



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ingeniería - Programa de Magister en Metalúrgica
Ingeniería Civil en Metalurgia

Evaluación del mecanismo de bioprotección en sistema de intercambio difusivo para el tratamiento de drenaje ácido de minas

Tesis para optar al grado de Magíster en Ingeniería Metalúrgica

MARTÍN ELÍAS TORREGROSA DELUCCHI
CONCEPCIÓN-CHILE
2018

Profesores Guías: Alex Schwarz Kusch
Eduardo Balladares Varela
Depto. de Ingeniería Metalúrgica, Facultad de Ingeniería
Universidad de Concepción

Autor: _____
Martín Torregrosa D.,

Profesor Guía: _____
Alex Schwarz Kusch.,

Director Programa: _____
Eduardo Balladares Varela.,

Esta tesis ha sido revisada por los señores:

Dr. Alex Schwarz Kusch Profesor Guía

Departamento Ingeniería Civil
Facultad de Ingeniería
Universidad de Concepción

Dr. Eduardo Balladares Varela Profesor Guía

Departamento Ingeniería Metalúrgica
Facultad de Ingeniería
Universidad de Concepción

Dr. Iván Ñancuqueo Cuevas
Facultad de Ingeniería y Tecnología
Universidad San Sebastián

Dr. Froilán Vergara Gutiérrez
Departamento Ingeniería Metalúrgica
Facultad de Ingeniería
Universidad de Concepción



AGRADECIMIENTOS

Primero quería agradecer a Pamela, Alejandra y a don Rene, del laboratorio de hidráulica y ambiental por su ayuda durante la ejecución de los experimentos. También al profesor Alex por la disponibilidad, consejos que me orientaron a un mejor desempeño en la investigación.

Por otro lado, agradecer también al profesor Iván, Camila y Daniela de la Universidad San Sebastián, por la ayuda y enseñanza en los análisis biológicos.

Por último, mis sinceros agradecimientos a toda mi familia, por su apoyo incondicional. A mi polola Valentina por su apoyo en esta última fase del magister.



RESUMEN

La actividad minera en Chile es fundamental para la economía, especialmente la extracción de cobre. Sin embargo, derivan a miles de toneladas de desechos lo cual puede ser una fuente potencial de generación de drenaje ácido por la oxidación de los minerales sulfurados por entrar en contacto con el agua y el aire. Además de su peligrosidad para el ambiente, estas concentraciones contienen altas cantidades de cobre, las cuales podrían recuperarse, por lo que los tratamientos de remediación deberían centrarse tanto en el aspecto ambiental como en el económico.

Este proyecto se centra en los tratamientos pasivos utilizando reactores bioquímicos con sistemas de intercambio difusivo (SID) los cuales evitan el contacto directo de los microorganismos con el drenaje ácido, como también generan un mecanismo de bioprotección a los agentes químicos lo cual permite remediar drenajes más ácidos y con una carga mayor de metales.

Para el desarrollo de la investigación se utilizan reactores a escala banco, la cual evalúa el mecanismo de bioprotección variando los grosores verticales de las capas a los siguientes valores en duplicado: 2.5 cm, 5 cm y 7.5 cm. Se trabajó en proceso continuo durante 225 días de los cuales 59 días fueron con alimentación de solución de sulfato de sodio, mientras que 166 días fue con drenaje ácido de mina DAM.

Respecto a los planteamientos propuestos, se puede concluir que una capa de grosor vertical de 2.5 cm presenta fallas en el sistema de bioprotección conduciendo una alta concentración de metales tóxicos como el cobre y el zinc, baja concentración celular presente en la digestión anaerobia, alta concentración de sulfatos, bajo pH y por último un alto ORP. Una vez que se alimentó con DAM en los reactores, la tasa de remoción de sulfato disminuyó debido a la presencia de metales tóxicos, como también disminuyó la concentración de sulfuros en el efluente. La concentración celular de la salida iba disminuyendo a medida que pasaba los meses debido a que aquellas bacterias están siendo afectadas por el flujo advectivo del DAM.

ABSTRACT

Mining activity in Chile is fundamental for the economy, especially copper extraction. However, they derive thousands of tons of waste which can be a potential source of generation of acid drainage due to the oxidation of the sulfur minerals due to contact with water and air. In addition to their dangerousness to the environment, these concentrations contain high amounts of copper, which could be recovered, so remediation treatments should be focused as much as improvement to capture copper as well.

In this project, it focuses on passive treatments using biochemical reactors with diffusive exchange systems (SID) which avoid direct contact of microorganisms with acid drainage, as well as generating a mechanism of bioprotection to chemical agents which allows to remediate drainages more acids and with a greater load of metals.

For the development of the research, reactors are used at bench scale, which evaluates the mechanism of bioprotection by varying the vertical thicknesses of the layers to the following values in duplicate: 2.5 cm, 5 cm and 7.5 cm. A continuous process was carried out during 225 days of which 59 days were fed with sodium sulphate solution, while 166 days were with DAM.

Regarding the proposals proposed, it can be concluded that a layer with a vertical thickness of 2.5 cm has flaws in the bioprotection system leading to a high concentration of toxic metals such as copper and zinc, low cellular concentration present in anaerobic digestion, high concentration of sulphates, low pH and finally a high ORP. Once DAM was fed into the reactors, the sulfate removal rate decreased due to the presence of toxic metals, as well as the concentration of sulfides in the effluent. The cellular concentration of the output was decreasing as the months passed due that those bacteria are being affected by the DAM advective flow.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE TABLAS	xi
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Motivación	1
1.2 Hipótesis	2
1.3 Objetivo general	2
1.3.1 Objetivos específicos.....	2
1.4 Plan de trabajo	3
CAPÍTULO 2	4
DRENAJE ÁCIDO DE MINAS	4
2.1 Generación del DAM	4
2.2 Consecuencias ambientales	6
2.3 Drenaje ácido de minas en Chile	6
CAPÍTULO 3	8
ESTRATEGIAS DE REMEDIACIÓN DEL DAM Y SU FUNCIONAMIENTO	8
3.1 Introducción	8
3.2 Estrategias de remediación del DAM.....	8
3.2.1 SAPS.....	9
3.2.2 Biorreactor reductor de sulfato (BCR).....	10
3.3 Sistema de intercambio difusivo (SID).....	10
3.3.1 Mecanismo de bioprotección	11
3.4 Microbiología dentro de un bioreactor	16

3.5 Ecuaciones de la digestión anaerobia	20
3.6 Análisis de la bioenergética de la reducción de sulfato	22
3.7 Composición de la materia orgánica de la zona reactiva	26
3.8 Comportamiento de los metales	27
3.8.1 Precipitación de metales como sulfuro.....	27
3.8.2 Neutralización con químicos.....	27
3.8.3 Manganeseo	28
3.8.4 Aluminio.....	28
3.8.5 Hierro	29
3.8.6 Tasa de remoción de metales	31
CAPÍTULO 4	33
DISEÑO DE REACTORES Y MÉTODOS DE ANÁLISIS	33
4.1 Introducción	33
4.2 Equipos	33
4.3 Diseño de reactor	33
4.3.1 Zona conductiva.....	36
4.3.2 Zona Reactiva.....	36
4.3.3 Composición del DAM	37
4.3.4 Caudal de alimentación.....	38
4.3.5 Criterio de uso del DAPRB	43
4.4 Ensayo experimental	43
4.4.1 ORP	44
4.4.2 pH.....	44
4.4.3 Sulfato	45
4.4.4 Sulfuro.....	45
4.4.5 Conductividad eléctrica.....	45
4.4.6 Metales Disueltos	45
4.4.7 Cuantificación Celular.....	46
4.4.8 Identificación molecular de bacterias en el efluente	47

