignina puede ser degradada por microorganismos, aunque en una tasa muy baja. Los mohos han demostrado ser los más eficientes debido a que producen las principales enzimas envueltas en la degradación de la celulosa, así como fenol oxidasas que oxidan los monómeros de fenil propano de la lignina (Enfors & Häggström, 2000).

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Determinar la precipitación de sulfuros metálicos mediante el uso de H_2S biogénico producido a partir de la degradación anaeróbica de material celulósico y xilanósico.

5.2 Objetivos específicos

- Comparar la producción de H_2S biogénico en cultivos en batch anaeróbicos a través de la degradación de diferentes sustratos celulósicos y xilanósicos: paja de trigo (*Triticum graminae*), de avena (*Avena sativa*), de quinua (*Chenopodium quinua willdenow*), paja brava (*Festuca Orthophylla)*, cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) y hojas secas de *Ulmus pumila.*

- Determinar la hidrólisis anaeróbica de distintos materiales crudos celulósicos y xilanósicos a través de la actividad enzimática.

- Seleccionar el mejor sustrato a través de la producción óptima de H_2S y la reducción desasimilatoria de SO_4^{-2}

- Establecer un sistema continuo de mayor escala para la producción de H_2S a partir de la hidrólisis anaeróbica del mejor sustrato seleccionado.

- Establecer un sistema de precipitación de metales pesados empleando el H_2S biogénicamente producido.

DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Material y métodos

6.1.1 Material biológico

6.1.1.1 Consorcio microbiano

Una muestra consistente en una mezcla de biomasa de algas y lodo fue colectada en las orillas de la laguna termal Chalviri (Temperatura = 45°C) (ver anexos) en Potosí, Bolivia. Para la colecta se usaron botellas de plástico llenadas hasta el tope para asegurar un mínimo espacio de aire, manteniéndose de esta manera bajos niveles de oxígeno. La muestra fué mantenida a 4°C hasta el momento de su uso. El consorcio microbiano presente en dicha muestra fue denominado A10 y ha sido anteriormente estudiado comprobándose su capacidad de degradar celulosa y xilano y producir sulfuro de hidrógeno (Alvarez, 2005).

6.1.1.2 Material celulósico y xilanósico

Todo el material celulósico y xilanósico fue obtenido de desechos agrícolas provenientes de distintas locaciones geográficas de Bolivia, como material donado por personas particulares.

6.2 Preparación del inóculo

El consorcio microbiano A10 fue activado en medio Postgate C modificado (Postgate, 1984) (ver anexos) diferentes empleando la técnica modificada de Hungate (1969) (Fig. 5). En un matraz erlenmeyer de 500 mL de capacidad fueron colocados 400 mL de medio Postgate C modificado y 8 g de paja de trigo previamente autoclavada (como soporte de la biomasa y donador de electrones), como agente reductor se agregó 0.8 mL de tioglicolato de sodio al 2%, el pH fue ajustado con KOH al 20% a 7.5. Posteriormente se saturó la atmósfera con N_2 y se inoculó 8 mL del consorcio microbiano A10. El cultivo batch se estableció en condiciones de temperatura ambiente durante un tiempo de 30 días.

6.3 Condiciones de cultivo

6.3.1 Cultivo batch

Para comparar la utilidad de los diferentes sustratos xilanósicos y celulósicos se establecieron 6 sistemas de cultivo anaeróbico en batch (en duplicado) utilizando la técnica modificada de Hungate (Fig. 5). Los cultivos anaeróbicos en batch se montaron en matraces erlenmeyer de 500 mL de capacidad conteniendo 400 mL de medio Postgate C modificado y 40 g de uno de los siguientes sustratos previamente autoclavados: paja de trigo (*Triticum graminae*), paja de avena (*Avena sativa*), paja de quinua (*Chenopodium quinua willdenow*), paja brava (*Festuca orthophylla)*, cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) u hojas secas de *Ulmus pumila.* Los sistemas se inocularon con 8 mL de consorcio A10, previamente activado. Las conecciones fueron selladas con silicona y la atmosfera interna fue desplazada con N_2 para asegurar las condiciones anaeróbicas. Al sistema se conectaron una jeringa de 10 mL para la toma de muestras y una bolsa colectora de gas para evitar la sobrepresión del sistema (Fig. 5).

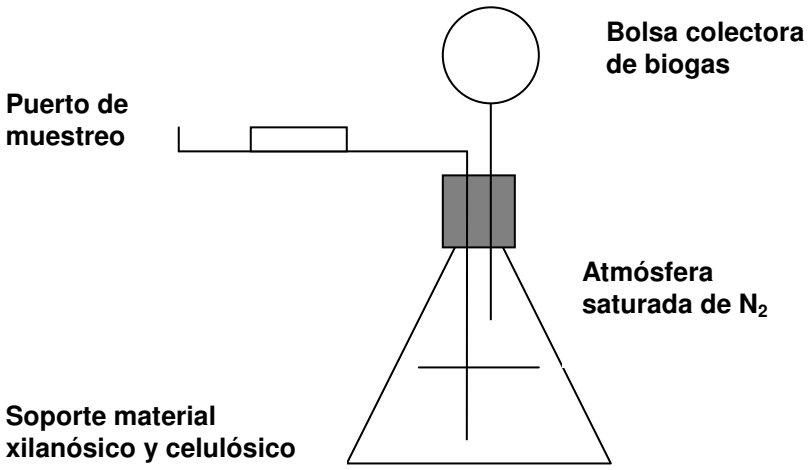


Figura 5. Esquema del sistema anaeróbico utilizado para la activación, establecimiento de las cepas y en los cultivos batch iniciales del presente estudio. (Técnica de Hungate, 1969).

6.3.2 Cultivo continuo

Para el escalado del proceso se armaron cuatro biorreactores de lecho empacado en frascos de vidrio de 3500 mL de capacidad (3 de prueba y un control), estos fueron empacados con 200 g de paja de trigo previamente autoclavada, se agregó 2500 mL

de medio Postgate C modificado previamente autoclavado y regulado a pH 7.5. Los tubos de conexión de tygon fueron sellados con silicona para asegurar las condiciones anaeróbicas. En el biorreactor 1 se usó un inóculo de 250 mL del cultivo previamente activado. Los biorreactores 2 y 3 fueron inoculados con 250 mL del biorreactor 1. El flujo de los biorreactores 0.17 mL/min en una primera etapa (A) y 0.1 mL/min (B) se mantuvo constante mediante bombas peristálticas de un canal (Cole Parmer) manteniendo así la Dilución (D) en las diferentes etapas del cultivo (D= 0.1 d^{-1} y 0.06 d^{-1}) (Fig. 6).

El cambio de carga orgánica en el biorreactor 1 se realizó después de un tiempo de residencia de 180 días, manteniendo un 30% del lodo activado. No se realizó cambio de carga orgánica en los bioreactores 2 y 3.

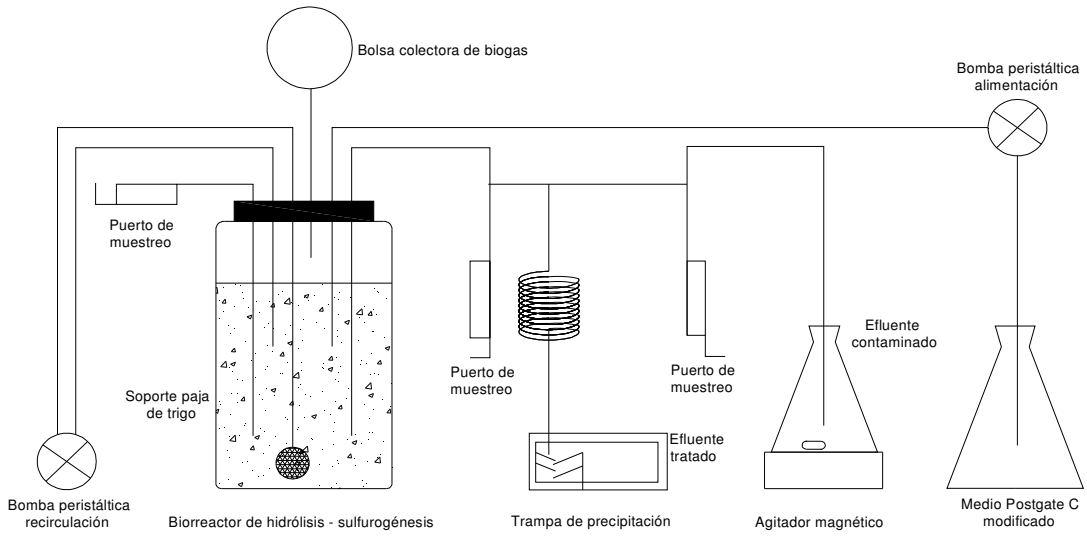


Figura 6. Diagrama esquemático del biorreactor anaeróbico de lecho empacado usado en el estudio.

6.4 Trampa de precipitación de metales pesados

El proceso de precipitación de metales pesados empleando H_2S biogénicamente producido se llevó a cabo en una trampa de vidrio de 300 mL de capacidad, construida con láminas de vidrio de grosor mediano. Una cámara de precipitación separada favorecía la sedimentación del sulfuro metálico (Fig. 7).

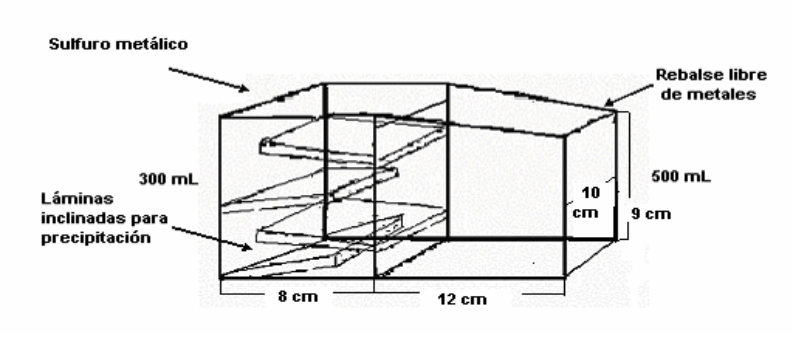


Figura 7. Trampa de precipitación de metales pesados para el tratamiento con sulfuro de hidrógeno de origen biogénico (Diseño de Teresa Alvarez).

Se prepararon efluentes artificiales que contenían algunos de los minerales explotados más representativos de la mina Bolívar. Los primeros ensayos se realizaron con soluciones de un solo metal: cobre, zinc o plomo a diferentes concentraciones. Ensayos posteriores se realizaron preparando mezclas a diferentes concentraciones de los 3 metales. Finalmente, se realizaron las pruebas con el efluente real de la mina Bolívar (ver tabla 6). Los efluentes artificiales y naturales se mantuvieron en constante agitación con agitadores magnéticos (Fisatom).

Para lograr una mezcla homogénea del sulfuro biogénico con el efluente de metales se conectó un tubo al rebalse del biorreactor y otro al matraz erlenmeyer (1000mL) con la solución de metales. En una primera etapa se tomaron diariamente 150 mL del rebalse y 150 mL del efluente, ambos se mezclaron en un tubo en espiral de tygon y fueron conducidos a la trampa de precipitación (Fig. 7), eliminando diariamente el contenido de la trampa. En una segunda etapa se tomaron 50 mL del rebalse y 50 mL del efluente, sin eliminar el contenido de la trampa.

En la trampa de precipitación de metales se hicieron controles diarios de pH con un pHmetro (Hanna Instruments) y del potencial redox (E_h) con un potenciometro de oxido-reducción sumergible (Cole Parmer).

6.5 Toma de muestras

Para las determinaciones analíticas y la determinación de precipitación de metales se tomaron diariamente 10 mL de muestra del biorreactor y 10 mL del rebalse de la trampa, utilizando jeringas de plástico, inmediatamente después de la toma, las muestras se filtraron a través de una membrana millipore de 0.45 µm, y posteriormente se realizaron los análisis respectivos.

6.6 Determinaciones analíticas

6.6.1 Determinación de sulfuro de hidrógeno (H_2S)

6.6.1.1 Ensayo de acetato de plomo

Para determinar si las bacterias presentes en el cultivo producían sulfuro de hidrógeno por reducción de sulfato, se colectó con una jeringa de 50 mL una fracción de la fase gaseosa y se esparció sobre una tira de papel filtro empapada en acetato de plomo al 10%. Una mancha marrón oscuro indica que el H_2S esta siendo producido de acuerdo a la siguiente reacción:

$$\text{Acetato de Pb} + H_2S \longrightarrow PbS_2$$

(Coloración marrón oscuro)

Este ensayo es usado como un control cualitativo de la producción de sulfuro de hidrógeno (Batziris *et al.*, 1999).

6.6.1.2 Método turbidimétrico

El sulfuro disuelto fue medido inmediatamente para prevenir su oxidación, para esto se utilizó el método descrito por Cord-Ruwish (1995). A una cubeta con 1950 µL de reactivo de cobre se añadió 50 µL de muestra (filtrada por 0.45 µm), se agitó manualmente y se leyó en espectrofotómetro (Cintra 5, GBC Scientific), a 480 nm. El blanco consistió de 1950 µL de reactivo de cobre y 50 µL de ácido clorhídrico 50 mM. Cada muestra fue analizada por triplicado y el valor promedio de la absorbancia fue usado para calcular la concentración de H_2S. La curva de calibración fue lineal a 480 nm hasta una absorbancia de 0.6094 correspondiendo a una concentración de 50 mM.

6.6.2 Determinación de sulfato

La concentración de sulfato fue determinada empleando el método turbidimétrico descrito por Kolmert *et al* (2000). En este método en un tubo de ensayo con 1 mL de reactivo condicionante se añadió 1 mL de muestra (previamente filtrada con filtro de poro 0.45 µm) y se mezcló vigorosamente. Se añadió aproximadamente 60 mg de cloruro de bario, se mezcló en vortex (Maxi mixer) durante 30 segundos y se leyó en espectrofotómetro (Cintra 5, GBC Scientific) a 420 nm. El blanco consistió de 2 ml de reactivo condicionante con 60 mg de cloruro de bario. Las muestras fueron diluidas 20

veces para que los datos se encuentren determinados dentro de la linearidad de la curva estándar. Cada muestra fue analizada por triplicado y el valor promedio de la absorbancia fue usado para calcular la concentración. La curva de calibración fue lineal a 420 nm hasta una absorbancia de 1.6 correspondiendo a una concentración de sulfato de 5 mM (ver anexos).

6.6.3 Análisis de ácidos grasos volátiles (AGVs)

6.6.3.1 Determinación de AGVs por HPLC

El análisis de ácidos grasos volátiles fue analizado por HPLC, como es descrito por Parawira *et al*. (2004).

Se recolectó 2 mL de muestra tres veces por semana de cada uno de los biorreactores, se filtraron por una membrana millipore de 0.45 µm y se las mantuvo a -20°C hasta el momento del análisis. La concentración individual de AGVs fue determinada usando cromatografía liquida de alta resolución HPLC (Star 900, Varian), con una columna Biorad, Cat 125-0115 para el monitoreo de la fermentación. La temperatura de la columna fue de 65°C, se usó ácido sulfúrico (1mM) como fase móvil y el flujo del líquido fue de 0.8 $mLmin^{-1}$.

6.6.4 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de las diferentes enzimas envueltas en la hidrólisis de material xilanósico y celulósico fue analizada por una versión modificada del procedimiento del ácido dinitrosalicílico (DNS) según Miller (1959), descrito por Alvarez *et al*. (2005). Usando como estándares para las curvas de calibración glucosa y xilosa y como sustratos para la reacción enzimática carboximetil celulosa, p-nitrofenilglucopiranósido, xilano, p-nitrofenilxilanopiránosido y almidón.

Para la determinación de la actividad enzimática a un tubo de ensayo con 1.5 mL de buffer (citrato para glucanasas y amilasas, y fosfato para xilanasas) se añadió 0.5 mL de muestra (previamente centrifugada y filtrada con filtro de poro 0.45 µm). Se incubó durante 1 hora a 50 °C y se añadió 3 mL de reactivo DNS, se incubó nuevamente A100 °C durante 10 minutos, finalmente se añadió 5 mL de agua destilada y se leyó al espectrofótometro (Cintra 5, GBC Scientific) a 540 nm. Para el control se siguieron los

mismos pasos salvo la enzima (muestra tal cual) que se añadió después de la incubación a 50 ^{o}C. El blanco consistió de 1.5 mL de buffer, 0.5 mL de sustrato, 3 mL de reactivo DNS y 5 mL de agua destilada.

Las actividades enzimáticas se determinaron restando la absorbancia del tubo control al test, y ejecutando este valor en la ecuación de la recta, proveniente de la curva de calibración (ver anexos).

$$\text{ABS real} = \text{ABS test} - \text{ABS control}$$

Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol/min de azúcar reductor expresado como equivalentes de glucosa o xilosa.

6.6.5 Determinación de la concentración de metales pesados

Para la determinación de la concentración de metales las muestras fueron tratadas como es descrito por Pott y Mattiason (2004). Se tomaron 10 mL de muestra de la trampa de precipitación, las muestras se filtraron usando filtros millipore de poro 0.45 μm para remover los desechos celulares y metal precipitado. Las muestras filtradas fueron tratadas con peróxido de hidrógeno 3.5% v/v para oxidar el sulfuro remanente y detener la reacción de precipitación. Después del tratamiento con peróxido toda la noche, se añadió ácido nítrico concentrado y se almacenaron las muestras a 4ºC hasta el día del análisis. Los recipientes para el almacenamiento de muestras fueron remojados en HNO_3 al 1% toda la noche, enjuagados con agua ultra pura y secados al medio ambiente antes de su uso.

La concentración de metales pesados fue cuantificada por el método de llama Absorción Atómica como es descrito por Drury (1999).

Se prepararon soluciones estándar de cada uno de los elementos a determinarse (Cu, Pb y Zn). Se establecieron las curvas de calibración de cada metal y se leyeron las muestras en el espectrofotómetro de absorción atómica (AAnalyst 100, Perkin Elmer), utilizando oxígeno como gas oxidante y acetileno como gas combustible.

RESULTADOS

7.1 Cultivos batch

7.1.1 Actividad enzimática

En la figura 8 se observa la actividad de las endoxilanasas y exoxilanasas en los cultivos batch que contienen distintos sustratos de origen celulosico y xilanosico, inoculados con el consorcio A10.

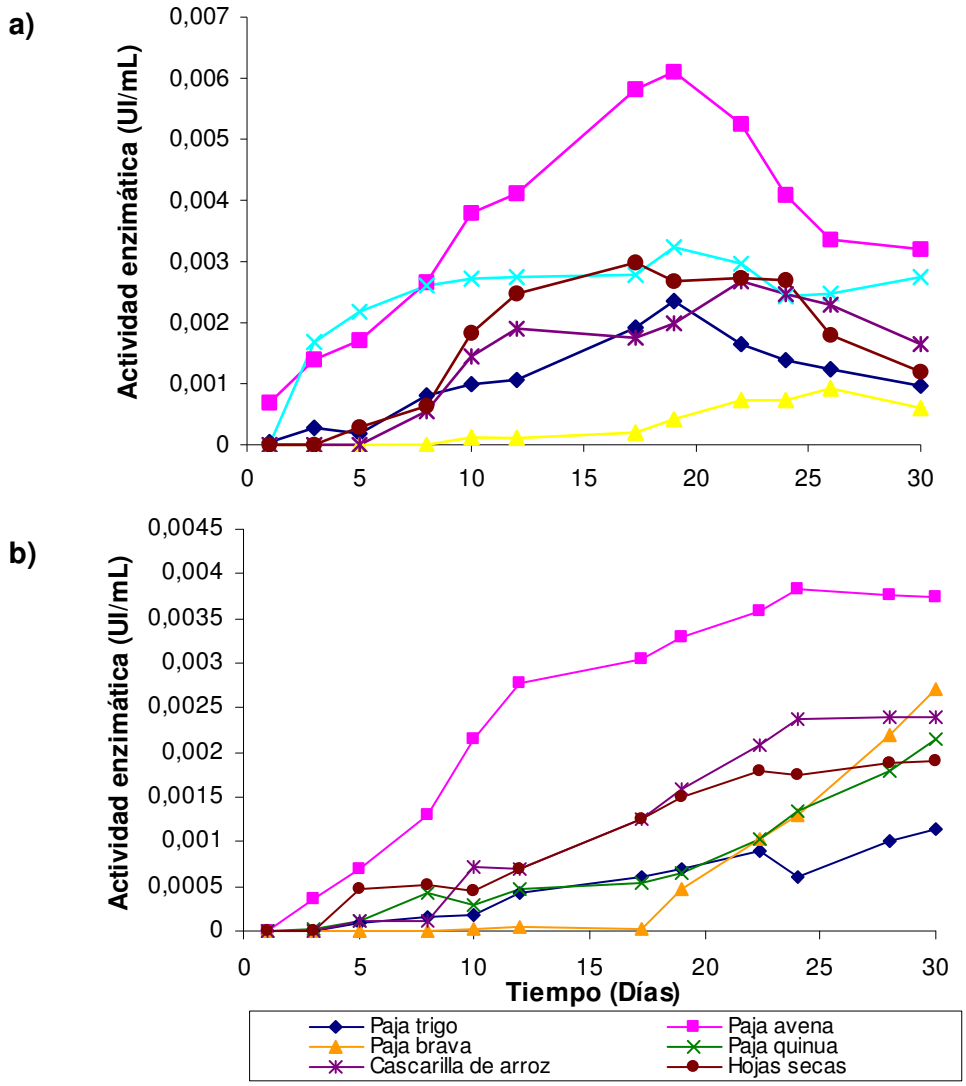
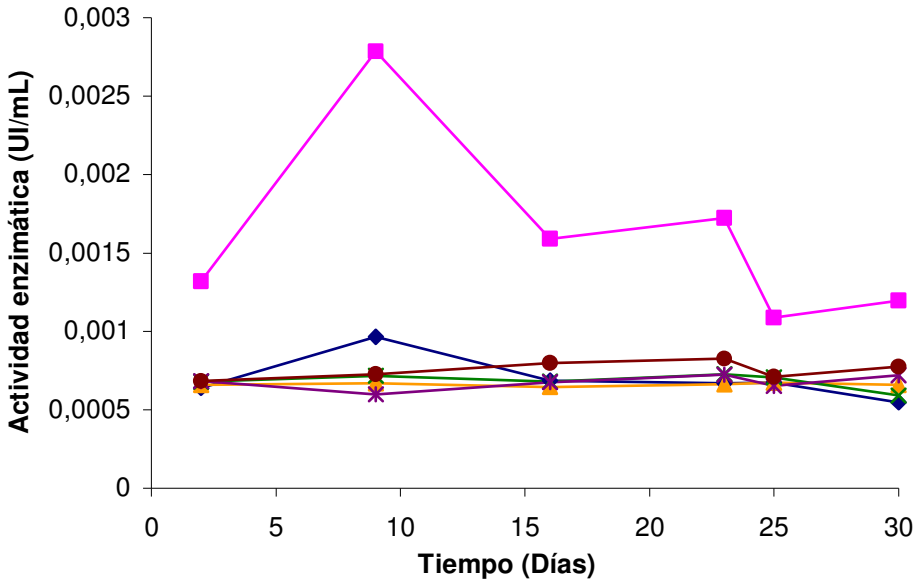


Figura 8. a) Actividad enzimática de Endoxilanasa b) Actividad enzimática de β-xilosidasa en los cultivos batch montados con los diferentes materiales celulósicos y xilanósicos. El tiempo de experimentación fue de 30 días.

