



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE**  
**MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**“Eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de  
fierro en drenaje ácido por consorcios bacterianos sulfato  
reductores tolerantes a la acidez, 2014”**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA**  
**MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

Br. Tammy Stephany Cabrera Villalta

Br. Salvador Tomás Orrego Zapo

**LAMBAYEQUE- PERÚ**

**2014**

**“Eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de  
fierro en drenaje ácido por consorcios bacterianos sulfato  
reductores tolerantes a la acidez, 2014”**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**APROBADO POR:**

Dr. César Estela Campos

**PRESIDENTE**

---

Dr. César García Espinoza

**SECRETARIO**

---

Lic. Julio César Silva Estela

**VOCAL**

---

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

**PATROCINADORA**

---

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2014**

## DEDICATORIA

A mis padres, María Elena y Neptalí, quienes brindaron todos los medios para la realización de este y todos los proyectos que he emprendido. Por su incansable apoyo y amor, por ser mi motivación máxima y ejemplo de constancia.

A mi hermano, Tommy Aldo, por su compañía y motivación.

A mis amados abuelos, que desde pequeña impulsaron en mí el deseo de superación y desarrollo.

*Tammy Stephany*

Para mis padres con mucho amor, Víctor Manuel Orrego Rivadeneira y María Vitoria Zapo Saldaña que con su gran esfuerzo día a día, han logrado que de mi primer triunfo en esta vida saliendo victorioso y demostrando lo orgulloso que me siento de ser su hijo.

A mi hermana Julissa del Carmen Orrego Zapo que es un ejemplo de profesional trabajo y superación a mí a mi sobrina y ahijada Cielo Marisol Castillo Orrego a quien también quiero mucho.

También a toda mi familia, tíos, primos y en general quienes han influido e inspirado a que me supere todos los días de mi vida a seguir luchando.

*Salvador Tomás*

## AGRADECIMIENTO

A mi Jesús, mi fortaleza, quien me bendice con mi familia, mis amigos y todas esas buenas personas que llegan a mi vida en momentos precisos, convirtiéndose en apoyo y refuerzo para el logro de este proyecto profesional y la realización de diversas metas personales.

A la Cruzada – Milicia de Santa María que son sus oraciones y entrega constante permitieron el éxito del propósito planteado, afianzando mi confianza y convenciéndome que la Inmaculada nunca falla.

*Tammy Stephany*

En primer lugar a Dios por haberme regalado la vida y darme salud, por la oportunidad de desarrollarme en un hogar sólido y con mucho amor.

A la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, por la oportunidad de estudiar mi hermosa carrera y desarrollarme como profesional, a mis amigos y compañeros de clases por todas las experiencias vividas, amanecidas, viajes, fiestas, exposiciones, etc.

*Salvador Tomás*

A la Dr. Carmen Rosa Carreño Farfán por confiar en nuestro proyecto, su tiempo y apoyo incesante, por ser más que nuestra patrocinadora, dándonos los consejos claves y correcciones necesarias para formar en nosotros profesiones íntegros.

A la Miera Colquirrumi S.A. por abrirnos sus puertas y enseñarnos que no existe límites en nuestra carrera.

*Los autores*

## Índice

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	3
	2.1 Antecedentes de la investigación.....	3
	2.2 Drenaje ácido.....	6
	2.3 Bacterias sulfato reductoras.....	7
	2.4 Tratamientos pasivos para drenajes ácidos.....	8
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
	3.1 Materiales.....	10
	3.1.1 Población y muestra.....	10
	3.2 Métodos.....	10
	3.2.1 Variables en estudio.....	10
	3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	10
	3.2.3 Caracterización del efluente de pasivo minero.....	11
	3.2.4 Obtención de consorcios de bacterias sulfato reductoras.....	11
	3.2.5 Selección de consorcios bacterianos tolerantes a la acidez.....	24
	3.2.6 Eficiencia de la producción de H <sub>2</sub> S para la precipitación de fierro en drenaje ácido.....	29
	3.2.7 Análisis estadístico de los datos.....	32
IV.	RESULTADOS.....	33
	4.1 Características del efluente mezclado con drenaje ácido del pasivo minero Hualgayoc, en Cajamarca.....	33
	4.2 Consorcios de bacterias sulfato reductoras obtenidos de del lodo residual.....	33
	4.3 Consorcios de bacterias sulfato reductoras tolerantes a la acidez.....	45

4.4	Eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de fierro en drenaje ácido de mina.....	45
V.	DISCUSIÓN.....	51
VI.	CONCLUSIONES.....	57
VII.	RECOMENDACIONES.....	58
VIII.	RESUMEN.....	59
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
X.	ANEXOS.....	64

## Índice de tablas

Tabla 1.	Características químicas de muestras de efluentes del pasivo minero tipo Bocamina de Hualgayoc en Cajamarca.....	34
Tabla 2.	Tiempo (días) requerido para observar el ennegrecimiento del acetato de plomo en el sistema de biorreactores anaerobios con bacterias sulfato reductoras.....	49
Tabla 3.	Análisis de varianza del tiempo requerido para el ennegrecimiento en la selección de bacterias sulfato reductoras.....	50
Tabla 4.	Eficiencia de la remoción de $\text{Fe}^{3+}$ en drenaje ácido sintético por consorcio bacteriano sulfato reductor tolerante a la acidez.....	52

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Ubicación geográfica de la zona de muestreo correspondiente al distrito de Hualgayoc, provincia de Hualgayoc, en Cajamarca, 2014.....	12
<b>Figura 2.</b>	Puntos de muestreo de drenaje ácido de mina, antes y después del efluente bocamina Mansita 7.....	12
<b>Figura 3.</b>	Ubicación del lugar de muestreo en el distrito de San José, provincia Chiclayo, región Lambayeque, 2014.....	13
<b>Figura 4.</b>	Ubicación de la Laguna de Estabilización de San José en la provincia de Chiclayo, región Lambayeque.....	15
<b>Figura 5.</b>	Vista aérea de las lagunas anaerobias de estabilización en el distrito de San José, provincia de Chiclayo, región Lambayeque.....	15
<b>Figura 6.</b>	Extracción de muestra de lodo residual en laguna anaerobia.....	16
<b>Figura 7.</b>	Muestras de lodo residual de planta de tratamiento de aguas residuales.....	16
<b>Figura 8.</b>	Mezcla de sobrenadante de lodo residual sedimentado y sulfato de sodio.....	18
<b>Figura 9.</b>	Mezcla de papel higiénico con yema de huevo.....	18
<b>Figura 10.</b>	Incorporación de sales de calcio a mezcla de lodo residual.....	19
<b>Figura 11.</b>	Preparación de lodo residual enriquecido.....	19
<b>Figura 12.</b>	Lodo enriquecido.....	20
<b>Figura 13.</b>	Higienizado de probeta con hipoclorito de sodio.....	20
<b>Figura 14.</b>	Adición de lodo enriquecido durante el armado de columna de Winogradsky.....	21



<b>Figura 15.</b>	Columna de Winogradsky con lodo enriquecido y lodo no enriquecido.....	21
<b>Figura 16.</b>	Llenando hasta 5cm antes del extremo superior de la probeta...	22
<b>Figura 17.</b>	Película de aceite comestible en extremo superior de probeta...	22
<b>Figura 18.</b>	Sellado de la columna de Winogradsky con papel aluminio.....	23
<b>Figura 19.</b>	Incubación de Columna de Winogradsky a temperatura ambiente.....	23
<b>Figura 20.</b>	Obtención de alícuota de la zona sulfato reductora en la columna de Winogradsky.....	25
<b>Figura 21.</b>	MedioPostgate C modificado inoculado con alícuotas de zona sulfato reductora de columnas de Winogradsky.....	25
<b>Figura 22.</b>	MedioPostgate C modificado; 30 días después de la inoculaciónde alícuotas de zona sulfato reductoras.....	26
<b>Figura 23.</b>	Tratamiento para seleccionar consorcios de bacterias sulfato reductoras tolerantes a la acidez.....	26
<b>Figura 24.</b>	Diseño de biorreactor tipo tanque con sistema discontinuo, anaerobio.....	27
<b>Figura 25.</b>	Biorreactor tipo tanque con sistema discontinuo anaerobio.....	27
<b>Figura 26.</b>	Geometría y proporciones de biorreactor tipo tanque anaerobio.	28
<b>Figura 27.</b>	Biorreactor anaerobio con medio Postgate C modificado incubado con consorcio de bacterias sulfato reductoras.....	30
<b>Figura 28.</b>	Proceso fermentativo para la selección de consorcios de bacterias sulfato reductoras tolerantes a la acidez.....	30
<b>Figura 29.</b>	Proceso fermentativo para determinar la eficiencia de la producción de H <sub>2</sub> S para la precipitación de fierro en drenaje ácido sintético.....	31
<b>Figura 30.</b>	Zonas diferenciadas en la columna de Winogradsky.....	35
<b>Figura 31.</b>	Pigmentación rojiza entre la zona microaerófila y aerobia de la columna.....	37

<b>Figura 32.</b>	Pigmentación rojiza observada en la zona microaerófila de la columna.....	37
<b>Figura 33.</b>	Pigmentación anaranjada entre la zona microaerófila y aerobia de la columna.....	38
<b>Figura 34.</b>	Manchas blancas en la parte superior de la zona anaerobia de la columna.....	38
<b>Figura 35.</b>	Ennegrecimiento de las manchas blancas en la zona anaerobia de la columna.....	39
<b>Figura 36.</b>	Ennegrecimiento de la zona anaerobia de la columna.....	39
<b>Figura 37.</b>	Estrato verde y púrpura en la zona microaerófila de la columna	40
<b>Figura 38.</b>	Coloración verdosa en la zona aerobia de la columna .....	40
<b>Figura 39.</b>	Estrato verde en la zona aerobia inferior de la columna .....	41
<b>Figura 40.</b>	Turbidez en la zona aerobia de la columna .....	41
<b>Figura 41.</b>	Ausencia de estrato verde en la zona microaerófila.....	42
<b>Figura 42.</b>	Ausencia de coloración en la zona microaerófila.....	42
<b>Figura 43.</b>	Pigmentación púrpura en la zona microaerófila y aerobia.....	43
<b>Figura 44.</b>	Frecuencia de muestras de lodo residual positivas para la obtención de consorcios de bacterias sulfato reductoras, 2014..	43
<b>Figura 45.</b>	Ennegrecimiento observado durante el cultivo de consorcios de bacterias sulfato reductoras.....	44
<b>Figura 46.</b>	Sulfuro de plomo de color negro platinado sobre papel filtro que evidenció la presencia de bacterias sulfato reductoras.....	44
<b>Figura 47.</b>	Consortios de bacterias sulfato reductoras según coloración oscura del papel filtro humedecido con acetato de plomo.....	46
<b>Figura 48.</b>	Coloración negro platinado en el papel filtro humedecido con acetato de plomo.....	46
<b>Figura 49.</b>	Ennegrecimiento en extremo inferior de la manguera y superficie del acetato del plomo.....	47

<b>Figura 50.</b>	Ennegrecimiento sobre el papel higiénico del biorreactor.....	47
<b>Figura 51.</b>	Ausencia de coloración en biorreactor testigo.....	48
<b>Figura 52.</b>	Observación de desaparición del color anaranjado inicial.....	49

## I. INTRODUCCIÓN

Las actividades mineras y metalúrgicas generan los llamados “drenajes ácidos de minas”, caracterizados por un pH ácido (2-4), grandes concentraciones de metales pesados y sulfatos. Estos efluentes tienen efecto devastador en los sistemas acuáticos y terrestres, siempre asociado a una coloración ocre-amarillenta de los lechos de los ríos afectados y un incremento de la turbiedad de las aguas (López *et al.*, 2002). Asimismo, finalizada la actividad extractiva, las minas en estado de abandono se convierten en pasivos mineros, que también producen drenajes ácidos de mina, cuyo tratamiento no se realiza y contamina el ambiente (Bonelli, 2005).

La “inmovilización” es una alternativa para la eliminación de metales pesados en efluentes como los drenajes ácidos de minas. El método tradicional más relevante es la alcalinización del efluente, comúnmente con carbonato o soda cáustica; sin embargo, el aumento del pH precipita los metales pesados como hidróxidos, generalmente coloidales, que ocupan grandes volúmenes, requieren disposición en rellenos de seguridad y además coprecipitan con otros elementos. Este método presenta limitaciones para el tratamiento de efluentes diluidos, cuando existen elementos anfóteros o complejantes en la solución, es de baja selectividad y requiere trabajar con pH muy alcalino (Jong y Parry, 2003). Por ejemplo, para los drenajes ácidos de la mina de Cerro de Pasco, que tiene un flujo promedio de  $150 \text{ L segundo}^{-1}$  se dosifican diariamente 70 toneladas de cal para neutralizar el pH 2,5 hasta 7,8 (Nina, 2008).

La habilidad de los microorganismos para sobrevivir en un ambiente con metales pesados implica mecanismos de inmovilización, que potencialmente

pueden ser utilizados para el tratamiento ambientes contaminados. Los procesos más relevantes en la inmovilización biológica de metales son la biosorción y precipitación. En la bioprecipitación se utilizan microorganismos, como las bacterias reductoras de sulfato, productoras de metabolitos que precipitan los metales pesados. La remediación para la remoción de sulfato y precipitación de metales pesados es un proceso anaerobio, basado en la interacción entre compuestos orgánicos como donadores de electrones y los sulfatos como aceptores finales, para la producción de sulfuro de hidrógeno,  $H_2S$  a través de la ruta desasimilatoria de sulfato. El sulfuro reacciona con los metales disueltos, formando precipitados de sulfuro de metal y neutralizando a la vez el pH del agua por la producción alcalina de bicarbonato en la oxidación del donador de electrones.

En la actualidad, para remediar drenajes ácidos de minas con pH ácido se propone el uso de piscinas de precipitación natural o artificial, basadas en el proceso biológico de la reducción de sulfatos; sin embargo, las bacterias reductoras desarrollan en condiciones ligeramente alcalinas, con un rango de pH relativamente estrecho (7,0-7,8), no estando disponibles consorcios bacterianos capaces de soportar condiciones ácidas, que puedan ser utilizados como inóculo en los procesos de remediación.

Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema ¿Cuál es la eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de fierro de drenaje ácido por consorcios bacterianos sulfato reductores tolerantes a la acidez?. Para resolver este problema, el objetivo general fue: Determinar la eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de fierro en drenaje ácido por consorcios bacterianos sulfato reductores tolerantes a la acidez. Los objetivos específicos fueron caracterizar el efluente del pasivo minero en Hualgayoc, Cajamarca, obtener consorcios de bacterias sulfato reductoras en lodo residual, seleccionar el consorcio de bacterias sulfato reductoras con mayor tolerancia a la acidez y determinar la eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de fierro de drenaje ácido de mina. La hipótesis planteada fue: La eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de fierro de drenaje ácido por consorcios bacterianos sulfato reductores tolerantes a la acidez es mayor de 50%.

## **II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

### **2.1 Antecedentes de la investigación**

El alto contenido de azufre (1,5-4,5%) en los crudos y derivados de petróleo afecta negativamente la demanda, por lo que se requiere la desulfuración que puede ser catalítica y biológica. En este contexto, se utilizaron bacterias sulfato reductoras, aisladas de sedimentos marinos y de un sistema anaerobio de tratamiento de aguas residuales. En medio Postgate B ajustado a pH 5 y 7, con 5% de inóculo y 1% de combustible se investigó el crecimiento bacteriano, por medición de la densidad óptica a 610 nm. Los mayores valores de la concentración celular se alcanzaron a los 14 días, a pH 7 y 5 días, a pH 5. El porcentaje de remoción para las 24 cepas bacterianas fue mayor a pH 7, después de 5 días y a pH 5, después de 14 días. Se concluyó que el pH 7 es el más conveniente para el proceso a escala industrial (Juárez *et al.*, 1995).

El sulfuro producido por las bacterias sulfato reductoras, puede utilizarse para precipitar metales catiónicos divalentes, en la biorremediación de efluentes contaminados. En este contexto, se investigó paja de trigo como donador de electrones para el proceso de reducción. El consorcio bacteriano con capacidad para degradar celulosa y producir H<sub>2</sub>S fue incrementado en medio Postgate C modificado, con paja de trigo como soporte y donador de electrones y pH 7,5 durante 30 días. En la determinación analítica se cuantificó el sulfuro de hidrógeno y el sulfato reducido por métodos turbidimétricos, con espectrofotómetro a 480 y 420 nm, respectivamente. En un sistema discontinuo se obtuvo 5-8 mM de H<sub>2</sub>S, en cultivo continuo 25 mM después de 100 días y la producción se mantuvo por 90 días, sugiriendo que el consorcio es prometedor para su aprovechamiento a escala industrial (Chávez, 2006).

Se realizó una investigación para optimizar las condiciones de cultivo de la bacteria sulfato-reductora *Desulfovibrio* sp. La bacteria fue incrementada en medio Postgate, observándose incremento constante de tipo exponencial hasta los 8 días. A continuación, el medio fue preparado con pH ajustado a 5,6 y 7,5. El bioproceso se realizó en nueve frascos con 100 mL de medio inoculado con 15% v/v del consorcio bacteriano e incubado a 30°C. El crecimiento bacteriano se determinó indirectamente, a través de la cuantificación de sulfato interdiariamente hasta los 14 días. La mayor reducción de sulfato se alcanzó con el cultivo a pH 7,5, correspondiente al pH óptimo de crecimiento de las BSR. A pH 6 también se cuantificó una significativa reducción de sulfato. Por el contrario, a pH 5 no se registró disminución del sulfato, evidenciando inhibición del crecimiento bacteriano por la acidez del medio (Vicente, 2006).

Los drenajes ácidos de mina (DAM) están caracterizados por acidez extrema y altas concentraciones de metales pesados y sulfatos. En este contexto, se investigaron bacterias sulfato reductoras acidófilas, productoras de sulfuro biogénico, para la precipitación de metales pesados. Muestras de lodo negro se enriquecieron en columnas de Winogradsky con celulosa como fuente de carbono, durante 5 semanas. Se observó en la parte inferior una zona negra correspondiente a la región sulfato reductora, de donde se tomaron muestras para ser inoculadas en medio Postgate, en anaerobiosis, pH 4 y como fuentes de carbono metanol, etanol, glicerol, ácido láctico, ácido acético, ácidos grasos volátiles totales y celulosa. Con todas las fuentes de carbono, a excepción, de la celulosa se cuantificó H<sub>2</sub>S, alcanzando los mayores valores (20,4 y 12,2 mM) con etanol. Se concluyó que estos dos consorcios sulfato reductores acidófilos pueden ser utilizados para la producción de H<sub>2</sub>S en condiciones ácidas (Gutiérrez *et al.*, 2007).

Se realizó una investigación para caracterizar fenotípicamente una bacteria sulfato reductora termofílica aislada de un manantial termal. La bacteria fue cultivada con lactato, extracto de levadura y sulfato de sodio, a pH 7,1 – 7,2. Se observaron células de forma ovoide o bacilos cortos no móviles, Gram positivos. La secuenciación del gen 16S rRNA, realizado para determinar la ubicación taxonómica de la bacteria se llevó a cabo por el análisis de cada secuencia con el BLAST, usando la base de datos de la NCBI, mostrando una similitud de 93% con el género *Desulfacinum*. El rango de

pH para el crecimiento fue 5,7 – 7,7, con un pH óptimo de 6,75 y en presencia de sulfato utilizó formiato, propionato, butirato, valerato, isovalerato, etanol, glicerol, piruvato y lactato, considerándose promisorio para su aplicación biotecnológica en ambientes contaminados (Carvajal y Perdomo, 2008).

Se realizó una investigación para demostrar la eficiencia técnica-ambiental del uso de bacterias sulfato reductoras en el tratamiento de drenaje ácido de minas. En el bioproceso se utilizó este contaminante como fuente principal de sulfato y estiércol de aves de corral, ovejas y vacas como donadores de electrones y fuentes de carbono y energía. En un inicio, las pruebas experimentales para el tratamiento químico y biogénico se llevaron a cabo en reactores discontinuo y continuo y después para el tratamiento biogénico en biorreactores anaerobios con sistema discontinuo y sistema en dos etapas. Con ambos tratamientos, disminuyeron los metales pesados cobre, hierro, plomo, zinc; sin embargo, con el químico la concentración de calcio se incrementó significativamente desde 380 ppm a 796 ppm, por la utilización de cal para aumentar el pH desde 2,21 hasta 8,15. Por el contrario, con el biológico, el calcio disminuyó en 99,95 % y los sulfatos precipitaron en 80,29 %. La ventaja del tratamiento biogénico de no generar lodos de hidróxidos demostró que se puede utilizar para la remoción de efluentes contaminados con metales pesados (Nina, 2008).

Se realizó una investigación con el objetivo de obtener consorcios de bacterias sulfato reductoras acidófilas, que puedan ser utilizados en el tratamiento de drenajes ácidos de minas. Muestras de lodo y aguas de un efluente minero se enriquecieron en columnas de Winogradsky y se obtuvieron consorcios bacterianos, que fueron inmovilizados en perlas de agar agar y cultivados en medio Postgate C, pH4, modificado con el efluente a tratar (1:1), y tres fuentes de carbono. En la determinación analítica se utilizaron tiras de papel filtro humedecidos con una solución de acetato de plomo, para detectar el sulfuro de plomo y el método turbidimétrico basado en la precipitación del sulfuro de cobre para la cuantificación de H<sub>2</sub>S. La efectividad en la producción de H<sub>2</sub>S fue mayor cuando se utilizó papel bond como soporte y fuente de carbono, tanto para cultivo discontinuo (19,05 mM), como para cultivo continuo (7 mM), concluyéndose que estos consorcios acidófilos pueden utilizarse para la remediación de drenaje ácido de mina (Gutiérrez *et al.*, 2009).



Se investigó el uso de un microelectrodo selectivo de sulfuro como producto de la actividad de bacterias sulfato reductoras, aisladas de columnas de Winogradsky. Se acondicionaron matraces conteniendo medio Postgate con lactato, acetato y etanol como fuentes de carbono y se taparon, manteniendo dos orificios en la parte superior. En un orificio se acopló un microelectrodo de plata-sulfuro de plata y microreferencia de cobre, selectivo para  $\text{H}_2\text{S}$  y por el segundo orificio se inyectó  $\text{N}_2$  para mantener la anaerobiosis. Se obtuvo una respuesta aceptablemente lineal ( $R^2=0,9790$ ) y se corroboró la factibilidad de realizar mediciones selectivas con microsensores de bajo costo (Vierna & Baeza, 2010).

## 2.2 Drenaje ácido de mina

La minería impacta la calidad de agua a través de las aguas ácidas, contaminación por metales pesados y lixiviación, contaminación por agentes químicos utilizados en el proceso y erosión-sedimentación. Las aguas ácidas son los drenajes de minas en actividad o en abandono, con un pH comprendido entre 2 y 4 y alto contenido de metales disueltos como Al, Mn, Zn, Cu, Pb, entre otros. Los drenajes ácidos causan mortandad de peces y crustáceos de ríos, afecciones al ganado, destrucción de cultivos y riberas, siempre asociados a una coloración ocre-amarillenta de los lechos de ríos y lagos afectados y un incremento de la turbiedad de la aguas (López *et al.*, 2002).

La oxidación de la pirita es el principal responsable de la formación de aguas ácidas. Esta oxidación se ve favorecida en áreas mineras debido a la facilidad con la que el aire entra en contacto con los sulfuros. En la oxidación  $[2 \text{FeS}_2(\text{s}) + 7 \text{O}_2 (\text{g}) + 2 \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2 \text{Fe}^{2+} + 4 \text{SO}_4^{-2} + 4 \text{H}^+]$ , se produce  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$  e  $\text{H}^+$ . Esta reacción provoca incremento en el total de sólidos disueltos y aumento de la acidez, que irá asociado a la disminución del pH. Si el ambiente circundante es lo suficientemente oxidante, entonces muchos iones ferrosos se oxidarán a iones férricos  $[2 \text{Fe}^{+2} + \frac{1}{2} \text{O}_2 (\text{g}) + 2 \text{H}^+ \longrightarrow 2 \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}]$ . Por lo general, por encima de un pH 3, el ión férrico formado precipita, como hidróxido  $[2 \text{Fe}^{+3} + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{Fe} (\text{OH})_3(\text{s}) + 6 \text{H}^+]$ , disminuyendo por tanto el  $\text{Fe}^{+3}$  en solución, mientras que el pH baja. Algunos cationes férricos ( $\text{Fe}^{+3}$ ) que se mantienen en solución, pueden seguir oxidando la pirita  $[\text{FeS}_2 + 14 \text{Fe}^{+3} + 8 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 15 \text{Fe}^{+2} + 2 \text{SO}_4^{-2} + 16 \text{H}^+]$  y formar  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$  e  $\text{H}^+$  (López *et al.*, 2002; Nina, 2008).

Cinéticamente la oxidación de la pirita en un principio, es un proceso lento, que acaba con el hierro liberado precipitado como hidróxido, al ser todavía relativamente alto el pH. Progresivamente, la capacidad neutralizadora del medio va disminuyendo y cuando el pH es 3,5 deja de formarse el hidróxido y la actividad del  $\text{Fe}^{+3}$  en solución se incrementa. A este pH, además, las bacterias catalizan y aceleran la oxidación de  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$ , entonces la reacción de oxidación de la pirita por el  $\text{Fe}^{+3}$  se magnifica (Nina, 2008).

### 2.3 Bacterias sulfato reductoras

Las bacterias sulfato reductoras, BSR, son anaerobios obligados que reducen el sulfato, sulfito o tiosulfato, utilizándolos como aceptores de electrones y produciendo  $\text{H}_2\text{S}$  como residuo metabólico. El proceso es una respiración anaerobia o reducción desasimilativa. Las bacterias se subdividen en dos grupos, según oxiden o no acetato. El grupo I, no oxidantes del acetato, se caracteriza porque realiza una oxidación incompleta de los sustratos orgánicos como lactato, formiato, propionato, butirato, piruvato e inorgánicos como el hidrógeno molecular, teniendo como producto final acetato. Se incluyen *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonas* y *Desulfolobus*. El grupo II, oxidantes del acetato, oxida completamente la materia orgánica, principalmente ácidos grasos, hasta dióxido de carbono e incluye a *Desulfococcus*, *Desulfobacterium*, *Desulfonema* y *Desulforacina*. En su mayoría, las bacterias de este grupo tienen capacidad de crecimiento autotrófico. Por el contrario, a excepción de *Desulfovibrio*, el grupo I no presenta crecimiento autotrófico (Nina, 2008).

Los mecanismos bioenergéticos de la reducción desasimilatoria del sulfato son tres: activación del sulfato y su reducción a bisulfito, reducción de bisulfito a sulfuro y metabolismo del hidrógeno. En un inicio, el sulfato es activado por la enzima ATP sulfurilasa que forma adenilil sulfato, APS y pirofosfato,  $\text{PPi}$  a partir de sulfato y ATP. Debido a la desfavorabilidad termodinámica de esta reacción, se necesita una segunda enzima, pirofosfatasa, que hidroliza  $\text{PPi}$ , originando dos  $\text{Pi}$ . La reducción del APS a AMP y bisulfito es catalizada por la APS reductasa. A su vez, la reducción de bisulfito a sulfuro se lleva a cabo por dos mecanismos. El primero involucra la reducción de seis electrones de bisulfito a  $\text{H}_2\text{S}$ . En el segundo mecanismo o vía

del tritionato mediada por dos tipos de bisulfito reductasas, el bisulfito es reducido a bisulfuro en tres pasos, con formación de intermediarios libres entre el tritionato y el tiosulfato. Por último, las hidrogenasas catalizan la oxidación reversible del hidrógeno molecular a protones y electrones, generando potencial de membrana y gradiente transmembrana de pH, con el bombeo de protones a través de la membrana celular (Fauque & Ollivier, 2004).

Las bacterias sulfato reductoras bajo condiciones anaerobias son las principales responsables de la generación de  $\text{H}_2\text{S}$ , gas incoloro, con fuerte olor fétido a huevos podridos y extremadamente tóxico para animales aerobios. En una concentración mayor de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  causa dolor de cabeza y náuseas en humanos y más de  $100 \text{ mgL}^{-1}$  puede ocasionar parálisis súbita y muerte. La forma química en que se encuentra el  $\text{H}_2\text{S}$  depende del pH. A pH ácido ( $< 6$ ) se tiene  $\text{H}_2\text{S}$ , a pH neutro (7)  $\text{HS}^-$  y a pH básico ( $> 8$ )  $\text{S}^{2-}$ . Tanto el  $\text{HS}^-$  como el  $\text{S}^{2-}$  son solubles en el agua, mientras que el  $\text{H}_2\text{S}$  es un gas poco soluble que escapa a la atmósfera (Nina, 2008).