4.5 Análisis de las capas reactivas	48
CAPÍTULO 5	50
RESULTADOS Y DISCUSIONES	50
5.1 Proceso batch	50
5.1.1 Análisis de consumo de sulfato	50
5.2 Análisis de Efluente	52
5.2.1 Análisis de sulfatos y otros del efluente.....	52
5.2.2 Análisis de metales del efluente	58
5.2.3 Cambio microbiológico.....	61
5.3 Análisis de capas	62
5.3.1 Análisis de pH y ORP	62
5.3.2 Análisis de metales y sulfato.....	64
5.3.3 Análisis biológico.....	66
5.3.4 Evaluación del mecanismo de bioprotección.....	67
5.4 Detección de bacterias	68
5.5 Comportamiento de flujos	71
CAPITULO 6	73
CONCLUSIONES Y COMENTARIOS	73
6.1 Conclusiones	73
6.2 Recomendaciones	74
CAPÍTULO 7	76
BIBLIOGRAFÍA	76
CAPÍTULO A	83
ANEXOS	83
A.1 Materiales usados para el proyecto	83
A.2 Tablas de resultados	84
A.2.1 Proceso Batch	84
A.2.2 Análisis de efluente	85

A.2.3 Metales en el efluente.....	91
A.3 Análisis de capas	97
A.3.1 Metales y sulfatos en las capas.....	97
A.3.2 Análisis de ORP y pH en las capas.	98
A.3.3 Código genético.....	100



INDICE DE FIGURAS

Figura 3. 1. Sistemas reductores y de producción de alcalinidad.....	9
Figura 3. 2. Reactor reductor de sulfato	10
Figura 3. 3. Representación de una barrera permeable reactiva de intercambio difusivo....	11
Figura 3. 4. Modelo conceptual del mecanismo de bioprotección	12
Figura 3. 5. Modelo que representa un DAPRB.....	16
Figura 3. 6. Proceso microbiológico de un bioreactor anaerobico	17
Figura 3. 7. Proceso de la digestión anaerobia.	19
Figura 4. 1. Diseño de reactor de capa de 7.5 cm.....	34
Figura 4. 2. Diseño de reactor de capa de 5 cm.....	35
Figura 4. 3. Diseño de reactor de capa de 2.5 cm.....	35
Figura 4. 4. Representa el comportamiento de la eficiencia utilizando distintas tasas de remoción.....	42
Figura 4. 5. Etapas del proceso experimental.....	44
Figura 4. 6. Equipo de contador de colonias	47
Figura 4. 7. Procedimiento de identificación de bacterias.....	48
Figura 4. 8. Puntos de muestreo de la zona reactiva del reactor R 7.5 A.	49
Figura 5. 1. Consumo de solución sulfatada en el proceso batch.	50
Figura 5. 2. Variaciones de concentraciones de sulfatos y sulfuros, pH, ORP, tasa de remoción de sulfatos y conductividad.	53
Figura 5. 3. Variaciones de concentraciones de metales.	59
Figura 5. 4. Variación de la cuantificación celular (UFC/ml) en el efluente con DAM.	61
Figura 5. 5. Análisis de capas de pH y ORP	63
Figura 5. 6. Análisis de concentración de metales y sulfato.....	65
Figura 5. 7. Concentración celular de los reactores R 2.5 A, R 5 A y R 7.5 A.....	67
Figura A. 1. Jeringa de alimentación.....	83
Figura A. 2. Bomba de trasvasije.	83
Figura A. 3. Caja y jarra anaerobia.....	84
Figura A. 4. Perforaciones para los puntos de muestreo en los reactores R 2.5 A, R 5 A y R 7.5 A.	84

INDICE DE TABLAS

Tabla 3. 1. Ejemplos de bioprotección basada en gradiente.....	12
Tabla 3. 2. Productos Metabólicos liberados durante la digestión anaerobia de diferentes polisacáridos por cepas puras de bacterias anaerobias	18
Tabla 3. 3. Semireacciones para reducción biológica de sulfato.....	23
Tabla 3. 4. Calculo del ΔG_p	25
Tabla 3. 5. Materiales reactivos usados en sistemas Batch para tratamiento del DAM.....	26
Tabla 3. 6. Tasa de remoción de sulfatos y de metales.	31
Tabla 3. 7. Concentraciones de metales (mg/L) de los DAM de distintos autores	32
Tabla 4. 1. Composición de la porción orgánica del sustrato.....	36
Tabla 4. 2. Caracterización química del DAM preparado en el laboratorio.....	37
Tabla 4. 3. Componentes del drenaje ácido preparado en el laboratorio de hidráulica y medio ambiente.	38
Tabla 4. 4. Caudales según el tiempo de residencia de distintas investigaciones.	39
Tabla 4. 5. Resumen de datos de las investigaciones presentados en el laboratorio de hidráulica y medio ambiente.....	40
Tabla 5. 1. Medición concentración de sulfato de la mezcla.....	51
Tabla 5. 2. Tasa de remoción de sulfatos con alimentación sulfatada.....	54
Tabla 5. 3. Tasa de remoción de sulfatos con alimentación de DAM.....	54
Tabla 5. 4. Combinaciones del valor p para la tasa de remoción de sulfatos con alimentación sulfatada.	55
Tabla 5. 5. Combinaciones para la tasa de remoción de sulfatos con alimentación con DAM.....	55
Tabla 5. 6. Efecto de inhibición de alimentación con DAM.	56
Tabla 5. 7. Estadística descriptiva de la tasa de remoción de metales ($\text{mol}/\text{m}^3/\text{día}$).....	60
Tabla 5. 8. Disminución de la concentración celular (UFC/mL).	61
Tabla 5.9. Microorganismos de los reactores.	69
Tabla 5.10. Comportamiento de flujos.	71

Tabla A. 1. Resultados de sulfatos (mg/L) batch 1.	85
Tabla A. 2. Resultados de sulfatos (mg/L) batch 2.	85
Tabla A. 3. Resultados de alimentación continua de DAM y solución sulfatada (mg/L). ...	86
Tabla A. 4. Resultados de tasa de remoción de sulfato ($\text{mol/m}^3/\text{días}$).	87
Tabla A. 5. Resultados de ORP (mV).	88
Tabla A. 6. Resultados de pH.	89
Tabla A. 7. Resultados de Conductividad	90
Tabla A. 8. Resultados de cobre en el efluente (mg/L)	91
Tabla A. 9. Resultados de Manganeseo en el efluente (mg/L).....	92
Tabla A. 10. Resultados de hierro en el efluente (mg/L)	93
Tabla A. 11. Resultados de Aluminio en el efluente (mg/L).....	94
Tabla A. 12. Resultados de Zinc en el efluente (mg/L).....	95
Tabla A. 13. Resultados de Calcio en el efluente (mg/L).....	96
Tabla A. 14. Concentración de cobre en las capas	97
Tabla A. 15. Concentración de Zinc en las capas.....	97
Tabla A. 16. Concentración de hierro en las capas	97
Tabla A. 17. Concentración de calcio en las capas	98
Tabla A. 18. Concentración de sulfatos en las capas.....	98
Tabla A. 19. Análisis de ORP	99
Tabla A. 20. Análisis de pH	99
Tabla A. 21. Código genético del 16S ribosomal.....	100