En la figura 9 se observa la actividad de las endoglucanasa y exoglucanasas en los cultivos batch que contienen distintos sustratos de origen celulosico y xilanosico, inoculados con el consorcio A10.

a)



b)

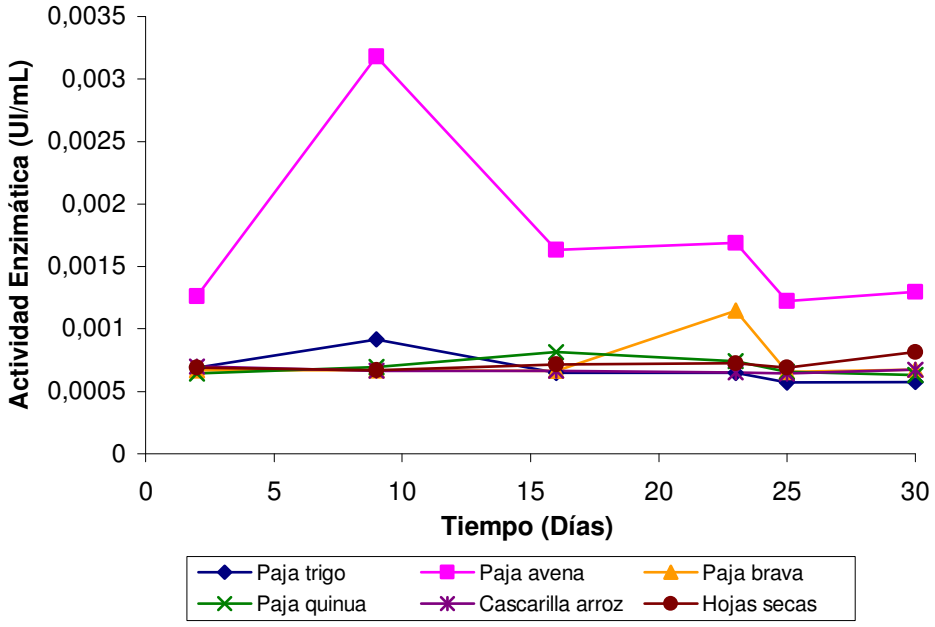
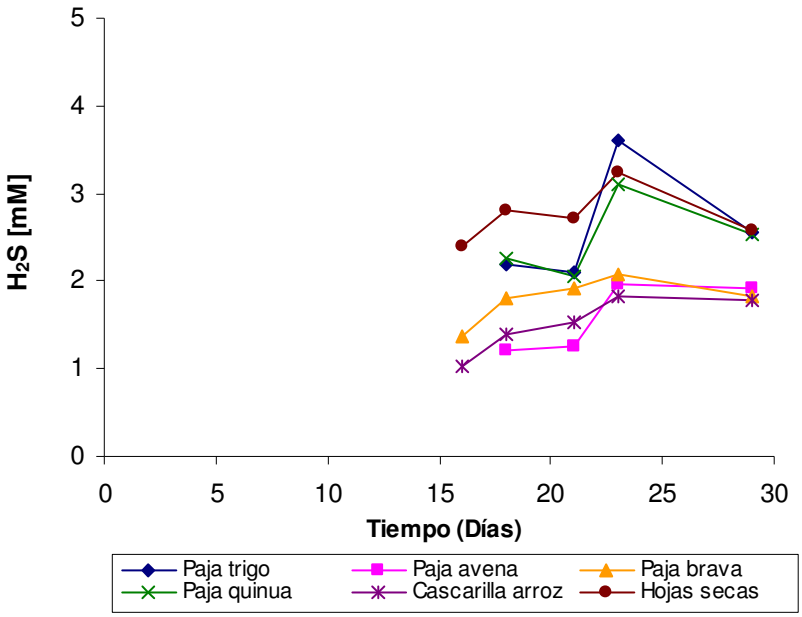


Figura 9. a) Actividad enzimática de Endoglucanasa y b) Actividad enzimática de β-glucosidasa en los cultivos batch montados con los diferentes materiales celulósicos y xilanósicos. El tiempo de experimentación fue de 30 días.

7.1.2 Producción de sulfuro de hidrógeno y reducción de sulfato

En la figura 10 se observa el comportamiento del consorcio respecto a la reducción de sulfato en el medio en los cultivos batch montados con los distintos sustratos y la producción de H_2S. La producción de H_2S comienza alrededor de la segunda semana. Se evidencia también que la mayor reducción de sulfato se da en el cultivo batch en el que se utilizó como sustrato paja de trigo.

a)



b)

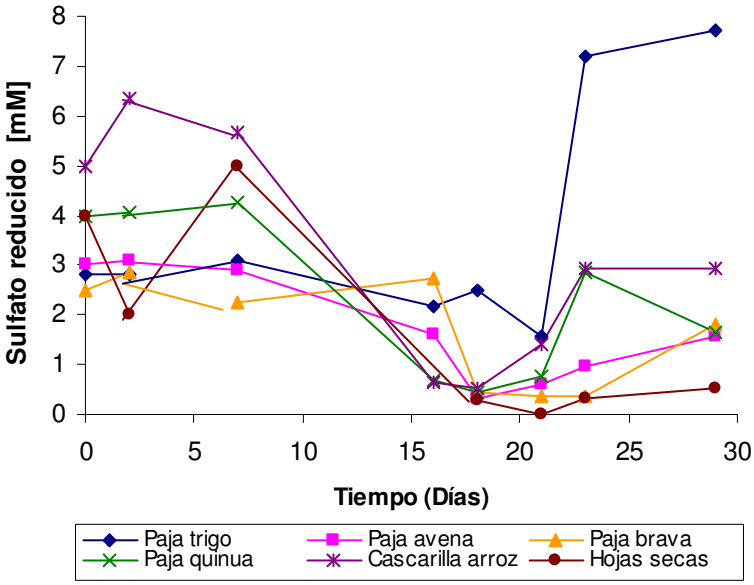


Figura 10. a) Producción de sulfuro de hidrógeno y b) Sulfato reducido por el consorcio A10 en los cultivos batch montados con los diferentes materiales celulósicos y xilanósicos. El tiempo de cultivo fue de 30 días.

7.2 Cultivo continuo

Un resumen de las condiciones de los biorreactores inoculados con el consorcio A10 se presenta en la tabla 6. La tabla muestra un promedio de las concentraciones iniciales y finales de sulfato y un promedio de la producción de sulfuro. El tiempo de cultivo fue de 365 días. El volumen de los biorreactores fue de 2500 mL.

Tabla 7. Condiciones de los biorreactores durante el tiempo de cultivo

Biorreactor	Condición	Dilución (d-1)	TRH (días)	SO^{-2}_4 inicial (mM)	SO^{-2}_4 Reducido Promedio (mM)	SO^{-2}_4 % Remoción (mM)	H_2S Promedio Producido (mM)
1*	**A**	0.1	10	32	7.90	25	10.49
	B	0.06	16.67	32	12.36	39	3.61
2	**----**	0.06	16.67	32	9.82	31	3.59
3	**----**	0.06	16.67	32	9.57	30	4.49

*** Recambio de carga orgánica a los 180 días**

7.2.1 Producción de sulfuro de hidrógeno y reducción de sulfato

En la figura 11 se observa el comportamiento del biorreactor 1 respecto a la producción de sulfuro de hidrógeno, y la concentración de sulfato reducido. Este cultivo se mantuvo en batch hasta el día 30, una vez establecido el cultivo batch, se empezó con el cultivo continuo, en el que distinguimos dos fases:

A: Cultivo continuo, período en el que se comienza la alimentación con 250 mL de medio Postgate C modificado; dilución D=0.1 d-1, parámetros constantes durante 9 tiempos de retención (90 días) Se registró una producción máxima de H_2S de 25 mM.

B: Cultivo continuo, con un flujo de alimentación de 150 mL/día de medio Postgate C modificado y dilución D =0.06 d-1, parámetros constantes durante 15 tiempos de retención. Se registró una producción máxima de H_2S de 6.2 mM.

Cambio de carga orgánica, después de un tiempo de residencia de 180 días, se recambió la carga orgánica, para lo cual se reemplazó el 70% del contenido de paja del biorreactor.

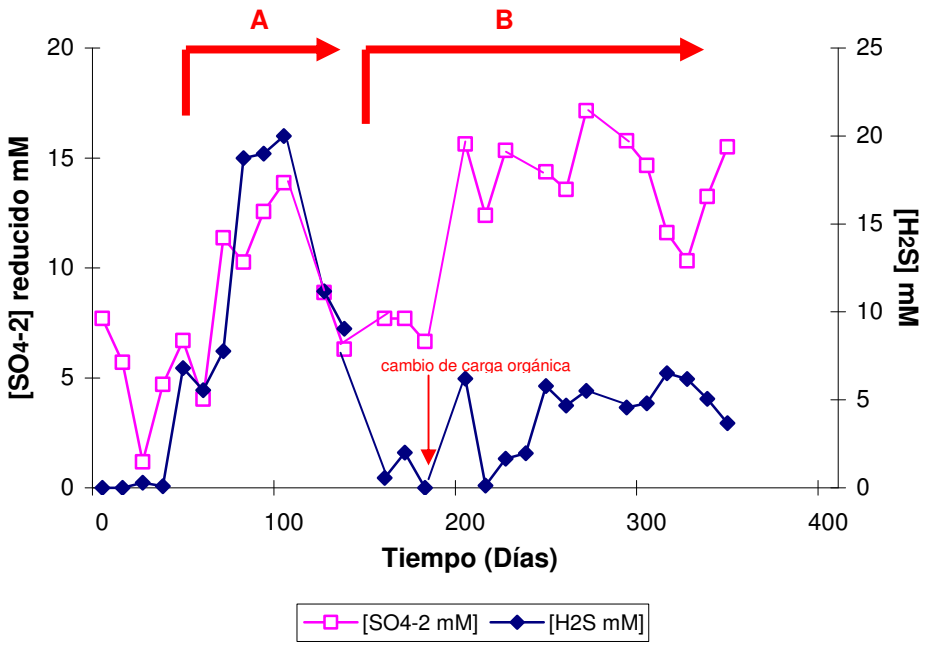


Figura 11. Biorreactor 1. Producción de sulfuro de hidrógeno biogénico a partir de material xilanósico -paja de trigo usando consorcio bacteriano A10 y concentración de sulfato reducido.

Los biorreactores 2 y 3 se pusieron en marcha cinco meses después del establecimiento del primer biorreactor. Después de mantener las condiciones en batch por 30 días se estableció el cultivo continuo. El flujo de alimentación fue de 150 mL/día de medio Postgate C, la velocidad de crecimiento fue de 0.06 d-1. La producción máxima de H_2S de los biorreactores 2 y 3 fue de 24 mM y 8.2 mM respectivamente. Las líneas punteadas indican una segunda etapa de cultivo batch (120 días). En los biorreactores 2 y 3 no se recambió la carga orgánica.

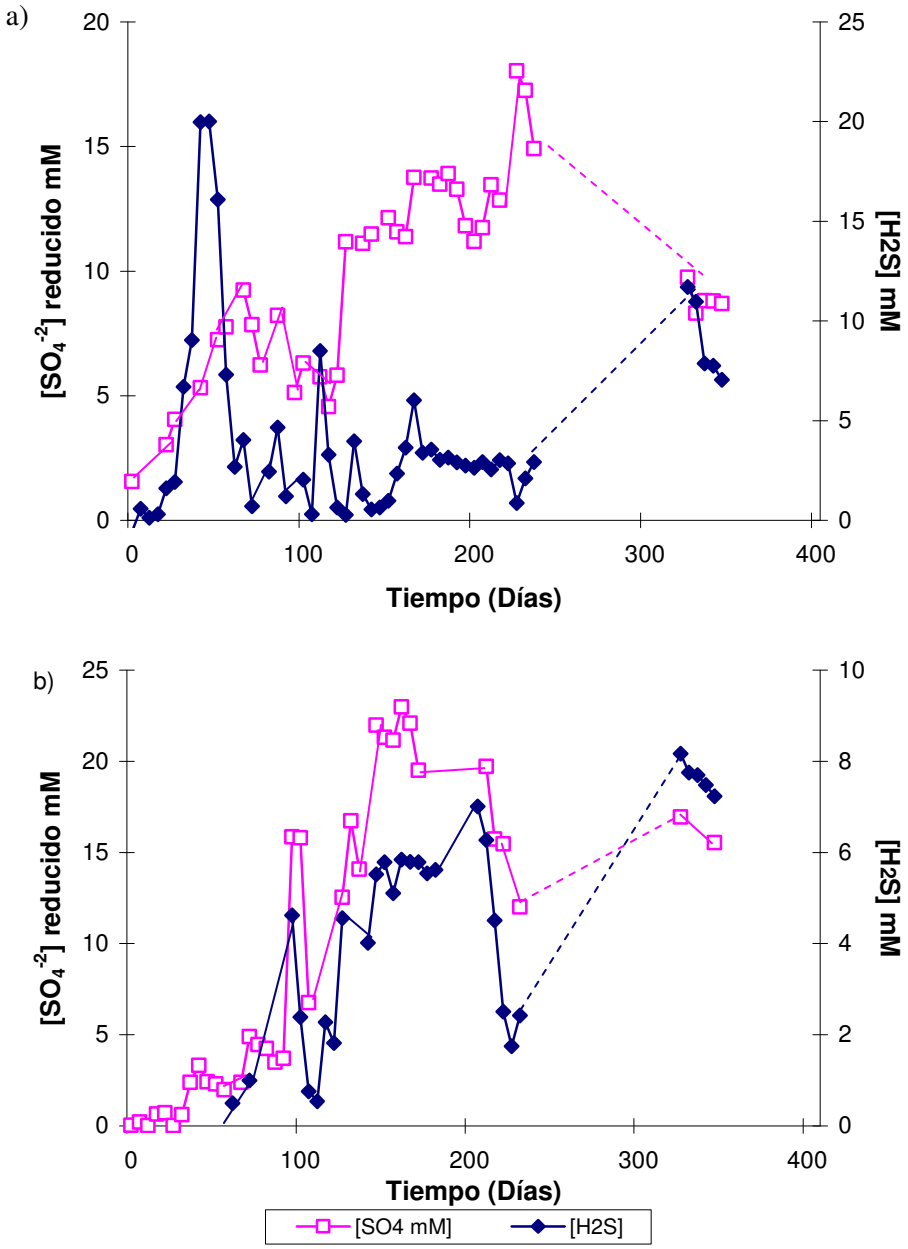


Figura 12. a) Biorreactor 2. b) Biorreactor 3. Producción de Sulfuro de hidrógeno biogénico a partir de material xilanósico-paja de trigo usando consorcio bacteriano A10 y concentración de sulfato reducido.

7.2.2 Producción de AGVs

Los principales ácidos grasos producidos durante la hidrólisis de la paja de trigo son el ácido acético y el ácido propiónico (Fig.13). Notése la relación directamente proporcional del consumo de estos ácidos por el consorcio microbiano A10 y el aumento de la producción de H_2S.

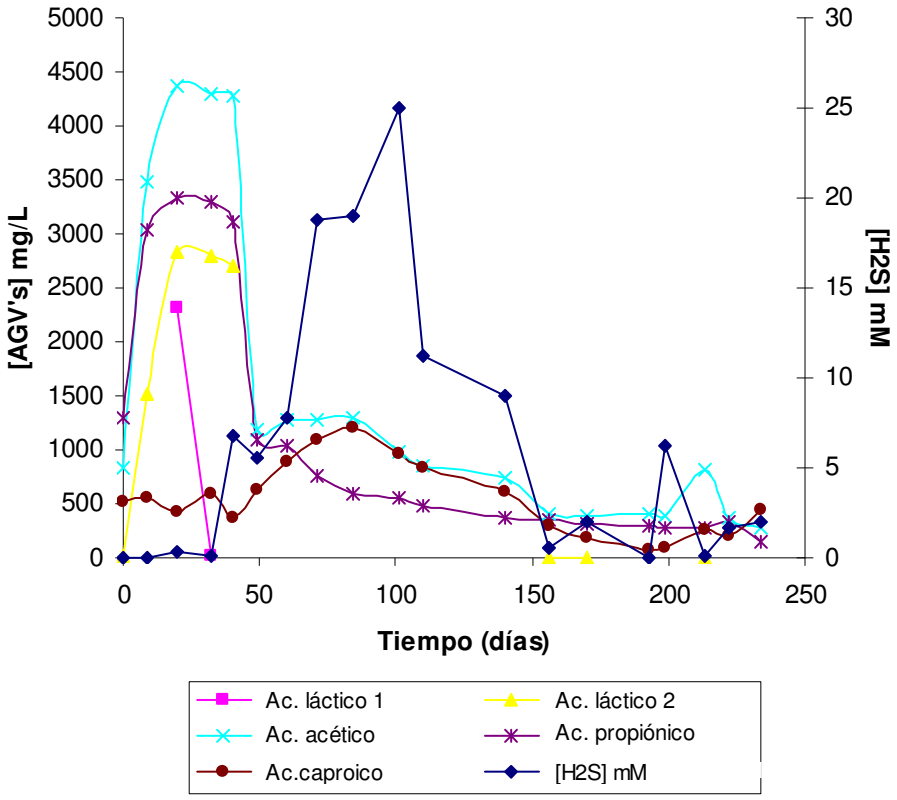


Figura 13. Relación entre la producción de AGVs y la producción de sulfuro biogénico en el biorreactor 1.

7.2.3 Actividad enzimática

La actividad enzimática de Endoglucanasa, β-glucosidasa, Endoxilanasa, β-xilosidasa (datos no mostrados) fue monitoreada durante 60 días en el biorreactor 1, alcanzando una actividad máxima el día 24 con 0.07 UI/mL.

7.2.4 pH y producción de sulfuro de hidrógeno

La figura 14 muestra la relación entre el pH y la producción de H_2S en los biorreactores 1, 2 y 3 durante el tiempo de cultivo. Después de la segunda etapa batch se observa un aumento del pH de los biorreactores 2 y 3.

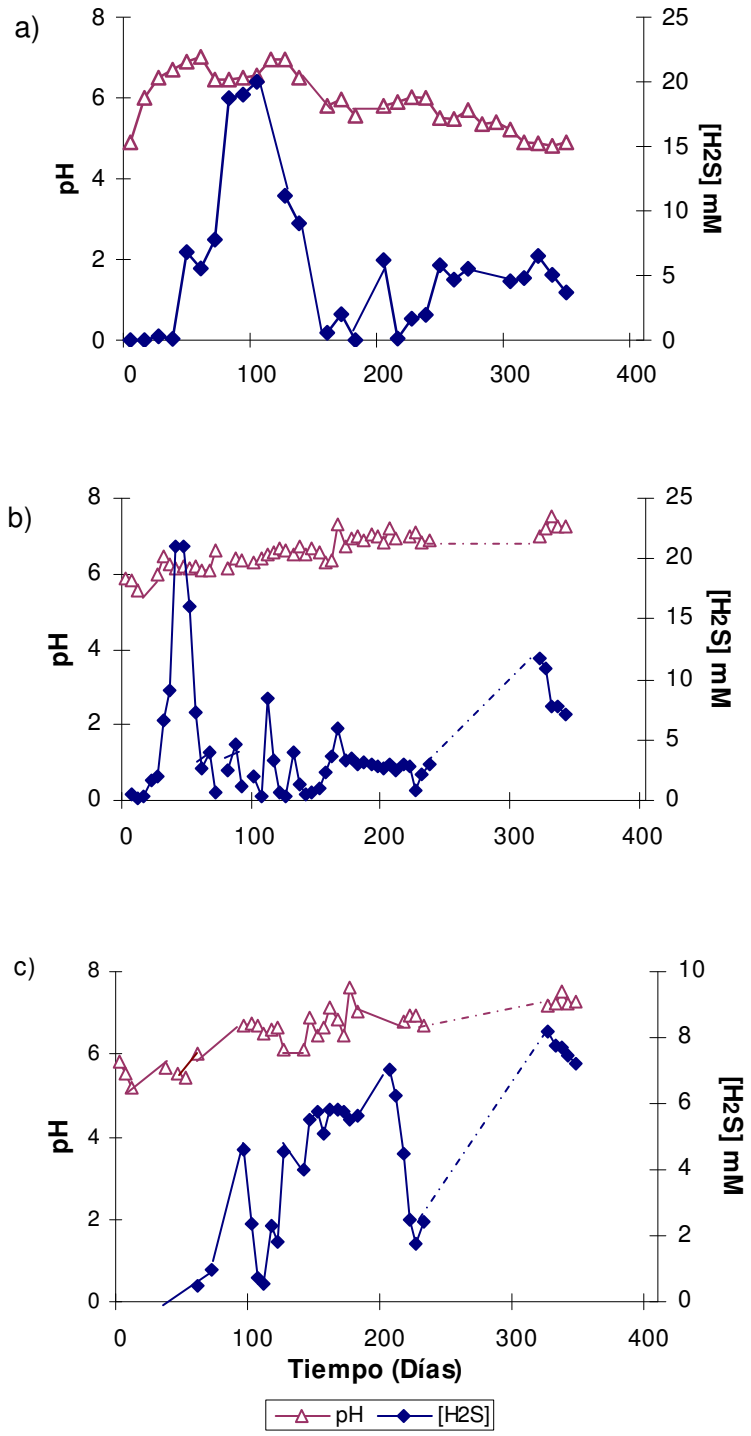


Figura 14. a, b y c. Relación entre la producción de sulfuro y el pH del medio en los biorreactores 1, 2 y 3.

