



Tecnología y Ciencias del Agua

ISSN: 0187-8336

revista.tyca@gmail.com

Instituto Mexicano de Tecnología del  
Agua  
México

Pérez, Norma; Schwarz, Alex; Urrutia, Homero  
Tratamiento del drenaje ácido de minas: estudio de reducción de sulfato en mezclas  
orgánicas  
Tecnología y Ciencias del Agua, vol. VIII, núm. 1, enero-febrero, 2017, pp. 53-64  
Instituto Mexicano de Tecnología del Agua  
Morelos, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=353549831004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica  
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

# Tratamiento del drenaje ácido de minas: estudio de reducción de sulfato en mezclas orgánicas

• Norma Pérez\* • Alex Schwarz • Homero Urrutia •  
Universidad de Concepción, Chile

\*Autor para correspondencia

## Resumen

Pérez, N., Schwarz, A., & Urrutia, H. (enero-febrero, 2017). Tratamiento del drenaje ácido de minas: estudio de reducción de sulfato en mezclas orgánicas. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 8(1), 53-64.

Las barreras permeables reactivas (BPR) son un sistema de tratamiento de aguas subterráneas usado en la descontaminación del drenaje ácido de minas. En esta tecnología, el material reactivo se dispone como barrera en el subsuelo, y el sulfato, los metales y la acidez son removidos por la actividad metabólica de los microorganismos reductores de sulfato (MRS). Los sustratos de las BPR deben ser económicos y proporcionar materia orgánica que favorezca el crecimiento de microorganismos. En esta investigación, usando reactores de operación discontinua, se evaluó la actividad de los MRS en 10 mezclas orgánicas con distintas proporciones de biosólidos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales, tejido óseo de peces, compost de corteza y hierro cero valente. Las mezclas se incubaron a  $30 \pm 2$  °C durante 47 días. Como indicación de la reducción de sulfato se determinó pH,  $H_2S$ ,  $SO_4^{2-}$ , potencial redox y alcalinidad. La cuantificación de los microorganismos totales se realizó por epifluorescencia usando DAPI y los MRS fueron cuantificados por NMP. Los resultados químicos y microbiológicos indicaron que las mezclas con mayor proporción de compost y con presencia de biosólidos y de hierro cero valente presentaron mayor actividad de los MRS. Los reactores con una sola fuente de materia orgánica mostraron los menores efectos en el tratamiento del drenaje ácido.

**Palabras clave:** drenaje ácido de minas, reducción de sulfato, mezclas orgánicas, alcalinidad.

## Abstract

Pérez, N., Schwarz, A., & Urrutia, H. (January-February, 2017). Treatment of acid mine drainage: Study of sulphate reduction in organic mixtures. *Water Technology and Sciences (in Spanish)*, 8(1), 53-64.

Permeable reactive barriers (PRB) are a system for the treatment of ground waters used in the decontamination of acid mine drainage. In this technology, the reactive material is placed as a barrier in the subsoil, and the sulphate, metals and acidity are removed by the metabolic activity of the Sulphate Reducing Microorganisms (SRM). The substrates of the PRB must be economical and provide organic material which favors microbial growth. In this research, biological batch reactors were used to evaluate SRM activity in 10 organic mixtures with different concentrations of: Bio solids obtained from a wastewater treatment plant, fish bone-tissue, and bark compost and zero-valent iron. The mixtures were incubated at  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  for 47 days. To indicate the sulphate reduction pH,  $H_2S$ ,  $SO_4^{2-}$ , redox potential and alkalinity were determined. The total numbers of microorganisms were determined by epifluorescence, and the numbers of SRM were determined by MPN. The chemical and microbiological results indicated that the mixtures with the greatest concentration of compost, and with presence of bio solids and zero-valent iron, presented higher SRM activity. Reactors with only a single source of organic material proved less effective in the treatment of acid mine drainage.

**Keywords:** Acid mine drainage, sulfate reduction, organic mixtures, alkalinity.

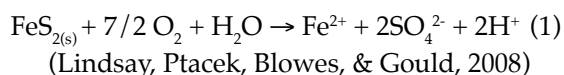
Recibido: 08/10/2015  
Aceptado: 20/09/2016

## Introducción

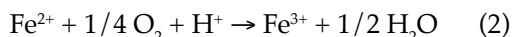
Los desechos de minas constituyen un peligro potencial para el medio ambiente, principalmente cuando los residuos contienen minerales que al oxidarse generan drenaje ácido de minas

(DAM). Entre los problemas de contaminación producidos por el DAM destaca la contaminación de cuerpos de agua con altas concentraciones de hierro (con la formación de  $Fe(OH)_{3(s)}$  que provoca coloración roja/naranja), alto contenido de sulfato (superior a los 2 500 mg/l (Benner,

Blowes, Gould, Herbert, & Ptacek, 1999) y bajo pH (pH 2.0 - 4.5). La pirita es el mineral más importante asociado con la generación de DAM, reportándose residuos de minas con contenidos superiores al 95% de este mineral (Nordstrom, Alpers, Ptacek, & Blowes, 2000). Existen varias reacciones involucradas en la generación de acidez. El proceso se inicia con la liberación de hierro a partir de la pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en estado sólido (s):



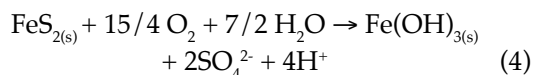
Posterior a esto, el  $\text{Fe}^{2+}$  es oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$ :



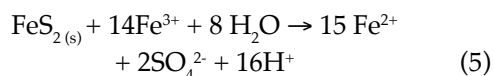
El hierro pierde solubilidad a pH superior a 3.5, por lo que precipita como oxihidróxido y libera  $\text{H}^+$ , como lo muestra la siguiente ecuación (Blowes, Ptacek, Jambor, & Weisener, 2003):



La reacción completa se resume a continuación (Akcil & Koldas, 2006):



Estas reacciones resultan en la producción de drenajes con pH bajo y altas concentraciones de sulfato y metales disueltos (Tsukamoto, Killion, & Miller, 2004). Si el pH alcanza valores bajos (pH: 2-4), el ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) se vuelve el principal oxidante (Simate & Ndlovu, 2014):



y la oxidación de hierro (ecuación (2)) puede acelerarse por actividad microbológica (Dold, 2010).