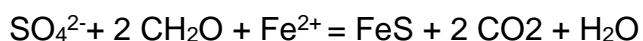
## **2.4 Tratamientos pasivos para drenajes ácidos**

Los métodos para el control del drenaje ácido de minas se clasifican en primarios o preventivos, secundarios o de contención y terciarios o de remediación. Los métodos de remediación pueden ser sistemas activos y pasivos. Los activos o convencionales tienen un coste elevado, por lo que no pueden ser mantenidos por un periodo prolongado, una vez finalizada la vida de la mina, más aún teniendo en cuenta que el problema de las aguas ácidas puede perdurar varios cientos de años. Los sistemas pasivos requieren mínimo mantenimiento y su bajo costo puede ser asumido por largos periodos, una vez clausurada la instalación minera. En estos sistemas se considera la remoción de metales pesados con sulfuro de hidrógeno biogénico (López *et al.*, 2002).

Entre los métodos pasivos destacan los humedales aerobios, los humedales anaerobios o balsas orgánicas, los drenajes anóxicos calizos (ALD, Anoxic Limestone Drains), los sistemas sucesivos de producción de alcalinidad (SAPS, Successive Alkalinity Producing Systems) y cuando el problema es en aguas subterráneas, las barreras reactivas permeables (PRB, Permeable Reactive Barriers). En la práctica, estos métodos se emplean solos o combinados, dependiendo del tipo de drenaje ácido y los requerimientos de

tratamiento. El objetivo principal de todos ellos es la supresión de la acidez, precipitación de metales pesados y disminución de los solutos en suspensión (López *et al.*, 2002).

En los humedales anaerobios, la altura de la línea de agua supera los 30 cm, para favorecer las condiciones anóxicas. Esta lámina cubre un sustrato permeable de 30-60 cm de espesor, formado mayoritariamente por 70- 90% de estiércol, compost, turba, heno o serrín, entremezclado o dispuesto sobre una capa de caliza. La finalidad del sustrato orgánico es eliminar el oxígeno disuelto, reducir el  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  y generar alcalinidad, mediante procesos químicos o microbianos. Sobre el sustrato se desarrolla la vegetación emergente característica de los humedales. El sistema de humedales anaerobios opera en permanente inundación, fluyendo parte del agua horizontalmente a través del sustrato orgánico. En éste, se desarrollan las bacterias anaerobias sulfato reductoras *Desulfovibrio* y *Desulfomaculum*, capaces de utilizar la materia orgánica ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) y el sulfato disuelto en el agua intersticial, como fuente de energía para su metabolismo. La reducción bacteriana del sulfato genera ácido sulfhídrico o azufre elemental y alcalinidad. En el proceso de reducción bacteriana se reduce la acidez mineral potencial debida al hierro y otros metales, al precipitar como sulfuros (López *et al.*, 2002).



Dependiendo del donador de electrones, se producirán aproximadamente 2 moles de alcalinidad por mol de sulfuro producido. Por ejemplo, con acetato como donador se produce  $2\text{HCO}_3^-$  ( $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 2\text{HCO}_3^-$ ). Un mol de sulfuro es generado por mol de sulfato reducido y el sulfuro precipitará los metales pesados (Nina, 2008).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Materiales**

El material biológico estuvo constituido por muestras de lodo residual, bacterias sulfato reductoras y drenaje ácido de mina.

##### **3.1.1 Población y muestra**

Se consideró como población los consorcios de bacterias sulfato reductoras del lodo residual de la planta de tratamiento de aguas residuales de San José en Lambayeque y se trabajó con los consorcios obtenidos de 54 unidades de muestreo, colectadas durante julio – octubre de 2014. El número de muestras fue calculado según la fórmula mencionada por Alvitres (2000), con una prevalencia de 90% (Anexo 1), determinada por los investigadores en un muestreo piloto.

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Variables en estudio**

Variable independiente: Consorcios bacterianos sulfato reductores tolerantes a la acidez.

Variable dependiente: Tiempo para observar el ennegrecimiento.  
Eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de fierro.

##### **3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis**

El trabajo de investigación se ejecutó en dos fases. En la primera fase con un estudio descriptivo y el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt (Alvitres,2000) se caracterizó el drenaje ácido y se obtuvieron los consorcios de bacterias sulfato reductoras.

En la segunda fase, con un estudio experimental y el diseño con estímulo creciente se seleccionaron los consorcios de bacterias tolerantes a la acidez y posteriormente con el diseño en sucesión o línea se determinó la eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de fierro en drenaje ácido sintético por un consorcio de bacterias seleccionado.

### **3.2.3 Caracterización del efluente de pasivo minero**

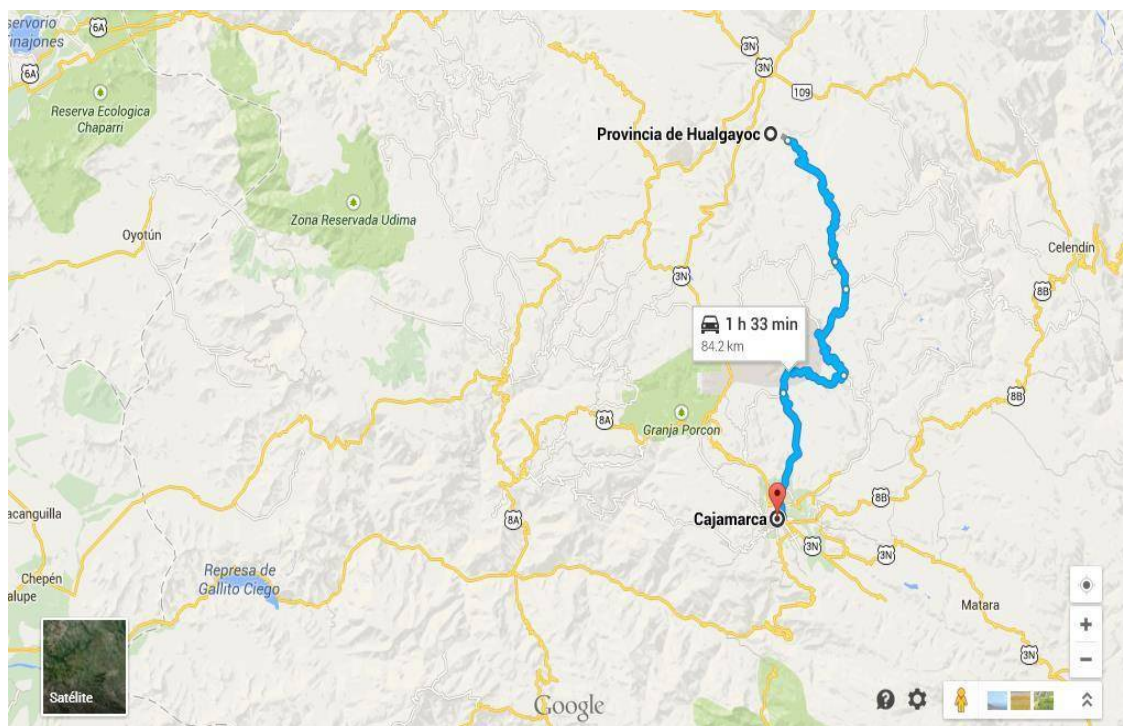
El muestreo de efluentes se realizó en el pasivo minero tipo bocamina de Hualgayoc, monitoreado por la compañía minera Colquirrumi S.A, en la región Cajamarca (Figura 1). El pasivo minero investigado tiene diez sectores, con una superficie de 777,15 km<sup>2</sup>, realizándose el muestreo en el sector 6, denominado Mansita. En el cuerpo receptor de la quebrada Mansita, antes y después del efluente bocamina Mansita 7 (Figura 2), se colectaron dos muestras de aproximadamente 500 mL de agua en frascos de vidrio boca ancha de 1 L de capacidad. Inmediatamente después, las muestras debidamente identificadas se transportaron en una caja térmica (10 ± 1 °C) para su procesamiento en el Laboratorio de Ensayo de la división laboratorio Medio Ambiente en Cajamarca.

### **3.2.4 Obtención de consorcios de bacterias sulfato reductoras**

En las lagunas anaerobias de la planta de tratamiento de aguas residuales se colectaron muestras de lodo para obtener consorcios de bacterias sulfato reductoras.

#### **a. Lugar de muestreo**

Se colectaron 54 unidades de muestreo de lodo residual en las tres lagunas anaerobias de la planta de tratamiento de aguas residuales en San José, región Lambayeque (Figura 3). El distrito de San José con una superficie de 46,73 km<sup>2</sup> está situado a 12,9 km. al Nor Oeste de la ciudad de Chiclayo, entre las coordenadas geográficas 6°47'54 de latitud sur y 79°59'30 de longitud oeste del meridiano de Greenwich ([http://es.wikipedia.org/wiki/Distrito\\_de\\_San\\_Jos28Lambayeque29](http://es.wikipedia.org/wiki/Distrito_de_San_Jos28Lambayeque29)).

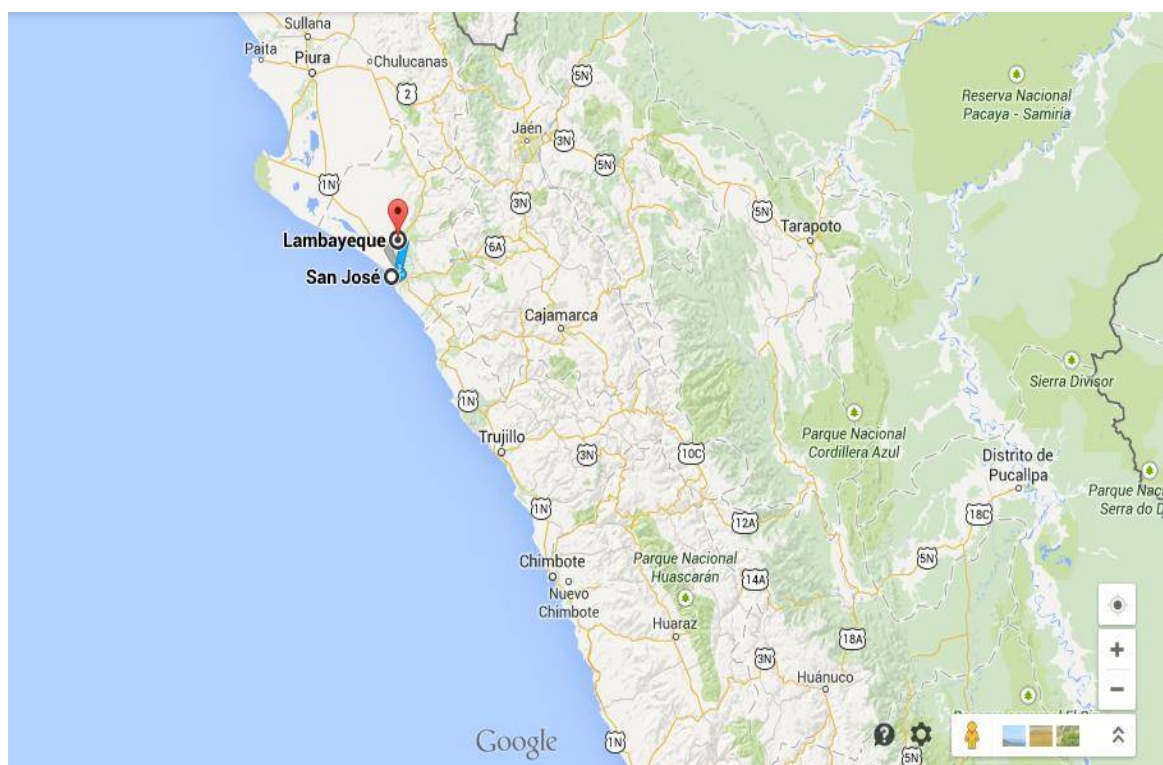


**Figura 1.** Ubicación geográfica de la zona de muestreo correspondiente al distrito de Hualgayoc, provincia de Hualgayoc, en Cajamarca, 2014. (<https://maps/dir/Provincia+de+Hualgayoc/Cajamarca/@-hl=es>).



**Figura 2.** Puntos de muestreo de drenaje ácido de mina, antes y después del efluente bocamina Mansita 7.





**Figura 3.** Ubicación del lugar de muestreo en el distrito de San José, provincia de Chiclayo, región Lambayeque, 2014.  
([https:// maps/dir/San+Jos%C3%A9/Lambayeque/@-es](https://maps/dir/San+Jos%C3%A9/Lambayeque/@-es)).



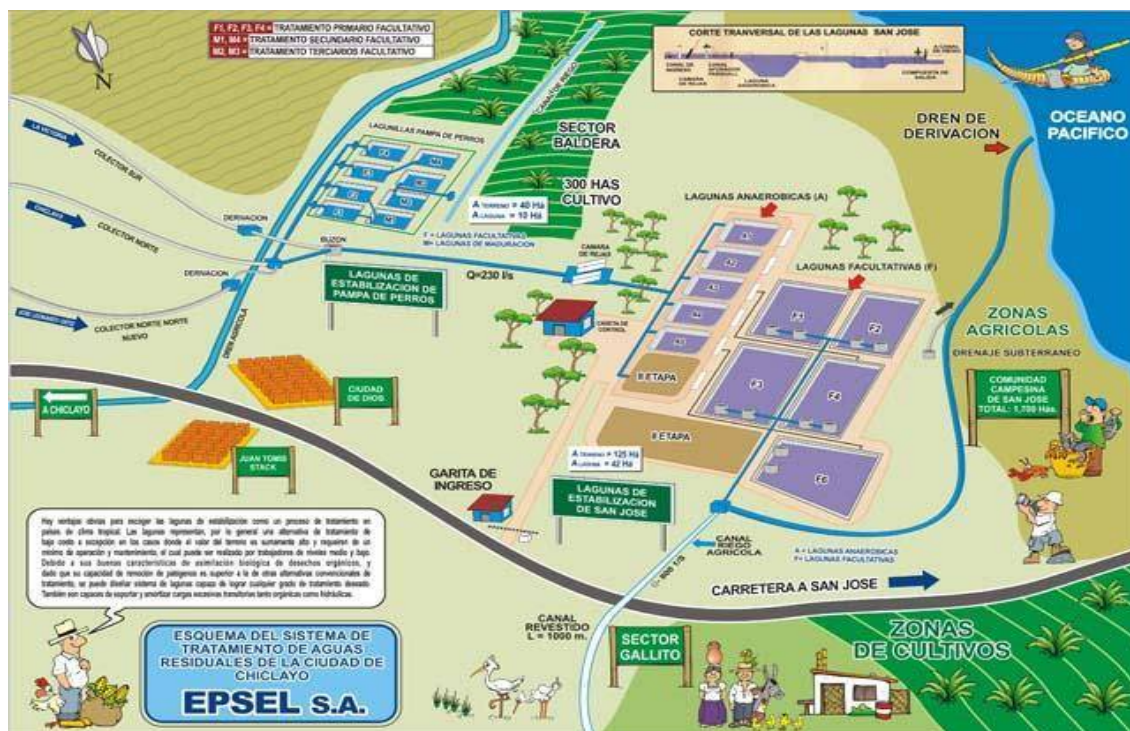
La planta de tratamiento de efluentes residuales denominada “Lagunas de Estabilización” de San José (Figura 4), se encuentra ubicada en el Km 6 de la carretera Chiclayo-San José, a 500 metros de Ciudad de Dios y fue construida como unidad compacta, para el tratamiento de las aguas residuales drenadas por los colectores Norte, Sur, Norte-Norte de Chiclayo, para una capacidad de  $76850 \text{ m}^3\text{día}^{-1}$ , correspondientes a  $890 \text{ Lsegundo}^{-1}$ . La planta de tratamiento consiste de un canal de ingreso de aguas residuales, dos cámaras de rejas automáticas, un medidor de caudales Parshall, una caja de distribución de caudales, cinco lagunas de estabilización anaerobias primarias de  $165 \times 122 \text{ m}$  y  $3,5 \text{ m}$  de profundidad, cinco lagunas de estabilización facultativas secundarias de  $245 \times 242 \text{ m}$  y  $1,80 \text{ m}$  de profundidad, una estructura de salida de agua tratada con dos compuertas de control y un canal de derivación de agua tratada a tajo abierto (<http://www.epsel.com.pe/Presentación/ServicioAL>)

#### **b. Obtención de muestras de lodo residual**

En tres lagunas anaerobias (Figura 5) se colectaron muestras de lodo residual, empleando un recipiente muestreador de 5L, a una profundidad de 1 m por debajo de la superficie (Figura 6). Después, 500 mL de las muestras se transfirieron a frascos de vidrio de boca ancha, debidamente identificados e inmediatamente se transportaron en una caja térmica ( $10 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo (Figura 7).