7.3 Precipitación de metales pesados

La tabla a continuación muestra las concentraciones usadas de cada uno de los metales analizados antes y después del tratamiento con sulfuro biogénico. Los resultados son reportados como el promedio de porcentajes de ión metálico removido durante el tiempo de experimentación (6 o 7 días) en rangos de concentración variables, con H_2S biogénico y las desviaciones estándar son reportadas en paréntesis.

Tabla 8. Precipitación de Cu (II), Pb (II) y Zn (II) con sulfuro biogénico producido a partir de la hidrólisis anaeróbica de material xilanósico y celulósico

Metal	Efluente	Concentración mg/ L	Promedio remoción %	Promedio H_2S en el biorreactor (mM)	Promedio H_2S en la Trampa (mM)
Cu(II)	Artificial de un solo metal	4.33	69.49 (± 2.17)	6.89 (± 8.02)	3.09 (± 6.34)
		6.25	73.40 (± 6.36)	5.57 (± 0.80)	2.65 (± 0.62)
		9.13	75.75 (± 2.75)	11.85 (± 8.49)	0.66 (± 0.83)
		12.11	71.92 (± 1.29)	1.50 (± 0.89)	0.20 (± 0.51)
	Artificial mezcla de metales	2.12	78.35 (± 3.21)	5.64 (± 0.29)	2.73 (± 0.67)
		8.22	88.46 (± 1.58)	0.72 (± 0.23)	0 (± 0)
		8.31	88.91 (± 1.44)	2.41 (± 0.83)	0.32 (± 0.91)
		12.10	79.92 (± 2.81)	6.11 (± 0.68)	2.11 (± 0.59)
	Natural Mina Bolívar	0.36	91.50 (± 5.02)	8.95 (± 1.95)	0.51 (± 0.26)
		0.48	91.46 (± 2.17)	3.71 (± 2.05)	2.60 (± 1.51)
		0.52	97.19 (± 1.12)	7.67 (± 0.35)	1.13 (± 0.78)
		0.53	87.79 (± 1.91)	2.95 (± 1.46)	0.39 (± 0.67)
Pb(II)	Artificial de un solo metal	0.89	57.70 (± 14.85)	3.93 (± 3.29)	0.4 (± 0.95)
		1.72	73.28 (± 14.53)	4.53 (± 0.30)	1.51 (± 0.1)
		5.14	73.50 (± 2.13)	3.50 (± 3.24)	0 (± 0)
		8.30	72.96 (± 3.27)	2.41 (± 1.53)	0 (± 0)
	Artificial mezcla de metales	0.98	100 (± 0)	5.64 (± 0.29)	2.73 (± 0.67)
		2.81	83.95 (± 8.84)	0.72 (± 0.23)	0 (± 0)
		4.39	88.31 (± 5.86)	2.41 (± 0.83)	0 (± 0)
		5.99	88.20 (± 6.08)	6.11 (± 0.68)	2.11 (± 0.59)
	Natural Mina Bolívar	0.13	100 (± 0)	8.95 (± 1.95)	2.81 (± 0.71)
		0.22	99.60 (± 1.02)	7.67 (± 0.35)	1.23 (± 0.17)
		1.50	70.59 (± 8.16)	3.71 (± 2.05)	0.57 (± 1.04)
		1.94	79.51 (± 3.65)	2.95 (± 1.46)	1.03 (± 0.95)
Zn(II)	Artificial de un solo metal	5.26	95.47 (± 1.12)	0.89 (± 1.54)	0 (± 0)
		6.13	97.48 (± 0.97)	4.67 (± 0.5)	2.16 (± 0.45)
		11.88	98.26 (± 0.72)	3.13 (± 0.3)	1.61 (± 0.27)
		14.05	97.28 (± 0.67)	2.58 (± 1.94)	1.01 (± 0.60)
	Artificial mezcla de metales	3.16	94.11 (± 1.24)	5.64 (± 0.29)	2.73 (± 0.67)
		7.50	98.78 (± 1.51)	2.41 (± 0.83)	0 (± 0)
		8.83	96.91 (± 1.05)	0.72 (± 0.23)	0 (± 0)
		11.00	86.62 (± 0.29)	6.11 (± 0.68)	2.11 (± 0.60)
	Natural Mina Bolívar	7.20	90.52 (± 2.92)	3.71 (± 2.05)	0.47 (± 0.71)
		12.50	98.90 (± 0.05)	8.95 (± 1.95)	2.69 (± 1.51)
		12.56	91.88 (± 1.80)	2.95 (±1.46)	2.11 (± 1.17)
		85.06	99.80 (±0.07)	7.67 (± 0.35)	0.59 (± 0.24)

7.3.1 Precipitación de metales en efluente artificial de un solo metal

7.3.1.1 Precipitación de cobre

En las figuras 15 y 16 se observa la precipitación de distintas concentraciones de Cu (II) con H_2S biogénicamente producido proveniente de los tres biorreactores descritos anteriormente. Las concentraciones usadas de este elemento fueron 0.069, 0.098, 0.14 y 0.19 mM (433, 6.25, 9.13 y 12.11 mg/L).

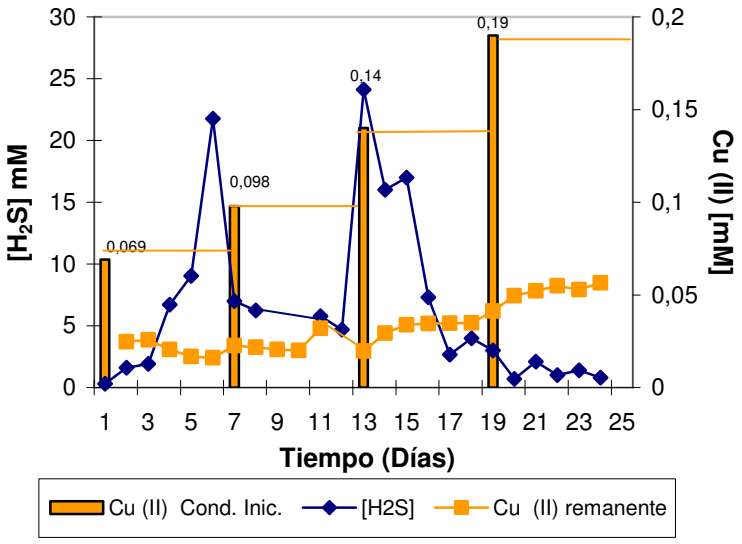


Figura 15. Concentración de Cu (II) en efluente artificial antes y después del tratamiento con H_2S biogénico.

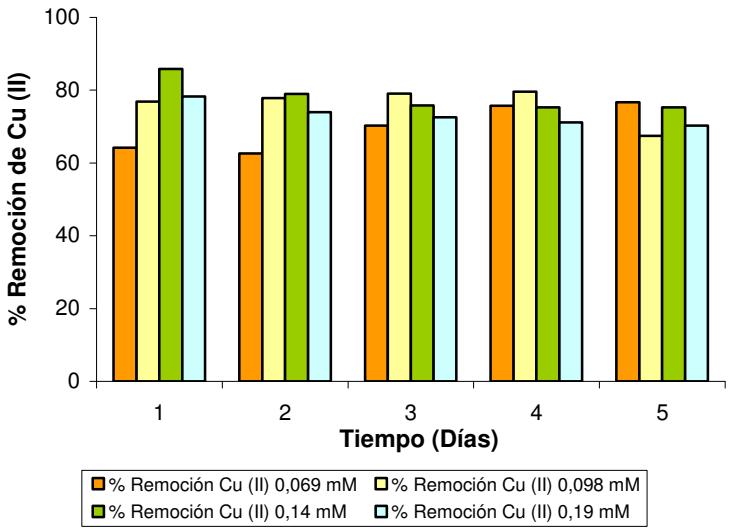


Figura 16. Porcentaje de remoción de las diferentes concentraciones de Cu (II) en efluente artificial.

7.3.1.2 Precipitación de plomo

En las figuras 17 y 18 se observa la precipitación de distintas concentraciones de Pb (II) con H_2S biogénicamente producido proveniente de los tres biorreactores descritos anteriormente. Las concentraciones de Pb (II) usadas en esta fase del experimento fueron 0.0043, 0.0083, 0.025, 0.040 mM (0.89, 1.72, 5.14 y 8.30 mg/L).

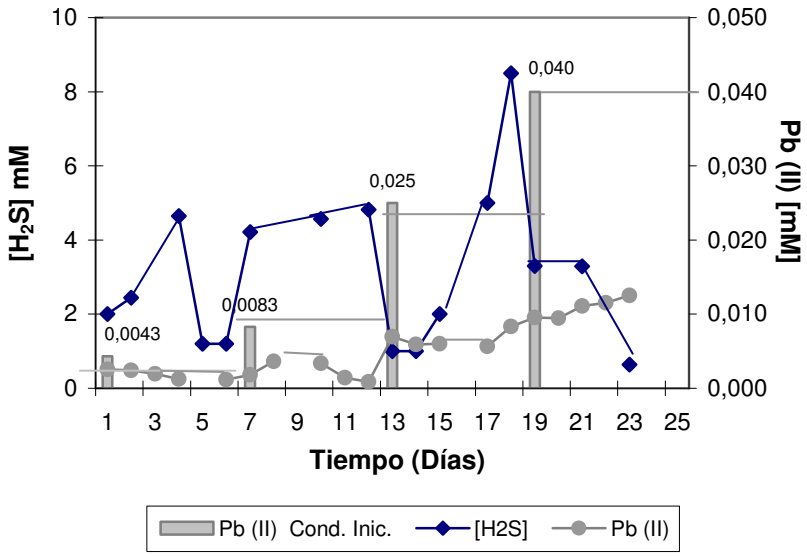


Figura 17. Concentración de Pb (II) en efluente artificial antes y después del tratamiento con H_2S biogénico.

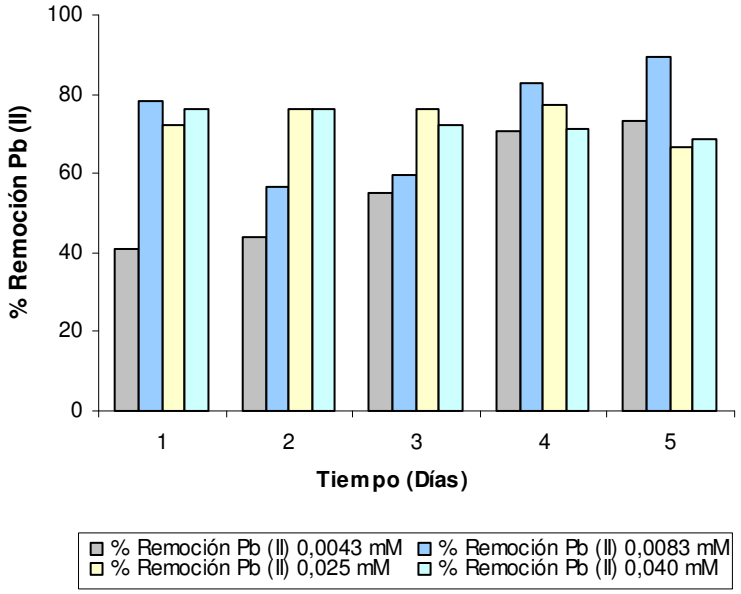


Figura 18. Porcentaje de remoción de las diferentes concentraciones de Pb (II) en efluente artificial.

7.3.1.3 Precipitación de zinc

En las figuras 19 y 20 se observa la precipitación de distintas concentraciones de Zn (II) con H_2S biogénicamente producido proveniente de los tres biorreactores descritos anteriormente. Las concentraciones de Zn (II) usadas fueron 0.08, 0.093, 0.1817, y 0.214 mM (5.26, 6.13, 11.88 y 14.05 mg/L).

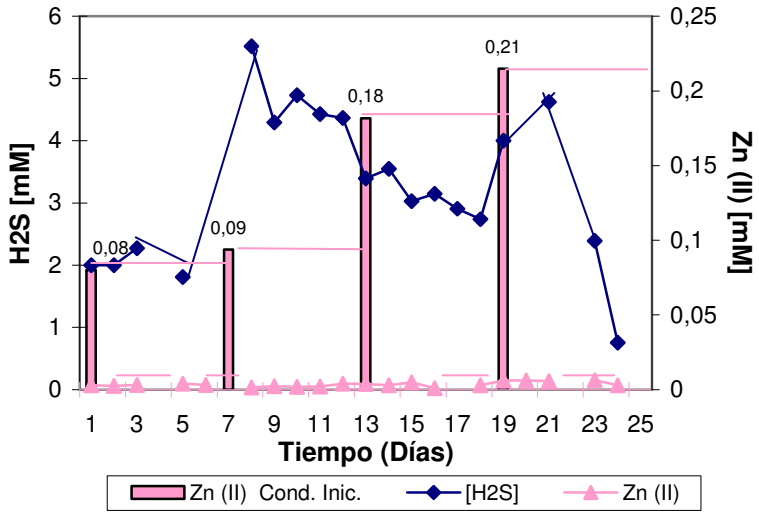


Figura 19. Concentración de Zn (II) en efluente artificial antes y después del tratamiento con H_2S biogénico.

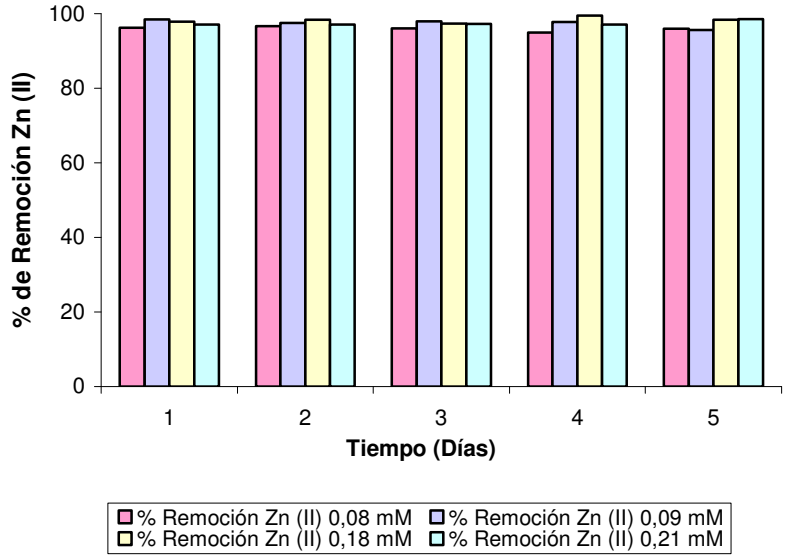


Figura 20. Porcentaje de remoción de las diferentes concentraciones de Zn (II) en efluente artificial.

7.3.2 Precipitación de Cu (II), Pb (II) y Zn (II) en efluente artificial

En la figura 21 se observa la precipitación del efluente artificial de Cu (II), Pb (II) y Zn (II) a diferentes concentraciones.

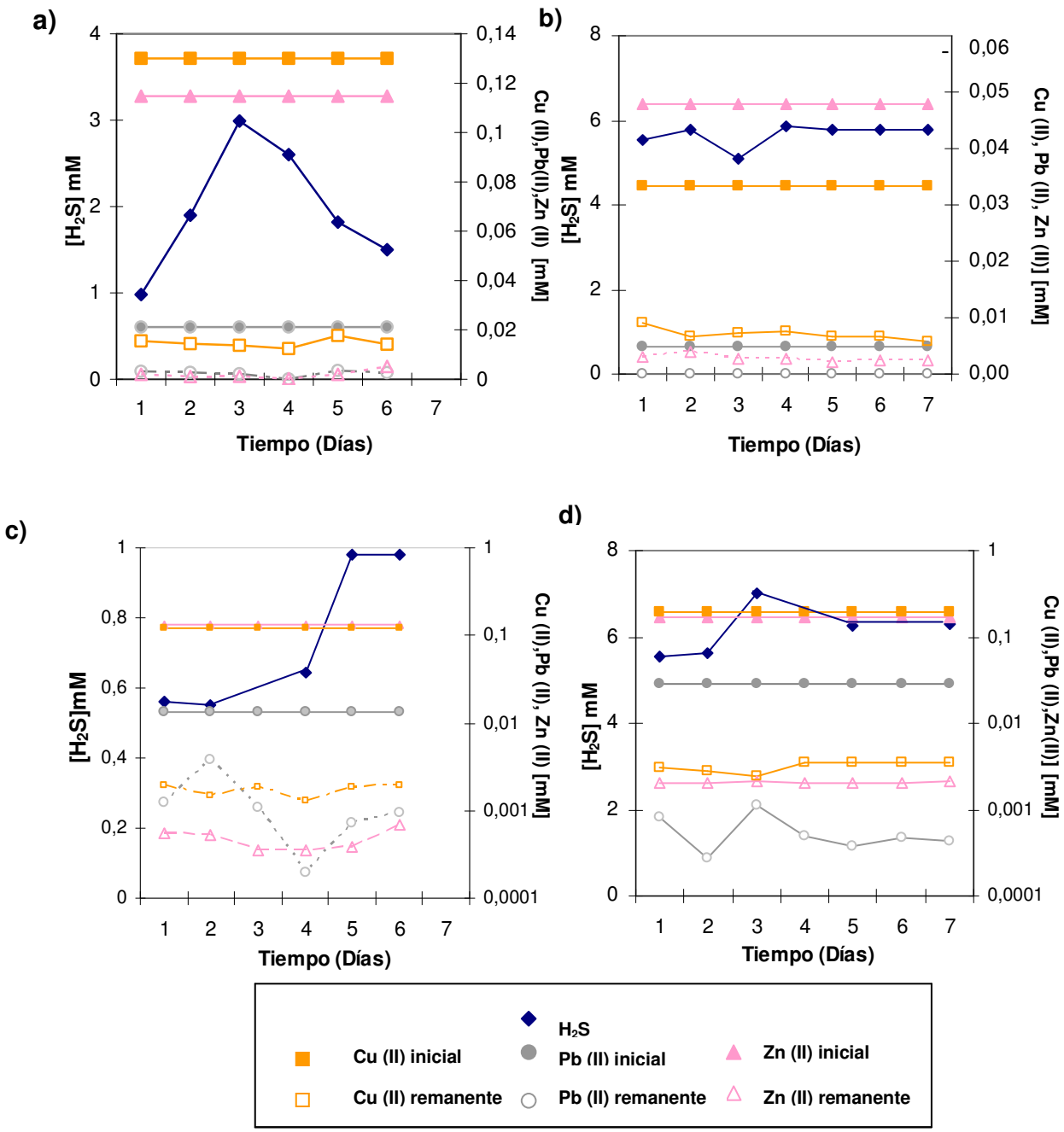


Figura 21. Precipitación de metales de efluente artificial con diferentes concentraciones después del tratamiento con sulfuro biogénico de los 3 biorreactores. Notése la escala logarítmica en c y d. a) Cu (II)=0.128, Pb (II)=0.021, Zn (II)=0.115 mM, b) Cu (II)=0.033, Pb (II) =0.005, Zn (II) =0.048 mM, c) Cu (II)=0.12, Pb (II)=0.0135, Zn (II)=0.135 mM y d) Cu (II)=0.19, Pb (II)=0.029, Zn (II)=0.168 mM.

Los porcentajes de remoción de las diferentes concentraciones de Cu (II), Pb (II) y Zn (II) en los efluentes artificiales se aprecian en la figura 22. La remoción de cobre estuvo dentro de un rango de 73% a 99%, el plomo tuvo una remoción entre el 72% al 100%, el zinc fue removido entre el 92% al 100%.