Para evitar el impacto del DAM en el ambiente, el agua contaminada debe tratarse antes de su descarga a aguas superficiales o de su ex-

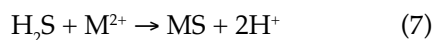
tracción para consumo. Las barreras permeables reactivas son un sistema pasivo de tratamiento para interceptar y remover contaminantes del agua subterránea. Cuando ésta fluye por un gradiente hidráulico natural a través del material reactivo poroso que conforma la barrera, los contaminantes orgánicos o inorgánicos son reducidos a compuestos no peligrosos, inmovilizados o convertidos a formas menos tóxicas; de esta forma el agua emerge tratada de la zona reactiva. El material reactivo consiste en sustratos orgánicos y hierro cero valente ( $\text{Fe}^0$ ) que promueven la reducción de sulfato realizada por microorganismos (del dominio *Bacteria* y del dominio *Archaea*) reductores de sulfato (US EPA, 1998; US EPA, 2005; Karri, Sierra-Alvarez, & Field, 2005; Martins et al., 2009).

La materia orgánica presente en las BPR permite el crecimiento de un consorcio microbiano que hidroliza y fermenta los compuestos orgánicos de cadenas largas como celulosas y hemicelulosas a ácidos orgánicos. Durante la degradación anaeróbica de la materia orgánica, el consorcio genera  $\text{CO}_2$ , ácidos grasos volátiles (acetato, propionato, butirato), ácidos grasos, lactato, piruvato, malato y alcoholes (Gibson 1990; Rabus, Hansen, & Widdel, 2006). Todos estos compuestos, junto con la elevada concentración de sulfato (procedente del DAM) proporcionan los sustratos requeridos para el crecimiento de los microorganismos reductores de sulfato (MRS) (Costa, Martins, Jesus, & Duarte, 2008). Los MRS usan como aceptor final de electrones el sulfato y oxidan los productos de fermentación, incluyendo compuestos orgánicos e hidrógeno (donadores de electrones), para producir  $\text{H}_2\text{S}$  y bicarbonato (Gibson, 1990):



La biorremediación de los metales disueltos en agua subterránea constituye una aplicación de los MRS. En el tratamiento del DAM remueven simultáneamente el sulfato y la acidez. Además, los metales catiónicos reaccionan con el  $\text{H}_2\text{S}$ , generando precipitados insolubles

(Neculita, Zagury, & Bussiere, 2007; Zagury, Kulnieks, & Neculita, 2006):



donde M es un metal catiónico como Cd, Fe, Ni, Cu o Zn.

No existe un consenso sobre cuál fuente de carbono produce mejores tasas de reducción ni sobre las proporciones adecuadas en que deben usarse los materiales cuando se realizan mezclas. La composición de la mezcla reactiva es fundamental para la eficiencia del proceso de reducción de sulfato.

Investigaciones realizadas determinaron que la mezcla más reactiva era aquella que contenía varias fuentes de carbono (Waybrant, Blowes, & Ptacek, 1998; Zagury et al., 2006) y hierro cero valente (Lindsay et al., 2008). La carencia de información ha llevado a indagar si existen sustratos alternativos que permitan obtener eficiencias similares. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de distintas mezclas orgánicas en la reducción de sulfato durante el tratamiento de un drenaje ácido de minas. Se trabajó con 10 mezclas que contenían distintas proporciones de tejido óseo de jurel, biosólidos y compost de corteza.

Las investigaciones existentes han incluido en las mezclas residuos vegetales propios de cada región, como alfalfa (Bécharde et al., 1994) y astillas de arce (Zagury et al., 2006). En esta oportunidad se evaluó el tejido óseo de jurel (*Trachurus* sp.), que contiene altas concentraciones

de ácidos grasos (no existe referencia para el contenido de ácidos grasos en el tejido óseo de esta especie) que varían con la edad y el sexo; se cree que el valor es superior al  $40 \pm 5\%$  asumido por Robinson y Pellegrino (1966) debido a la alta concentración de ácidos grasos en el tejido blando (28% EPA, ácido eicosapentaenoico; y DHA, ácido docosahexaenoico; Salas-Maldonado, Ayala-Galdós, & Albrecht-Ruiz, 2002). Además de proporcionar materia orgánica, el tejido óseo posee gran capacidad de adsorción de metales por su porosidad y reactividad (Wright & Conca, 2002). Se estudiaron también biosólidos de una planta de tratamiento de aguas residuales que han mostrado altos rendimientos en otros estudios (Prasad, Wai, Bérubé, & Henry, 1999; Waybrant et al., 1998), y el compost de corteza de pino (*Pinus radiata*).

## Métodos

### Ensayos en reactores de operación discontinua

En frascos de 500 y 1 000 ml se desarrollaron 10 cultivos anaeróbicos conformados por las mezclas en diferentes proporciones (cuadro 1), el inóculo bacteriano ( $10^4$  MRS/ml) obtenido de un lodo anaerobio de la planta local de tratamiento de aguas residuales (empresa de servicios sanitarios ESSBIO), y el drenaje ácido sintético. Los pesos de las mezclas adicionados fueron 100 y 200 g para los frascos de 500 y 1 000 ml, respectivamente. Se incubó a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  en condiciones anaeróbicas. Como control para

Cuadro 1. Composición de las mezclas (peso en g).

Material	Mezclas									
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Compost corteza gruesa	180	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Compost corteza media	0	180	0	0	0	0	0	0	0	0
Compost corteza fina	0	0	180	100	160	160	180	0	40	45
Lodo ESSBIO	20	20	20	0	40	20	0	0	10	10
Tejido óseo peces	0	0	0	0	0	0	0	100	40	45
Hierro cero valente	0	0	0	0	0	20	20	0	10	0

Tamaño de las partículas usadas para corteza fina: 6 mm; corteza media: 8 mm; corteza gruesa: 12 mm. Se trabajó con tejido óseo de jurel (*Trachurus* sp.)

observar el comportamiento del DAM (cambios en el pH, reacciones químicas que provocaran cambios en la concentración de sulfato y potencial redox) se monitoreó un reactor con el drenaje sin inóculo ni material reactivo.