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Motivación

La industria extractiva minera es una de las actividades económicas más importantes de Chile, con una participación en torno al 11% del Producto Interno Bruto, además de constituir el 51,4% de las exportaciones totales (Cochilco, 2014). A nivel internacional, Chile es el primer productor de cobre del mundo y el tercero en molibdeno, entre otros (Cochilco, 2014). No obstante esta actividad minera genera gran cantidad de desechos y residuos. Algunos de estos desechos son altamente peligrosos y contaminantes en potencia.

Los desechos de minas constituyen un peligro potencial para el medio ambiente, principalmente si estos contienen sulfuros de metal. Cuando los residuos son expuestos al oxígeno y a agua de deshielo como sucede con los desechos de Codelco en su división El Teniente, se forma un drenaje ácido rico en sulfatos y metales como: Fe, Al, Mn, Zn, Cu y Pb. Estos elementos en elevadas concentraciones son nocivos para la actividad biológica, contaminan los cauces y, además, esas aguas pueden llegar a dañar la estructura y la cimentación de construcciones.

Existen métodos para tratar el DAM, entre los que se encuentran los métodos pasivos, como los biorreactores que usan bacterias reductoras de sulfato (BRS). Entre los tipos de biorreactor se encuentran los que usan un sistema homogéneo y aquellos con un sistema de intercambio difusivo (SID). Este último separa una zona reactiva, con menor conductividad hidráulica y en donde se desarrollan los microorganismos, de la zona conductiva, con mayor conductividad hidráulica, con la finalidad de proteger a los microorganismos del transporte advectivo del DAM y promover el mecanismo de bioprotección. Sin embargo, se desconoce el efecto de la variación de las capas reactivas sobre este mecanismo por lo que es muy importante investigarlo para determinar cómo afecta a la comunidad microbiana.

1.2 Hipótesis

Si el espesor de la capa reactiva es muy pequeño, disminuirá la eficiencia de remoción de metales debido a que no se podrá mantener el mecanismo de bioprotección a los agentes químicos.

En reactores de intercambio difusivos las capas reactivas de mayor grosor pueden disminuir la tasa volumétrica de remoción de sulfatos debido a que tienen una menor superficie específica de transferencia de masa.

1.3 Objetivo general

Evaluar el efecto del espesor vertical de capas sobre el mecanismo de bioprotección en base a gradientes químicos.

1.3.1 Objetivos específicos

Determinar el efecto de los metales en la alimentación sobre las tasas volumétricas de remoción de sulfato y metales de los reactores con diferentes espesores de material reactivo en un proceso continuo.

Monitorear la población microbiana anaeróbica e identificar las bacterias reductoras de sulfato en el efluente de los bioreactores en un proceso continuo.

Comparar la tasa volumétrica de remoción de sulfato de los reactores con diferentes espesores de material reactivo en un proceso batch con solución sulfatada.

1.4 Plan de trabajo

El plan de trabajo se compuso de las siguientes etapas: investigación bibliográfica, diseño y construcción de los reactores de banco, fase de adaptación, proceso batch, proceso continuo con alimentación de solución sulfatada, proceso continuo con alimentación con drenaje ácido, desarme de los reactores y análisis de resultados. La primera etapa consistió en investigar sobre los estudios más recientes sobre tratamiento biológico activo de DAM. En la segunda etapa se diseñó los reactores, se cotizó los materiales, se tamizó la arena, se colectó la tierra de hoja, el estiércol, se montó el sistema, entre otros. La tercera etapa fue el proceso de adaptación, en que se dejó durante 20 días los reactores con una solución de sulfato de sodio. La cuarta etapa consistió en el proceso batch, realizado dos veces. En la quinta etapa, se alimentó con solución sulfatada durante aproximadamente dos meses y la sexta etapa fue una alimentación con DAM durante casi 6 meses. Por último, la séptima etapa consistió en analizar el comportamiento de flujos de los reactores, el desarme y posterior análisis de todos los resultados de las etapas anteriores.

CAPÍTULO 2

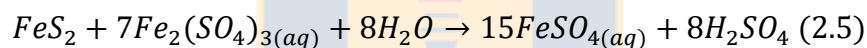
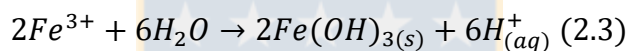
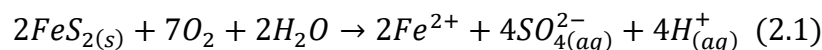
DRENAJE ÁCIDO DE MINAS

2.1 Generación del DAM

La formación de drenaje ácido de minas (DAM) es un impacto ambiental que se produce cuando se conjugan cuatro factores (INAP, 2012):

- La existencia de agua, ya sea de origen natural, como las aguas lluvia, subterráneas o de ríos, agua de proceso, tal como el agua utilizada para transportar los relaves hasta los tranques, o el agua de lavado, utilizada por ejemplo para lavar las instalaciones;
- Segundo, que dicha agua entre en contacto con roca o material que ha sido removido de la mina y almacenado en botaderos, material que ha sido tratado (relaves, rípios de lixiviación) y almacenado o depositado, la roca superficial de la mina misma que ha quedado al descubierto tras la explotación, ya sea de rajo abierto o subterránea;
- Tercero, que la roca o material que entra en contacto con el agua, y en presencia de oxígeno, debe tener una composición tal que al producirse dicho contacto se produzca una reacción química de oxidación que genera ácido. Esto es muy común cuando aguas de acidez neutra entran en contacto con rocas de tipo pirítico. Debe tenerse en cuenta también la capacidad de tampón de la roca que acompaña al mineral, la que en condiciones específicas, podría neutralizar el ácido generado;
- El cuarto factor es la existencia de microorganismos, junto a la disponibilidad de dióxido de carbono, nutrientes y la presencia de elementos traza, que permiten el desarrollo de dichos microorganismos y su intervención catalizadora en el proceso de oxidación.