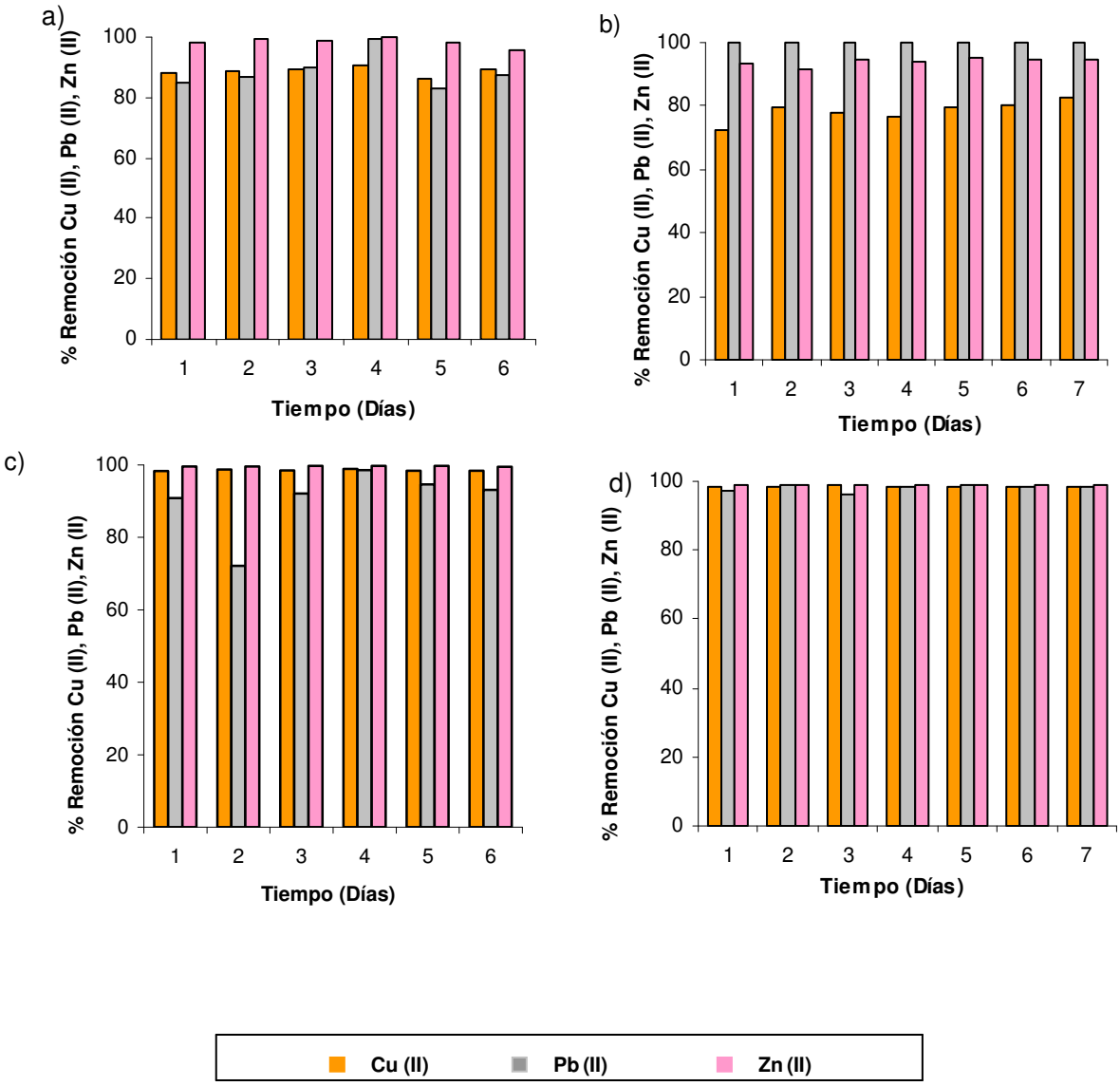


Figura 22. a,b,c, y d. Porcentaje de precipitación de cobre, plomo y zinc de efluentes artificiales en trampa de precipitación. Las concentraciones usadas fueron: a) Cu(II)=0.128, Pb(II)=0.021, Zn(II)=0.115 mM, b) Cu(II)=0.033, Pb(II) =0.005, Zn(II) =0.048 mM, c) Cu(II)=0.12, Pb(II)=0.0135, Zn(II)=0.135 mM y d) Cu(II)=0.19, Pb(II)=0.029, Zn(II)=0.168 mM.

7.3.3 Precipitación de Cu (II), Pb (II) y Zn (II) en efluente natural

En la figura 23 se observa la precipitación de Cu (II), Pb (II) y Zn (II) en el efluente de la mina Bolívar. La diferencia en concentraciones es debida a un proceso de filtración previo al que fue sometido una parte de las muestras y al lugar de colecta (bocamina y/o escorrentía). Obsérvese el uso de escala logarítmica en los diferentes gráficos.

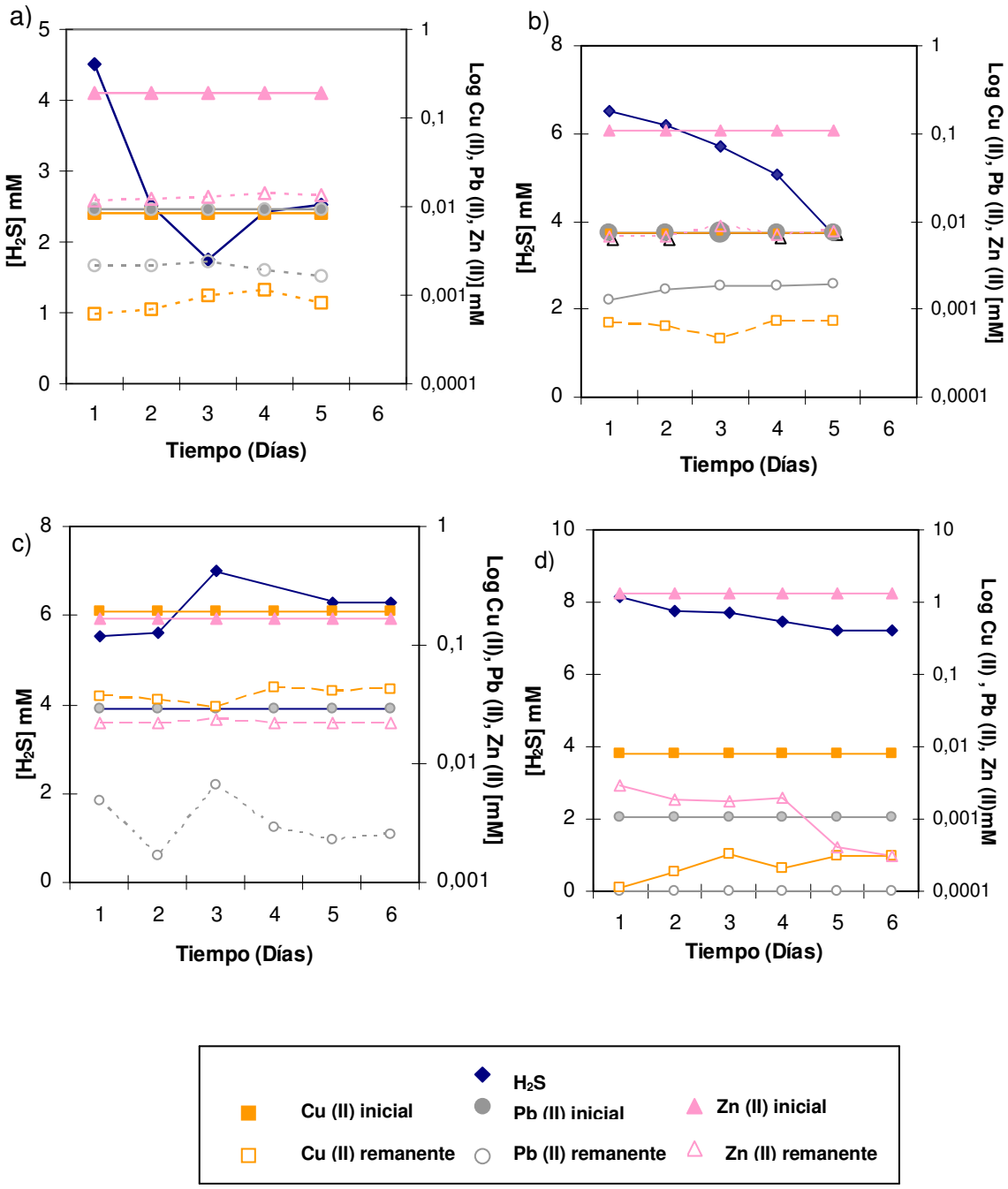


Figura 23. Precipitación de metales de efluente de la mina Bolívar después del tratamiento con sulfuro biogénico. a) Cu(II)=0.0084, Pb(II)=0.0094, Zn(II)=0.192 mM, b) Cu(II)=0.0076, Pb(II) =0.0093, Zn(II) =0.192 mM, c) Cu(II)=0.191, Pb(II)=0.029, Zn(II)=0.168 mM y d) Cu(II)=0.0083, Pb(II)=0.0093, Zn(II)=1.3 mM.

La remoción de Cu (II), Pb (II) y Zn (II) en el efluente de la mina Bolívar se aprecia en la figura 24. El porcentaje de remoción de cobre estuvo dentro de un rango de 77% a 99%, el plomo tuvo una remoción entre el 73 % al 100%, y el zinc fue removido entre el 86% al 100%.

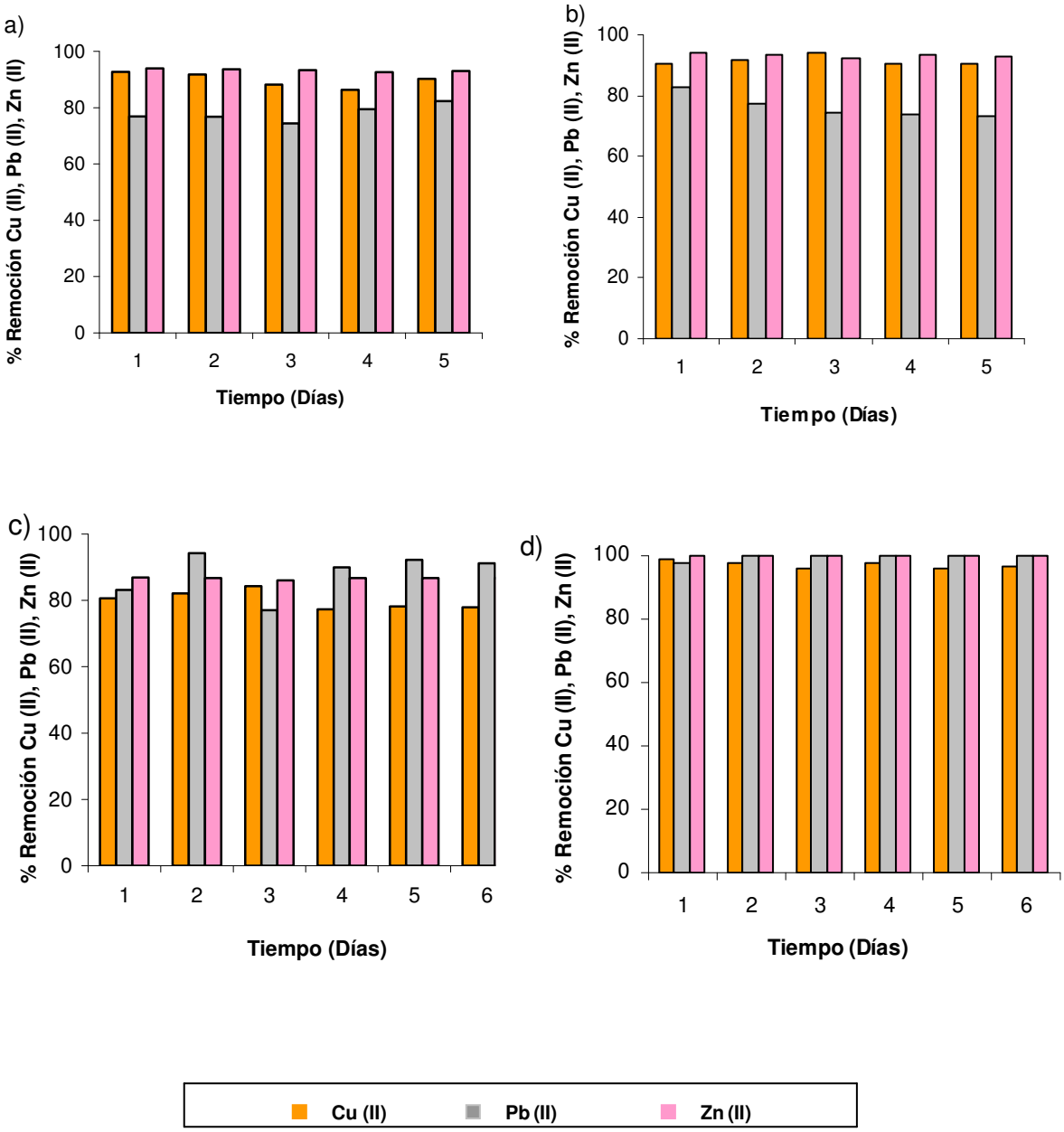


Figura 24. a,b,c, y d. Porcentaje de precipitación de cobre, plomo y zinc de efluente de la mina Bolívar . Las concentraciones usadas fueron: a) Cu(II)=0.0084, Pb(II)=0.0094, Zn(II)=0.192 mM, b) Cu(II)=0.0076, Pb(II) =0.0093, Zn(II) =0.192 mM, c) Cu(II)=0.191, Pb(II)=0.029, Zn(II)=0.168 mM y d) Cu(II)=0.0083, Pb(II)=0.0093, Zn(II)=1.3mM.

Las figuras a continuación muestran el comportamiento de los metales del efluente de la mina Bolívar no tratado. Se usó escala logarítmica en la figura 25.

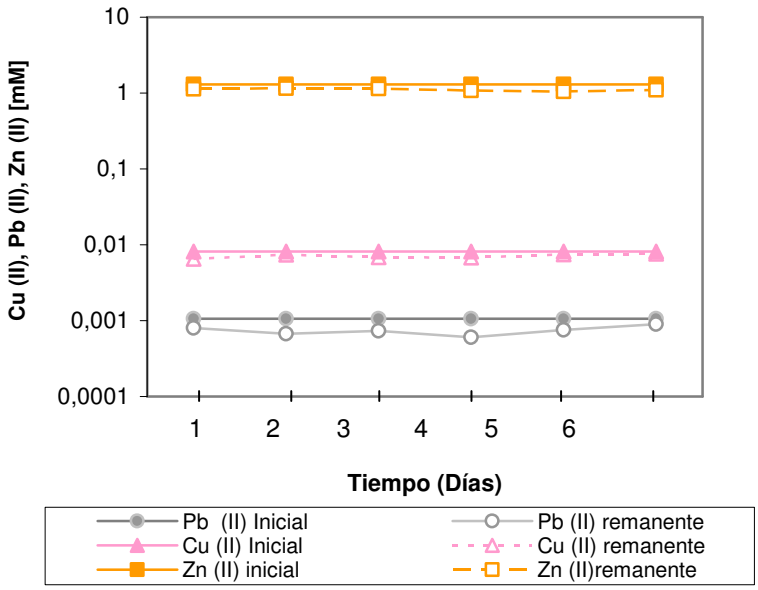


Figura 25. Control. Comportamiento del efluente de la mina Bolívar Cu (II)=0.0083, Pb (II)=0.0093, Zn (II)= 1.3 mM. No hubo producción de H_2S durante el tiempo de experimentación (6 días).

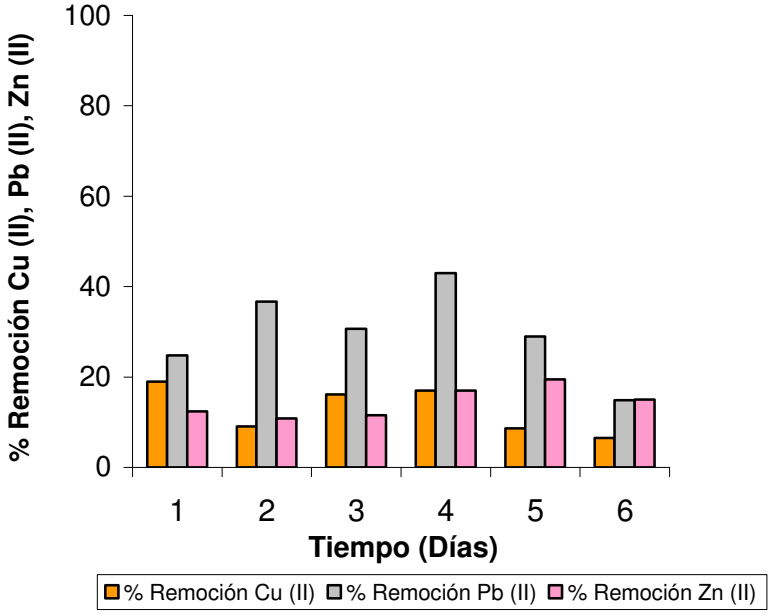


Figura 26. Porcentaje de remoción de Cu (II), Pb (II) y Zn (II) en el efluente de la mina Bolívar: Cu (II)=0.0083, Pb (II)=0.0093, Zn (II)=0.11 mM.

7.3.4 Precipitación de metales, potencial redox y pH

7.3.4.1 Relación del potencial redox, pH y precipitación de Cu (II), Pb (II) y Zn (II) en efluente artificial

La figura 27 muestra la variación del potencial redox (Eh) durante la precipitación de metales (Cu (II), Pb (II) y Zn (II)) del efluente minero artificial. La determinación del Eh se realizó tres veces por día. Como se observa en la figura, se produce un cambio drástico en el potencial redox al ser mezclado el efluente minero artificial (~ 200 mV) y el H_2S producido biogénicamente, descendiendo a valores aproximados a -250 mV, registrados en la trampa de precipitación. Las concentraciones de sulfuro en la trampa brindan una aproximación de la concentración de sulfuro requerida para la precipitación. Se produce a su vez una variación del pH al mezclarse la solución de metales (pH~5.5) y el H_2S del biorreactor (pH~6.3), incrementándose a valores aproximados a pH 7 registrados en la trampa de precipitación. Las precipitaciones de Cu (II) Pb (II) y Zn (II) estuvieron en un rango entre el 88 y 98 %. Un comportamiento similar se observó con los diferentes efluentes artificiales en mezcla y de un solo metal.

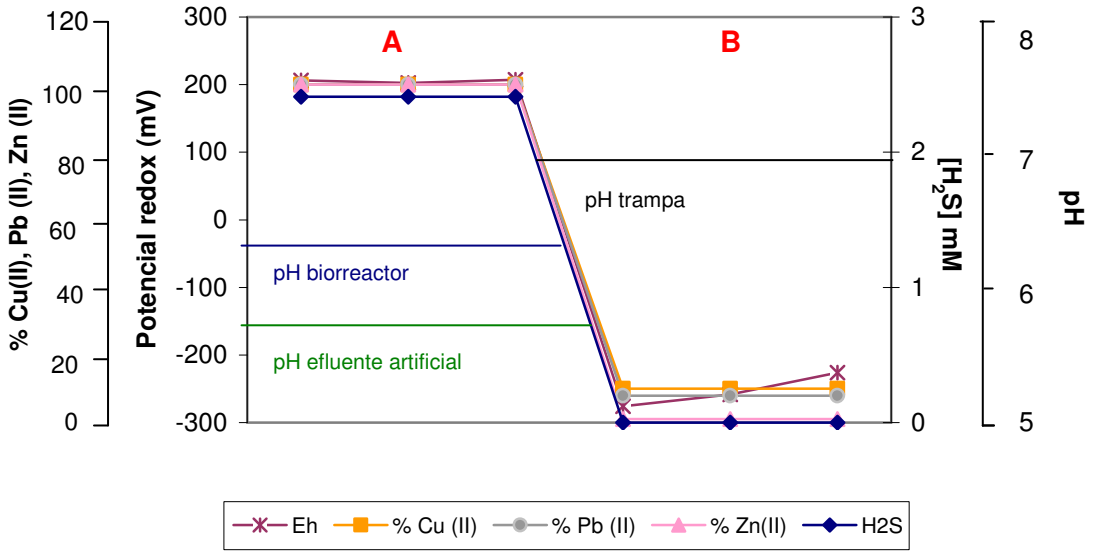


Figura 27. Variación del pH y potencial redox (mV), durante la precipitación de metales (Cu (II), Pb (II) y Zn (II)) del efluente minero artificial y concentración de H_2S en el biorreactor de hidrólisis-sulfurogénesis (A= condiciones iniciales) y en la trampa de precipitación (B= después del tratamiento con sulfuro biogénico). Las concentraciones de los metales en el efluente artificial fueron Cu (II)=0.128, Pb (II)=0.021 y Zn (II)=0.115 mM.

7.3.4.2 Relación del potencial redox y precipitación de Cu (II), Pb (II) y Zn (II) en efluente natural

En la figura 28 se observa la variación del potencial redox (Eh) durante la precipitación de metales (Cu (II), Pb (II) y Zn (II)) del efluente minero de la mina Bolívar. La concentración de sulfuro corresponde a mediciones realizadas en el biorreactor (A) y en la trampa de precipitación (B). Se observa un cambio drástico en el potencial redox al ser mezclados, el efluente minero (~ 250 mV) y el H_2S biogénico, descendiendo a valores aproximados a -200 mV, registrados en la trampa de precipitación. Se produce además una variación del pH al mezclarse el efluente minero (pH~2.3) y el H_2S proveniente del biorreactor (pH~7). Luego de la precipitación de metales en la trampa de precipitación se registra un pH aproximado a 4.8. Las precipitaciones de Cu (II), Pb (II) y Zn (II) estuvieron en un rango entre el 94 y 100 %.