La composición del drenaje ácido de mina sintético fue (en g/l): 5.8  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2.5  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.3  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 0.178  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 2.28  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.308  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 1.0  $\text{CaCO}_3$ ; 0.233  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.302  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; y pH: 5.8. (Waybrant et al., 1998).

### Toma de muestras

Se tomaron muestras de 5 ml semanales durante 47 días usando jeringas estériles de 5 ml y agitando vigorosamente los reactores antes de cada toma de muestras. Se determinó alcalinidad, sulfato, hidrógeno sulfurado, pH y potencial de óxido-reducción (ORP). Las muestras se filtraron (poro de 0.2  $\mu\text{m}$ ) para remover los sólidos interferentes antes de realizar los análisis químicos.

Las determinaciones de alcalinidad, pH, ORP y sulfato se realizaron inmediatamente después de la toma de muestras. El electrodo Thermo Scientific Orion 9180B se usó para determinar el ORP y el electrodo Thermo Scientific Orion 3, para determinar el pH. Los análisis se hicieron por duplicado. El sulfato se determinó por el método 4 500- $\text{SO}_4^{2-}$ -E (APHA, 2005) comercializado por HACH (Sulfaver 4). A su vez, el hidrógeno sulfurado ( $\text{H}_2\text{S}$ -HS) en muestras almacenadas a 4 °C con acetato de zinc 2M se determinó por el método colorimétrico "Methylene Blue" (4500- $\text{S}^{2-}$ -D; APHA, 2005) comercializado por HACH. La alcalinidad total se determinó por titulación con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.02N (Método 2320; APHA, 2005).

Durante los días 24 y 47 se efectuaron recuentos de bacterias reductoras de sulfato por número más probable (NMP) y recuento total bacteriano por epifluorescencia usando DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 1  $\mu\text{g}$ /ml).

Las tasas de reducción de sulfato se calcularon usando la regresión de mínimos cuadrados (Neculita & Zagury, 2008). Para NMP se

usó el medio de cultivo anaerobio Postgate C modificado (Benner, Gould, & Blowes, 2000) haciendo cinco diluciones y tres repeticiones; las diluciones se realizaron en solución salina (pH 7.0). Se efectuaron cálculos de crecimiento relativo haciendo una resta entre el Log10 de cada recuento y la cuantificación (Log10) obtenida para el inóculo.

Para realizar los recuentos de microorganismos con DAPI, se incubaron 500  $\mu\text{L}$  de la muestra durante 15 min con igual volumen de DAPI y luego se filtró (poro de 0.2  $\mu\text{m}$ ). Las células se observaron en el microscopio de epifluorescencia a 100X (Olympus BX51).

## Resultados y discusión

### Efecto de las mezclas en pH, alcalinidad y ORP

El aumento del pH, la disminución del potencial redox y la producción de alcalinidad fueron un indicativo de la actividad anaerobia microbiana (figura 1). En todas las mezclas el pH aumentó. En el reactor con sólo compost de corteza (R4) y en todos los que contenían tejido óseo (R8, R9 y R10), el incremento del pH no fue considerable (entre 1.1 y 1.6 unidades de pH, ver cuadro A1); en las mezclas restantes se detectaron aumentos superiores a dos unidades de pH, y el pH final fue neutro (R7, pH: 7.07) o alcalino (pH: 7.68-7.85). A partir del día 30, todas las mezclas estabilizaron su pH, tiempo que coincide con los resultados obtenidos por Zagury et al. (2008), y Gibert, De Pablo, Cortina y Ayora (2004). El aumento del pH estuvo relacionado con la producción de carbonatos que son generados en la actividad quimioorganótrofa de los grupos microbianos activos en los reactores. Los pH neutros-alcalinos obtenidos concuerdan con los resultados de Cocos, Zagury, Clement y Samson (2002), así como con Vasquez, Escobar, Neculita, Arbeli y Roldan (2016), quienes trabajaron con compost de hojas, compost de champiñones, estiércol de aves de corral y astillas de madera.

El pH del DAM disminuyó en el tiempo (pH inicial: 5.45), hasta alcanzar un pH = 4.40. Esto