Un ejemplo típico de formación del drenaje ácido de mina es el de la pirita, mencionado anteriormente, en cuyo caso se expone a las condiciones fisicoquímicas que prevalecen en la superficie terrestre, es decir, en presencia de abundante agua y gases atmosféricos, dando lugar a ácido sulfúrico e ion férrico. Este proceso produce un fluido con pH muy bajo (1-5), Eh alto ($>+0,6$ V), elevada conductividad ($>800\mu\text{S}/\text{cm}$), y elevada concentración de sulfatos y diversos metales y metaloides (Fe, Pb, Zn, Cu, Cd, Cr, Ni, Co, Al, Sb, As) (Carretero, 2007). Las siguientes reacciones ilustran el proceso para la pirita (Singer y Stumm, 1970; Evangelou, 1995, 1998; Stumm y Morgan, 1996; Thomas *et al.*, 2003; Jennings *et al.*, 2008; citados en Jacobs *et al.*, 2014):



En la reacción 2.1 muestra la generación de acidez y sulfato (ácido sulfúrico) a partir de la oxidación de la pirita. Mientras que la reacción 2.2 representa la oxidación de hierro ferroso a férrico una vez que hay suficiente oxígeno atmosférico o disuelto en agua. La reacción 2.3 ocurre a pH cercano a 3, y sirve como fuente de ión férrico en solución, siendo el paso mayor en la liberación de sulfato y acidez (ácido sulfúrico) al ambiente. Además, el ión férrico puede reaccionar con más pirita para producir más protones, como se ve en la reacción 2.4. La reacción 2.5 indica la creciente producción de ácido sulfúrico a medida que pirita sin reaccionar va siendo oxidada en agua. Luego, comunidades microbianas fijas al mineral sulfurado catalizan la oxidación de pirita y la generación de ácido (Jacobs *et al.*, 2014).

2.2 Consecuencias ambientales

Los impactos ambientales generados por el DAM son variados: se solubilizan parte de los metales contenidos en los materiales lavados y dichos metales son transportados por las aguas hasta zonas agrícolas, fuentes de agua potable o los sedimentos de ríos y o el mar; la existencia de aguas ácidas con contenido metálico puede eliminar, dañar o alterar el hábitat de los cursos de agua superficiales; las aguas ácidas de mina pueden percolar hasta las napas subterráneas, alterando su composición; las aguas ácidas pueden dañar instalaciones de infraestructura tales como conductos de alcantarillado, rellenos sanitarios, fundaciones, etc (INAP, 2012).

2.3 Drenaje ácido de minas en Chile

La explotación y procesamiento de los recursos minerales no sólo generan una gran cantidad de minerales procesados. Por ejemplo, en el caso del cobre, la producción del año 2015 fue de 5,8 millones de toneladas, lo cual conlleva la generación de un gran volumen de residuos mineros (Sernageomin, 2015). Según el departamento de relaves del Servicio Nacional de Geología y Minería en diciembre del año 2016 se tiene registro de 696 depósitos de relaves los cuales se encuentran distribuidos entre las regiones I y VII, además de la región de Aysén. La mayor parte de estos se encuentran en la regiones III y IV representando 22% y 52% del total, respectivamente. Estos centran la atención desde el punto de vista ambiental ya que, dependiendo de la constitución de los mismos, constituyen una fuente potencial de la generación de drenaje ácido de mina (DAM).

El drenaje ácido de mina en Chile no había sido estudiado hasta el año 2000, en que la Unidad Ambiental del Ministerio de Minería, realizó el estudio “Catastro del Potencial de Generación de Aguas Ácidas de Minas y Elaboración de Guía Metodológica para la Prevención y Control del Drenaje Ácido de Minas en Chile”, cuyo objetivo principal fue elaborar un diagnóstico y análisis del potencial de generación de drenaje ácido de minas en Chile, desde la I a la VI Región (INAP, 2012).

De los cuatro factores mencionados en el capítulo 2.1, el oxígeno y las bacterias están presentes en todo el territorio nacional y es difícil asociar su mayor o menor presencia a las distintas zonas geográficas del país. De esta manera, el riesgo geográfico fue a partir de: presencia de minerales con potencial de generación de drenaje ácido y presencia de agua evaluada a partir de las precipitaciones cuya distribución geográfica es definida analizando la distribución geográfica del valor promedio anual (mm/año). Por último, para evaluar el riesgo de la presencia de minerales sulfurados precursores de drenaje ácido, el país se dividió en 12 franjas geológicas cuyas características metalogénicas son comparables (INAP, 2012).

A partir de este análisis, el estudio arrojó que la franja metalogénica de Cobre Molibdeno del Mioceno Superior-Plioceno presenta el mayor riesgo de drenaje ácido donde se encuentran las siguientes faenas: Cía. Minera Pelambres, Codelco Chile-División Andina, Cía. Minera los Bronces y Codelco Chile-División El Teniente. Estas faenas se encuentran ubicada en las regiones de: O'Higgins, Metropolitana, Valparaíso y Coquimbo. Todas ellas ubicada en las zonas de la precordillera y cordillera de Los Andes donde presenta una mayor cantidad de precipitaciones. Mientras que las franjas con menor riesgo de generación de drenaje ácido son aquellas que se ubican en las primeras regiones del país debido a su bajas precipitaciones como por ejemplo es el caso de la franja metalogénica de cobre-Plata-Oro del Paleoceno en la que se encuentran: Compañía minera Cerro Dominador, Compañía Minera Lomas Bayas, Cía Minera Meridian y Compañía Minera Soledad, las cuales se ubican en la región de Antofagasta (INAP, 2012).

CAPÍTULO 3

ESTRATEGIAS DE REMEDIACIÓN DEL DAM Y SU FUNCIONAMIENTO

3.1 Introducción

En este capítulo se mostrará las estrategias de remediación del DAM, con foco en los tratamientos pasivos que usan reactores bioquímicos. Se explicarán algunas de las tecnologías que existen y se enfatizará en la tecnología de barrera permeable reactiva de intercambio difusivo y el mecanismo de bioprotección. Por otro lado, se mencionarán los microorganismos que participan en el proceso de la reducción de sulfato.

3.2 Estrategias de remediación del DAM

Las estrategias de remediación del DAM se clasifican en métodos activos y pasivos (Jamil y Clarke, 2013), en base en sus características de costos y necesidad de control. En el caso de los primeros, la necesidad de control y sus costos son altos, pero con la ventaja de que la recuperación de metales es alta, al revés de lo que sucede con los métodos pasivos, en los que la recuperación es baja, pero poseen la gran ventaja de que el costo y la necesidad del control es menor que en el caso activo. Los métodos de tratamiento pasivo más utilizados son los humedales artificiales (aerobios o anaerobios), los drenajes anóxicos de caliza, los sistemas de producción de alcalinidad, y cuando el problema se manifiesta en aguas subterráneas, las barreras reactivas permeables. Para este proyecto resultan relevantes los métodos pasivos utilizando reactores bioquímicos, entre los cuales se pueden encontrar los reactores homogéneos reductores de sulfato (BRS), los reactores con sistema reductor y de producción de alcalinidad y, por último, los reactores con sistema de barrera permeable reactiva de intercambio difusivo.

3.2.1 SAPS

Conocido como Sistema de producción sucesivo de alcalinidad (SAPS) y por sus siglas en inglés (RAPS), se usa para tratar agua ácida de mina con alto contenido de metal (ver Figura 3.1). En este sistema el agua fluye verticalmente a través del lecho. Primero, el agua ácida fluye a través de la parte de compost de baja conductividad hidráulica del RAPS, donde se consume oxígeno disuelto gracias a microorganismos, y el hierro férrico (Fe^{3+}) se reduce a hierro ferroso (Fe^{2+}). Como resultado, el agua se vuelve anóxica y fluirá a través de la capa de piedra caliza dando como resultado agua alcalina sin precipitación de hierro en la capa alcalina (Matthies, 2010).