#### **c. Enriquecimiento de bacterias sulfato reductoras**

Las bacterias sulfato reductoras contenidas en el lodo residual se enriquecieron en columnas de Winogradsky según la metodología descrita por López (2008) y Gutiérrez et al. (2007) modificada por los autores. Para determinar los componentes requeridos en el armado de las columnas, inicialmente se realizaron los cálculos correspondientes a probetas de 1L de capacidad, determinándose un requerimiento de 406,6 mL de lodo residual, 4g de  $\text{CaCO}_3$ , 4g de  $\text{CaHPO}_4$ , 25g de papel higiénico y dos yemas de huevo cocinado durante 3' (Anexo 2).



**Figura 4.** Ubicación de la Laguna de Estabilización de San José en la provincia de Chiclayo, región Lambayeque.

(<http://www.epsel.com.pe/Presentacion/WFrmServicioAL.aspx>).



**Figura 5.** Vista aérea de las lagunas anaerobias de estabilización en el distrito de San José, provincia de Chiclayo, región Lambayeque.

(<https://maps/dir/San+Jos%C3%A9/Lambayeque/=es>).





**Figura 6.** Extracción de muestra de lodo residual en laguna anaerobia.



**Figura 7.** Muestras de lodo residual de planta de tratamiento de aguas residuales.

A continuación en un balón de vidrio de 3L de capacidad se depositaron 681,4 mL del sobrenadante de lodo residual sedimentado y se mezclaron con 3g de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), obteniéndose una disolución de sulfato de sodio (Figura 8).

Para obtener lodo enriquecido, en un mortero de 0,5mL de capacidad se depositaron 25g de papel higiénico fragmentado y humedecido en agua potable durante 12 horas y se mezclaron con dos yemas de huevo (Figura 9). El contenido se maceró con 100mL de lodo residual durante 10 minutos y luego se incorporaron las sales de calcio (Figura 10). A continuación, en un envase de plástico herméticamente cerrado de 1 galón de capacidad se depositó un cuarto (101,65 g) del lodo previamente calculado y se mezcló rápidamente con la preparación del mortero(Figura 11), se añadió el resto de lodo (304,95 g), se mezcló y se tapó rápidamente, obteniéndose de esta manera el lodo enriquecido (Figura 12).

Las columnas de Winogradsky constituidas por probetas de vidrio de 1L de capacidad se lavaron con agua potable y se higienizaron con hipoclorito de sodio comercial 5%,(p/v) durante 12 horas (Figura 13). Con ayuda de una manga de polietileno se depositaron 781,44g de lodo enriquecido (Figura 14) y 253,44g de lodo no enriquecido (Figura 15)correspondientes a 1/3 del volumen útil de la columna y una capa de 10 cm; respectivamente. Después, cuidadosamente por las paredes de la probeta se vertieron 681,4g de disolución de sulfato de sodio en agua residual, de tal manera que la probeta se llenó hasta 5cm antes del extremo superior, constituyéndose así el volumen útil de la columna de Winogradsky (Figura 16). Después, se depositaron 10mL de aceite comestible formando una capa de 2cm de espesor(Figura 17) y finalmente el extremo superior se selló con parafilm y papel aluminio, para evitar la entrada de aire(Figura 18). Las columnas se incubaron a temperatura ambiente, cerca de una ventana para favorecer la iluminación, durante 30 días (Figura 19).



**Figura 8.** Mezcla de sobrenadante de lodo residual sedimentado y sulfato de sodio.



**Figura 9.** Mezcla de papel higiénico con yema de huevo.





**Figura 10.** Incorporación de sales de calcio a mezcla de lodo residual.



**Figura 11.** Preparación de lodo residual enriquecido.



**Figura 12.** Lodo enriquecido.



**Figura 13.** Higienizado de probeta con hipoclorito de sodio.



**Figura 14.** Adición de lodo enriquecido durante el armado de columna de Winogradsky.



**Figura 15.** Columna de Winogradsky con lodo enriquecido y lodo no enriquecido.

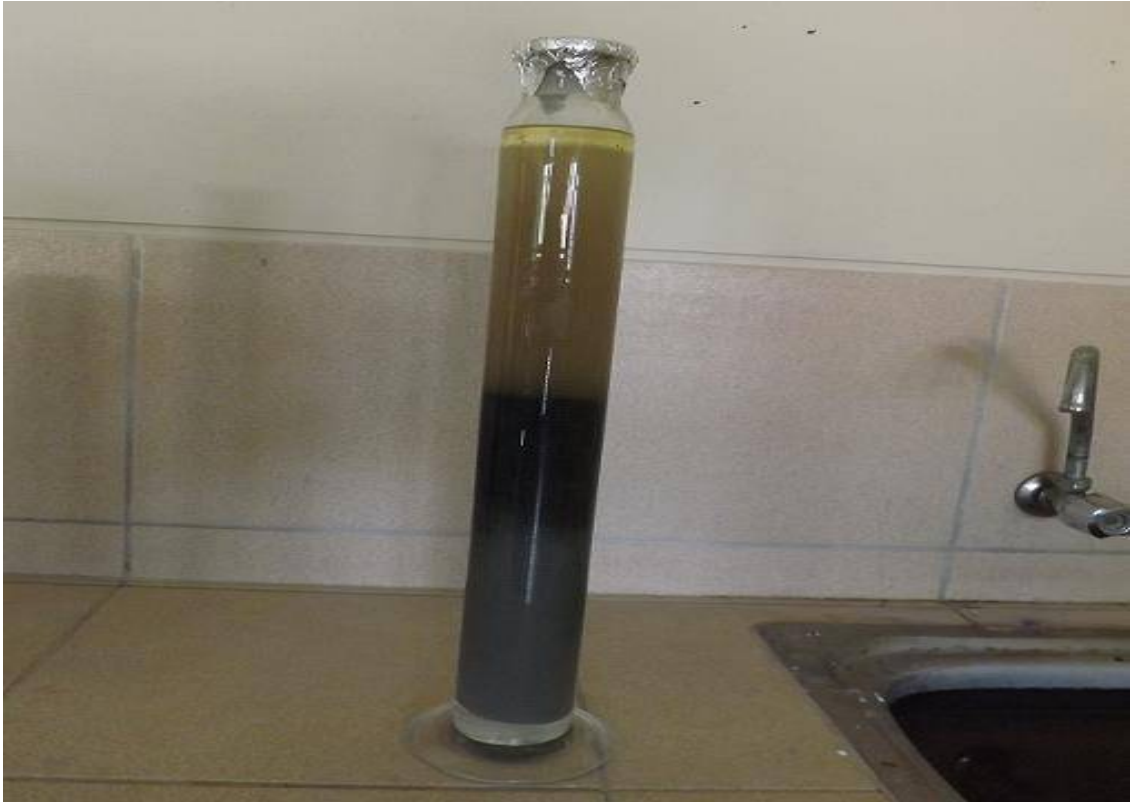




**Figura 16.** Llenando hasta 5cm antes del extremo superior de la probeta.



**Figura 17.** Película de aceite comestible en extremo superior de probeta.



**Figura 18.** Sellado de la columna de Winogradsky con papel aluminio.



**Figura 19.** Incubación de Columna de Winogradsky a temperatura ambiente.

#### **d. Obtención de consorcios bacterianos**

Para la obtención de consorcios de bacterias sulfato reductoras se tomaron alícuotas de la zona negra de la parte inferior de las columnas de Winogradsky, correspondientes a la región sulfato reductora (Figura 20) y se inocularon en tubos de 50 mL de capacidad, con tapa rosca, conteniendo 10mL de medio Postgate C modificado descrito por Gutierrez *et al.*, 2007 (Anexo 3) (dos tubos/columna), con 1% de etanol como fuente de carbono (Figura 21). Después de la incubación, se agregó en la superficie cuidadosamente 2 mL de aceite esterilizado y los tubos se taparon herméticamente.

Transcurrida la incubación a 30°C, durante 30 días (Figura 22), los tubos fueron abiertos y cubiertos inmediatamente con círculos de papel filtro de 1cm de diámetro, humedecidos previamente con una solución de acetato de plomo. La presencia de bacterias sulfato reductoras se evidenció por ennegrecimiento platinado sobre el papel filtro. Este color correspondió al sulfuro de plomo formado y se calificó según una escala convencional elaborada por los autores en: ligero oscurecimiento (+), oscurecimiento (++), negro (+++) y negro platinado (+++).

#### **3.2.5 Selección de consorcios bacterianos tolerantes a la acidez**

Los consorcios bacterianos obtenidos en las columnas de Winogradsky se cultivaron en biorreactores, conteniendo medio de cultivo Postgate C modificado con pH 3, 4, 5 y 6 y se seleccionó el consorcio que desarrolló y formó sulfuro de hidrógeno a menor pH y en el menor tiempo.

##### **a. Tratamientos en estudio**

Los tratamientos correspondieron al pH del medio de cultivo, con cuatro niveles: 3 (T<sub>1</sub>), 4 (T<sub>2</sub>), 5 (T<sub>3</sub>) y 6 (T<sub>4</sub>) cada uno con cuatro repeticiones. Asimismo, se incluyó un testigo no inoculado en cada pH (Figura 23).

##### **b. Acondicionamiento de biorreactores**

Los biorreactores tipo tanque anaerobios, con sistema discontinuo, en número de 20 estuvieron constituidos por frascos de vidrio de 0,5 L de capacidad, ajustados a la geometría y proporciones de un biorreactor estándar, según Guzmán y Hurtado, 2011 (Figuras 24, 25,26).