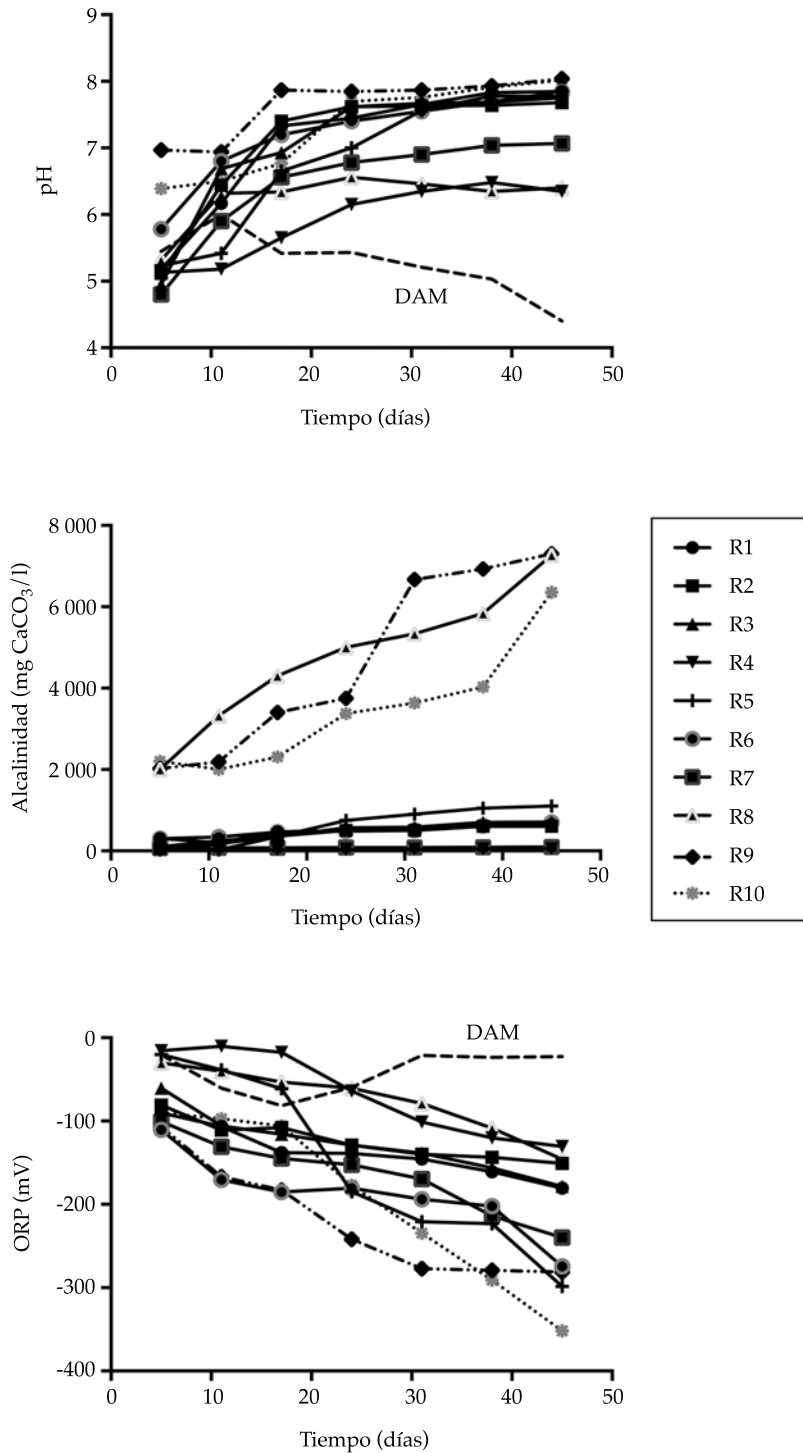


Figura 1. Variaciones del pH, alcalinidad (mg CaCO<sub>3</sub>/l) y potencial redox (mV) en las mezclas incubadas por 47 días a 30 °C. El DAM representa el comportamiento del drenaje ácido de mina en condiciones anaerobias y en reactores de operación discontinua sin inoculación (control negativo).



ocurrió por la oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$  agregado y la liberación de protones (Blowes *et al.*, 2003) durante la precipitación de  $\text{Fe}^{3+}$  como  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  (ecuación (3)).

La alcalinidad reportada para los reactores se generó por actividad metabólica y por propiedades de los sustratos orgánicos (p. ej., tejido óseo), ya que a diferencia de otras investigaciones no se incluyó fuente externa de alcalinidad, como el carbonato de calcio o caliza (Gibert *et al.*, 2004; Zagury *et al.*, 2006; Pereyra, Hiibel, Pruden, & Reardon, 2008; Pagnanelli, Cruz-Viggi, Mainelli, & Toro, 2009). La alcalinidad registrada se dividió en cuatro grupos. Las mezclas 4 y 7 presentaron valores menores a 100 mg  $\text{CaCO}_3/\text{l}$  (58 y 95 mg  $\text{CaCO}_3/\text{l}$ , respectivamente). En este caso los valores fueron menores a los 187 mg  $\text{CaCO}_3/\text{l}$  reportados por Cocos *et al.* (2002), quienes trabajaron con residuos celulósicos (compost de hojas y astillas de madera) y estiércol de aves de corral. Las mezclas 1, 2, 3 y 6 presentaron alcalinidades finales entre 600 y 719 mg  $\text{CaCO}_3/\text{l}$  y la mezcla 7 acumuló una alcalinidad de 1 000 mg  $\text{CaCO}_3/\text{l}$ . Estos resultados son menores a los reportados por Zagury *et al.* (2006), quienes al día 33 de sus experimentos obtuvieron alcalinidades entre 1 300 mg y 24 000 mg  $\text{CaCO}_3/\text{l}$ , pero son cercanos o superiores a los reportados por Neculita y Zagury (2008), quienes después de 75 días de incubación obtuvieron valores máximos de 1 200 mg  $\text{CaCO}_3/\text{l}$ . Los reactores con tejido óseo de pescado (8, 9 y 10) presentaron las alcalinidades más altas al inicio (2 000 mg  $\text{CaCO}_3/\text{l}$ ) y final de los ensayos (de 6 300 a 7 300 mg  $\text{CaCO}_3/\text{l}$ ). La rápida producción de alcalinidad se debe a la gran disponibilidad de materia orgánica de cadena corta (principalmente ácidos grasos) presentes en el tejido óseo (Conca & Wright, 2006), que son sustratos fácilmente disponibles para las bacterias anaerobias, y a la disolución de la apatita ( $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$  contenida en el tejido óseo (Nzihou & Sharrock, 2010). En contraste con los resultados de alcalinidad, R8 alcanzó un pH menor a R9 y R10, lo cual podría deberse a la diferente naturaleza de la alcalinidad generada ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HS}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), pues R9 y R10 estuvieron

entre las mezclas con mayor actividad biológica de todas las evaluadas, al contrario de R8. En todo caso, los valores de pH finales obtenidos para las mezclas con tejido óseo son similares a los resultados de experimentos realizados por Oliva, Cama, Cortina, Ayora y De Pablo (2012).

El potencial redox en todas las mezclas disminuyó en el tiempo, lo que es un indicativo de la actividad anaerobia. Los reactores 4 y 8 presentaron los mayores potenciales (-130 y -146 mV, respectivamente), alcanzando valores subóptimos para la reducción de sulfato; para este proceso metabólico se han reportado como valores óptimos potenciales menores a -150 mV (Gibson, 1990). Las mezclas 1, 2 y 3 presentaron potenciales entre los -150 y -180 mV, y los reactores 5, 6, 7 y 9 presentaron potenciales entre los -240 y -298 mV. Estos rangos coinciden con los valores reportados por Neculita y Zagury (2008). Potenciales menores a -300 mV favorecen la metanogénesis (Mota *et al.*, 2009). El reactor 10 presentó el potencial mínimo (-352 mV). En esta mezcla también se detectaron los valores más altos de sulfuros (42.3 mg/l), por lo que la producción de este agente reductor influyó en la generación del bajo potencial redox.