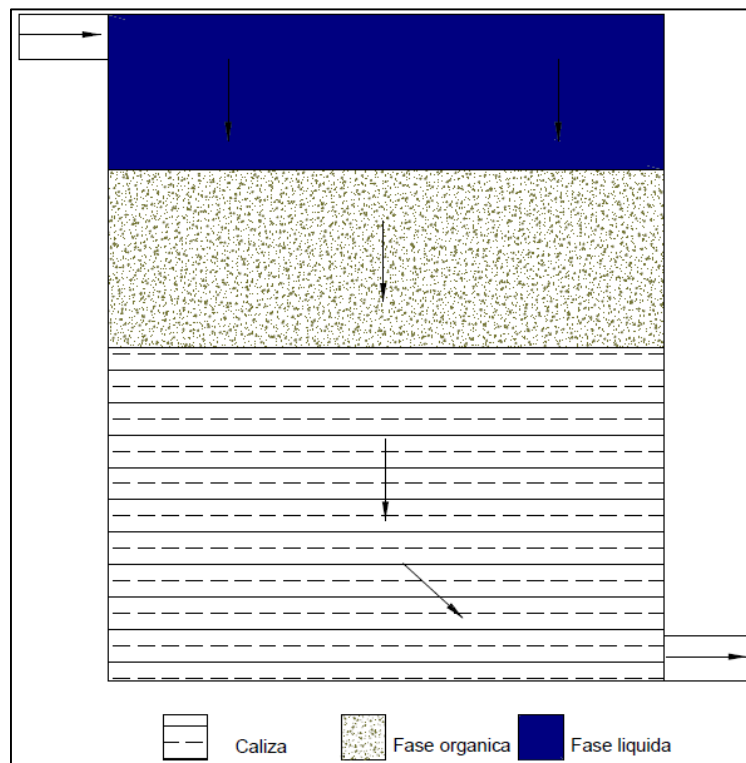


Figura 3. 1. Sistemas reductores y de producción de alcalinidad (Doshi, 2006).

3.2.2 Biorreactor reductor de sulfato (BCR)

Se define como “un sistema de tratamiento que utiliza un sustrato orgánico (donador de electrones) para conducir reacciones microbianas y químicas que reducen las concentraciones de metales, acidez, y sulfato en un DAM”. (ITRC, 2012)

El reactor tipo BCR es un sistema parecido al RAPS, pero se diferencian en que la zona reactiva es una mezcla homogénea de material orgánico, tales como chips de madera, estiércol y paja, más la piedra caliza que toma el rol de neutralización del DAM (ver Figura 3.2) (ITRC, 2012).

Los BRS para tratar los DAM aprovechan procesos microbianos de la digestión anaerobia (ver capítulo 3.4) que transforman los contaminantes e incrementan el pH, catalizados por distintos tipos de bacterias: Fermentadoras, degradadores de celulosa (encargadas de degradar los polímeros naturales más complejos) y, por último, las bacterias reductoras de sulfato. Este último tipo de bacterias son las que producen sulfuro lo que permite remover metales divalentes como, cobre, zinc, fierro, y hacerlos precipitar como sulfuros de metal. (ITRC, 2012)

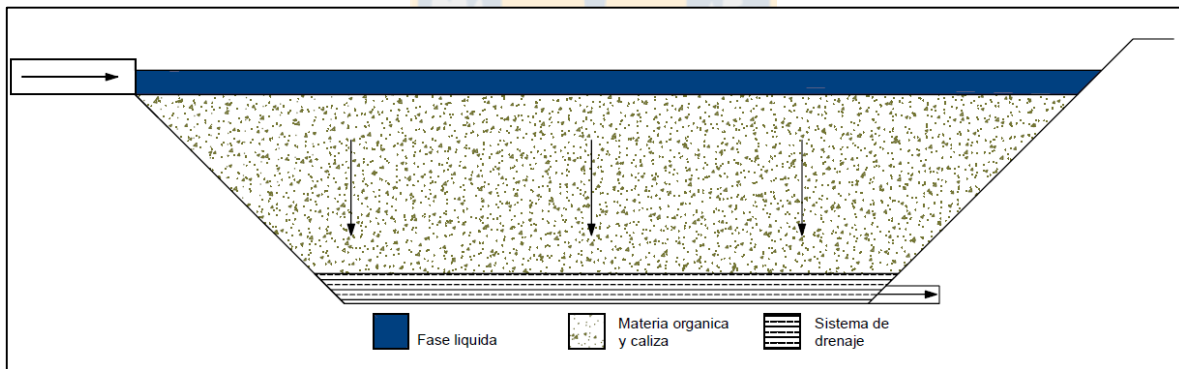


Figura 3. 2. Reactor reductor de sulfato (ITRC, 2012)

3.3 Sistema de intercambio difusivo (SID)

Con el propósito de atenuar la toxicidad del drenaje ácido para los microorganismos involucrados en el tratamiento, Schwarz y Rittmann (2010) propusieron una variación a la barrera permeable reactiva tradicional y plantearon la distribución de material reactivo en capas, la cual se denomina barrera permeable reactiva de intercambio difusivo, como se

observa en la Figura 3.3. En este sistema se separa la zona reactiva, con menor conductividad hidráulica, y en donde se desarrollan los microorganismos, de la zona conductiva, con mayor conductividad hidráulica. El sulfuro producido en la zona reactiva migra por difusión a la capa conductiva (arena), donde precipitan los metales. Este sistema evita el contacto directo de los microorganismos con el drenaje ácido, permitiendo mayor actividad microbiana.

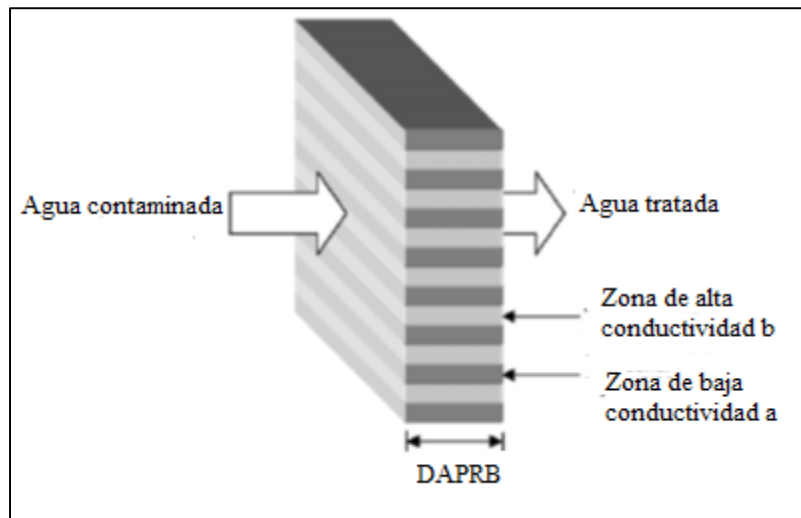


Figura 3. 3. Representación de una barrera permeable reactiva de intercambio difusivo (Schwarz y Rittmann, 2010).