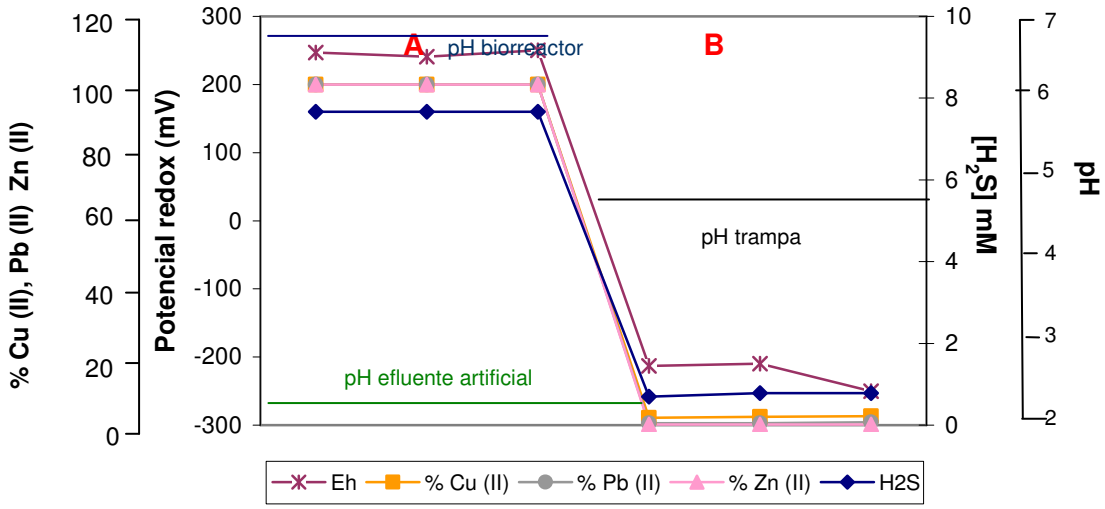


Figura 28. Variación del potencial redox (mV), durante la precipitación de metales (Cu (II), Pb (II) y Zn(II)) del efluente de la mina Bolívar y concentración de sulfuro de hidrógeno en el biorreactor de hidrólisis-sulfurogénesis (A= condiciones iniciales) y en la trampa de precipitación (B= después del tratamiento con sulfuro biogénico). Las concentraciones de los metales en el efluente natural fueron Cu (II)=0.0083, Pb (II)=0.0093, Zn (II)=1.3mM

DISCUSIÓN

8.1 Cultivos batch

8.1.1 Actividad enzimática

La matriz orgánica de los residuos agrícolas está constituída principalmente por xilano (hemicelulosa), celulosa y lignina en proporciones variables de acuerdo a la especie vegetal. Debido a que las BSR requieren moléculas simples como fuente de carbono y energía (Logan *et al.*, 2005), la degradación o hidrólisis de esta matriz es esencial para brindar moléculas fácilmente asimilables por estas bacterias.

Generalmente los consorcios microbianos estan constituídos por bacterias que presentan capacidades metabólicas diversas, siendo factible la degradacion de polímeros complejos como ser celulosa y xilano entre otros. Debido a esta diversidad microbiana se puede optimizar la degradación de la materia orgánica en biorreactores (Kaksonsen, *et al.*, 2004) con finalidades diversas tales como la producción de metano y H_2S. El consorcio A10 empleado en el presente estudio, esta constituído por especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Clostridium* y *δ-proteobacteria* entre otros (Alvarez *et al.*, 2005).

Debido a la producción de enzimas por especies clostridiales presentes en el consorcio se establece la degradación de celulosa y hemicelulosa (Tang *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2005).

El mecanismo endo de degradación enzimática del polisácarido se produce de manera aleatoria; en las primeras etapas, las enzimas unidas al sustrato causan rupturas múltiples en el polisácarido y producen fragmentos más cortos, que servirán como sustrato para la degradación exo (Morales *et al.*, 2005). En el presente trabajo se puede observar este fenómeno cunado se utilizan como sustratos los seis residuos agrícolas usados en este estudio (Fig. 8 a, b y 9 a, b).

Como se observa en la figura 8 a, la actividad enzimática de la endoxilanasas es mayor cuando se utiliza como sustrato paja de avena y paja de quinua, sin embargo la hidrólisis enzimática lenta de la paja de trigo contribuye al establecimiento de un

proceso sostenible de producción de H_2S, en el sentido de que la producción de moléculas orgánicas simples para las BSR se da de una forma paulatina. En este sentido la actividad de la endoxilanasa fue uno de los parámetros más importantes para la elección de la paja de trigo como sustrato para realizar el escalado del proceso.

Una posible causa para la baja actividad encontrada podría deberse a la presencia de una proteína inhibidora de xilanasa, encontrada en las semillas de cereales (Sørensen *et al*., 2004; Elliot *et al*., 2002).

La actividad de celulasas: Endoglucanasa y β-glucosidasa fue marcadamente más alta en los cultivos con avena como sustrato. Sin embargo, debido a que la celulosa es principalmente degradada aeróbicamente, (Galler & Winter, 2005), es posible que las condiciones anaeróbicas del cultivo no permitieran que una óptima actividad de las celulasas. Otro factor que pudo afectar la actividad enzimática de xilanasas y celulasas fue la temperatura (Andreaus *et al*., 1999).

8.1.2 Producción de sulfuro de hidrógeno y reducción de sulfato

Una vez que se agota la fuente de carbono del cultivo, las BSR no reducen suficiente sulfato a sulfuro (Costa & Duarte, 2005). Por lo tanto la disponibilidad de la fuente de carbono es un aspecto fundamental para la reducción de sulfato. En el presente estudio las fuentes de carbono utilizadas: paja de trigo (*Triticum graminae*), de avena (*Avena sativa*), de quinua (*Chenopodium quinua willdenow*), paja brava (*Festuca orthophylla)*, cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) y hojas secas de *Ulmus pumila*, cumplieron también la función de soporte. La diferencia en el consumo de carbono fue la habilidad del consorcio para establecerse en los distintos soportes (ver punto 8.1.3 más abajo).

El cultivo que presentó la producción de H_2S y consumo de sulfato más alto fue el cultivo montado con paja de trigo (Fig. 10 a y b), alcanzando una producción máxima de 3.61 mM de H_2S el día 23. El mayor consumo de sulfato se observa el día 21, lo cual corrobora la producción de H_2S.

Los cultivos establecidos con hojas secas y paja de quinua muestran una producción de H_2S similar a la observada en el cultivo con paja de trigo. Sin embargo, una

producción cercana a 1.5 mM de sulfuro se observa en cultivos establecidos con paja brava, paja de avena y cascarilla de arroz. Estas características facilitan el posible empleo de estos residuos agrícolas para la producción de H_2S dependiendo de la localización georgráfica donde se vayan a establecer sistemas de biorremediación de metales pesados.

8.1.3 Soporte de la biomasa y desarrollo de la biopelícula

En la naturaleza las BSR son encontradas en suelos y sedimentos donde las bacterias se congregan en biopelículas. Por lo tanto las características físicas de la superficie son muy importantes ya que las bacterias tienden a agregarse en áreas que ofrecen alguna protección física. La supervivencia y la actividad de BSR bajo condiciones adversas son probablemente debidas a la propagación de estos microambientes. Por esto, cualquier sistema de tratamiento que use BSR necesita tener un soporte físico sobre el cual estas bacterias puedan ser establecidas (Lyew & Sheppard, 1997). La naturaleza del soporte será también importante para el desarrollo y mejor actividad de algunos miembros del consorcio (Vidal, *et al.*, 2000; Logan, *et al.*, 2004; Kuo & Shu, 2004; Simon, 2005).

Por lo expuesto, los sustratos que presentan las mejores características como soporte serían las pajas de avena y trigo puesto que no sólo permiten la formación de la biopelícula en su superficie, sino, debido a su disposición física permiten también la congregación de los microorganismos al interior de estas; evitando de esta forma el lavado de la biopelícula cuando se establezca la alimentación continua. En este sentido, estudios anteriores han demostrado que la paja es un buen soporte sólido y donador de electrones para BSR (Chang *et al.*, 2000; Alvarez, *et al.*, 2005), lo cual se corrobora en este estudio.

8.2 Cultivo continuo

De acuerdo a los resultados obtenidos en los cultivos en batch, la paja de trigo fue seleccionada como el sustrato adecuado para el escalado del sistema. Los parámetros tomados en cuenta fueron las actividades enzimáticas de xilanasas, la producción de H_2S y la reducción de sulfato en el medio, además se consideraron las características del soporte, y la disponibilidad de este residuo agrícola.

8.2.1 Hidrólisis enzimática y producción de ácidos grasos volátiles

Debido a que las BSR utilizan un número muy limitado de fuentes de carbono (Parés y Juárez, 1997), establecer las características del sustrato es muy importante para una hidrólisis óptima. Si bien las BSR no tienen la capacidad de degradar rápidamente la materia orgánica, otros microorganismos que se encuentren en el consorcio A10 si la tienen, por lo tanto es recomendable establecer el uso de consorcios microbianos en los procesos de digestión anaeróbica en lugar de cepas puras.

El presente estudio demuestra que la paja es hidrolizada por la actividad enzimática de celulasas y xilanasas. La actividad endoxilanasa alcanzó 0.07 UI/mL, por debajo de lo reportado por Alvarez (2004), pero superior a la actividad registrada durante el cultivo batch. La concentración de sustrato decreció con el tiempo, de manera que la actividad enzimática disminuye, debido a que la enzima esta menos saturada de sustrato, por lo cual se hace necesaria el cambio de carga orgánica.

En nuestro estudio el cambio de carga orgánica se hizo a los 180 días en solo uno de los biorreactores (Fig. 11) esto debido a que una vez que se realiza el cambio, el consorcio debe adaptarse nuevamente, implicando retardo en la producción de H_2S. Al incrementarse el sustrato con el recambio de la carga orgánica, la actividad enzimática incrementa a un valor máximo. Esto es contrario a lo reportado por Logan (2005), que reporta que la actividad enzimática es independiente de la cantidad de sustrato provisto.

El producto de esta actividad se refleja en la generación de monosacáridos consumibles como fuente de carbono por el consorcio A10, que genera a su vez metabolitos para la producción de AGVs; en este sentido se estableció un segundo parámetro indicador de la hidrólisis completa del sustrato, debido a la relación directa entre la actividad enzimática y la producción de AGVs (Crespo, *et al*., 2005). Los primeros AGVs en producirse fueron el ácido acético y ácido propiónico, estos resultados son similares a los reportados por Parawira (2004).

La determinación de ácidos grasos volátiles por HPLC en el biorreactor 1 reportó que el ácido acético y el ácido propiónico fueron los AGVs que se encontraron en concentraciones más altas (Fig. 13). Esto concuerda en parte con lo reportado por Alvarez (2005), donde el ácido láctico y el ácido acético eran los AGVs

predominantes, en tanto el ácido caproico se encontró en menor concentración. Esta diferencia podría explicarse a que en el estudio de Alvarez para la preparación del inóculo se usó medio Pfenning, en tanto en el nuestro se usó medio Postgate C modificado. La diferencia en la composición de ambos medios pudo posibilitar el potenciamiento o la disminución de la actividad metabólica de algunos miembros del consorcio, originando de esta forma la diferencia en la producción y/o consumo de los diferentes ácidos grasos.

El hecho de que la disminución de ácidos grasos en el biorreactor coincida con el inicio de la producción de sulfuro (Fig.13), evidencia una directa relación entre el consumo de AGVs y la producción del sulfuro biogénico. Los AGVs mayormente consumidos son el ácido acético y el ácido propiónico. Sin embargo, también se observa el consumo de ácido láctico. Dichas características metabólicas determinan la presencia de los dos grupos de BSR de acuerdo a su metabolismo, las bacterias oxidadoras de ácido acético y las de ácido láctico (*Kolmert et al.,* 1999).

.

8.2.2 Producción de sulfuro de hidrógeno

La utilización de procesos biotecnológicos, constituye una alternativa de protección ambiental, para ello se emplean sistemas utilizando microorganismos, un ejemplo claro, es el uso de consorcios anaeróbicos robustos de bacterias sulfato reductoras encargadas de la producción de H_2S biogénico, como una alternativa para la remoción de metales y sulfatos de efluentes contaminados (Alvarez, *et al*., 2005).

En el presente estudio se demostró que la producción biogénica de H_2S por el consorcio A10 de BSR alcanzó una máxima concentración de 20 mM (Fig. 11), manteniéndose constante alrededor de 20 días en los biorreactores 1 (Fig.11) y 2 (Fig.12a) sin existir inhibición debida al producto; en comparación con estudios como los de Reis (1992), Okabe (1992) y Kolmert (1997) que reportaron inhibición del crecimiento del cultivo de *Desulfovibrio vulgaris* a 16.1 mM , *Desulfovibrio desulfuricans* a 7.81 mM de H_2S *y Desulfobivibrio sp*. a 14 mM, respectivamente. No obstante, la alta producción alcanzada por el consorcio A10, si afectó el rendimiento del biorreactor, disminuyendo drásticamente la producción de H_2S, lo que coincide con las observaciones de O'Flaherty (1998).

Si bien Barnes (1991) y Tabak y Govind (2003) reportan que el efecto de la temperatura es insignificante en la producción de sulfuro, en el presente estudio la temperatura tuvo influencia en el tiempo en que se alcanzó la máxima producción de sulfuro. El biorreactor 1 (Figura 11) fue montado en abril (otoño, temperatura promedio = 15 ^{o}C), y alcanza su máxima producción aproximadamente a los 120 días, en tanto los biorreactores 2 y 3 (Figura 12 a y b) fueron montados en septiembre (primavera, temperatura promedio = 20 ^{o}C), alcanzándose la máxima producción de sulfuro alrededor del día 50. El biorreactor 3 no se considera en este análisis debido a que sufrió un derrame los primeros días de su puesta en marcha. El retardo en la producción de sulfuro en el biorreactor 3 (100 días), se debe a que durante las primeras semanas de la puesta en marcha de este biorreactor, se produjo una perdida de aproximadamente el 50% del contenido del biorreactor, y la entrada de oxígeno al medio, pudo haber provocando la muerte de una gran parte de la población de BSR y/o cambios de la comunidad microbiana debidas a la aereación (Tang *et al.*, 2004).

8.2.2.1 Influencia del pH

El pH es el factor limitante como indicador del crecimiento de BSR y del rendimiento de producción de H_2S (Reis *et al.*, 1992; Mizuno *et al.,* 1998; Castro *et al.,* 2001; Liu & Shen, 2004; Cohen, 2005). Aparentemente el pH límite para la reducción de sulfato esta entre 3 y 4 (Koschorreck *et al.*, 2003).

En el presente estudio, el pH más bajo que se registró fue de 4.5 (Figura 14 a,b y c). Como se observa en la figura 14 la disminución del pH coincide con una disminución de la producción de H_2S, lo que corrobora las observaciones de Dvorak *et al.* (1992) que indica que los pH menores a 5 inhiben la producción de sulfuro.

Durante algunas etapas del cultivo fue necesario hacer ajustes del pH para evitar una acidificación aún mayor del medio. Sin embargo lo aconsejable es hacer este cambio de pH solo al principio de la puesta en marcha del biorreactor, ya que es en las primeras etapas cuando la producción de AGVs es mayor. En etapas posteriores los ajustes manuales de pH no fueron necesarios debido a que las BSR tienen la capacidad de generar alcalinidad (tamponamiento celular). Puesto que el consorcio A10 es de característica neutrófila las producciones de H_2S más altas se lograron a pHs próximos a 7. Por otro lado, es posible que al alto flujo de alimentación al que fue

sometido el biorreactor 1 en la etapa A, pudo haber excedido la capacidad de tamponamiento del consorcio.

8.2.2.2 Influencia del soporte de la biomasa

Las características del donador de electrones y/o sustrato es uno de los factores más importantes que determinan el proceso microbiano de tratamiento de drenaje ácido de mina, se prefiere un donador de electrones que mantenga la sulfurogénesis por un período prolongado y no necesite la adición de suplementos (Crespo, *et al*., 2005). En el presente estudio se demostró que la paja de trigo es un excelente donador de electrones, y que no es degradado rápidamente ya que el recambio de carga orgánica se realizó a los 180 días de puesta en marcha del sistema. En los biorreactores 2 y 3 después de un año de puesta en marcha continuaba la producción de H_2S.

Probablemente el largo período de crecimiento continuo en el que se mantuvo el sistema (180 días) ocasionó la pérdida de algunos de los microorganismos del consorcio original, favoreciendo a otros de crecimiento más rápido. Es importante considerar también el origen del sustrato, puesto que la paja de trigo que se utilizó para el cambio de carga orgánica no fue obtenida del mismo lugar que la paja de trigo con la que se montaron los cultivos inicialmente.

8.3 Precipitación de metales pesados

Las pruebas de precipitación de metales comenzaron después del cambio de carga orgánica en el biorreactor 1 y del inicio del cultivo continuo en los biorreactores 2 y 3. Las mismas constaron de 3 etapas. En una primera etapa se evaluó la precipitación de efluentes artificiales en soluciones constituidas por un solo metal (Cu (II), Pb (II) o Zn (II)), en la segunda etapa se evaluó una mezcla artificial de los tres metales y finalmente la precipitación de los metales del efluente o drenaje acido de la mina Bolívar.

Las concentraciones de cobre analizadas estuvieron en el rango de 0.36 a 12.11 mg/L con precipitaciones de sulfuro de metal que oscilaban entre el 69 % al 97 % utilizando concentraciones de H_2S entre 0.72 y 11.85 mM (Tabla 7).

La precipitación de plomo estuvo en un rango entre el 58 % al 100% y las concentraciones analizadas estuvieron entre el rango de 0.13 a 8.30 mg/L. Dicha precipitación fue efectuada con concentraciones de H_2S entre 0.72 y 8.95 mM. (Tabla 7).

Finalmente las concentraciones de zinc analizadas estuvieron en el rango de 3.16 a 85.06 mg/L con precipitaciones de sulfuro de metal que oscilaban entre el 87 % al 100% utilizando concentraciones de H_2S entre 0.72 y 8.95 mM (Tabla 7).

Según lo observado las precipitaciones más bajas (en los tres metales) se registraron cuando estos se encontraban en efluentes artificiales de un solo metal, esto sugiere que las mezclas metálicas favorecen la precipitación.

Si bien el plomo fue removido completamente en los efluentes, lo que concuerda con Crespo (2005), es necesario tomar en cuenta que este metal se encontraba en menor concentración en los efluentes artificiales y naturales por lo que afirmar que existe una precipitación del 100% no es del todo correcto puesto que el tratamiento de las muestras para su lectura en espectrofotómetro de Absorción Atómica requiere filtración previa, donde una cantidad de metal será retenido. Por otro lado deben considerarse los límites de detección del equipo de absorción atómica.

Por lo tanto los mejores resultados fueron los de la precipitación del zinc, lo que concuerda con lo reportado por Harris y Ragusa (1999) y Logan (2005) puesto que el Zn (II) se encuentra entre los metales que son más fácilmente removidos, debido a su alta solubilidad (Tabla 5).

La precipitación del cobre fue importante también, pero menor en las soluciones que contenían un solo metal. Este detalle sin embargo no es de gran importancia puesto que en los efluentes ácidos de mina generalmente estan compuestos de una mezcla de metales.

Las precipitaciones logradas concuerdan con estudios anteriores (ver antecedentes) y en muchos casos supera la precipitación de metales obtenida por estos.

La bioprecipitación de metales fue atribuida a la acción del H_2S producido por la actividad biológica de BSRs del consorcio A10. No obstante no fue necesario una alta

producción de sulfuro, puesto que se lograron buenos resultados incluso con concentraciones tan bajas de sulfuro como 0.3 mM (Figura 16), contrario a lo expuesto por Hyun-Joon (2003) que indica que para la remoción completa de metales se requiere aproximadamente 7.2 mM de sulfuro.

La remoción de metales podría deberse también a un efecto de bioadsorción de metales (Cañizares, 2000; Kortba *et al.*, 2000; Kosolapov *et al.,* 2004, Alvarez *et al.*, 2005; Cohen, 2005; Valls & de Lorenzo, 2002), dado que las soluciones eran mezcladas con una parte igual del rebalse del biorreactor, que no sólo contenía sulfuro soluble, sino también gran cantidad de biomasa. Adicionalmente, la presencia de fosfatos y carbonatos en el medio de cultivo facilitarían la precipitación de metales pesados. Las figuras 25 y 26 describen la remoción de cobre, plomo y zinc utilizando el rebalse del biorreactor de control abiótico, donde posiblemente las sales constituyentes del medio de cultivo facilitaron la precipitación de dichos metales.

Los mejores resultados en cuanto a precipitación de los tres metales en estudio se presentaron en los efluentes naturales de la mina Bolívar, lo que pueden explicarse a que probablemente en los efluentes ácidos de minas se encuentran especies químicas que faciliten la precipitación de metales, distintas a los sulfuros metálicos.

Las pruebas de precipitación de metales se realizaron en dos etapas: En una primera etapa el rebalse de la trampa de metales era eliminado diariamente, en una segunda etapa el rebalse de metales de la trampa era acumulado, para determinar de esta forma si existía variación en la precipitación de metales (efecto acumulativo), sin embargo no se observó diferencia en los resultados de precipitación de metales debido a este factor.

8.3.1 Potencial redox, pH y precipitación de metales

Las BSR están asociadas a ambientes anaerobios cuyos potenciales redox se encuentran alrededor de -150 mV (Barton & Tomei, 1995). En nuestro estudio el potencial redox en los 3 biorreactores se mantuvo en rangos desde -110 mV y -350 mV (datos no mostrados), esta determinación es una medida de la actividad metabólica de las BSR.

El potencial redox es también un indicador directo de la precipitación ya que permite la medición indirecta de la concentración de sulfuro en solución determinando las condiciones de reducción del medio (Pott & Mattiasson, 2004).