#### Consumo de $\text{SO}_4^{2-}$ y producción de $\text{H}_2\text{S}$

Los resultados de consumo de sulfato se observan en la figura 2. Los reactores con un solo sustrato orgánico R4 y R8 presentaron el menor consumo de sulfato en el tiempo (sulfato remanente de 1 470 y 1 275 mg/l, respectivamente). La efectividad de las mezclas con diferentes fuentes de carbono fue evidente por los altos consumos de sulfato que presentaron R1 y R2 (valores finales entre 115 y 272 mg/l), y a su vez en R3, R5, R6, R9 y R10 con concentraciones finales entre 3 y < 1 mg/l. A partir del día 31 se registraron concentraciones de sulfato menores a 100 mg/l en R5, R9 y R10; este tiempo de consumo es similar al obtenido por Lindsay *et al.* (2008), y Cocos *et al.* (2002). En general, las mezclas proporcionaron materia orgánica para el crecimiento de un consorcio microbiano anaeróbico y los MRS se desarrollaron según las

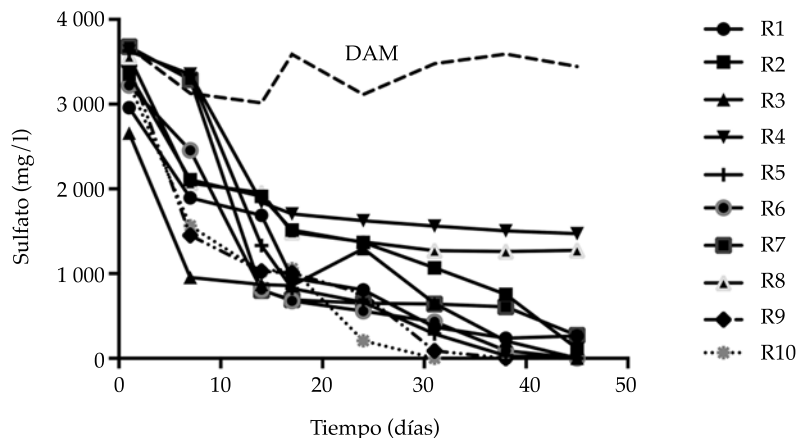


Figura 2. Consumo de sulfato en las mezclas (R1 a R10) en función del tiempo, durante 47 días a 30 °C. El DAM representa el comportamiento del drenaje ácido de mina en condiciones anaerobias y en reactores de operación discontinua sin inoculación (control negativo).

condiciones de disponibilidad de sustratos. El compost contiene materia orgánica parcialmente degradada, el tejido óseo proporciona ácidos grasos potencialmente disponibles para este grupo metabólico (Conca & Wright, 2006), y los biosólidos son fuente de nitrógeno y fósforo indispensables para el desarrollo de las bacterias.

En cuanto a la acumulación de sulfuro en los reactores (figura 3) fue baja e incluso en la mezcla 9 no fue detectada; debido a la baja

solubilidad del FeS, ZnS y NiS, una mayor acumulación de sulfuro ocurre sólo una vez que se agotan los metales (Waybrant *et al.*, 1998). Los reactores mostraron acumulaciones entre 0.2 y 29.52 mg/l. Las mezclas 5 y 10 presentaron los valores más altos durante el día 38 (11.26 y 29.52 mg/l). Las concentraciones de sulfuro obtenidas para R5, R6 y R10 fueron mayores a lo reportado por Lyndsay *et al.* (2008), quienes obtuvieron 0.2 mg/l.

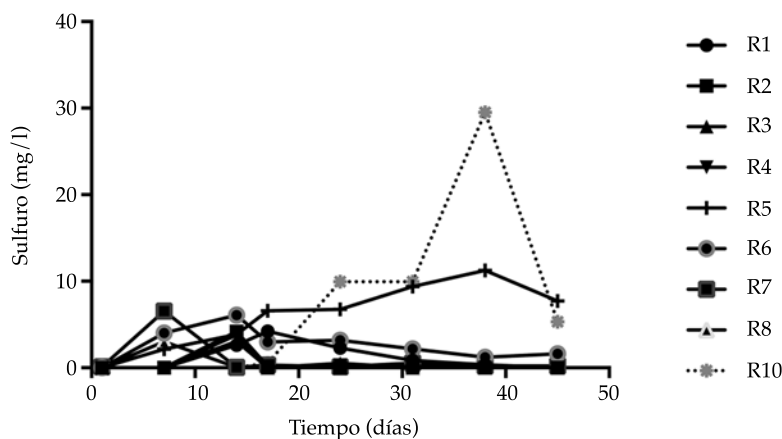


Figura 3. Concentración de sulfuro en las mezclas (R1 a R10) en función del tiempo. El DAM representa el comportamiento del drenaje ácido de mina en condiciones anaerobias y en reactores de operación discontinua sin inoculación (control negativo).



### Análisis microbiológicos

Las bacterias cuantificadas en todos los reactores (figura 4) durante el día 47 se encontraban en fase estacionaria; el número varió entre  $1.6 \times 10^8$  células/ml y  $8.95 \times 10^9$  células/ml. R4 presentó los recuentos más bajos ( $4.47 \times 10^8$  células/ml al final de los experimentos) en los días 24 y 47, mientras que las mezclas R2, R5 y R8 tuvieron las poblaciones más altas ( $9.77 \times 10^9$ ,  $8.95 \times 10^9$  y  $8.17 \times 10^9$  células/ml, respectivamente) el día 47. En los sistemas de BPR es importante que exista un consorcio bacteriano principalmente acidófilo (Johnson & Hallberg, 2003) que proporcione los sustratos que permitan la actividad de los MRS. El recuento de bacterias totales no permitió conocer con detalle las sucesiones que existieron en los reactores en el tiempo; sin embargo, para el día 24, los recuentos por epifluorescencia superiores a los del NMP indican que las reductoras de sulfato coexistían con otros grupos bacterianos y para el día 47 en todos los reactores se mostró la predominancia de los MRS, principalmente en las mezclas 5, 6 y 10.