3.3.1 Mecanismo de bioprotección

Las comunidades microbianas pueden aprovechar un mecanismo general de bioprotección (Schwarz y Rittmann, 2006a, b, c) en el que algunas bacterias inducen gradientes químicos al producir productos que se unen al metal tóxico, reduciendo así la toxicidad a niveles no inhibitorios para gran parte de los microorganismos. En la Figura 3.4a muestra el modelo conceptual del mecanismo de bioprotección basado en gradientes químicos que involucran bacterias reductoras de sulfato. El flujo de un metal tóxico (M^{2+}) se desintoxica por un flujo opuesto de sulfuro (S^{2-}) producido biológicamente dentro de una zona reactiva. Como resultado del transporte difusivo, resistencia e inmovilización (por ejemplo la reacción de precipitación), se desarrollan gradientes de concentración. Mientras que la Figura 3.4b

muestra los perfiles de concentración de metal u_M y sulfuro u_L característicos para la condición límite considerada. Esta figura servirá como modelo para calcular el criterio de estabilidad de un sistema dominado por la difusión, como se explicará más adelante. Mientras que la Tabla 3.1 muestra ejemplos de gradientes basados en la bioprotección.

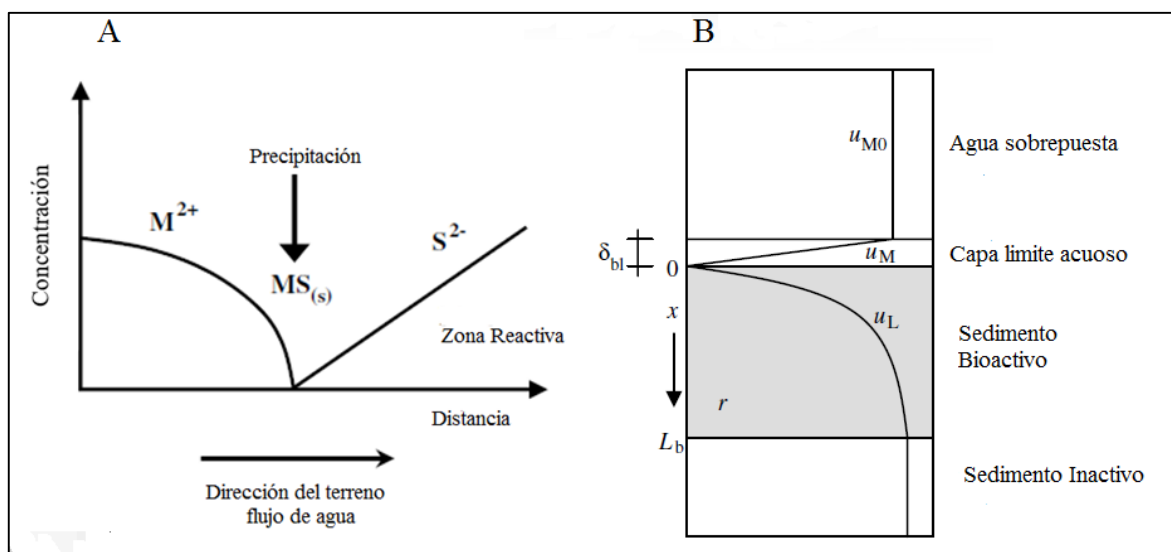


Figura 3. 4. Modelo conceptual del mecanismo de bioprotección (Schwarz y Rittmann, 2006a)

Tabla 3. 1. Ejemplos de bioprotección basada en gradiente (Schwarz y Rittmann, 2006a)

Reacción bioquímica	Especie producida	Ejemplos de sustancias tóxicas	Complejos / sólidos no tóxicos
Reducción de sulfato	Sulfuro (principalmente en forma de HS^-)	Zn^{2+} , Ni^{2+} , As^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}	ZnS(s) , NiS(s) , CdS(s) , PbS(s) , CuS(s) , $\text{As}_2\text{S}_3(\text{s})$, HgS(s) , Zn(HS)_2 , ZnS(HS)^- , CdHS^+ , Cd(HS)_2
Oxidación orgánica	Carbonato (principalmente en forma de HCO_3^-)	Zn^{2+} , Pb^{2+}	$\text{ZnCO}_3(\text{s})$, $\text{PbCO}_3(\text{s})$
Generación base	Hidróxido (OH^-)	Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{3+} , U^{4+} , Np^{4+}	$\text{Zn(OH)}_2(\text{s})$, $\text{Cu(OH)}_2(\text{s})$, $\text{Pb(OH)}_2(\text{s})$, $\text{Ni(OH)}_2(\text{s})$, $\text{Cr(OH)}_3(\text{s})$, $\text{UO}_2(\text{s})$, $\text{Np(OH)}_4(\text{s})$, Cd(OH)^+ , Pb(OH)^+ , Hg(OH)^+ , Hg(OH)_2 , Cu(OH)^+

El diseño preliminar de una barrera reactiva permeable activa por difusión (DAPRB), se emplea resultados analíticos (Schwarz y Rittmann, 2006a) cuyo modelo incluye las siguientes características críticas (ver Figura 3.4b):

- El sulfuro se genera a una tasa promedio constante r a lo largo del sedimento activo, que está representado por una zona bioactiva de espesor L_b , siempre que μ_M sea cero.
- El agua sobrepuesta está bien mezclada, teniendo una constante concentración de metal μ_{M0} .
- La difusión del metal hacia el sedimento está controlada por una capa límite acuosa de espesor δ_{bl} , y su flujo hacia el sedimento es $D_M (u_{M0} - u_M(x=0)) / \delta_{bl}$, según la primera Ley de Fick. Podemos desprestigiar la concentración de metal en el borde del sedimento superior en este cálculo, porque u_M en equilibrio con la fase sólida en $x = 0$ se acerca a cero.
- En el borde superior de la zona bioactiva, el metal y el sulfuro se encuentran y la formación del sólido es instantánea siempre que ambas especies estén disponibles. De nuevo, suponemos una estequiometría molar 1: 1 para esta reacción.
- El metal y el sulfuro tienen contra-gradientes causados por su consumo en el límite superior de la zona bioactiva.
- El sulfuro se transporta hacia el límite superior por difusión. En estado estacionario, el flujo del sulfuro hacia el límite es equivalente a la tasa de sulfuro producido dentro del sedimento por área de unidad de sedimento, dado por L_{br} .
- La condición que se muestra es un caso límite para un máximo de resistencia, que ocurre cuando los gradientes de concentración del metal u_M y del sulfuro u_L solo se encuentran en el límite superior de la zona bioactiva.