**Figura 20.** Obtención de alícuota de la zona sulfato reductora en la columna de Winogradsky.

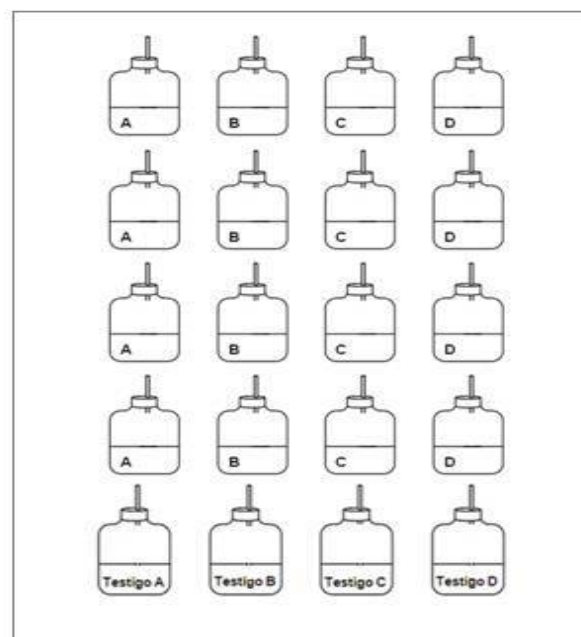


**Figura 21.** Medio Postgate C modificado inoculado con alícuotas de zona sulfato reductora de columnas de Winogradsky.



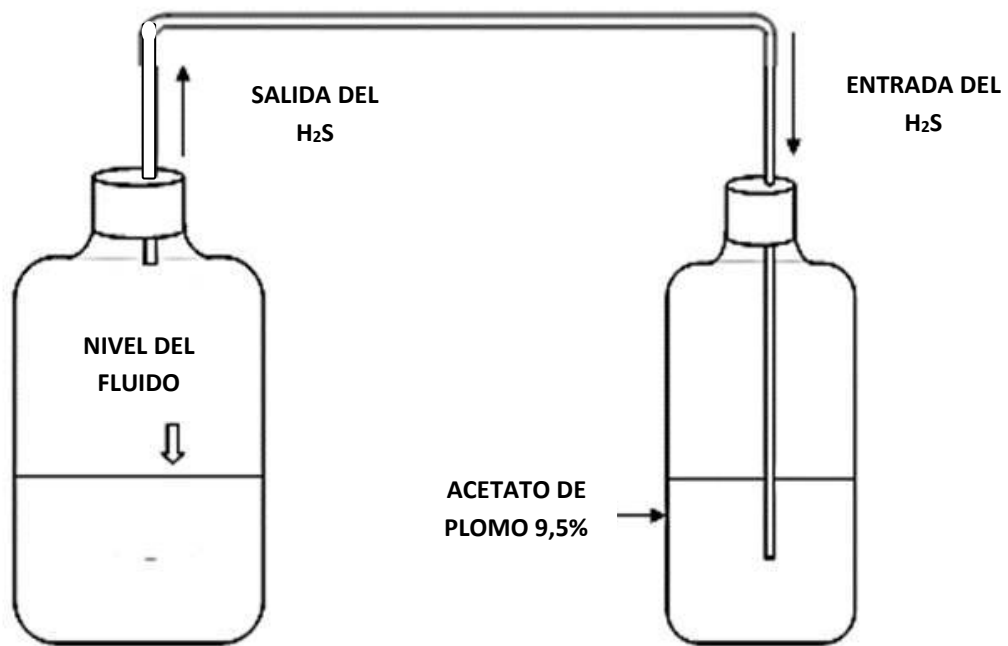


**Figura 22.** Medio Postgate C modificado, 30 días después de la inoculación de alícuotas de zona sulfato reductora.



A: pH 3  
 B: pH 4  
 C: pH 5  
 D: pH 6

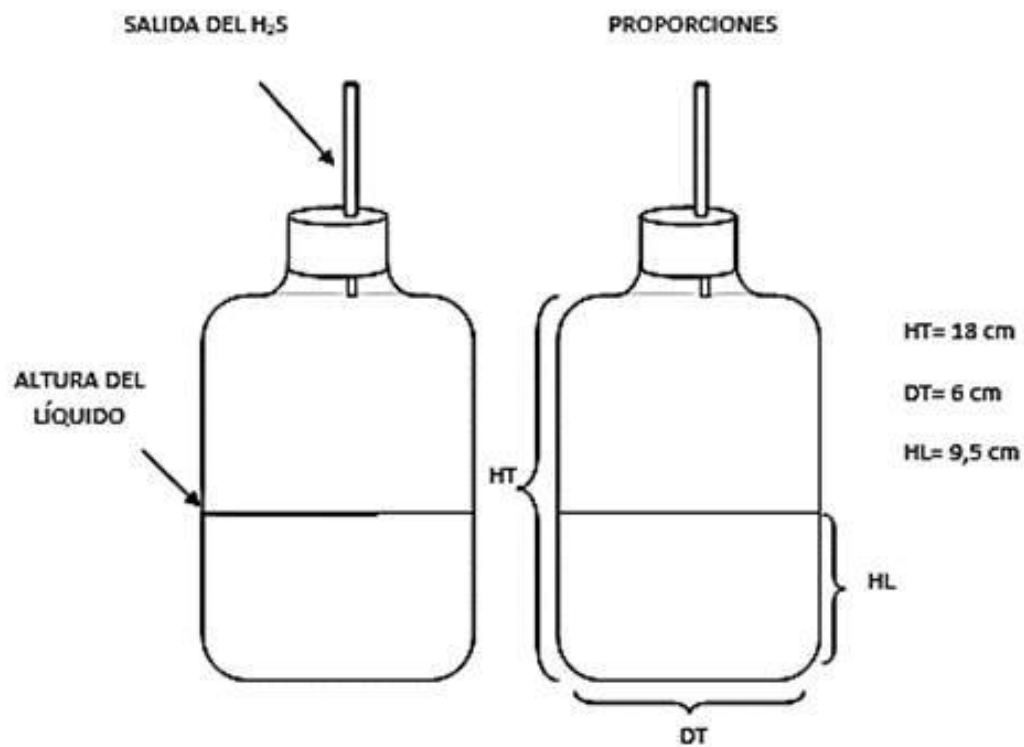
**Figura 23.** Tratamientos para seleccionar consorcios de bacterias sulfato reductoras tolerantes a la acidez.



**Figura 24.** Diseño de biorreactor tipo tanque anaerobio con sistema discontinuo.



**Figura 25.** Biorreactor tipo tanque anaerobio con sistema discontinuo.



**Figura 26.** Geometría y proporciones de biorreactor tipo tanque anaerobio.

El extremo superior de cada biorreactor estuvo cubierto por una tapa de goma, que presentó un orificio, por donde ingresó una manguera de plástico, de 0,5 cm de diámetro, para la salida del  $H_2S$  hacia un frasco de 250mL conteniendo 100mL de una solución de acetato de plomo 9,5% p/v. Los frascos de vidrio se esterilizaron en horno (180°C por 2 horas), el material de plástico y goma se sumergieron en hipoclorito de sodio al 5%, durante 24 horas y posteriormente se irradiaron con luz ultravioleta, durante 30 minutos. En cada, biorreactor, asépticamente, se depositaron 100 g de papel higiénico fragmentado, remojado en agua destilada durante 24 horas y licuado (procesado), y sobre éste se vertieron 200 mL de medio de cultivo Postgate C modificado. Los biorreactores se llevaron al autoclave, a 121 ° C, 15 libras de presión, durante 20 minutos, para la esterilización correspondiente.

#### **c. Proceso fermentativo**

En los biorreactores se depositó 4% de inóculo (12 mL), correspondiente a cada consorcio de bacterias sulfato reductoras previamente obtenidos. Los biorreactores se taparon herméticamente y la manguera plástica se conectó hacia el frasco con la solución de acetato de plomo (Figura 27). La incubación se realizó a 30°C, por tiempo suficiente para observar ennegrecimiento en la manguera, acetato de plomo del frasco anexo al biorreactor y contenido del biorreactor (Figura 28). La coloración se consideró producto del  $H_2S$  formado por las bacterias sulfato reductoras tolerantes a la acidez, seleccionándose el consorcio que ennegreció al menor pH, en el menor tiempo.

#### **3.2.6 Eficiencia de la producción de $H_2S$ para la precipitación de hierro en drenaje ácido sintético**

El consorcio de bacterias sulfato reductoras seleccionado fue inoculado (4%) en tres biorreactores tipo tanque anaerobio, con sistema discontinuo, conteniendo 100 g de papel higiénico “procesado” y 200 mL de drenaje ácido sintético, según López *et al.*, 2013 (Figura 29, anexo 4), previamente esterilizado y con una concentración de ión férrico determinada ( $C_i$ ). La incubación se realizó a 30°C y 4 días después de observado el ennegrecimiento del drenaje ácido sintético se cuantificó el ion férrico ( $C_f$ ) del drenaje ácido sintético cultivado con las bacterias, en el Laboratorio de Ensayo de la división laboratorio Medio Ambiente en Cajamarca.





**Figura 27.** Biorreactor anaerobio con medio Postgate C modificado inoculado con consorcio de bacterias sulfato reductoras.



**Figura 28.** Proceso fermentativo para la selección de consorcios de bacterias sulfato reductoras tolerantes a la acidez.



**Figura 29.** Proceso fermentativo para determinar la eficiencia de la producción de  $\text{H}_2\text{S}$  para la precipitación de fierro en drenaje ácido sintético.

La eficiencia (%) de la producción de H<sub>2</sub>S para la precipitación de hierro se calculó según la ecuación mencionada por Castro y Gonzales (2003).

$$E = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

Donde:

E= Eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de hierro

C<sub>i</sub>= Concentración inicial de Fe<sup>2+</sup> en el biorreactor

C<sub>f</sub>= Concentración final de Fe<sup>3+</sup> en el biorreactor

### **3.2.7 Análisis estadístico de los datos**

La información obtenida se ordenó en tablas y figuras para analizar la eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de hierro en drenaje ácido sintético por un consorcio de bacterias sulfato reductoras tolerantes a la acidez. Con los valores del tiempo requerido para la selección de los consorcios de bacterias se realizó un análisis de varianza para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos y la prueba múltiple de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) para determinar el nivel de significancia. Se utilizaron los programas Microsoft Office Word y Excel versión 2013.

## **IV. RESULTADOS**

### **4.1 Características del efluente mezclado con drenaje ácido del pasivo minero Hualgayoc, en Cajamarca**

El efluente del pasivo minero tipo bocamina de Hualgayoc se colectó en el sector 6 Mansita. La zona correspondió a la quebrada Mansita, por donde discurren efluentes mineros y en la trayectoria hacia abajo se mezclan con el drenaje ácido del componente bocamina Mansita 7, cerrado mediante tapón con drenaje y trampa de aire. Por esta razón, se colectaron las muestras al inicio y final de la quebrada, es decir antes y después de la mezcla del efluente con el drenaje ácido.

En la muestra del inicio de la quebrada el pH fue de 2,56 con 27,859 mgL<sup>-1</sup> de hierro total y 139,62 mgL<sup>-1</sup> de sulfato (Tabla 1). A su vez, en la muestra del final de la quebrada el pH fue de 2,8; con 74,924 mgL<sup>-1</sup> de hierro total y 508,86 mgL<sup>-1</sup> de sulfato.

### **4.2 Consorcios de bacterias sulfato reductoras obtenidos**

Los consorcios bacterianos sulfato reductores se obtuvieron de la zona sulfato reductora en las columnas de Winogradsky. Transcurridos 2 días después del armado, se observaron tres zonas diferenciadas: 2/5 de color grisáceo, correspondientes al lodo enriquecido o zona anaerobia, 1/5 de color negro del lodo residual o zona microaerófila y 2/5 del líquido turbio del sobrenadante del lodo sedimentado o zona aerobia (Figura 30).

**Tabla 1.** Características químicas\* de muestras de efluentes del pasivo minero tipo Bocamina de Hualgayoc en Cajamarca

Características químicas	Quebrada Mansita		Incremento (%)
	Inicio	Final	
pH	2,56	2,80	
Conductividad (us/cm)	508,00	767,00	31,29%
Hierro total (mgL <sup>-1</sup> )	27,859	74,924	168,94%
Sulfatos (mgL <sup>-1</sup> )	139,62	506,86	263,02%

\*Laboratorio de ensayo acreditado por INDECOPI – SNA

- Metales disueltos y totales: Método EPA 200.8,1994 Rev 5.4 Determination of trace elements in Waters and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry

- Aniones: Método 300.0 : 1993, Rev. – Determination of Inorganic Anions by ion Chromatography.



**Figura 30.** Zonas diferenciadas en la columna de Winogradsky.

Entre los días 3 y 4, después del armado de las columnas de Winogradsky se observó un burbujeo ascendente del armado, que desapareció gradualmente hasta los 30 días. En simultáneo al burbujeo, aparecieron pigmentaciones púrpuras entre la zona microaerófila y aerobia (Figura 31), siendo más evidentes en la parte de la columna con exposición directa a la radiación solar (Figura 32). Después de 10 días junto a la pigmentación púrpura se observaron manchas anaranjadas (Figura 33).

Entre los 15 a 20 días, en la parte superior de la zona anaerobia aparecieron puntos blancos, que en un inicio se observaron aisladamente y luego como una masa blanca (Figura 34). Esta masa, posteriormente tomó un color negro. El ennegrecimiento se inició como un punto oscuro central, que se fue agrandando, observándose en algún momento círculos negros con halos blancos (Figura 35) y finalmente todo de color negro (Figura 36). En simultáneo al ennegrecimiento apareció una pigmentación verde en la zona microaerófila, debajo de la pigmentación púrpura. De esta manera, en la zona microaerófila se visualizaron dos capas: una verde inferior y una púrpura inferior (Figura 37).

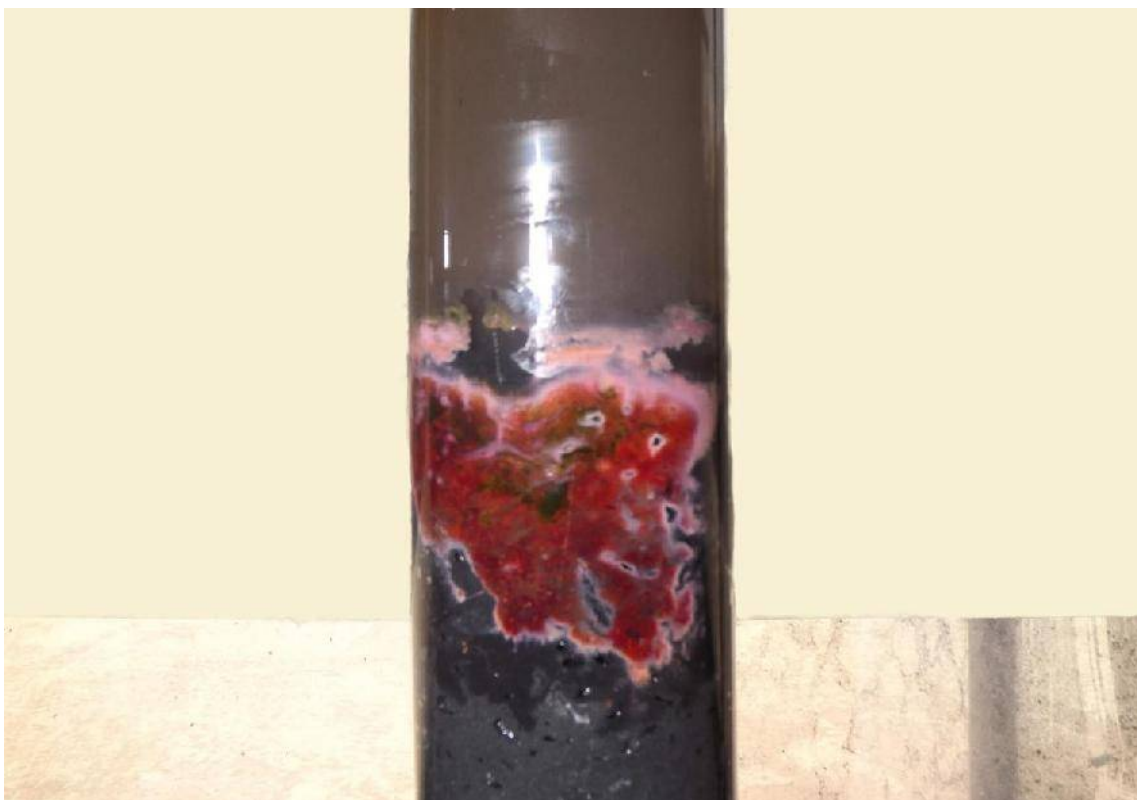
En la zona aerobia de la columna se observó una coloración verdosa, que se extendió gradualmente y se mantuvo como un estrato en la parte inferior hasta los 30 días (Figuras 38, 39). Por el contrario, en la zona aerobia de algunas columnas se observó turbidez (Figura 40).

En el 80% (43) de las columnas de Winogradsky, se observaron los cambios descritos anteriormente; no obstante, en el 20% (11) existió variabilidad: no se observó el estrato verde (Figura 41), la capa verde, púrpura y manchas anaranjadas (Figura 42) y la pigmentación púrpura se extendió en la zona microaerófila y aerobia de la columna (Figura 43).