Se registró el aumento de los reductores de sulfato en el tiempo (figura 5) en todos los reactores, excepto en R8, en el cual al día 24 los MRS disminuyeron en 1.6 unidades logarítmicas (de  $5.87 \times 10^4$  NMP de MRS/ml el día de inoculación a  $1.47 \times 10^3$  NMP de MRS/ml el día 24). Este reactor presentó un número alto de bacterias, microorganismos con metabolismo distinto a los MRS, según lo indican los recuentos realizados por DAPI. Considerando que los ácidos grasos del tejido óseo son un sustrato importante para las bacterias fermentadoras, se asume que el alto número registrado corresponde a este grupo metabólico. La poca cantidad de MRS concuerda con el bajo consumo de sulfato. Los ácidos grasos y el alto contenido de apatita del tejido óseo promueven el crecimiento de otros grupos bacterianos como *Enterococcus* (Conca & Wright, 2006).

Al término de los experimentos (47 días), las mezclas R4, R8 y R9 presentaron los menores recuentos de MRS ( $2.41 \times 10^7$  NMP de MRS/ml;  $4.0 \times 10^6$  NMP de MRS/ml y  $2.8 \times 10^8$  NMP de MRS/ml), y los reactores R5, R6 y R10 tuvieron las mayores poblaciones de MRS con  $1.51 \times 10^9$

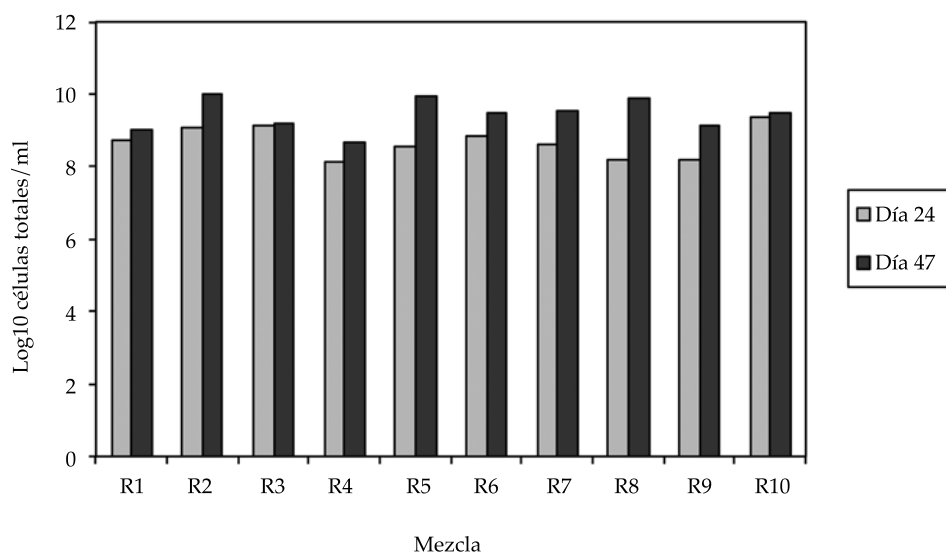


Figura 4. Cuantificación del total de bacterias por epifluorescencia (DAPI) presentes en las mezclas (R1 a R10) durante 47 días. Las columnas representan los recuentos a los 24 y 47 días.

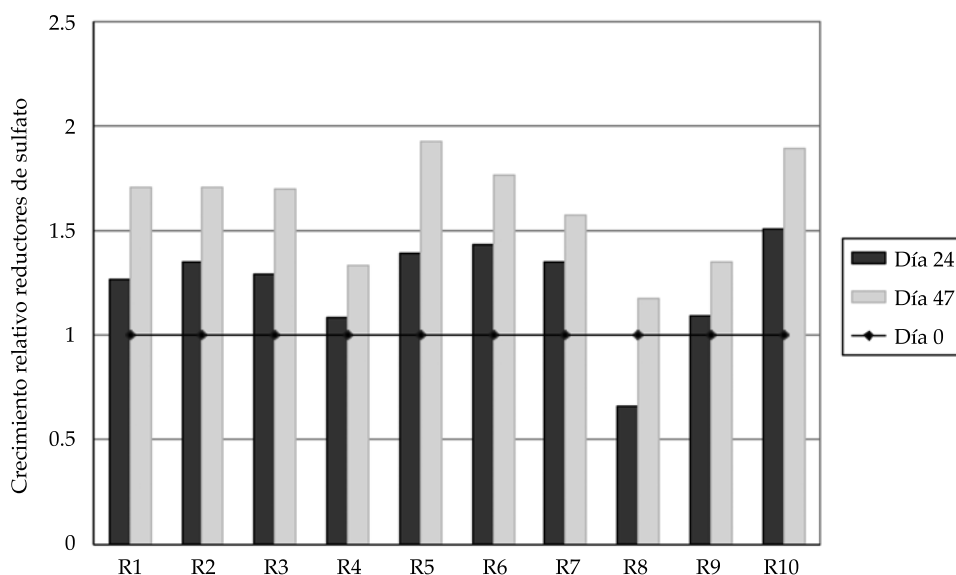


Figura 5. Crecimiento relativo (respecto al inóculo) de microorganismos reductores de sulfato en las mezclas (R1 a R10) durante 47 días. La línea horizontal representa el número de bacterias presentes en el inóculo y las columnas los recuentos a los 24 y 47 días. Los cálculos del crecimiento relativo se obtuvieron a partir de la resta entre el Log10 de cada recuento y la cuantificación (Log10) obtenida para el inóculo.

NMP de MRS/ml;  $2.12 \times 10^9$  NMP de MRS/ml y  $5.32 \times 10^9$  NMP de MRS/ml. Los componentes de estas mezclas son materiales finos. El hierro cero valente es benéfico a largo plazo para la actividad biológica debido a que por corrosión se genera  $H_{2(g)}$  que puede ser usado como donador de electrones por los MRS (Lindsay *et al.*, 2008). Los sustratos finos pueden utilizarse en nuevos diseños de reactores como los sistemas de intercambio difusivo que proveen vías de transporte del DAM a través del reactor y en los cuales las zonas biológicamente activas están protegidas de la toxicidad de los metales por gradientes químicos (Schwarz & Rittmann, 2010; Pérez, Diaz, Barahona, Schwarz, & Urrutia, 2011; Perez, Schwarz, Sanhueza, & Chaparro, 2016).