A partir de lo mencionado anteriormente, se puede calcular el criterio de estabilidad de un sistema de resistencia por difusión (ver Figura 3.5) como se aprecia en la ecuación 3.1:

$$q_D = \frac{rL_b\delta_{bl}}{u_{M0}D_M} \geq 1 \quad (3.1)$$

Donde:

q_D = Criterio de estabilidad de un sistema dominado por la difusión (-)

δ_{bl} = Espesor de la capa límite acuosa (L)

u_{M0} = Concentración total de metal soluble en la porción superpuesta bien mezclada de la columna de agua (caso de sedimento) (ML^{-3})

L_b = Espesor de la zona de sedimentos bioactivos (L)

D_M = Coeficiente de difusión del metal (L^2/T)

Mientras que para calcular la estabilidad de la advección (ver Figura 3.5) se usa la siguiente ecuación:

$$q_A = \frac{rD_L}{u_{M0}v^2} \geq 1 \quad (3.2)$$

Donde:

q_A = Criterio de estabilidad de un sistema dominado por la advección.

r = Velocidad constante de producción de sulfuros ($ML^{-3}T^{-1}$)

D_L = Coeficiente de difusión efectivo del ligando en la barrera reactiva permeable (L^2T^{-1})

u_{M0} = Concentración total de metal soluble en la porción superpuesta bien mezclada de la columna de agua (caso de sedimento) (ML^{-3})

v = Velocidad del agua subterránea (LT^{-1})

A continuación, realizamos un ejemplo de cálculo preliminar para confirmar si se requiere un sistema DAPRB utilizando el criterio de resistencia (Schwarz y Rittmann, 2006a). A partir de los datos disponibles, Schwarz y Rittman (2010) evaluaron la ecuación 3.2 con los siguientes valores: u_{M0} igual a $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, D_L es de $10^{-4} \text{ m}^2 \text{ d}^{-1}$, v es igual a $2.77 \times 10^{-2} \text{ m d}^{-1}$, r es $10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. En este caso q_A fue de 0.013, lo que indica que un PRB uniforme no podría desintoxicar y que se necesita un DAPRB.

En la Figura 3.5 se muestra las ubicaciones críticas que enfrentan las concentraciones más altas de metal en un sistema DAPRB representados en 1 y 2. Si los criterios de resistencia química no se cumplen en estas ubicaciones, la retroalimentación negativa entre la inhibición y la resistencia dará lugar a una falla total del sistema. La velocidad de capa K-baja (capa de baja conductividad hidráulica) v_1 es la velocidad del agua subterránea relevante para la ubicación 1. Como v_1 depende directamente de la relación de conductividades hidráulicas de la capa K-alta a baja, esta relación es una variable fundamental para garantizar el cumplimiento del criterio de estabilidad en la ubicación 1. Para este diseño, suponemos una relación de conductividad hidráulica de 100, que proporciona velocidades de 20 m/y y 0.2 m/y para las capas de alta y baja conductividad, respectivamente. Es importante destacar que el régimen de flujo en la ubicación 1 no está totalmente dominado por la advección, por lo que requiere la evaluación del siguiente criterio de estabilidad general (Schwarz y Rittmann, 2006a), en lugar del criterio simplificado para casos advectivos (Ecuación 3.2):

$$q_A = \frac{rD_L}{u_{M0}v^2} \geq \frac{1}{(1 - e^{D_L/v})} \quad (3.3)$$

Donde:

q_A = Criterio de estabilidad de un sistema dominado por la advección.

r = Velocidad constante de producción de sulfuros ($ML^{-3}T^{-1}$)

D_L = Coeficiente de difusión efectivo del ligando en la barrera reactiva permeable (L^2T^{-1})

u_{M0} = Concentración total de metal soluble en la porción superpuesta bien mezclada de la columna de agua (caso de sedimento) (ML^{-3})

v = Velocidad del agua subterránea (LT^{-1})

e = Espesor de barrera reactiva permeable (L)

Se evalúa la ecuación 3.3 con los siguientes valores de Schwarz y Rittman (2010): $r = 10^{-4}$ mol l^{-1} d^{-1} , $D_L = 10^{-4}$ m^2 d^{-1} , $u_{M0} = 10^{-3}$ mol l^{-1} , $e = 1.5$ m, y $v = v_1 = 2.74 \times 10^{-4}$ md^{-1} , se calcula que $q_A = 133.2$ (lado izquierdo) y el criterio = 1.07 (lado derecho). Ya que $133.2 \gg$

1.07, la relación de conductividad elegida de 100 cumple con el criterio de estabilidad para la ubicación 1, por lo que el PRB no falla.

Mientras que, para el cálculo del criterio de estabilidad de un sistema dominado por la difusión (-) se usó la ecuación 3.1 usando los siguientes valores: r igual a 10^{-4} mol l⁻¹ d⁻¹, D_M igual a 10^{-4} m² d⁻¹, u_{M0} es 10^{-3} mol l⁻¹, L_b es 0.126 m y por último δ_{bl} igual a 0.0315 m. Realizando el cálculo el resultado es de 3.9 cumpliendo con el criterio mostrado en la ecuación 3.1.

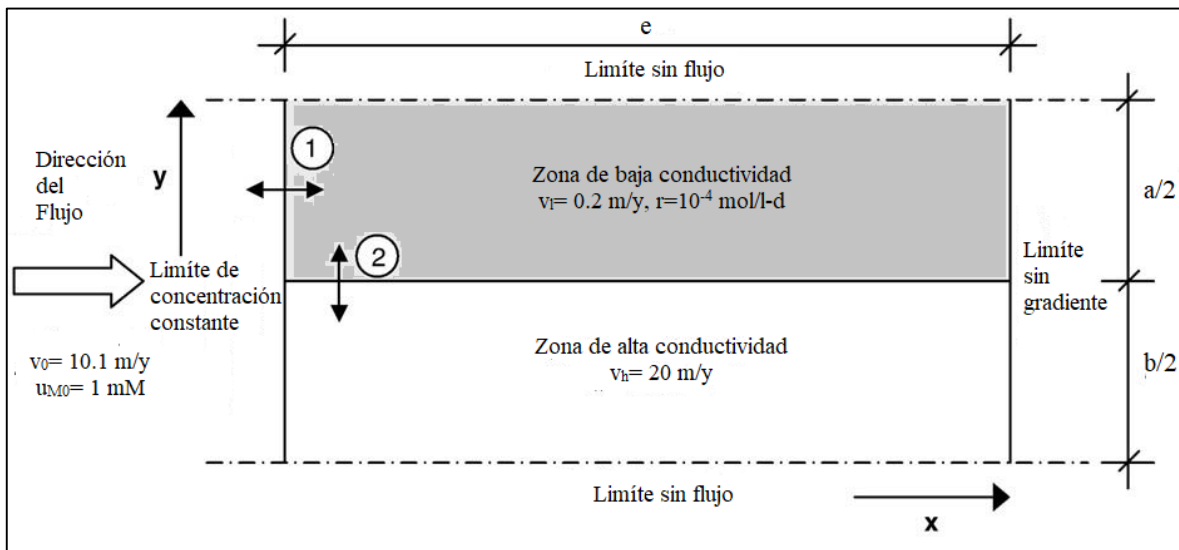


Figura 3. 5. Modelo que representa un DAPRB, con sus propiedades de transporte y condiciones de contorno. Los criterios de resistencia se aplican en ubicaciones 1 y 2.

(Schwarz y Rittmann, 2010).