EL 85,2% (46) de las muestras de lodo residual resultó positivo para la obtención de consorcios de bacterias sulfato reductoras a partir de la región negra de las columnas de Winogradsky respectivas (Figura 44). Se obtuvieron 63 consorcios de bacterias, cuya presencia durante el cultivo, se evidenció por un ennegrecimiento debajo de la capa de aceite inicialmente y debajo y sobre la capa, posteriormente (Figura 45). Esta observación fue corroborada por el sulfuro de plomo negro o negro platinado sobre el papel filtro colocado al destapar el tubo de cultivo de cada consorcio (Figura 46).



**Figura 31.** Pigmentación púrpura entre la zona microaerófila y aerobia de la columna.



**Figura 32.** Pigmentación púrpura observada en la zona microaerófila de la columna.





**Figura 33.** Pigmentación anaranjada entre la zona microaerófila y aerobia de la columna.



**Figura 34.** Manchas blancas en la parte superior de la zona anaerobia de la columna.



**Figura 35.** Ennegrecimiento de las manchas blancas en la zona anaerobia de la columna.



**Figura 36.** Ennegrecimiento de la zona anaerobia de la columna.



**Figura 37.** Estratos verde y púrpura en la zona microaerófila de la columna.



**Figura 38.** Coloración verdosa en la zona aerobia de la columna.



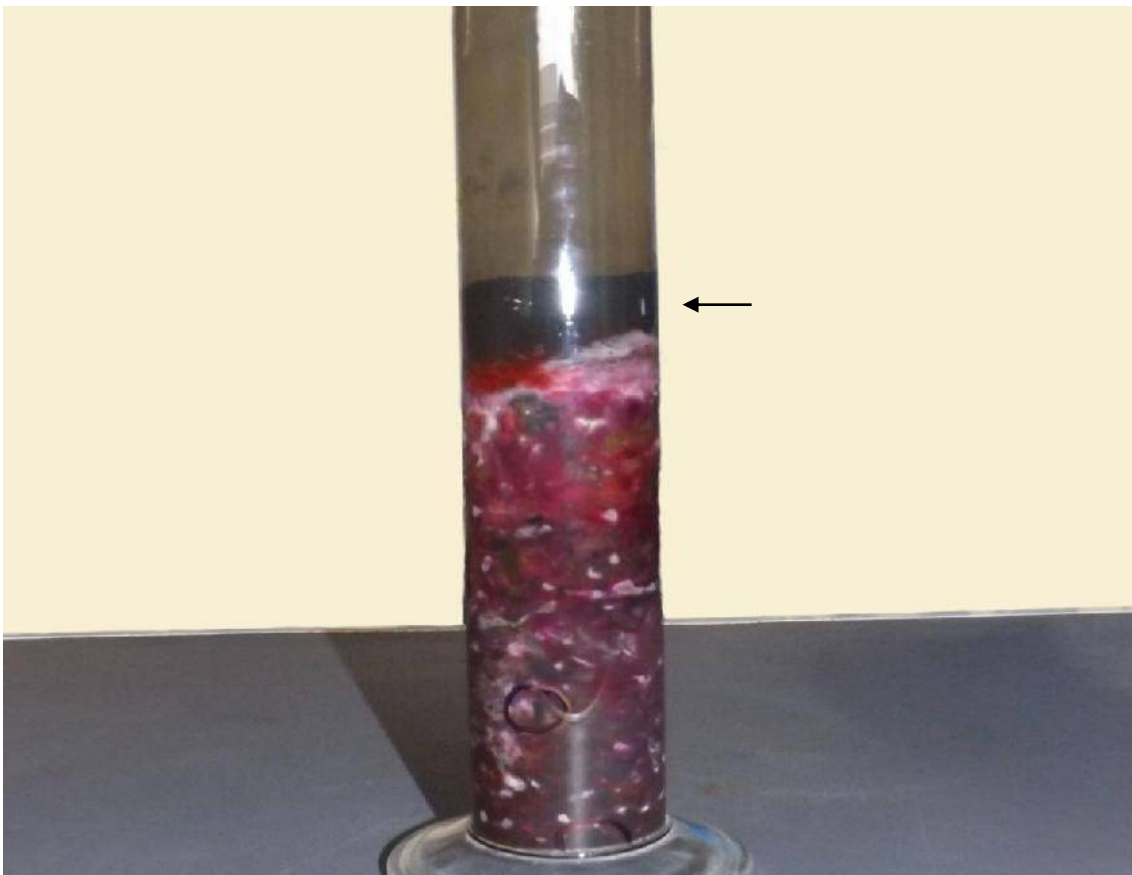
**Figura 39.** Estrato verde en la zona aerobia inferior de la columna.



**Figura 40.** Turbidez en la zona aerobia de la columna.



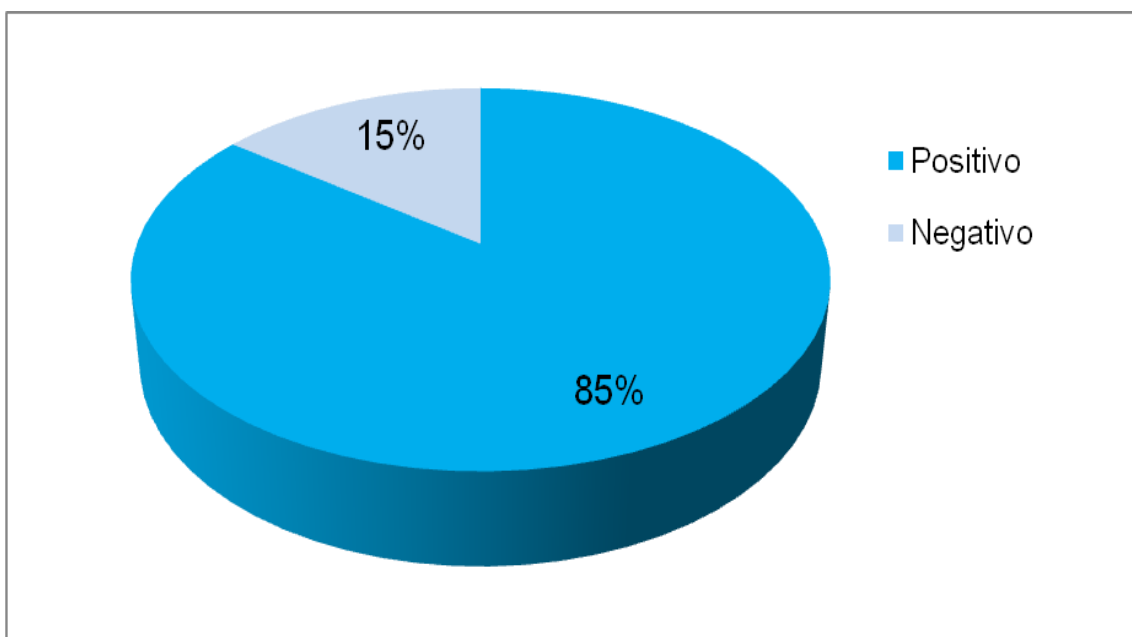
**Figura 41.** Ausencia de estrato verde en la zona microaerófila.



**Figura 42.** Ausencia de coloración en la zona microaerófila.

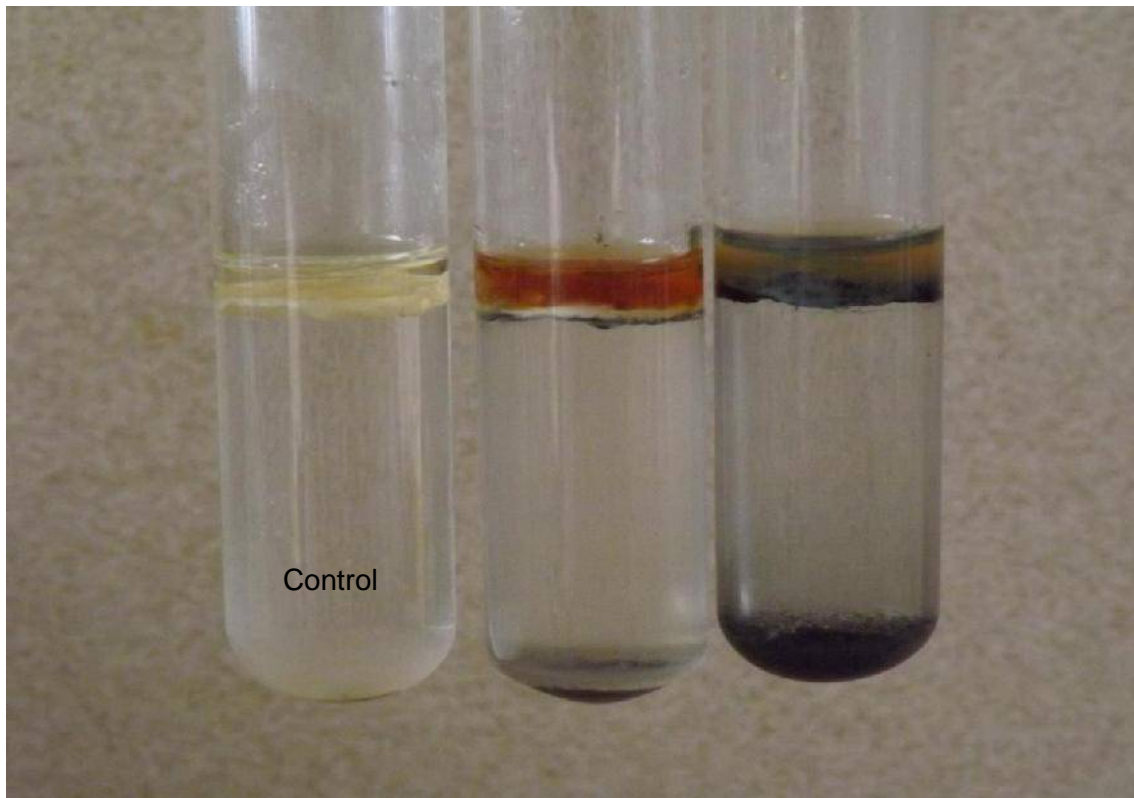


**Figura 43.** Pigmentación púrpura en la zona microaerófila y aerobia.



**Figura 44.** Frecuencia de muestras de lodo residual positivas para la obtención de consorcios de bacterias sulfato reductoras, 2014.





**Figura 45.** Ennegrecimiento observado durante el cultivo de consorcios de bacterias sulfato reductoras.



**Figura 46.** Sulfuro de plomo de color negro platinado sobre papel filtro que evidenció la presencia de bacterias sulfato reductoras.

El 63,49% (40) de los consorcios de bacterias sulfato reductoras presentó una coloración negro platinado en el papel filtro (Figuras 47,48). Entre éstos, se seleccionó el consorcio con la coloración oscura más acentuada, para investigar la tolerancia a la acidez

#### **4.3 Consorcios de bacterias sulfato reductoras tolerantes a la acidez**

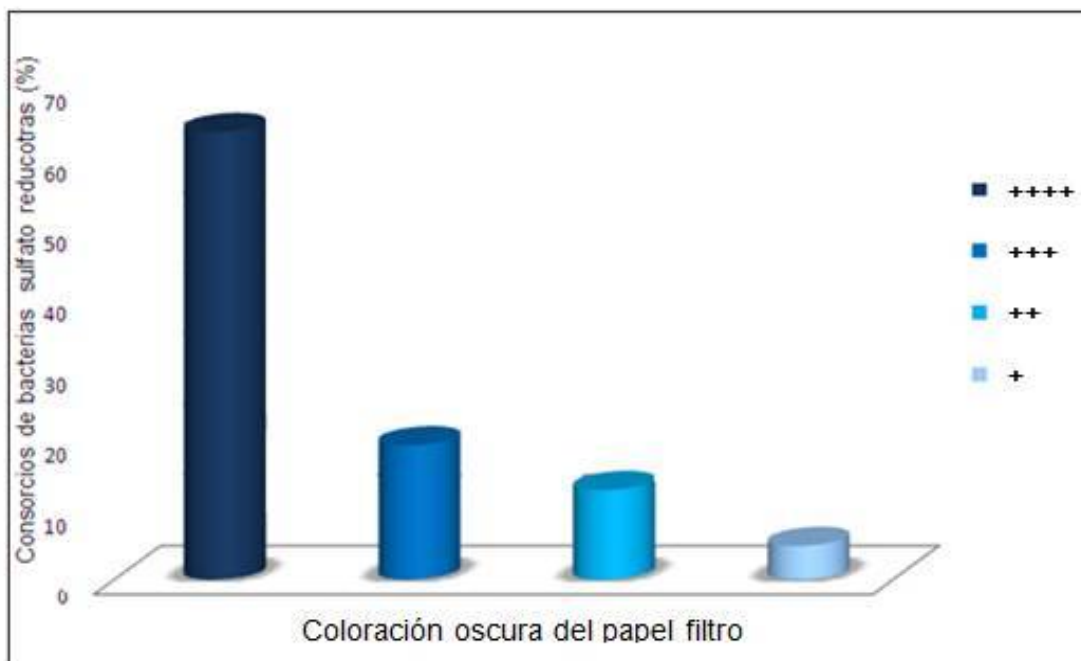
El consorcio de bacterias sulfato reductoras seleccionada, desarrolló en el medio de cultivo Postgate C modificado con pH 3, 4, 5 y 6, observándose ennegrecimiento, inicialmente en el extremo inferior de la manguera y superficie del acetato del plomo (Figura 49), contenido en el frasco anexo al biorreactor. Posteriormente, se observó ennegrecimiento sobre el papel higiénico del biorreactor (Figura 50). En el testigo no se observó alguna coloración (Figura 51).

El tiempo requerido para el ennegrecimiento osciló entre 4 y 7 días, correspondiendo en promedio 4,8 días al pH 3 y 7 días al pH 6 (Tabla 2). La prueba F del análisis de varianza evidenció alta significancia (Tabla 3) y según la prueba múltiple de Tukey el menor tiempo se alcanzó con los tratamientos pH 3 y 4, no diferenciándose significativamente entre ellos, pero si de los demás tratamientos (Tabla 2). El consorcio T1-pH3-r2 evidenció ennegrecimiento a pH 3 a los 4 días, por lo que fue seleccionado para la siguiente fase de la investigación.

#### **4.4 Eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de fierro en drenaje ácido de mina**

El consorcio de bacterias sulfato reductoras seleccionado, evidenció crecimiento en el drenaje ácido sintético, observándose desaparición del color anaranjado inicial, sobrenadante incoloro y precipitado verde oscuro (Figura 52). Después de 2 días el pH fue de 7,3 y la concentración de  $\text{Fe}^{3+}$  de  $0,23 \text{ mgL}^{-1}$  (Tabla 4), valores que se encuentran por debajo del límite máximo permisible, según la Ley General de aguas clase III, aguas para riego de vegetales de consumo crudo y bebida de animales DL N° 17752, Art. 81 (Anexo 5).