Los recuentos por epifluorescencia de R5, R6 y R10 fueron superiores a los reportados por Johnson y Hallberg (2005), que trabajaron con compost de hojas y reportaron  $1 \times 10^6$  células/ml. Además, fueron superiores a los reportados por Lindsay *et al.* (2008), y Neculita y Zagury (2008). Los altos recuentos de bacterias y en

particular de MRS indican que el inóculo usado es recomendable para el tratamiento del drenaje ácido de minas y resistente a las condiciones tóxicas que se presentan en estos ambientes.

#### Eficiencia en el consumo de sulfato

Se realizó el cálculo de consumo de sulfato celular usando las tasas de reducción de sulfato y el NMP de MRS (cuadro 2) durante la fase exponencial (día 24).

Los cálculos de eficiencia son los que permiten elegir las mezclas que proporcionan mayor concentración de donadores de electrones para el crecimiento y la actividad celular. Para ello, se consideró la fase exponencial, pues en ésta las bacterias presentan mayor actividad metabólica y el consumo de sulfato depende de la afinidad a los donadores que proporciona cada mezcla (Liamleam & Annachhatre, 2007). Las mezclas R5 y R6 presentaron los mayores consumos de sulfato por célula ( $3.32 \times 10^{-5}$  mg/ $1 \cdot d \cdot$ NMP de MRS y  $2.82 \times 10^{-5}$  mg/ $1 \cdot d \cdot$ NMP de MRS); tales

Cuadro 2. Eficiencia en el consumo de sulfato (mg/l•día•NMP de MRS) para todas las mezclas.

Mezcla	Consumo sulfato mg/l•día•NMP de MRS
R1	$8.1 \times 10^{-7}$
R2	$8.87 \times 10^{-7}$
R3	$3.51 \times 10^{-6}$
R4	$6.76 \times 10^{-6}$
R5	$3.32 \times 10^{-5}$
R6	$2.82 \times 10^{-5}$
R7	$5.81 \times 10^{-7}$
R8	$2.08 \times 10^{-6}$
R9	$7.33 \times 10^{-6}$
R10	$3.15 \times 10^{-7}$

valores son mucho más bajos a los  $7.04 \times 10^{-3}$  mg/l•día•NMP de MRS obtenido por Cocos *et al.* (2002). Se obtuvo baja eficiencia en las mezclas con sustratos lignocelulósicos (compost de corteza) y ácidos grasos (tejido óseo de jurel). La lignina no es degradada anaeróbicamente por bacterias y los ácidos grasos promueven el crecimiento de grupos bacterianos distintos a MRS, por ello es necesario explorar el rendimiento del inóculo con fuentes de carbono con mayor concentración de celulosa.

## Conclusiones

Considerando los resultados químicos y microbiológicos, las mezclas que presentaron mayor eficiencia en el consumo de sulfato fueron R5 (compost de corteza fina y lodo de ESSBIO) y R6 (compost de corteza fina, lodo de ESSBIO, y hierro cero valente). Es importante estudiar el comportamiento a largo plazo de las mezclas en los reactores R5 y R6 para que sean consideradas como componentes del material reactivo en una BPR a gran escala. Incorporar sustratos finos en los reactores permitirá desarrollar nuevas tecnologías de tratamiento.

R10 presentó altos recuentos de bacterias, pero baja eficiencia en el consumo de sulfato. Esta mezcla, en conjunto con R8 y R9, mostró elevada generación de alcalinidad ( $> 3\ 600$  mg  $\text{CaCO}_3/\text{l}$ ). El tejido óseo no fue un buen sustrato para la actividad de los MRS; el elevado

contenido de ácidos grasos promueve el desarrollo de grupos bacterianos que generan fuentes de carbono diferentes a las requeridas por los reductores de sulfato presentes en el inóculo. Es necesario analizar el inóculo para conocer sus características metabólicas.

El compost de corteza como principal componente de las mezclas mostró ser un buen sustrato para el desarrollo de los microorganismos encargados del tratamiento del DAM, los resultados microbiológicos y químicos así lo confirman.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado con la beca de doctorado Conicyt (63100133) y por los proyectos FONDAP/CRHIAM/15130015, y FONDECYT 1140451.

## Referencias

- Akcil, A., & Koldas, S. (2006). Acid mine drainage (AMD): Causes, treatment and case studies. *Journal of Cleaner Production*, 14(12), 1139-1145.
- APHA (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (20th ed.). Washington, DC: American Public Health Association.
- Benner, S., Blowes, D., Gould, W., Herbert, R., & Ptacek, C. (1999). Geochemistry of a permeable reactive barrier for metals and acid mine drainage. *Environ. Sci. Technol.*, 33(16), 2793-2799.
- Benner, S., Gould, W., & Blowes, D. (2000). Microbial populations associated with the generation and treatment of acid mine drainage. *Chemical Geology*, 169(3), 435-448.