En nuestro estudio el alto potencial redox de las soluciones de un solo metal (entre -40 y 200 mV) (Figura 28, a, b y c) hace que el cambio de éste al ser mezclado con el sulfuro biogénico no sea tan drástico como el observado en los efluentes artificiales (de ~200 a -280 mV), lo que explicaría porque la precipitación en los efluentes artificiales de un solo metal fue la más baja. Por otro lado la diferencia de potencial redox observada en las pruebas con el efluente natural (de ~250 a -250 mV) explicaría el mayor grado de precipitación en este tipo de efluentes.

Es importante mencionar que los metales presentan un potencial redox determinado al cual se da la precipitación (Pott & Mattiason, 2004) de aquí también la diferencia en la eficacia de precipitación de los metales en soluciones artificiales y naturales.

Los resultados del presente estudio muestran que el H_2S producido por el consorcio A10 tiene una capacidad simultánea de precipitar cobre, plomo y zinc tanto en efluentes artificiales como en uno natural, logrando a la vez un incremento en el pH debido principalmente a la formación de bicarbonatos como resultado de la oxidación de la materia orgánica (Figuras 27 y 28).

El pH es también un factor que permite una remoción diferencial de los metales (Foucher *et al.*, 2001, Veeken *et al.*, 2003; Tsukamoto *et al.*, 2004). En nuestro estudio es un tanto difícil establecer la influencia del pH en la precipitación puesto que en las pruebas con el efluente artificial el cambio de pH al mezclar el sulfuro de hidrógeno con el efluente mostró variaciones muy leves, en tanto que en las pruebas con el efluente de la mina Bolívar esta variación fue más drástica (~2.5) (Figuras 27 y 28).

CONCLUSIONES Y PLANES FUTUROS

9.1 Conclusiones

En el presente trabajo, se determinó que el mejor sustrato para el desarrollo de la biopelícula de BSR fue la paja de trigo. En la primera parte de este estudio se demostró que la paja de trigo es fácilmente degradada por miembros del consorcio A10. Así, la estabilidad de las actividades xilanolítica y celulolítica y el rápido consumo de sulfato para la producción de sulfuro son factores importantes para la elección de este material en procesos a gran escala.

Se estableció una relación directamente proporcional entre la actividad enzimática y la producción de ácidos grasos volátiles, considerando ambos como indicadores de la hidrólisis de la carga orgánica de paja de trigo en el biorreactor de hidrólisis-sulfurogénesis.

La máxima producción biogénica de sulfuro de hidrógeno (ca. 20 mM) a partir de la utilización de AGVs (fuente de carbono y donador de electrones) se evidenció cuando las condiciones de cultivo fueron: D = 0.1 d^{-1}, pH neutro, Temp = 20 ^{o}C y potencial redox de aproximadamente -200 mV.

El H_2S biogénico posee alta capacidad precipitante de cationes divalentes presentes en el drenaje ácido de la mina Bolivar. Con un promedio de remoción de cobre 92 %, 90 % de plomo y 95 % de zinc, sin existir diferencia debida al tiempo de contacto entre el DAM y el H_2S.

Mediante el análisis potenciométrico se determinó que durante y después del tratamiento del efluente de metales con H_2S, el valor del pH se incrementa desde 5.5 a un valor cercano a 6.3 en la mezcla artificial de metales, en tanto que en el efluente de la mina Bolívar este aumento se hizo más evidente desde un valor aproximado de 2.3 hasta 4.8, con lo que comprueba la capacidad de este sistema para aliviar en alguna medida la condición ácida del DAM. Así mismo, la condición reductora del efluente tratado (determinada por el ORP), descendió de valores superiores a los 200

mV a valores cercanos a -250 mV en ambos efluentes (artificial y natural). Ambas variables expuestas, son indicadores de la precipitación de metales.

9.2 Recomendaciones

En el presente trabajo se utilizó paja de trigo como sustrato y soporte para el desarrollo de BSR, sin embargo en muchas regiones de nuestro país no es abundante este tipo de desecho agrícola. En base a los resultados obtenidos en el presente estudio es aconsejable también utilizar otros desechos agrícolas como paja brava, paja de quinua y/o hojas secas.

Debe cambiarse gradualmente la alimentación del sistema con Postgate C modificado hasta llegar a una alimentación constituida netamente del efluente minero. Es también necesario el establecimiento de un sistema de alimentación que requiera un mínimo de vigilancia.

La producción de H_2S debe ser controlada en orden de no alcanzar producciones demasiado altas que con el tiempo llevan a la inhibición parcial del sistema, para lo cual se debe poner especial cuidado en el control del pH. Se propone además establecer la cantidad de COD (materia orgánica disponible) para establecer el momento oportuno de realizar el cambio de la carga orgánica.

Es importante incluir en un próximo estudio el uso de modelos matemáticos que nos podrían dar un acercamiento de las condiciones óptimas para el establecimiento de biorreactores.

En este estudio se analizaron Cu (II), Pb (II) y Zn (II), es necesario sin embargo establecer pruebas con otros metales, además del análisis de otras especies químicas como ser fosfatos y carbonatos que coadyuvan a la precipitación de metales pesados.

Se recomienda también el establecimiento de sistemas combinados: algas y BSR o fitorremediación, para asegurar una remoción total de los metales.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas e instituciones que han colaborado de una u otra forma en la culminación de esta tesis, mil gracias, este trabajo es también suyo.

A la Agencia Internacional de Cooperación Sueca ASDI-SAREC cuyo financiamiento hizo realidad el proyecto Biodiversidad Microbiana, que se ejecuta en el Área de Biotecnología del IIFB.

Gracias al Institute de Recherche pour le développement (IRD) por la beca otorgada para mis estudios de post grado en la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas.

Gracias, Dr. Alberto Giménez por darme la oportunidad de formar parte del IIFB (un verdadero honor para mí y un riesgo para él) y gracias también a todos quienes ahí trabajan, de forma especial al Dr. Irahola y al Dr. Udaeta.

Agradezco a mi querida Dra. TK pues estoy muy orgullosa de que fuera mi asesora, porque siempre me alentó a seguir adelante. Ella no es sólo una excelente profesional, sino también (y es lo más importante) una excelente persona. Lo mejor que me ha pasado fue trabajar con usted estos dos años.

Hasta el otro lado del mundo a los profesores Bo y Rajni de la universidad de Lund por depositar su confianza en mí lo que me devolvió la fe en mi misma.

A quienes fueron docentes en la maestría por compartir sus conocimientos, especialmente a los doctores Sánchez, talvez no se acuerde, pero fue el primero en decirme inténtalo y Carvajal por preocuparse no solo de mis notas sino también de mi estado de ánimo.

A los docentes de la facultad, por los conocimientos brindados especialmente a las doctoras: Peñaloza, Tellez y Domic quienes siempre me alentaron.

Para mis compañeras del área de Biotecnología Ambiental: Mónica, Delia, Carla y Pamela con quienes compartí estos dos años. He sido afortunada en trabajar con ustedes, lo sé, pudo haber sido peor, pero a nada… (estoy bromeando!!! ya me conocen). Ustedes son, lo que se dice rica gente.

Obviamente, debo agradecer a mi papá, mi mamá y mi querida madrina Charo quienes también me han financiado durante estos dos años, además de siempre echarme porras y presumirme con sus amigos. Mi familia es chiquita pero nos amamos más que ninguna.

Para mis amigos de siempre: Bessie eres la hermana que no me dio la vida, pero la que Dios puso en mi camino, Lorena porque son más de 20 años que te conozco y no me canso de descubrir tus virtudes, Alejandra por echarme a perder (en buena onda), Gabriela por tu visión y aliento constante, Eliana por que cuento contigo siempre, Roxana gracias por hacerme ver la vida como es y bajarme de las nubes cuando se debe, Narda porque sé que rezas por mí cada noche, César porque eres mi ejemplo contemporáneo, Eddy sin tus inyecciones de alegría no se que hubiera hecho durante este tiempo, de verás a veces quiero ser como tú, Vanesa prima gracias por siempre darme una mano y a mis queridos cachorros Jorge Luna y Renán Villafuerte por su valiosa colaboración en la edición de este documento, se rajaron conmigo.

También a los nuevos: Maggi por salvarme de un par de accidentes en el labo, Claudia siempre que te llame estuviste ahí, Marité porque me haz enseñado tanto, Deyni eres a todo dar te mereces lo mejor, es una suerte haberte conocido, Noemí porque además de llevarme gratis varias veces, eres un ejemplo de que las mujeres podemos, Ana nunca pensé que existiera alguien tan parecido a mí, gracias por estar conmigo, eres una amiga muy fiel, Lencho por escuchar mis múltiples quejas y aún así seguir hablándome y Jimmysillo porque contigo he practicado lo que es ser mamá (trabajo duro), y porque al final fueron más los buenos momentos que los malos.

Como olvidarme de mis queridos Tobias y Mini, quienes son mi único escape de la realidad y aunque ya no están físicamente conmigo siempre me han acompañado.

También se debe agradecer a la gente que no lo quiere a uno, porque a veces no más para que no se alegren, me esfuerzo en salir adelante. Siento hacerlos renegar ahora mismo, ji, ji, ji.

Y aunque no soy la católica más devota, debo admitir que le debo un par de favores a la Virgen de Copacabana, al Señor de los Milagros y a San Martín de Porres, yo sé que hablaron con papa Dios para que esta tesis sea finalmente una realidad.

REFERENCIAS

Achá D., Iñiguez V., & Roulet, M. (2004) Bacterias Sulfato reductoras en la rizósfera de macrófitas de una laguna de la llanura de inundación del rio Beni, La Granja. Tesis de licenciatura. IBMyB, UMSA, La Paz-Bolivia,

Ackil, A. & Soner K. (2005) Acid Mine Drainage (AMD): Causes, treatment and case studies. *Journal of cleaner production*. Artículo en prensa.

Andreaus, J., Azevedo, H & Cavaco, A. (1999) Effects of temperature on the cellulose binding ability of cellulase enzymes. *Journal of molecular vatalysis B: Enzymatic,* 7: 223-239.

Alvarez, T. (2005) Microbial tretament of heavy metals leachates. Tesis de doctorado. Dept. of Biotechnology. Lund University.

Alvarez, T. , Crespo, C. & Mattiason, B. (2005) Precipitation of $Zn^{(+2)}$, $Cu^{(+2)}$ and $Pb^{(+2)}$ at bench –scale using biogenic hydrogen sulphide from the utilization of volatile fatty acids. Póster presentado en el 12vo Congreso Europeo de Biotecnología. Dinamarca.

Alvarez, T, Pott B., Gimenez, A., Hatti-Kaul, R. & Mattiason, B. (2005) Step towards the development of a robust, low technology sulfide producing process as an integral component in the treatment of heavy metal pollution in the environment. Submitido para publicación.

Alvarez, T., Pozzo, T. & Mattiason, B. (2005) Enhancement of sulphide production in anaerobic packed bed benh-scale biofilm reactors by sulphate reducing bacteria. *Biotechnology Letters*. Artículo en prensa.

Alvarez, T., Quillaguamán, J. & Mattiason, B. (2005) *Clostridium boliviense sp. nov.* and *Clostridium algarum sp.nov.,* xylanolytic, thiosulphate and sulphite-reducing bacteria isolated from the Bolivian Andean region. Submitido para publicación.

Avery S. & Tobin JM. (1993) Mechanism of adsorption of hard and soft metal ions to *Saccharomyces cerevisae* and influence of hard and soft anions. *Appl Environ Microbiol.,* 59: 2851-2856.

Arnsdorff, M. Alvarez T. & Giménez, A (2005) Producción biogénica de sulfuro de hidrógeno a partir de ácidos grasos volátiles obtenidos de la hidrólisis de la papa *(Solanum tuberosum)*.Tesina de licenciatura. IIFB, UMSA, La Paz-Bolivia

Banks, D., Younger, P., Arnesen, R. Ibersen. E. (1997). Mine-water chemistry: the good, the bad and the ugly. *Environm Geology,* 32 (3): 157-174

Barnes, L., Janseen, F., Sherfren, J., Versteegh J., Koch, R. & Scheeren, P. (1991) A new process for the microbial removal of sulphate and heavy metals from contaminated waters extracted by a geohydrological control system*. Trans Ichem E.,* 69:184-187

Barnes, L., Janssen, F., Scheeren, P., Versteegh J. & Koch, R.(1992) Simultaneous microbial removal of sulphate and heavy metals from waste water. *The Institution of Mining and Metallurgy*, C: 183-189

Barton, L. & Tomei, F. (1995) Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. En Barton, L. (ed.), *Sulfate-Reducing Bacteria*. Plenum Press, New York, pp 1-32

Batziris, H. , McIntyre, I. & Drummer, O. (1999) The effect of sulfur-metabolisng bacteria on sulfur-containing psycotropic drugs. *International Biodeterioration and Biodegradation,* 44: 111-116.

Béchard,G, Yamasaki H., Douglas Gould W. & Bedard,P. (1994) Use of cellulosic substrates for the microbial treatment of Acid Mine Drainage. *J. Environ. Qual.* 23: 111-116.

Beguin, P. & Aubert, J. (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13:25-58.

Bhagat M., Burgess J., Antunes A., Whiteley C. & Duncan J. (2004) Precipitation of mixed metal residues from wastewater utilizing biogenic sulphide. *Minerals Engineering* 17: 925-932.

Brady D, Stoll AD, Starke L & Duncan JR (1994) Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisa*e. *Appl Microbiol Biotechnol.* 41:149-154.

Buchauer, K. (1998) A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to waste-water and sludge tratment processes. Water SA, 24: 49-56

Buisman, C., Boonstra J., Krol, J. & Dijkman H. (1990) Biotechnological removal of sulfate and heavy metals from waste water. *Environmental Technology*, 91-94

Buisman, C. , Boonstra J., Krol, J. &Dijkman H. (1996) Biotechnological removal of sulfate and heavy metals from contaminated waters extracted by a geohydrological control system. *TransIChemE*., 69: Part A, Mayo, 1991

Cañizares R. O. (2000) Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42:131-143

Castro HF, Williams NH & Ogram A (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microb Ecol.* 31:1-9.

Christiensen B., Laake,M. , and Lien, T. (1996) Treatment of acid mine water by sulfate-reducing bacteria; results from a bench scale experiment. *Water Res.*30: 1617-1624

Chang, I., Shing, P., & Kim, H. (2000) Biological Treatment of acid mine drainage under sulphate-reducing consitions with solid waste materials as substrate. *Water Res.*34: 1269-1277

Cheong Y., Min J. & Ken K. (1998) Metal removal efficiencies of substrates for treating AMD of the Dialysing mine, South Korea. *J Geochem Explor.* 64: 147-152.

Chicón, Lorenzo (2003) Especiación de metales pesados en lodos de aguas residuales de origen urbano y aplicación de lodos digeridos como mejoradotes de suelo; Ingeniería Ambiental. Universidad de Málaga-España.

Chun,L., Hongzhang C. & Zuohu, L. (2004) Adsorptive removal of Cr(VI) by Fe-modified
steam exploded wheat straw. *Process Biochemistry,* 39: 541–545

Chuichulcherm S. (2004) An integrated system for the bioremediation of wastewater containing xenobiotics and toxic metals. *Eng. Life Sci.,* 4:354-357

Cocos, I., Zagury, G., Clement, B. & Samson, R. (2002) Multiple factor design for reactive mixture selection for use in reactive walls in mine drainage treatment. *Water Researc*h, 36: 167-177

Cohen, R. (2005) Use of microbes for cost reduction of metal renoval from metals and minino industry waste streams. *Journal of Cleaner Production*. Artículo en prensa

Cord-Ruwisch, R (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate reducing bacteria. *J. Microbiol Meth.* 4:33-36

Costa, M. & Duarte, J. (2005) Biorremediation of acid mine drainage using acidic soil and organic wastes for promoting sulphate-reducing bacteria activity on a column reactor. *Water, Air, and Soil Pollution*, 165:325-345

Cotoras Davor (1996) Biohídrica: Drenaje Acido de LAS Minas (AMD), Buenos Aires-Argentina.

Cowling, S., Gardner, M. & Hunt, D. (1991) Removal of heavy metals from sewage by sulphide precipitation: thermodynamic calculations and test on a pilot-scale anaerobic reactor, *Environmental Technology*, 13: 281-291

Crespo, C. Alvarez T. & Gimenez, A. (2005) Biogénesis de sulfuro de hidrógeno empleando ácido grasos volátiles producidos por la hidrólisis de vegetales y frutas en descomposición. Tesina de licenciatura. IIFB, UMSA, La Paz-Bolivia

Daly K., Sharp R. & McCarthy A. (2000) Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology,* 146: 1693-1705.

De Vegt A. and Buisman, C. (1996) Sulfur compounds and heavy metals removal using bioprocess technology, EPD Congress 1995, *The Mineral, Metal & Material Society*. Ed. Garry W. Warren.

Diorio, L., Forchiassin, F., Papinutti, V., Sueldo V. (2003) Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides*
(Fungi, Ascomycotina). Rev. Iberoam. Micol., 20: 11-15

Djurle, C. (2004) Development of a model of simulation of biological sulphate reduction with hydrogen as energy source. Department of Chemical Engineering, Lund University.

Drury, W. (1999) Treatment of acid mine drainage with anaerobic solid substrate reactors. *J. Microbiology methods*, 19: 1-11

Dvorak D., Hedin R., Edenborn H. & McIntire P. (1992) Treatment of metal-contaminated water using bacterial sulfate reduction: results from a pilot-scale reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 40:609-616

El Bayoumy, M., Bewtra J.K., Ali, H.I. & Biswas, N. (1999) Removal of heavy metals and COD by SRB in UAFF reactor. *Journal of Environmental Engineering*, 125: 532-539

El Bayoumy, M., Bewtra, J.K., Ali, H.I. & Biswas N. (1999) Sulfide production by sulfate reducing bacteria with lactate as feed in an upflow anaerobic fixed film reactor. Water, *Air and Soil Pollution*, 112: 67-84

Elliott, P., Ragusa, S. & Catcheside D. (1998) Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. *Wat. Res.* 32: 3724-3730.

Enfors, S. & Häggsström (2000) Bioprocess Technology Fundamentals and Applications. 1ed., Högskoletryckeriet, Royal Institute of Technology, Sweden.

Fauque, G. (1995) Ecology of Sulfate-Reducing Bacteria. En BARTON, L. (ed.), Sulfate, Reducing Bacteria. Plenum Press, New York, pp.217-241.

Feng, X., Sun, R., Fowler, P. & Baird, M. (2005) Extraction and Characterization of Original Lignin and Hemicelluloses from Wheat Straw. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 861-870.

Foucher, S., Battaglia, F., Ignatiadis, I. & Morin, D. (2001) Treatment by sulfate-reducing bacteria of Chessy acid-mine drainage and metals recover. *Chemical Engineering Science*, 56: 1639-1645.

Frommichen R, Kellner S & Friese K (2003) Sediment conditioning with organic and/or inorganic carbon sources as a first step in alkalinity generation of acid mine pit lake water (pH 2-3). *Envirol Sci Technol .,* 37:1414-1421.

Gallert C. & Winter, J. (2005) Bacterial Metabolism in Wastewater Treatment Systems en Jördening, H. & Winter (eds.), *Environmental Biotechnology.Concepts and Applications.* Verlag, pp.1-48

García, C., Moreno, D., Ballester, A., Blázquez, M. & González, F. (2001) Bioremediation o fan industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. *Minerals Engineering,* 14: 997-1008.

Glombitza, F. (2001) Treatment of acid lignite mine flooding water by means of microbial
sulfate reduction. *Waste Management,* 21:197-203.

González, E., Albanell, E. & Caja G. (2004) Utilización de enzimas fibrinolíticas en cabras lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas *in vitro*. Tesis doctoral. Departamento de Ciencias de los animales y de los alimentos. Universidad autónoma de Barcelona. Barcelona-España.

Hallberg K. & Johnson B. (2003) Passive mine water treatment at the former Wheal Jane tin mine, Cornwall: important biogeochemical and microbiological lesson. *Land Contamination & Reclamation*, 11: 213-220.

Hallberg K. & Johnson B. (2005) Microbiology of a wetland ecosystem constructed to remediate mine drainage from a heavy metal mine. Science of the Total Envrionment, 338: 53-66.

Hamilton, A. (1998) Bioenergetics of sulphate-reducing bacteria in relation to their environmental impact. *Biodegradation*, 9:201-212.

Hao O. (2000) Metal effects on sulphur cycle bacteria and metal removal by sulphate-reducing bacteria. En: Lens, P. y Pol, L. (eds.), 2000. *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: Principles and Engineerin*g, IWA Publishing, London, UK, pp. 393-414.

Harris M. & Ragusa S. (2000) Bacterial mitigation of pollutants in acid drainage using decomposable plant material and sludge. *Environmental Geology* ,40: 195-215

Harris M. & Ragusa, S. (2001) Bioremediation of acid mine drainage using descomposable plant material in a constant flow bioreactor. *Environmental Geology*, 40: 1192-1204.

Hines, M., Visscher, P. & Devereux, R. (2002) Sulfur cycling en Hurst, C.m Crawford, R., Knuden, G., McInerney, M. & Stetzenbach, L. (eds.), *Manual of Environmental Microbiology.* ASM Press, Washington, D.C. p. 427-438.

Hongpattarakere, T. (2002) Hyperthermostable cellulytic and hemicellulolytic enzymes and their biotechnological applications. Songklanakarin.*J. Sci. Technol.,* 24: 481-491

http:// www. lenntech.com

Huang C & Morehart AL (1990) The removal of copper from dilute aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisa*e. *Water Res* 24: 433-439.

Hulshof A., Blowes D., Ptacek C. & Gould W. (2003) Microbial and nutrient investigations into the use of in situ layers for treatment of tailings effluent. *Environ Sci.Technol.* 37: 5027-5033.