**Figura 47.** Consortios de bacterias sulfato reductoras según coloración oscura del papel filtro humedecido con acetato de plomo.



**Figura 48.** Coloración negro platinado en el papel filtro humedecido con acetato de plomo.



**Figura 49.** Ennegrecimiento en extremo inferior de la manguera y superficie del acetato del plomo.



**Figura 50.** Ennegrecimiento sobre el papel higiénico del biorreactor.



**Figura 51.** Ausencia de coloración en biorreactor testigo.

**Tabla 2.** Tiempo (días) requerido para observar el ennegrecimiento del acetato de plomo en el sistema de biorreactores anaerobios con bacterias sulfato reductoras

Tratamientos	Tiempo (días)					Sign
	r1	r2	r3	r4	$\bar{X}$	$\alpha=0,05$
T1 (pH3)	5	4	5	5	4,8	a
T2 (pH4)	5	5	5	6	5,3	a
T3 (pH5)	6	6	7	6	6,3	b
T4 (pH6)	7	7	7	7	7,0	b

**Tabla 3.** Análisis de varianza del tiempo requerido para el ennegrecimiento en la selección de bacterias sulfato reductoras

$$H_0 = \mu A1 = \mu A2 = \mu A3 = \mu A4$$

$H_a$  = Al menos una media es diferente

Fuente de variación	SC	GL	CM	Fc	p	Sign	Decisión
Tratamientos	12,188	3	4,063	21,667	0,000	**	Rechaza $H_0$
Error	2,250	12	0,188				
Total	14,438	15					





**Figura 52.** Sobrenadante incoloro y precipitado verde oscuro observados en drenaje ácido sintético cultivado con bacterias sulfato reductoras.

**Tabla 4.** Eficiencia de la remoción de  $\text{Fe}^{3+}$  en drenaje ácido sintético por consorcio bacteriano sulfato reductor tolerante a la acidez

Drenaje ácido sintético	Valores		
	Consorcios	LMP (1)	LMP (2)
$\text{Fe}^{3+}$ Concentración inicial ( $C_i$ )	74,93 $\text{mgL}^{-1}$	-	-
$\text{Fe}^{3+}$ Concentración final ( $C_f$ )	0,23 $\text{mgL}^{-1}$	1,0 $\text{mgL}^{-1}$	1,0 $\text{mgL}^{-1}$
Eficiencia de remoción (%)	99,63%	-	-
pH inicial	2,8	-	-
pH final	7,3		

1: Límite máximo permisible según Ley General de Aguas Clase III Aguas para riego de vegetales de consumo crudo y bebida de animales (DL N° 17752. Art. 81)

2: Límite máximo permisible según MEM de emisión para unidades minero-metalúrgicas

La eficiencia de la remoción de  $\text{Fe}^{3+}$  en el drenaje ácido de mina sintético fue de 99,63%, valor que correspondió a la eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de fierro. Por lo expuesto, el consorcio de bacterias sulfato reductoras T1-pH3-r2 es promisorio para su aplicación en la remediación de drenajes ácidos mineros.



## V. DISCUSIÓN

Las muestras de agua superficial del efluente del pasivo minero Hualgayoc, en Cajamarca evidenciaron contaminación por drenaje ácido, incrementándose la concentración de hierro (168,94%) y sulfato (263,02%), después de la mezcla del efluente con el drenaje ácido. Las aguas ácidas son los drenajes de minas en actividad o en abandono, con un pH de 2-4 y alto contenido de metales disueltos como hierro, aluminio, manganeso, zinc y cobre, entre otros (López *et al.*, 2002).

La oxidación del mineral sulfurado pirita es responsable, en su mayoría, de la formación de drenaje ácido. Durante las excavaciones, la pirita se expone al aire y una combinación de autooxidación espontánea (pH neutro) y oxidación microbiana del hierro (pH 3,5-4,5 y pH < 3,5) genera acidez. El pH del drenaje, con un valor casi neutro disminuye a 2,0 – 4,5 y la concentración de sulfato puede alcanzar 1000 – 20000 mgL<sup>-1</sup>. A su vez, el ión ferroso Fe<sup>+2</sup> soluble se oxida a Fe<sup>+3</sup>, que forma hidróxido férrico insoluble. Éste junto a las sales férricas complejas, precipitan, formando un barro amarillo-anaranjado (Madigan *et al.*, 2004). La caracterización previa del drenaje ácido es muy importante para efectuar la correcta selección y dimensionamiento de los dispositivos operacionales que configuran el conjunto del tratamiento pasivo de los drenajes ácidos, donde se considera la remoción de metales pesados con sulfuro de hidrógeno, producido por bacterias sulfato reductoras (López *et al.*, 2002; Nina, 2008).

Para la obtención de consorcios de bacterias sulfato reductoras, las bacterias de muestras de lodo residual se enriquecieron en columnas de Winogradsky, coincidiendo con Godoy & Rachumí (1999) y Gutiérrez *et al.* (2007, 2009). La columna de Winogradsky es utilizada para enriquecer diversos procariotas, tanto aerobios como anaerobios, observándose el proceso

evolutivo y de adaptación. Una vez establecida la columna, se facilita el desarrollo de una serie de comunidades acuáticas, diferenciadas por el color y relacionadas con la concentración de oxígeno, nutrientes, pH y luz. De esta manera, se obtienen inóculos listos para el aislamiento de consorcios y cultivos puros (López, 2008).

En el armado de las columnas de Winogradsky se utilizan cilindros de vidrio o de plástico, donde se deposita lodo residual, rico en materia orgánica, papel higiénico o filtro como fuente de carbono y energía, sulfato de calcio, anhidrita o yeso como base de sulfato y carbonato de calcio como agente tamponador de pH (López, 2008; Moreno *et al.*, 2012).

Una vez sedimentados los componentes, en la columna de Winogradsky se diferenciaron tres zonas, correspondientes al lodo enriquecido, lodo no enriquecido y sobrenadante de lodo sedimentado. Al respecto, López (2008) determinó que la altura de la columna permite diferenciar tres zonas características, con base a su concentración relativa de oxígeno. En el fondo una zona anaerobia, en el centro una microaerófila y encima, cerca de la superficie, una zona aerobia con alta concentración de oxígeno. Moreno *et al.* (2012) definieron tres zonas, pero también seis estratos, cuatro en la zona anaerobia, una en la microaerófila y una en la aerobia. A su vez, Malajovich (2014) estratificó la columna con base a la gradiente de oxígeno, sulfato y  $H_2S$ , considerando una zona anaerobia inferior, medio y superior, correspondientes a los estratos uno, dos-tres y cuatro, respectivamente.

Transcurridos 3 días de incubación, se observó la salida de burbujas, desde la zona anaerobia de la columna. Este flujo ascendente es explicado por la degradación anaerobia de la materia orgánica, en la que interaccionan bacterias fermentativas, acetogénicas, metanogénicas y sulfato reductores y para las que el producto final de unas es el sustrato de otras, hasta que se completa la oxidación (Madigan *et al.* 2004). En la digestión anaerobia, la materia orgánica se transforma en biomasa y compuestos inorgánicos en su mayoría volátiles: metano, dióxido de carbono, amoníaco, nitrógeno molecular y  $H_2S$ , con la intervención secuencial de bacterias hidrolíticas y fermentadoras, acetogénicas obligadas, reductoras de hidrógeno, sulfato reductoras consumidoras de hidrógeno, homoacetogénicas, desnitrificantes y metanogénicas (Soria *et al.*, 2001; Benavides & Plasencia, 2012).

En la zona microaerófila de la columna se observaron pigmentaciones púrpura, coincidiendo con López (2008) y Moreno *et al.* (2012). Esta pigmentación correspondió a las bacterias púrpuras oxidantes del azufre. La descomposición de la materia orgánica y reducción de sulfato en la zona anaerobia, genera una gradiente de H<sub>2</sub>S hacia la zona microaerófila, donde es oxidado por las bacterias púrpuras y verdes del azufre.

Las bacterias púrpuras y verdes son oxidantes fotosintéticas del azufre. Llevan a cabo la fotosíntesis no oxigénica, en la que el oxígeno no está implicado. El azufre es oxidado a azufre elemental (S<sup>0</sup>), que es almacenado como gránulos en el interior de las células (púrpuras) o en el exterior (verdes). Las bacterias púrpuras del azufre incluyen rodoespiraláceas y cromatiáceas como *Rhodospirillum* y *Rhodopseudomonas*. Estas bacterias presentan una coloración violeta- azulada, púrpura, rojo profundo y marrón anaranjado, debido a pigmentos fotosintéticos como las bacterioclorofilas y los carotenoides (Coyne, 2000; Madigan *et al.*, 2004). Por su parte, las bacterias verdes del azufre, representadas por clorobiáceas y cloroflexiáceas como *Chlorobium spp.* deben su color a la bacterioclorofila (Coyne, 2000).

Las bacterias púrpuras y verdes se estratificaron en la zona microaerófila de la columna de Winogradsky, dependiendo de su tolerancia al H<sub>2</sub>S: las verdes abajo y las púrpuras encima. A su vez, en la parte superior de la zona microaerófila, limitando con la zona aerobia se observaron manchas anaranjadas correspondientes a las bacterias púrpuras no oxidantes del azufre, que obtienen energía por fotosíntesis anoxigénica, utilizando como fuente de carbono ácidos orgánicos, azúcares o alcoholes y son inhibidas por altas concentraciones de H<sub>2</sub>S (López, 2008; Moreno *et al.*, 2012). Las bacterias púrpuras “no del azufre” pueden oxidar el sulfuro; no obstante, no son viables en los niveles de H<sub>2</sub>S oxidados por las bacterias púrpuras del azufre, son nutricionalmente muy diversas y la mayoría también puede crecer fotoautotróficamente con dióxido de carbono más hidrógeno o dióxido de carbono más bajos niveles de H<sub>2</sub>S (Madigan *et al.*, 2004).

Las bacterias verdes y púrpuras del azufre y púrpuras “no del azufre”, se hicieron más evidentes con la radiación solar directa, porque son fotolitótrofos-autótrofos en el caso de las bacterias verdes y púrpuras del azufre y fotoorganotrofos-heterótrofos en las bacterias púrpuras no del azufre (Madigan

*et al. 2004*). Al respecto, López (2008) explicó que cuando una columna se expone a la luz solar o la proporcionada por la incandescencia de un filamento de tungsteno de una lámpara de laboratorio, la luz roja e infrarroja es absorbida por la clorofila y bacterioclorofila, desarrollándose microorganismos fotosintéticos. Como las bacterias púrpuras del S, las verdes viven en ambientes anaerobios con abundante  $H_2S$  y debido a que el clorosoma o estructura que alberga la bacterioclorofila es muy eficiente como recolector de luz se requiere muy poca luz para la fotosíntesis, por lo que normalmente se encuentran a mayores profundidades que el resto de fotótrofos y en la columna de Winogradsky el estrato verde se encuentra por debajo del púrpura (Madigan *et al. 2004*).

Las bacterias púrpuras del azufre fueron más evidentes que las verdes. Se coincide con López (2008), quien manifestó que las bacterias púrpuras, mayoritarias en la columna de Winogradsky, son anaerobias, parcialmente sensibles al oxígeno molecular y sulfuro de hidrógeno y producen compuestos reducidos a partir del dióxido de carbono. De igual manera, Malajovich (2014) mencionó que las bacterias púrpuras crecen antes que las verdes y por encima de ellas, porque son menos exigentes en relación al  $H_2S$ . Inclusive en presencia de poco oxígeno, las bacterias florecen (blooming), llegando a visualizarse en el líquido de la parte superior de la columna. Por el contrario, Godoy y Rachumí (1999) observaron crecimiento de las bacterias verdes a los 3 días y púrpuras a los 7 días de incubación de la columna de Winogradsky. Estos investigadores utilizaron sulfuro de sodio en reemplazo del sulfato, lo que favoreció rápidamente una mayor concentración de  $H_2S$ , como donador de electrones para las bacterias verdes, que generalmente crecen masivamente asociadas, con las bacterias púrpuras.

En la región anaerobia de color negro de las columnas de Winogradsky se obtuvieron consorcios de bacterias sulfato reductoras, coincidiendo con Gutiérrez *et al.* (2007,2009) y Vierna & Baeza (2010). Estas bacterias se encuentran en ambientes acuáticos y terrestres, que se vuelven anóxicos, debido a los procesos de descomposición. La mejor estudiada es *Desulfovibrio desulfuricans*, común en ambientes acuáticos o en suelos encharcados, con abundante materia orgánica y sulfato. Las bacterias sulfato reductoras utilizan tanto el sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) como el azufre ( $S^0$ ) como aceptores de electrones,

compuestos orgánicos e  $H_2$  como donadores de electrones y producen  $H_2S$  al final de la reducción. La coloración negra de la zona sulfato reductora se debe a la precipitación de  $H_2S$  con los metales reducidos depositados en el fondo de la columna, (sulfuro ferroso) donde *Desulfovibrio* y otras bacterias metabolizan ácidos orgánicos, alcoholes e  $H_2$ , producto de la degradación de materia orgánica (Coyne, 2000; López, 2008).

En la obtención de consorcios de bacterias sulfato reductoras, tolerantes a la acidez, se utilizó medio Postgate C modificado con etanol y sulfato como donador y aceptor de electrones, respectivamente, coincidiendo con Gutierrez *et al.* (2007). Las bacterias reductoras utilizan el sulfato como aceptor de electrones, en procesos que generan energía. Los donadores de electrones mayoritariamente son orgánicos: etanol, lactato, piruvato, fumarato y propionato, entre otros: heterótrofos quimiolitótrofos, pero también, utilizan el  $H_2$ : autótrofos quimiolitótrofos (Coyne, 2000; Gutierrez *et al.*, 2007; Carvaján & Perdomo, 2008).

El medio Postgate C modificado también presentó ión ferroso, por cuanto éste se combina con el ácido sulfhídrico, producto de la reducción de sulfato, originando un precipitado negro de sulfuro de hierro. Este ennegrecimiento indica no solamente la reducción de sulfato y formación de sulfhídrico, sino que, al originarse sulfuro de hierro se destoxifica el ácido sulfhídrico, lo que favorece el crecimiento celular con mayor rendimiento (Madigan *et al.*, 2004).