- Blowes, D. W., Ptacek, C. J., Jambor, J. L., & Weisener, C. J. (2003). The geochemistry of acid mine drainage (pp. 149-204). En: *Treatise on Geochemistry*. Holland, H. D., & Karl, K. (eds.). Elsevier. Amsterdam.
- 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 Research*, 36(1), 167-177.
- Conca, J., & Wright, J. (2006). An Apatite II permeable reactive barrier to remediate groundwater containing Zn, Pb and Cd. *Applied Geochemistry*, 21(8), 2188-2200.
- Costa, M., Martins, M., Jesus, C., & Duarte, J. (2008). Treatment of acid mine drainage by sulphate-reducing bacteria using low cost matrices. *Water Air Soil Pollut.*, 189(1-4), 149-162.
- Dold, B. (2010). Basic concepts in environmental geochemistry of sulfidic mine-waste management, *Waste Manag.*, 24, 173-198.
- Gibert, O., De Pablo, J., Cortina, J., & Ayora, C. (2004). Chemical characterization of natural organic substrates for biological mitigation of acid mine drainage. *Water Research*, 38(19), 4186-4196.
- Gibson, G. (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(6), 769-797.
- Johnson, D., & Hallberg, K. (2003). The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology*, 154(7), 466-473.
- Johnson, D., & Hallberg, K. (2005). Biogeochemistry of the compost bioreactor components of a composite acid mine drainage passive remediation system. *Science of the Total Environment*, 338(1), 81-93.
- Karri, S., Sierra-Alvarez, R., & Field, J. (2005). Zero valent iron as an electron-donor for methanogenesis and sulfate reduction in anaerobic sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(7), 811-819.
- Liamleam, W., & Annachhatre, A. P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances*, 25(5), 452-463.
- Lindsay, M., Ptacek, C., Blowes, D., & Gould, W. (2008). Zero-valent iron and organic carbon mixtures for remediation of acid mine drainage: Batch experiments. *Applied Geochemistry*, 23(8), 2214-2225.
- Martins, M., Faleiro, M., Barros, R., Veríssimo, A., Barreiros, M., & Costa, M. (2009). Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2-3), 706-713.
- Neculita, C., Zagury, G., & Bussiere, B. (2007). Passive treatment of acid mine drainage using sulfate-reducing bacteria: Critical review and research needs. *Journal of Environmental Quality*, 36(1), 1-16.
- Neculita, C., & Zagury, G. (2008). Biological treatment of highly contaminated acid mine drainage in batch reactors: Log-term treatment and reactive mixture characterization. *Journal of Hazardous Materials*, 157(2), 358-366.
- Nzihou, A., & Sharrock, P. (2010). Role of phosphate in the remediation and reuse of heavy metal polluted wastes and sites. *Waste and Biomass Valorization*, 1(1), 163-174.
- Nordstrom, D., Alpers, C., Ptacek, C., & Blowes, D. (2000). Negative pH and extremely acid mine waters from Iron Mountain, California. *Environ. Sci. Technol.*, 34(2), 254-258.
- Oliva, J., Cama, J., Cortina, J. L., Ayora, C., & De Pablo, J. (2012). Biogenic hydroxyapatite (Apatite II™) dissolution kinetics and metal removal from acid mine drainage. *Journal of Hazardous Materials*, 213, 7-18.
- Pagnanelli, F., Cruz-Viggi, C., Mainelli, S., & Toro, L. (2009). Assessment of solid reactive mixtures for the development of biological permeable reactive barriers. *Journal of Hazardous Materials*, 170(2), 998-1005.
- Prasad, D., Wai, M., Bérubé, P., & Henry, J. (1999). Evaluating substrates in the biological treatment of acid mine drainage. *Environmental Technology*, 20(5), 449-458.
- Pereyra, L. P., Hiiibel, S. R., Pruden, A., & Reardon, K. F. (2008). Comparison of microbial community composition and activity in sulfate reducing batch systems remediating mine drainage. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(4), 702-713.
- Pérez, N., Diaz, I. C., Barahona, E., Schwarz, A. O., & Urrutia, H. (2011). Effect of reactive material distribution in the biological treatment of acid mine drainage. 2nd International Seminar on Environmental Issues in the Mining Industry, Enviromine2011, Chile.
- Pérez, N., Schwarz, A., Sanhueza, P., & Chaparro, G. (2016). Performance of three bench-scale diffusive exchange systems during treatment of acid mine drainage with high copper concentration. *Desalination and Water Treatment*. Artículo aceptado.
- Rabus, R., Hansen, T., & Widdel, F. (2006). Dissimilatory sulfate - and sulfur-reducing prokaryotes (pp. 659-768). En: *The Prokaryotes*. Vol 2. Chapter 1.22. SPRINGER, New York.
- Robinson, M. B., & Pellegrino, E. (1966). The chemical anatomy of bone: I. A comparative study of bone composition in sixteen vertebrates. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 51(2), 456-466.
- Salas-Maldonado, A., Ayala-Galdós, M. E., & Albrecht-Ruiz, M. (2002). Contenido de EPA y DHA en aceite crudo de pescado producido en Perú durante el periodo 1996-2000. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 3(5), 283-287.
- Schwarz, A. O., & Rittmann, B. E. (2010). The diffusion-active permeable reactive barrier. *Journal of Contaminant Hydrology*, 112(1), 155-162.
- Simate, G., & Ndlovu, S. (2014). Acid mine drainage: Challenges and opportunities. *J. Environ. Chem. Eng.*, 2(3), 1785-1803.
- Tsukamoto, T., Killion, H., & Miller, G. (2004). Column experiments for microbiological treatment of acid

- mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. *Water Research*, 38(6), 1405-1418.
- US EPA (1998). *Permeable Reactive Barrier Technologies for Contaminant Remediation* (102 pp.). EPA/600/R-98/125. Washington DC.
- US EPA (2005). *Management and treatment of water from hard-rock mines. draft engineering issue*. Washington DC.
- Vasquez, Y., Escobar, M. C., Neculita, C. M., Arbeli, Z., & Roldan, F. (2016). Selection of reactive mixture for biochemical passive treatment of acid mine drainage. *Environmental Earth Sciences*, 75(7), 1-11.
- Waybrant, K., Blowes, D., & Ptacek, C. (1998). Selection of reactive mixtures for use in permeable reactive walls for treatment of mine drainage. *Environ. Sci. Technol.*, 32(13), 1972-1979.
- Wright, J., & Conca, J. (2002). *Remediation of groundwater contaminated with Zn, Pb and Cd using a permeable reactive barrier with Apatite II*. RTDF PRB Action Meeting November 6-7. . Washington DC.
- Zagury, G., Kulnieks, V. & Neculita, C. (2006). Characterization and reactivity assessment of organic substrates for sulphate-reducing bacteria in acid mine drainage treatment. *Chemosphere*, 64(6), 944-955.

## Dirección institucional de los autores

Dra. Norma Raquel Pérez  
Dr. Alex Otto Schwarz

Universidad de Concepción  
Centro de Recursos Hídricos para la Agricultura y Minería (CRHIAM)  
Laboratorio de Hidráulica y Ambiental  
Barrio Universitario s/n, Concepción, CHILE  
Teléfono: +56 (41) 2203 258  
normaperez@udec.cl  
alexschwarz@udec.cl

Dr. Homero Urrutia

Universidad de Concepción  
Centro de Biotecnología  
Laboratorio de Biopelículas y Microbiología Ambiental  
Barrio Universitario s/n, Concepción, CHILE  
Teléfono: +56 (41) 2207 174  
hurrutia@udec.cl