Hungate, R.E. (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in Microbiol.* 3: 117-132

Hyun-Joon, L., Kyoung-Ho, K., Zhe-Xue, Q., Young-Gyun, C. & Sung-Taik, L. (2003) Enhancement of sulfate reduction activity using granular sludge in anaerobic treatment of acid mine drainage. *Biotechnology Letters*, 25: 503-508

Ingvorsen K., de Nielsen M. & , Joulian C. (2003) Kinetics of bacterial sulfate reduction in an activated sludge plant. *Microbiology Ecology* 46: 129 – 137

Ito T., Okabe S., Satoh H., & Watanabe Y. (2002) Successional development of sulfate-reducing bacterial populations and their activities in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions. *Applied and environmental microbiology,* 68: 1392–1402.

Iverson, W. P. (2001) Research on the mechanisms of anaerobic corrosion. *International Biodeterioration & Biodegradation,* 47: 63 –70

Jalali K. & Baldwin S. A. (2000) The role of sulphate reducing bacteria in copper removal from aqueous sulphate solutions. *Water Res.*,34: 797- 806

Johnson, B. & Hallberg K. (2005) Acid mine drainage remediation options: a review. *Science of the Total Environment*. 338: 3– 14.

Johnson, B. & Hallberg, K. (2005) Biogeochemistry of the compost bioreactor components of a composite acid mine drainage passive remediation system. *Science of the Total Environment*, 338: 81-93.

Jong, T. & Parry. D.L. (2003) Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale up flowanaerobic packed bed reactor runs. *Water Res.* 37: 3379 –3389.

Kaksonen A., Riekkola-Vanhanenc M., & Puhakkaa J. (2003) Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater. *Water Re*s. 37: 255-266.

Kaksonen, A., Plumb, J., Franzman, P. & Puhakka, J. (2004) Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *FEMS Mcirobiology Ecology*, 47: 279-289

Kilborn Inc. (2002) Review of Passive Systems for Treatment for Acid Mine Drainage. Canada.

Kolmert Å., Henrysson T., Hallberg R & Mattiasson B. (1997) Optimization of sulphide production in an anaerobic continuous biofilm process with sulphate reducing bacteria. *Biotech lett.* 19: 971- 975.

Kolmert, Å. (1999) Sulfate-Reducing Bacteria in Bioremediation Processes. Tesis de licenciatura. Department of Biotechnology. Lund University.

Kolmert Å, Wikstöm P. & Hallberg K. (2000) A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulphate in sulphate reducing bacteria cultures. *J. Microbiol Meth.*,41: 179-184.

Kolmert, Å. & Jhonson B. (2001) Remediation of acidic waste waters using immobilised, acidophilic sulfate-reducing bacteria. *J. Chem. Technol. Biotechnol.,* 78: 836-843.

Koschorreck M., Frömmichen R., Herzsprung, P., Tittel J. & Wendt-Potthoff, K. (2002).; Functions of straw for in situ remediation of acidic mining lakes. *Water, Air and Soil Pollution*, 2: 97-109.

Koschorreck ,M., Potthoff, K. & Geller W. (2003) Microbial Sulfate reduction at low pH in sediments of an acidic lake in Argentina. *Environ. Sci. Technol.* 37: 1159-1162.

Kortba, P. & Rumi, T. (2000) Bioremediation of heavy metal pollution exploiting constituents, metabolites and metabolic pathways of livings. A review. *Collect Czech. Chem. Commun.* 65: 1205-1247.

Kosolapov, D., Kuschk, P., Vainshtein, M., Vatsourina, A., Wieβner., Kästner, M. & Müller, R. (2004) Microbial Processes of Heavy Metal Removal from Carbon-Deficient Effluents in Constructed Wetlands. *Eng. Life Sci*., 4:403-411

Krauter P., Martinelli R., Williams K. & Martins S. (1996) Removal of Cr (VI) from ground water by *Saccharomyces cerevisae. Biodegradation,* 7: 277-286.

Kuo W. & Shu T. (2004) Biological pre-treatment of wastewater containing sulfate using anaerobic immobilized cells. *Journal of Hazardous Materials*. B 113: 147–155

Lapierre, C. (1993) Application of new methods for the investigation of lignin structure. En: Hung, H., Buxton, D., Hatfield, R. & Ralph, J. (Eds.), Forage Cell Wall Structure and Digestibility. Americamn Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. , Madison WI, PP 131-136.

Labrenz M. & Banfield, J.F. (2004) Sulfate-Reducing Bacteria-Dominated Biofilms that precipitate ZnS in a subsurface circumneutral-pH mine drainage system. *Microbial ecology*, 47:205-217.

Le Gall, J, & Xavier, A. (1996) Anaerobes Response to Oxygen: The Sulfate-reducing Bacteria. Anaerobe, 2:1-9.

Logan, M., Reardon, K., Figueroa, L., McLain, J. & Ahmann, D. (2005) Microbial community activities during stablishment, performance, and decline of bench-scale passive treatmente systems for mine drainage. *Water research* (artículo en prensa).

Lovley, D. Phillips, E. & Woodward, J. (1993) Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bateria. *Mar. Geol*., 113: 41-53

Luna R., Iñiguez V., & Roulet, M. (2004) Perfil preliminar de bacterias sulfato reductoras de la laguna “La Granja” (Beni). Tesis de licenciatura. IBMB, UMSA, La Paz-Bolivia.

Luptakova A. & Kusnierova M. (2005) Bioremediation of acid mine drainage contaminated by SRB. *Hydrometallurgy*, 77: 97-102

Lyew D. & Sheppard J. (1997) Effects of Physical Parameters of a Gravel Bed on the Activity of Sulphate-Reducing Bacteria in teh Presence of Acid Mine Drainage. *J. Chem, Technol. Biotechnol*. 70:223-230

Lyew D. & Sheppard J. (2001) Use of conductivity to monitor the treatment of acid mine drainage by sulphate-reducing bacteria. *Water Res.,* 35: 2081-2086.

Macaskie L. & Dean A.(1989) Microbial metabolism, desolubilization and deposition of heavy metals: uptake by immobilized cells and application to the treatment of liquid wastes. En: Mizrahi A (ed.) 1989. *Biological Waste Treatmen*t, Alan R. Liss, New York, pp. 150-201.

Madigan, M., Martinko, J & Parker,J. (1998) *Brock: Biología de los microorganismos.* 8 ed., Prentice Hall, España.

Maree, J., & Strydom F. W. (1987) Biological Sulphate Removal from industrial effluent in an upflow packed bed reactor. *Wat. Res*. 21: 141-146.

Maree, J.P., Gerber, A., McLaren A.R., & Hill, E. (1987) Biological treatment of mining effluents. *Environmental Technology letters*, 8: 53-64.

Mendieta,J Alvarez T. & Gimenez, A (2002) Aislamiento de bacterias sulfato reductoras provenientes de muestras de agua, lodo y tierra de la región altiplánica de Bolivia. Tesina de licenciatura. IIFB, UMSA, La Paz-Bolivia.

Mejia, T., Mújica, F, González, A. & Ortega, J. (2002) Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología. Avance y Perspectiva, 21:267-27.

Miller T & Wolin, M.J. (1974) A serum bottle modification of the Hungate tecchnique for cultivating obligate anaerobes. *Applied Microbiology*, 27: 985-987.

Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, Secretaría Nacional de Minería, Swedish Geological AB (1996) Proyecto Piloto Oruro. Aspectos ambientales de los metales y metaloides en el sistema hidrológico del Desaguadero.

Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, Secretaría Nacional de Minería, Swedish Geological AB (1996) Proyecto Piloto Oruro. Depósitos de colas de minerales en el área del Proyecto Piloto Oruro.

Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, Secretaría Nacional de Minería, Swedish Geological AB (1996) Proyecto Piloto Oruro. Hidrología del área del Proyecto Piloto Oruro.

Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, Secretaría Nacional de Minería, Swedish Geological AB (1996) Proyecto Piloto Oruro. Impacto de la contaminación minera e industrial sobre aguas subterráneas.

Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, Secretaría Nacional de Minería, Swedish Geological AB (1996) Proyecto Piloto Oruro. Impacto de la minería y el procesamiento de minerales en cursos de agua y lagos.

Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, Secretaría Nacional de Minería, Swedish Geological AB (1996) Proyecto Piloto Oruro. Evaluación de recursos minerales y su utilización.

Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, Secretaría Nacional de Minería, Swedish Geological AB (1997) Proyecto Piloto Oruro. Documento final. Plan de gestión ambiental.

Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, Secretaría Nacional de Minería, Swedish Geological AB (1997) Proyecto Piloto Oruro. Estudio experimental de los factores que influyen en los niveles de metales en la quinua.

Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, Secretaría Nacional de Minería, Swedish Geological AB (1997) Proyecto Piloto Oruro. Estudios de flora terrestre y contaminación de suelos y plantas en el área de Proyecto Piloto Oruro.

Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, Secretaría Nacional de Minería, Swedish Geological AB (1997) Proyecto Piloto Oruro. Evaluación de la problemática de residuos orgánicos y aguas residuales domésticas en la ciudad de Oruro.

Mizuno, O., Li, Y. & Naike, T. (1998) The behavior of sulfate-reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestión. *Wat. Res.*, 32: 1626-1634.

Morales, P. Trejo, B., Salazar, A. & Aguilar, G. (2005) Efectos de las xilanasas de *Aspergillus.* Departamento de Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química. Universidad Autónoma de México UNAM.

Morin, A., Hutt, N. (1998) Kinetic tests and risk assesment for ARD. 5th annual BC metal leaching and ARD workshop, Vancouver, Canada, p. 1-10

Moura, I., Bursakov, S., Costa, C. & Moura, J. (1997) Nitrate and Nitrite Utilization in Sulfate-Reducing Bacteria. *Anaerobe,* 3:279-290.

Muller, R. (2001) Microbially Mediated Thalium Inmobilization in Bench Scale Systems. *Mine Water and the Environment*, 20: 17-29

O'Flaherty, V. & Colleran E. (1999) Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor. I:process disturbance and remediation. *BioresourceTechnology* 68:101-107

O'Flaherty, V., Colohan, S., Mulkerrins, D. & Colleran, E. (1999) Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor. II: microbial interactions and toxic effects. *BioresourceTechnology* 68:109-120

Okabe, S., Nielsen, P.H., Jones, W. L.& Characklis, W.G. (1995) Sulfide product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures. *Water Res.,* 29: 29.571-578.

Omil., F., Lens, P., Hilshoff, P. & Lettinga, G. (1996) Effect of Upward Velocity and Sulphide Concentration on Volatile Fatty Acid Degradation in a Sulphidogenic Granular Sludge Reactor. *Process Biochemistry*, 31: 699-710.

Panthapulakkal S., Zereshkian, A. & Sain, M. (2005) Preparation and characterization of wheat straw .bers for reinforcing application in injection molded thermoplastic composites. *Bioresource Technology*. Artículo en prensa.

Parawira, W. Mutro, M. , Read, J. & Mattiasson, B. (2004) Volatile fatty acid production during anaerobic mesophilic digestion of solid potato waste. *J. Chem Technol Biotechnol.,* 79:673-677.

Pardo, A.G., Obertello M., & Forchiassin, F. (2003) Cellulose and xylan degrading enzymes in *Thecotheus pelleteri.* http//www.drwebsa.com.ar/aam/revvol132v32-4-05.htm

Parés & Juarez (1997) Bioquímica de los microorganismos., Editorial Reverté, S.A., Barcelona, España.

Postgate, J. (1984) T*he Sulphate Reducing Bacteria*. 2 ed., Cambridge University Press., Cambridge.

Pott B. & Mattiasson B. (2004) Separation of heavy metals from water solutions at the laboratory scale. *Biotechnol Lett.*, 26: 451-456.

Pozzo T, Alvarez, T & Gimenez, A. (2002) Cuantificación de metales pesados, cadmio, cobre, plomo y zinc en aguas superficales de las minas Avicaya y Estalsa ubicadas en el altiplano boliviano mediante espectrofotometría de absorción atómica, gestion 2002. Tesina de licenciatura. IIFB.UMSA, La Paz-Bolivia.

Prasad D, Wai M, Bérubé P & Henry JG (1999) Evaluating substrates in the biological treatment of acid mine drainage. *Environ Technol.,* 20: 449-458.

Quispe, D., Alvarez, M. & Giménez, A. (2005) Establecimiento de las condiciones para la producción de biogas a partir de ácidos grasos volátiles obtenidos de la hidrólisis anaeróbica de la papa (*Solanum tuberosum*) a nivel de laboratorio. Tesina de licenciatura. IIFB, UMSA, La Paz-Bolivia.

Rai L., Gaur J. & Kumar H. (1981) Phycology and heavy metal pollution. *Biol Rev.,* 56: 99-151.

Rampersad K., Goldstone, L.A., and Tivchev, G.N. (1998) Study of methods for the cultivation of anaerobic cellulose-degrading bacteria. *Water SA* 24: 343-345.

Reis, M., Almeida, J., Lemos, P., Carrondo, M. (1992) Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 40: 593-600.

Ribes, J., Keesman, K. & Spaniers, H. (2004) Modelling anaerobic biomass growth kinetics with a substrate threshold concentration. *Water Res.*, 38: 4502-4510.

Rose, P. Boshoff, G., van Hille, R., Wallace, L. Dunn, K. & Duncan, J. (1998) An integrated algal sulphate reducing high rate ponding forthe treatment of acid mine drainage wastewaters. *Biodegradation*, 9: 247-257.

Rowley M, Warkentin D & Sicotte V (1997) Site demonstration of the biosulphide process at the former Britannia mine. In: Proceedings of the Fourth International Conference on Acid Rock Drainage. Vancouver, British Columbia, Canada, May 31 – June 6, 1997. American Society of Surface Mining and Reclamation. 4: 1533-1547.

Roy A. & Trudinger P. (1970) The Biochemistry of Inorganic Compounds of Sulfur, Cambridge Univ. Press, London.

Sánchez, G. (2005) Ethanol from Paja Brava: Diluyte-Acid Hydrolysis and Fermentation of a Bolivian Straw Material. Tesis de Licenciatura. Department5 of Chemical Engineering, Lund, Sweden.

Sá-Pereira, Paveia, H., Costa-Ferreira, M. & Aires-Barros, M. (2003) A New Look at Xylanases. An overview of Purification Strategies. *Molecular Biotechnology*, 24: 257-281.

Servicio Nacional de Geología y Minería. Boletín N°19, 2000.

Sheoran A. & Sheoran V. (2005) Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wtlands: A critical review. *Minerals engineering,* Artículo en prensa.

Siegert, I. & Banks, C. (2005) The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochemistry*, 40: 3412-3418

Sørensen, J., Kragh, K., Sibbesen, O., Delcour, J., Goesaert, H., Svensson, b., Tahir, T., Brufau, J., Vendrell, A., Bellicampi, D., Ovidio, R., Camardella, L., Giovane, A., Bonnin, E. & Juge, N. (2004) Potential role of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological apllications. *Biochimica et Biophysica Acta,* 1696: 275-287

Stanier, R., Adelberg, E. & Ingraham, J. (1985) *Microbiología,* 4ed., Reverté, España.

Steed, V., Suidan, T., Gupta M, Miyahara T., Acheson, C.M. & Sayles, G. (2000) Development of a sulfate-reducing biological process to remove heavy metals from acid mine drainage. *Wat. Res*. 72: 530- 535

Stocker & Seager (1981) Química ambiental: contaminación del aire y del agua. 1 ed. Blume Ecología. España.

Sun, X., Sun, R., Fawler, P & Baird, M. (2005) Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. *J. Agric. Food. Chem*. , 53: 860-870.

Sung-Taik, L. & Jay, L. (1997) Insoluble dye substrate for screening and assay of xylan-degrading enzymes. *Journal of Microbiological Methods*, 29: 1-5.

Tabak, H., Scharp R., Burckle J.,Kawahara, F.& Govind, R. (2003) Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 1. Metal precipitation for recovery and recycle. *Biodegradation* 14: 423–436.

Tabak, H. & Govind R. (2003) Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 2. Membrane bioreactor system for sulfate reduction. *Biodegradation* 14: 437-452.

Tang, Y., Shigematsu, T., Ikbal, Morimura, S. & Kida, K. (2004) The effects of micro-aeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in a thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester. *Water research,* 38: 2537-2550.

Tsukamoto T.K., Killion H.A. & Miller G.C Water (2004) Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. *Water Res.* 38:1405 –1418.

Tuttle, J., Dungan, P. & Randles, C. (1969) Microbial dissimilatory sulfur cycle in acid mine water. *J Bacteriol.,* 97: 594-602.

U.S. EPA (1997) Recent development for in situ treatment of metal contained soils, EPA/547/3-97/Washington D.C. USA.

Valls,M. & de Lorenzo, V. (2002) Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *Microbiology reviews*, 26: 327-338

Van Hille, R., Petreson, K. & Lewis, A. (2005) Cooper sulphide precipitation in a fluidised bed reactor. *Chemical Engineering Science*, 60: 2571-2578.

Van Houten, R. & Lettinga, G. (1995) Treatment of acid mine drainage with sulfate-reducing bacteria using synthesis gas as energy carbon source. 9th forum of applied biotechnology, Gent, Belgium.

Van Soest, P. (1994) Nutritional Ecology of the Rumiant. 2da Ed. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY.

Veeken, A., Akoto, L., Hulshoff, L. & Weijma, J. (2003) Control of the sulfide (S^{2-}) concentration for optimal zincremoval by sulfide precipitation in a continuously stirred tank reactor. *Water Res.* 37: 3709 –3717

Vidal, R. (2000) Colonization of supports by methanogenic and sulphate reducing bacteria in anaerobic filter-type reactors. Concepción, Chile.

Vogel, J. (1996) Qualitative Inorganic Analysis. Longman Publishing Ltd, London, UK.

Madigan, M., Martinko, J & Parker,J. (1998) *Brock: Biología de los microorganismos.* 8 ed., Prentice Hall, España.

Voet, D. & Voet, G. (1990) *Biochemistry.*, Jhon Wiley & Sons, Inc. , U.S.A.

Wakao N, Takashi, T., Dakurrai, Y. & Shiota H. (1979) A treatment of acid mine water using sulfate reducing bacteria. *J. Ferment. Technol.,* 57: 445-452.

Waybrant KR, Blowes DW & Ptacek CJ (1998) Selection of reactive mixtures for use in permeable reactive walls for treatment of mine drainage. *Environ Sci Technol* 32, 1972-1979.

Waybrant KR, Ptacek CJ & Blowes DW (2002) Treatment of mine drainage using permeable reactive barrers: column experiments. *Environ Sci Technol* 36, 1349-1356.

Yamamoto, T. & Montero, H. (2004) Efectos de los Metales Tóxicos en la Salud de los Trabajadores Mineros del Cerro Rico de Potosí. *Revista Técnica Informativa CIMA*, Potosí-Agosto, 38-47.

Zhe-Xue, Q., Bae, J., Rhee, S., Cho, Y. & Lee, S. (2004) Toxicicty and degradation of metal-complexed cyanide by a bacterial consortium under sulfate-reducing conditions. *Biotechnology Letters*, 26: 1007-1011.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Tabla 1. Valores máximos admisibles de parámetros en cuerpos receptores del reglamento de la ley de medio ambiente en Bolivia en mg/L.

Anexo 2. Tabla 2. Límites permisibles para descargas líquidas en mg/L establecidos en el reglamento de la ley de medio ambiente en Bolivia.

Anexo 3. Figura 1. Biorreactor de lecho empacado usado en el estudio

Anexo 4. Esquema del procedimiento seguido en el trabajo de investigación

Anexo 5. Mapa de ubicación de la laguna Chalviri.

Anexo 6. Mapa de ubicación de la mina Bolívar

Anexo 7. Preparación de medios.

Anexo 8. Preparación de reactivos.

Anexo 9. Preparación de tampones

Anexo 10. Curva de calibración de enzimas.

Anexo 11. Curva de calibración de sulfuros y sulfatos.

Anexo 1.

Tabla 1. Valores máximos admisibles de parámetros en cuerpos receptores del reglamento de la ley de medio ambiente en Bolivia en mg/l.

PARAMETRO	CLASE A	CLASE B	CLASE C	CLASE D
pH	6.0-8.5	6.0-9.0	6.0-9.0	6.0-9.0
Aluminio	0.2	0.5	1.0	1.0
Amoniaco NH3	0.05	1.0	2.0	4.0
Antimonio	0.01	0.01	0.01	0.01
Arsénico (total)	0.05	0.05	0.05	0.05
Cadmio	0.005	0.005	0.005	0.005
Cianuro	0.02	0.1	0.2	0.2
Cobre	0.05	1.0	1.0	1.0
Cromo^{6+}	0.05 total	0.05 Cr^{6+}	0.05 Cr^{6+}	0.05 Cr^{6+}
Cromo^{3+}	-	0.6	0.6	1.1
Estaño	2.0	2.0	2.0	2.0
Hierro (soluble)	0.3	0.3	1.0	1.0
Mercurio	0.5	1.0	1.0	1.0
Litio	2.5	2.5	2.5	5.0
Plata	0.05	0.05	0.05	0.05
Plomo	0.05	0.05	0.05	0.01
Selenio	0.01	0.01	0.01	0.05
Zinc	0.2	0.2	5.0	5.0

MDSMA REGLAMENTO A LA LEY DE MEDIO AMBIENTE Cortesía del Programa Manejo Integrado del Medio Ambiente en la pequeña Minería Decreto Supremo Nº 24176 Publicación Autorizada por la Gaceta Oficial y Resolución Ministerial Nº 046/96, anexo A de contaminación hídrica, pag.243-246.1995 La Paz Bolivia.

Clase A: Agua natural de máxima calidad (apta para el consumo humano sin tratamiento).