El consorcio de bacterias sulfato reductoras seleccionado desarrolló en el medio de cultivo Postgate C modificado con pH 3, 4, 5 y 6, evidenciándose formación de  $H_2S$  después de 4 días. Se coincide con Gutiérrez *et al.* (2007), quienes obtuvieron consorcios sulfato reductores acidófilos (pH 4) de muestras de lodo negro. Por el contrario, Vicente (2006) observó inhibición del crecimiento de *Desulfovibrio sp.* en medio Postgate con pH5.

En biorreactores anaerobios, el consorcio de bacterias sulfato reductoras tolerantes a la acidez incrementó el pH y disminuyó la concentración de  $Fe^{+3}$  del drenaje ácido sintético, alcanzando 99,63% de eficiencia. Se coincide con Nina (2008), quien reportó disminución del pH y concentración de  $Fe^{+3}$ , con una eficiencia de 99,56%.

En algunos cuerpos de agua bajo condiciones anaerobias y reductoras intensas (potencial redox  $< 0,1$  voltios) la reducción bacteriana del sulfato genera ácido sulfhídrico o azufre elemental y alcalinidad. Dependiendo del donador de electrones, se producirán aproximadamente 2 moles de alcalinidad por mol de sulfuro producido (Nina, 2008). Parte significativa del sulfuro se convierte en  $\text{H}_2\text{S}$  y otra parte reduce químicamente el  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  y luego lo precipita en formas insolubles de sulfuro ferroso ( $\text{FeS}$ ). De esta manera, el pH aumenta y tanto el  $\text{Fe}^{+3}$  como el  $\text{SO}_4^{-2}$ , disminuyen (Coyne, 2000).

Las bacterias sulfato reductoras generan  $\text{H}_2\text{S}$  y alcalinidad, eliminando la acidez y disminuyendo la concentración de sulfato e ión férrico del drenaje ácido sintético. En este contexto, el consorcio bacteriano T1-pH3-r2 de bacterias sulfato reductoras tolerantes a acidez tiene potencial para su aplicación en la remediación de drenaje ácido sintético.

## VI. CONCLUSIONES

- ✓ El efluente mezclado con drenaje ácido del pasivo minero Hualgayoc en Cajamarca, presentó un pH final de 2,80 y 74,924 mgL<sup>-1</sup> de hierro total.
- ✓ Se obtuvieron 63 consorcios de bacterias sulfato reductoras de muestras de lodo residual.
- ✓ El consorcio T1-pH3-r2 de bacterias sulfato reductoras tolerantes a acidez se seleccionó porque desarrolló y formó H<sub>2</sub>S a pH 3, después de 4 días.
- ✓ La eficiencia fue de 99,63% en la producción de sulfuro para la precipitación de hierro en drenaje sintético por el consorcio de bacterias sulfato reductoras T1-pH3-r2.



## **VII. RECOMENDACIONES**

- ✓ Seleccionar consorcios de bacterias tolerantes a la acidez utilizando celulosa como fuente de carbono.
- ✓ Identificar fenotípicamente y a nivel molecular las bacterias sulfato reductoras del consorcio T1-pH3-r2.
- ✓ Determinar la eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de fierro en drenaje ácido por consorcios bacterianos sulfato reductores tolerantes a la acidez en condiciones de humedales.

## VIII. RESUMEN

Los drenajes ácidos de minas afectan negativamente el ambiente por el pH ácido y grandes concentraciones de metales pesados como el fierro; no obstante, procesos de inmovilización pueden ser utilizados para su tratamiento. La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar la eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de fierro de drenaje ácido por consorcios bacterianos sulfato reductores tolerantes a la acidez. Las bacterias de lodo residual se enriquecieron en columnas de Winogradsky durante 30 días, obteniéndose 63 consorcios de bacterias sulfato reductoras a las que se les investigó la tolerancia a la acidez, cultivándolos en medios Postgate C con pH 3, 4,5 y 6. Las bacterias tolerantes se reconocieron por el ennegrecimiento, debido al  $H_2S$  producido, seleccionándose T1-pH3-r2 porque desarrolló y formó  $H_2S$  a pH 3, después de 4 días. En biorreactores tipo tanque, anaerobios la eficiencia fue de 99,63% en la producción de sulfuro para la precipitación de fierro en drenaje ácido sintético por el consorcio seleccionado. Se demostró el potencial de los consorcios de bacterias para producir  $H_2S$  y precipitar el fierro en drenaje ácido de mina.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la Investigación*. 2da ed. Lambayeque: Editorial Ciencia.
- Benavides C. & Plasencia R. (2012). *Caracterización físico-química y biológica del abono líquido "BIOL" obtenido por digestión anaerobia de tres sustratos orgánicos en Jayanca, Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Bonelli, J. (2005) Reporte presentado por el Ministerio de Energía y Minas del Perú. Recuperado de [http://intranet2.minem.gob.pe/web/archivos/dgaam/certificado/RD\\_071\\_2006\\_MEM\\_AAM.PDF](http://intranet2.minem.gob.pe/web/archivos/dgaam/certificado/RD_071_2006_MEM_AAM.PDF)
- Carvajal, M. & Perdomo, N. (2008) *Caracterización fenotípica de la cepa sulfato reductora termofílica USBA 53 aislada del manantial termal Ojo del Diablo en Paipa, Boyaca*. (Tesis de Microbiología). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Castro, M. & Gonzales, F. (2003) *Eficiencia de la biodegradación de cianuro por un consorcio microbiano aislado de aguas superficiales de quebradas que alimentan el río Llaucano, Cajamarca*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Chávez, L. (2006) *Precipitación de metales pesados con sulfuro de hidrogeno biogénico producido a partir de la degradación anaeróbica de material celulósico y xilanósico*. (Tesis de Maestría). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.
- Coyne, M. (2000) *Microbiología del Suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid, España. Ed. Paraninfo.

- Fauque, G. & Ollivier, B. (2004) *Anaerobes: The sulfate reducing bacteria as an example metabolic diversity. Microbial Diversity Bioprospecting*, 17, 169-176.
- Godoy P. & Racchumí Ch. (1999) *Efecto de las concentraciones de sulfuro y el tiempo de incubación en la capacidad oxidante de las bacterias verdes y púrpuras sulfurosas*. (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- González, M. (2006) *Bacterias reductoras de sulfato (BRS) como medida de mitigación y adaptación al cambio climático* Recuperado de [http://www.cambioclimatico.yucatan.gob.mx/energias\\_renovables/documentos\\_posgrados\\_cicy/Bacterias\\_reductoras\\_sulfato\\_Muriel\\_Gonzalez.pdf](http://www.cambioclimatico.yucatan.gob.mx/energias_renovables/documentos_posgrados_cicy/Bacterias_reductoras_sulfato_Muriel_Gonzalez.pdf)
- Gutierrez, A., Terrazas, L & Álvarez, M. (2007) Aislamiento y cultivo de bacterias sulfato reductoras acidófilas para la producción de sulfuro biogénico para la precipitación de metales pesados .*BIOFARBO*, XV: 5-12.
- Gutierrez, A., Terrazas, L & Álvarez, M. (2009) Cultivo a escala de laboratorio de bacterias sulfato reductoras acidófilas y su aplicación en procesos de biorremediación utilizadas para la precipitación de metales pesados. *BIOFARBO*, 17(1), 1-8.
- Guzmán, C. & Hurtado, A (2011) *Producción de polihidroxialcanoatos por bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de almidón contenido en cáscaras de Solanum tuberosum L.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.
- Juárez, R., Rodríguez, A., Torres, L. & Gimenez, B. (1995) *Caracterización de bacterias con capacidad sulfato-reductoras y su aplicación en el proceso de biodesulfuración de combustóleo mexicano*. Recuperado de [http://web2.semarnat.gob.mx/temas/internacional/Documents/EDA\\_OCDE\\_Mexico2013.pdf](http://web2.semarnat.gob.mx/temas/internacional/Documents/EDA_OCDE_Mexico2013.pdf)

- Jong, T. & Parry, D. (2003). Removal of sulphate and heavy metal by sulphate reducing bacteria in short-term beach scal upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research*, 37, 3379-3389.
- López, P., Aduvire, O. & Barettino, D. (2002) Tratamientos pasivos de drenajes ácidos de mina; estado actual y perspectivas de futuro. *Boletín Geológico y Minero*, 113(1), 3-21.
- López G., Caro M. & Estrada V. (2013) *Evaluación de los efectos del travertino y estiércol de bovino sobre el contenido de fierro en un tratamiento anaeróbico de aguas ácidas*. Informe Final. Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo, Perú.
- López, J. (2008). La columna de Winogradsky un ejemplo de microbiología básica en un laboratorio de educación secundaria. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*, 5(3), 373-376.
- Madigan, M., Martinko J. & Parker, J. (2004) *Biología de los Microorganismos*. 10<sup>ma</sup> ed. España: Pearson Educación.
- Malajovich M. (2014) *Guía de actividades. Biotecnología: enseñanza y divulgación*. Guía 28. Recuperado de [http:// www.bteduc.blo.br](http://www.bteduc.blo.br)
- Moreno, J., Gorriti, M., Flores, M & Albarracin, V. (2012) Micología Ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremo. *REDUCA (Biología). Serie Micológica*, 5(5), 94-109
- Nina, Ch. (2008). *Evaluación de los métodos químicos y biogénico para el tratamiento de drenaje ácido de mina a escala de laboratorio*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Soria, M., Ferrera R., Etchevers J., Alcantar G., Trinidad J., Borges L. & Pereyda G. (2001). Producción de biofertilizantes mediante biodigestión de excreta líquida de cerdo. *Terra*, 19 (4), 1-35.

Vicente, M. (2006). *Uso de bacterias sulfato-reductoras inmovilizadas para la precipitación de metales pesados*. Trabajo final de laboratorio de Procesos Biotecnológicos. Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Vierna, L. & Baeza, A. (2010) Microelectrodo selectivo de fácil construcción para la determinación de ácido sulfídrico en un sistema microbial. *Revista FABICIB*,1(14), 52-57.

## **ANEXOS**



## ANEXO 1

### **Cálculo del número de muestras para el aislamiento de consorcios de bacterias sulfato reductoras ( Alvitres, 2000)**

$$n = \frac{Z^2 p.q}{T^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90. 0,10)}{(0,8)^2}$$

$$n = 54,02 \text{ muestras}$$

Donde:

n = Tamaño de la muestra

Z = 1,96 ( $\alpha = 0,05$ ) valor estándar

p = prevalencia o presencia de microorganismos reductores de sulfato tolerantes a la acidez para la precipitación del hierro en drenaje ácido de mina (0,90)

q = 1-p, ausencia (0,10)

T = error estimado (0,08)

## ANEXO 2

### Composición de lodo enriquecido para una probeta de 1L de capacidad (Gutierrez, *et al.*, 2007, modificada por los autores)

---

Lodo residual	406,6 g (1/3 de la capacidad útil de probeta)
CaCO <sub>3</sub>	4 g
CaHPO <sub>4</sub>	4 g
Yemas de huevo	2
Papel higiénico	25 g

---

### ANEXO 3

#### Medio Postgate C modificado (Gutierrez *et al.*,2007)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,5 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	4,5 g
NH <sub>4</sub> Cl.....	1,0g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,06g
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	0,06g
Citrato de sodio.....	0,3g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,004g
Agua destilada c.s.p. ....	1000mL

**ANEXO 4**  
**Drenaje ácido sintético**  
**(López *et al.*, 2013, modificado por los autores)**

---

Fe (mgL <sup>-1</sup> )	74,924
Sulfatos (umg/ L <sup>-1</sup> )	506,86
Conductividad (uScm <sup>-1</sup> )	767
pH	2,80

---

## Anexo 5

### Límites Máximos Permisibles según Ley General de Aguas DL N° 17752

#### Art. 81

Parámetro	Unidad	Uso del Agua					
		I	II	III	IV	V	VI
Límites de Demanda Bioquímica de Oxígeno Disuelto							
Oxígeno disuelto	mg/L	3	3	3	3	5	4
D.B.O. <sup>(2)</sup>	mg/L	5	5	15	10	10	10
Límites para Sustancias Potencialmente Peligrosas							
Selenio	mg/L	0.01	0.01	0.05	----	0.005	0.01
Mercurio	mg/L	0.002	0.002	0.01	----	0.000 1	0.0002
B.P.C.	mg/L	0.001	0.001	<sup>(3)</sup>	----	0.002	0.002
Esteres Estalatos	mg/L	0.000 3	0.000 3	0.000 3	----	0.000 3	0.0003
Hierro	mg/L	0.01	0.01	0.01	----	0.000 2	0.004
Cromo	mg/L	0.05	0.05	1.00	----	0.05	0.05
Niquel	mg/L	0.002	0.002	<sup>(3)</sup>	----	0.002	<sup>(4)</sup>
Cobre	mg/L	1.0	1.0	0.50	----	0.01	<sup>(3)</sup>
Plomo	mg/L	0.05	0.05	0.1	----	0.01	0.03
Zinc	mg/L	5.0	5.0	25.0	----	0.02	<sup>(4)</sup>
Cianuro (NC)	mg/L	0.2	0.2	<sup>(3)</sup>	----	0.005	0.005
Fenoles	mg/L	0.000 5	0.001	<sup>(3)</sup>	----	0.001	0.1
Sulfuros	mg/L	0.001	0.002	<sup>(3)</sup>	----	0.002	0.002
Arsénico	mg/L	0.1	0.1	0.2	----	0.01	0.05
Nitratos(N)	mg/L	0.1	0.01	0.1	----	N.A.	N.A.
Pesticidas		<sup>(6)</sup>	<sup>(6)</sup>	<sup>(6)</sup>		<sup>(6)</sup>	<sup>(6)</sup>

I. Abastecimiento de Agua Doméstica con desinfección simple.

II. Abastecimiento de Agua Doméstica con tratamiento equivalente a procesos combinados de mezcla y coagulación, sedimentación, filtración y cloración aprobados por el Ministerio de Salud.

III. Agua usada para irrigar vegetales comestibles y agua de consumo animal.

IV. Agua en áreas de recreación con contacto directo (baños públicos y usos similares).

V. Aguas para pesca de moluscos.

VI. Aguas en áreas de preservación de fauna acuática o pesca recreacional o comercial.

(2): Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días a 20°C)

(3): Valores a ser determinados. En caso que se sospeche presencia, aplicar provisoriamente los valores de la columna V.

(4): Prueba de 96 horas, multiplicadas por 0.02.

(5): Prueba LC50 de 96 horas, multiplicada por 0.1, siendo LC50 la dosis letal que provoca la muerte o inmovilización del 50% de las especies usadas en el bioensayo.

(6) : Para cada uso, los límites a aplicar serán aquellos establecidos por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de EE. UU. (EPA).