Clase B: Agua de utilidad general (requiere tratamiento físico y bacteriológico para su consumo).

Clase C: Agua de utilidad general (requiere tratamiento físico, químico y bacteriológico para su consumo y es apta para riego).

Clase D: Agua con calidad mínima para el consumo humano y limitado para riego.

Anexo 2.

Tabla 2. Límites permisibles para descargas líquidas en mg/l establecidos en el reglamento de la ley de medio ambiente en Bolivia.

Norma o Parámetro	Propuesta	
	Diario	Mes
Cadmio	0.3	0.5
Cobre	1.0	0.5
Plomo	0.6	0.3
Zinc	3.0	1.5
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[1]	0.2	0.1
pH	6.9	6.9
Sulfuros	2.0	1.0
DBO[2]	80	-
DQO[3]	250	-

MDSMA REGLAMENTO A LA LEY DE MEDIO AMBIENTE Cortesía del Programa Manejo Integrado del Medio Ambiente en la pequeña Minería Decreto Supremo Nº 24176 Publicación Autorizada por la Gaceta Oficial y Resolución Ministerial Nº 046/96, anexo A de contaminación hídrica, pag.243-246.1995 La Paz Bolivia.

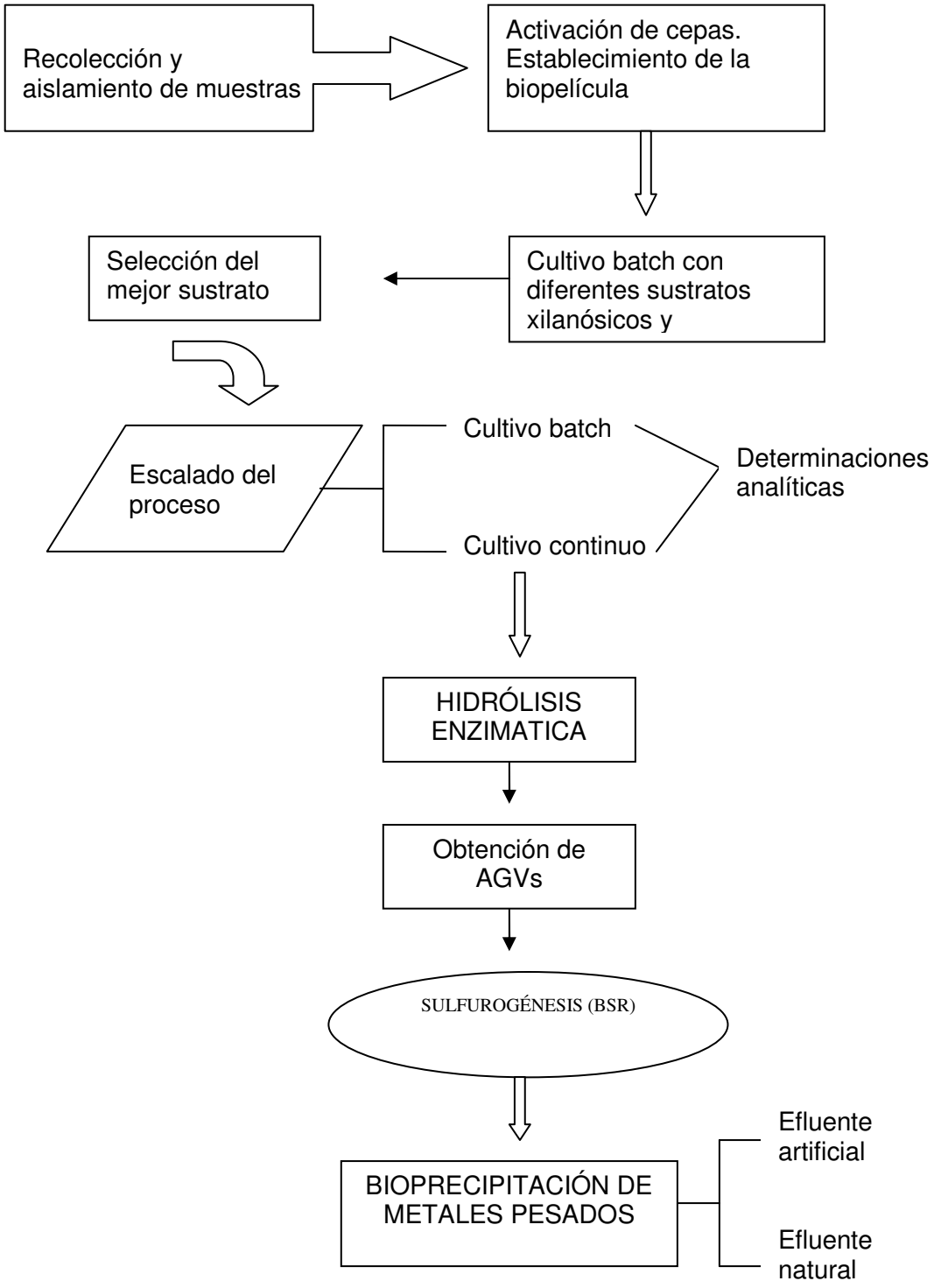
1 y 2 aplicable a descargas de procesos mineros e industriales en general.
3 aplicable a procesos hidrocarburíferos.

Anexo 3.

Figura 1. Biorreactor de lecho empacado usado en el estudio

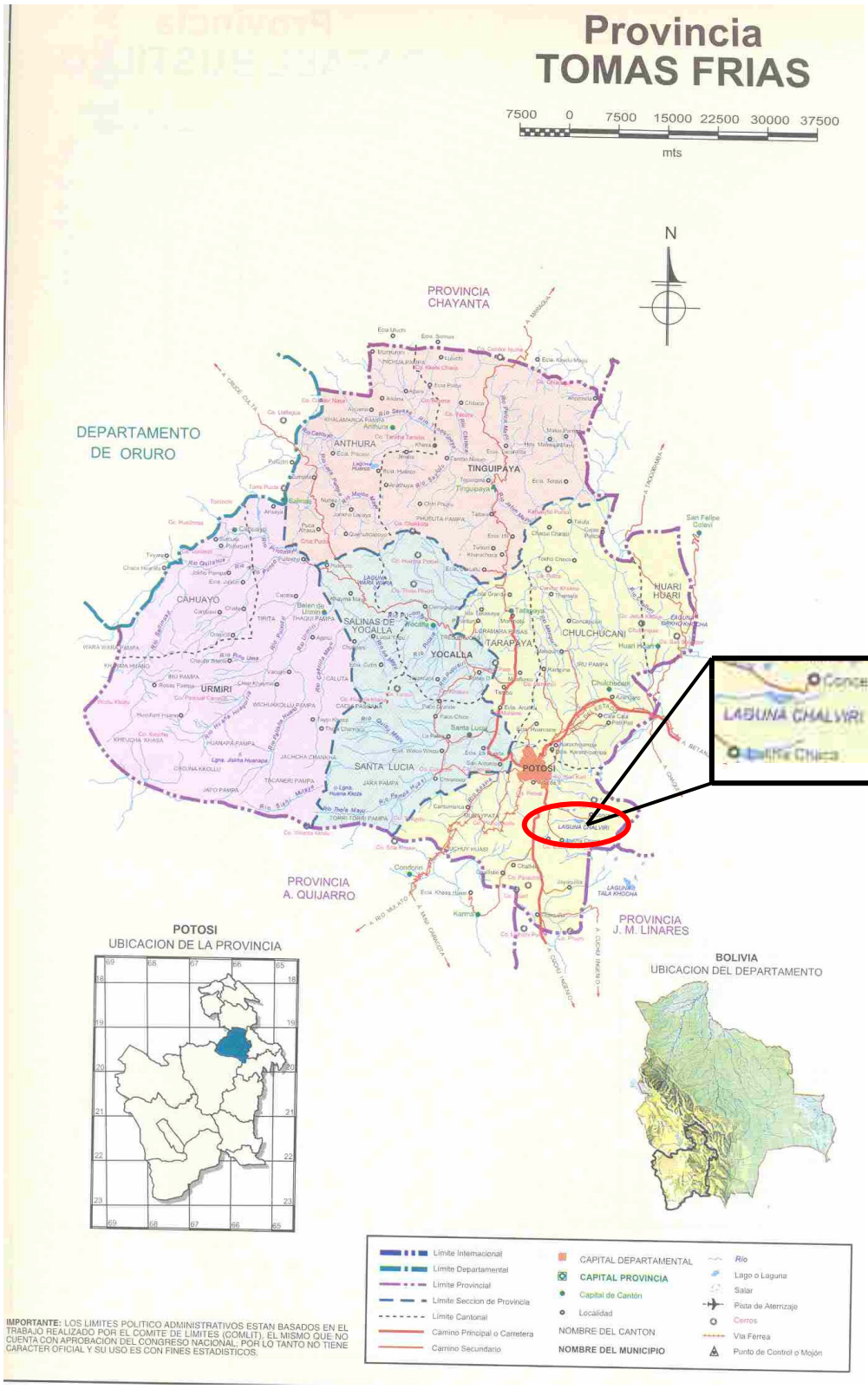
Anexo 4.

Esquema del procedimiento seguido en el trabajo de investigación



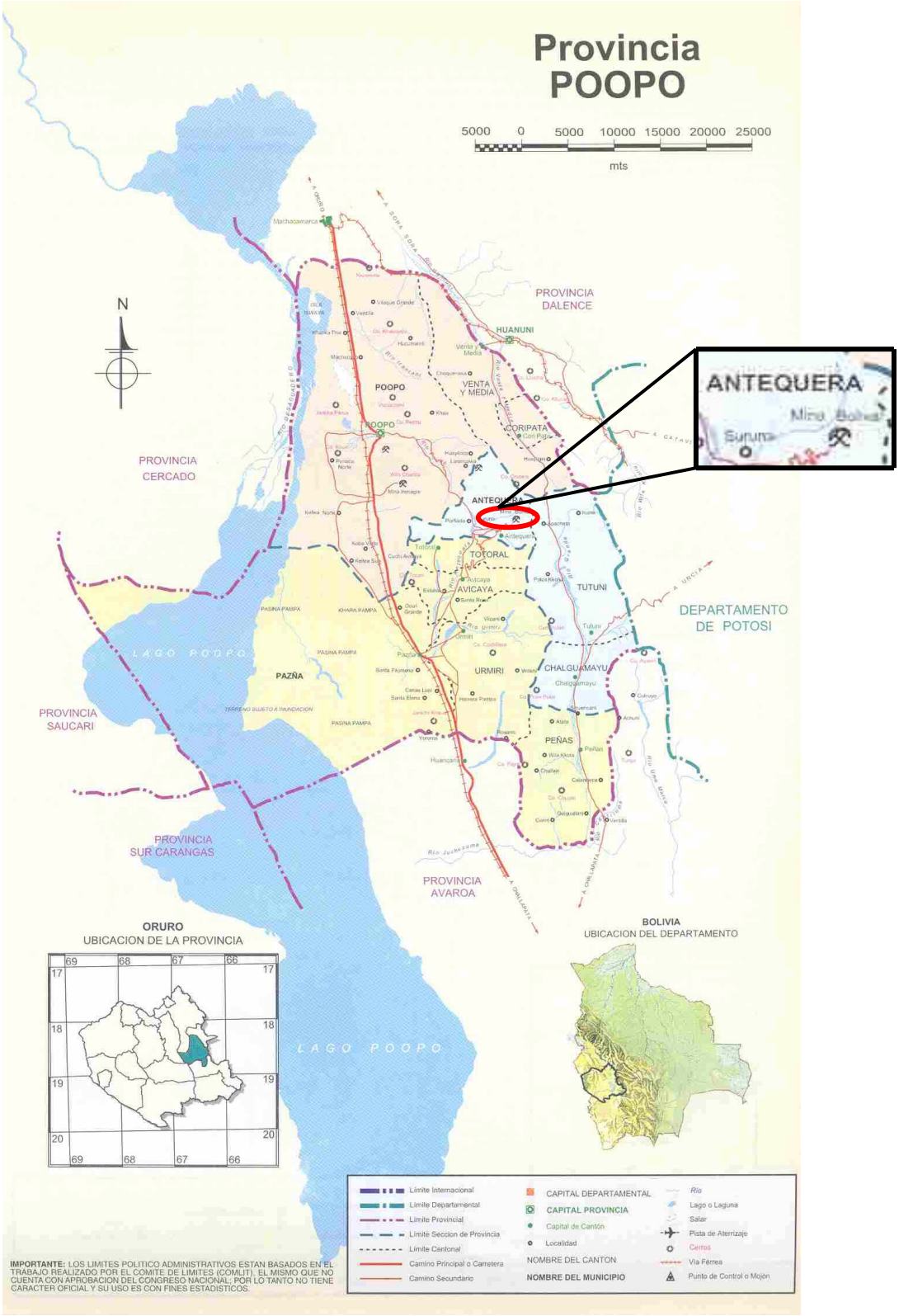
Anexo 5.

Mapa de ubicación de la laguna Chalviri



Anexo 6.

Mapa de Ubicación de la Mina Bolívar



Anexo 7.

Preparación de medios

Medio Postgate C modificado

Para 1 Litro

KH_2PO_4	0.5	g
Na_2SO_4	4.5	g
NH_4Cl	1.0	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.06	g
$CaCl_2.6H_2O$	0.06	g
Acido Cítrico	0.3	g
$FeSO_4.7H_2O$	0.004	g

Llevar a pH = 7.5 con NaOH y autoclavar

Anexo 8.

Preparación de reactivos

Acido Dinitrosalícilico (DNS)

Para 1 Litro

Fenol	0.2 g
$K_2S_2O_3$	0.5 g
Acido Dinitrosalícilico	10.0 g
NaOH	10.0 g
Tartrato doble de Sodio y Potasio	200.0 g

Reactivo Condicionante

Para 1 Litro

ClNa	150.0 g
Glicerol	100.0 mL
HCl 37%	60.0 mL
Etanol 96%	200.0 mL

Reactivo de Cobre

Para 1 Litro

$CuSO_4.5H_2O$	1.25 g
HCl 37%	4.2 mL

Anexo 9.

Preparación de Tampones

Tampón Citrato de Sodio

Para 100 mL

Acido cítrico	0.83 g
Citrato de Sodio	1.07 g

pH = 4.8

Tampón Fosfato

Solución A

Para 250 mL

NaOH	2.00 g

Solución B

Para 250 mL

NaH_2PO_4	6.00 g

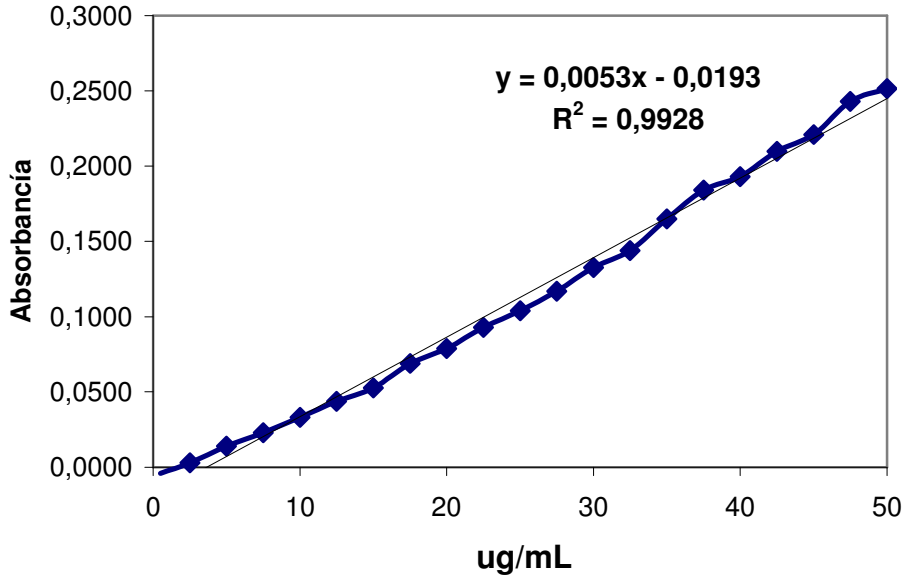
Mezclar 5.8 mL de solución A y 50 mL de solución B, enrasar A100 mL

pH= 6

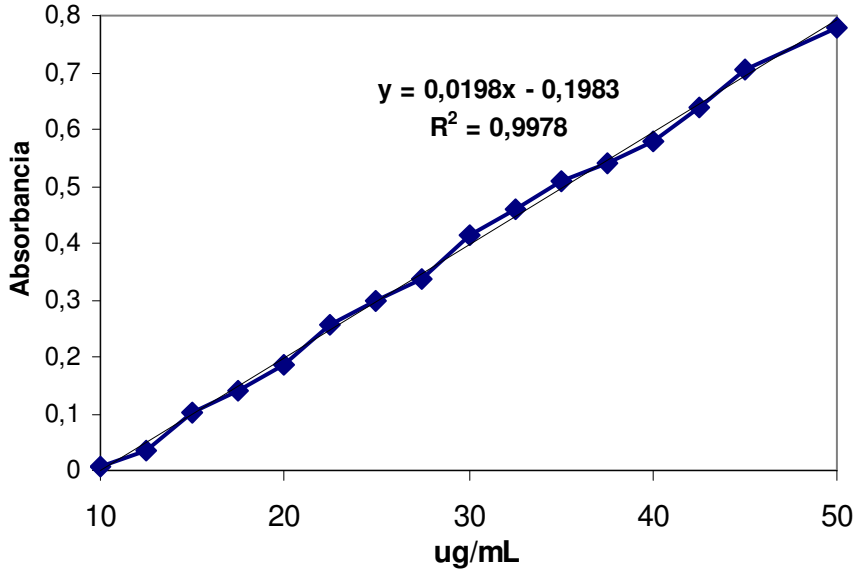
Anexo 10.

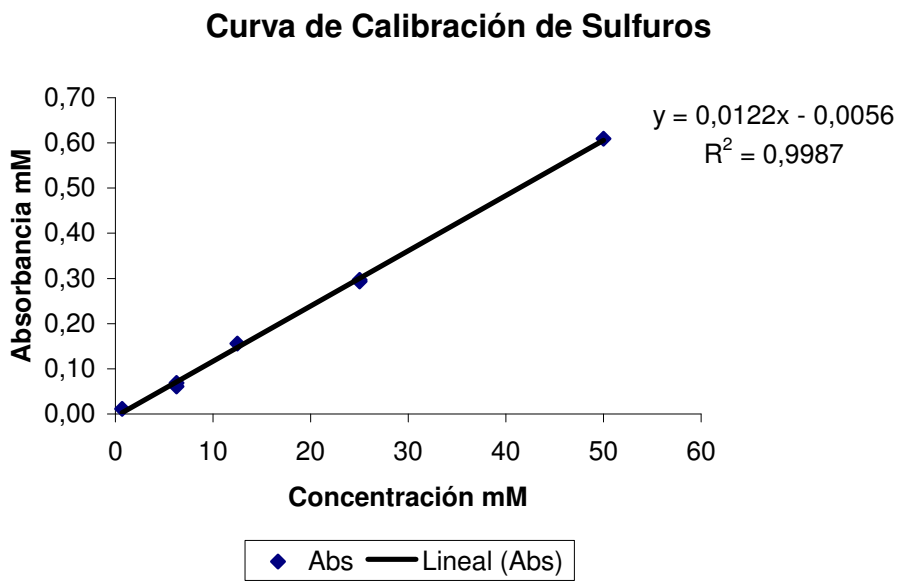
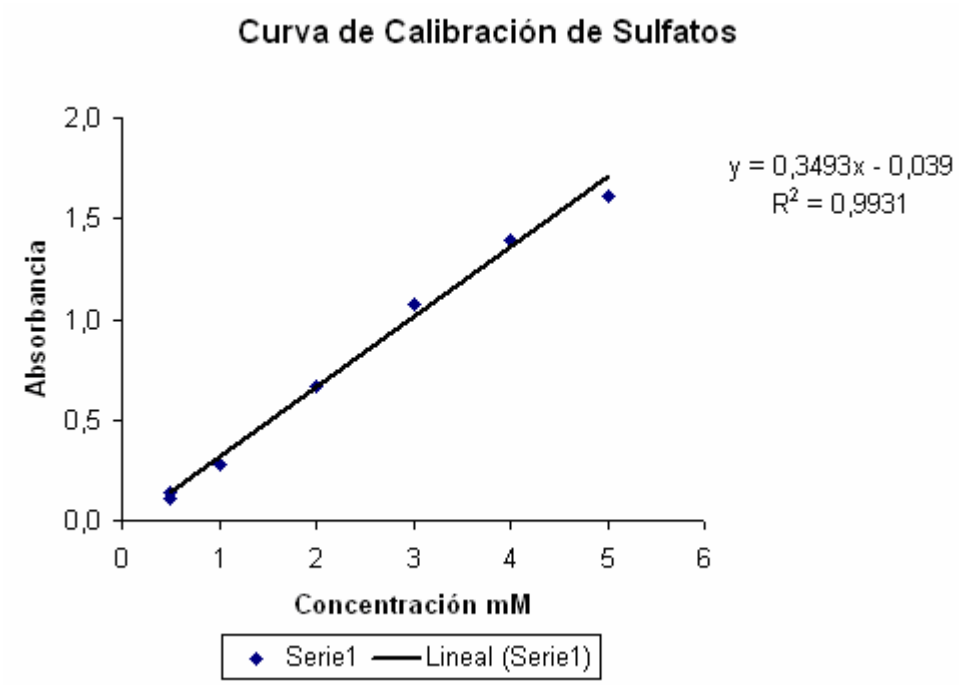
Curva de calibración de enzimas

CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA GLUCOSA



CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA XILOSA



Anexo 11.

Curva de calibración de sulfuros y sulfatos