3.4 Microbiología dentro de un bioreactor

La comunidad microbiana en los sistemas de tratamiento de reducción de sulfato incluye varias clasificaciones importantes de microorganismos con diferentes tipos de actividad metabólica (Figura 3.6). Estos microorganismos incluyen bacterias reductoras de sulfato (BRS), degradadores de celulosa y fermentadores (Hiibel et al., 2008, Logan 2005). Los BRS dependen de la actividad metabólica de estos otros grupos de microorganismos (Neculita, 2007).

Las BRS son bacterias anaeróbicas que utilizan sulfato como aceptor de electrones terminal y una fuente simple de carbono orgánico como donante de electrones. Los diferentes géneros de BRS usan diferentes fuentes de carbono (por ejemplo, ácido acético, hidrógeno, azúcares simples) y una variedad de géneros se encuentran en un BCR típico (Prieto et al., 2008). Los BRS se encuentran dentro de una serie de grupos taxonómicos que incluyen *Deltaproteobacteria* (por ejemplo, *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium* y *Desulfobacter*) y bacterias formadoras de esporas como *Desulfomaculum* (Doshi 2006).

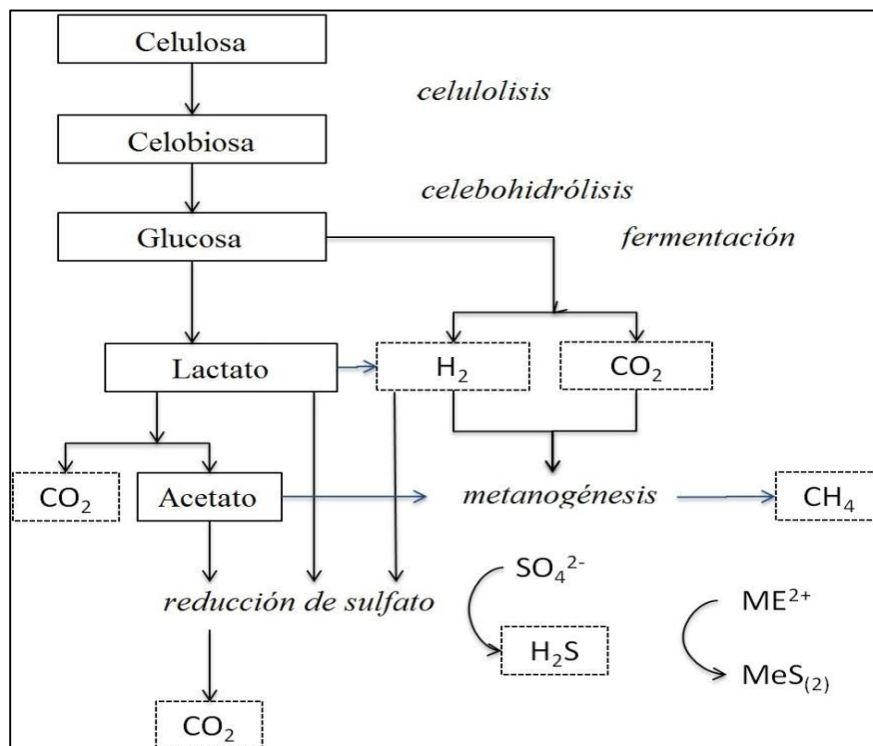


Figura 3. 6. Proceso microbológico de un bioreactor anaeróbico (Logan, 2005)

La temperatura afecta el crecimiento de BRS. Las *deltaproteobacteria* son bacterias mesófilas gramnegativas (rango óptimo de temperatura de crecimiento 20-40 °C) con una variedad de formas y rasgos fisiológicos. La mayoría de las especies bacterianas prefieren un rango de temperatura similar a la *Deltaproteobacteria*, aunque algunas pueden soportar ambientes con temperaturas más altas. Los SRB termófilos prosperan a las altas

temperaturas que se encuentran en ambientes tales como respiraderos geotérmicos, sin embargo, estas bacterias generalmente no están presentes en los sistemas de tratamiento BCR.

Los degradadores de celulosa son necesarios para los biorreactores porque degradan el sustrato, que típicamente es un carbohidrato complejo, en compuestos de carbono simples. Los BRS no puede degradar la celulosa y dependen de los degradadores de celulosa para proporcionar la fuente de carbono (Neculita et al., 2007). La degradación de la celulosa puede ser aeróbica o anaeróbica, y los anaerobios fermentativos probablemente predominan en un sistema de tratamiento reductor de sulfato como se muestra en la Tabla 3.2:

Tabla 3. 2. Productos Metabólicos liberados durante la digestión anaerobia de diferentes polisacáridos por cepas puras de bacterias anaerobias (Chynoweth e Isaacson, 1987)

Organismo	Fuente	Sustrato	Productos*
<i>Bacteroides succinogenes</i>	Rumen	Celulosa	F, A, S
<i>Bacteroides Fibrisolvens</i>	Rumen	Celulosa Hemicelulosa Pectina	F, L, H ₂ , CO ₂ F, B, L, H ₂ , CO ₂ F, A, B, L, M, H ₂ , CO ₂
<i>Bacteroides Ruminicola</i>	Rumen	Hemicelulosa Pectina	F, A, P, S F, A, P, B, L, S
<i>Ruminococcus Flavefaciens</i>	Rumen	Celulosa	F, A, S, H ₂ , CO ₂
<i>Neocallimastix frontalis</i>	Rumen	Celulosa	F,A, L, E, CO ₂
<i>Rumen spirochetes</i>	Rumen	Pectina	F, A, L, S, M
<i>Rumen treponemes</i>	Rumen	Pectina	F, A, S, M
<i>Lachnospira multiparus</i>	Rumen	Pectina	F, A, L, M, E, H ₂ , CO ₂
<i>Acetivibrio Cellulolyticus</i>	Digestor	Celulosa	A, E, H ₂ , CO ₂
<i>Clostridium thermoillum</i>	Digestor	Celulosa	A, E, H ₂ , CO ₂
<i>Clostridium papyrosolvens</i>	Sedimento de estuario	Pectina	F, A, L, E
<i>Clostridium butyricum</i>	Sedimentos de lago	Pectina	A, B, M, E, H ₂ , CO ₂
*F=formato, A=acetato, P= propionato, B=butirato, S=Sucinato, L=lactato, M=metanol, E=etanol			

Los fermentadores son importantes en los sistemas de tratamiento de reducción de sulfato porque degradan los aminoácidos, azúcares y ácidos grasos en compuestos orgánicos más simples (por ejemplo, ácido propiónico y alcoholes) que también pueden usarse como fuentes de carbono por BRS. Algunas veces llamadas "acidógenos fermentativos", estas bacterias realizan fermentación y acidogénesis. La fermentación es un proceso metabólico anaeróbico que no depende de aceptadores de electrones externos (a diferencia de la respiración) y en el cual la fuente de carbono se reduce y una porción se oxida para producir la energía que la unidad debe tener para prosperar (Madigan et al., 2012). La acidogénesis es una etapa de la digestión anaeróbica en la que las moléculas como los azúcares y los aminoácidos se dividen en ácidos grasos simple y alcoholes (Figura 3.7).

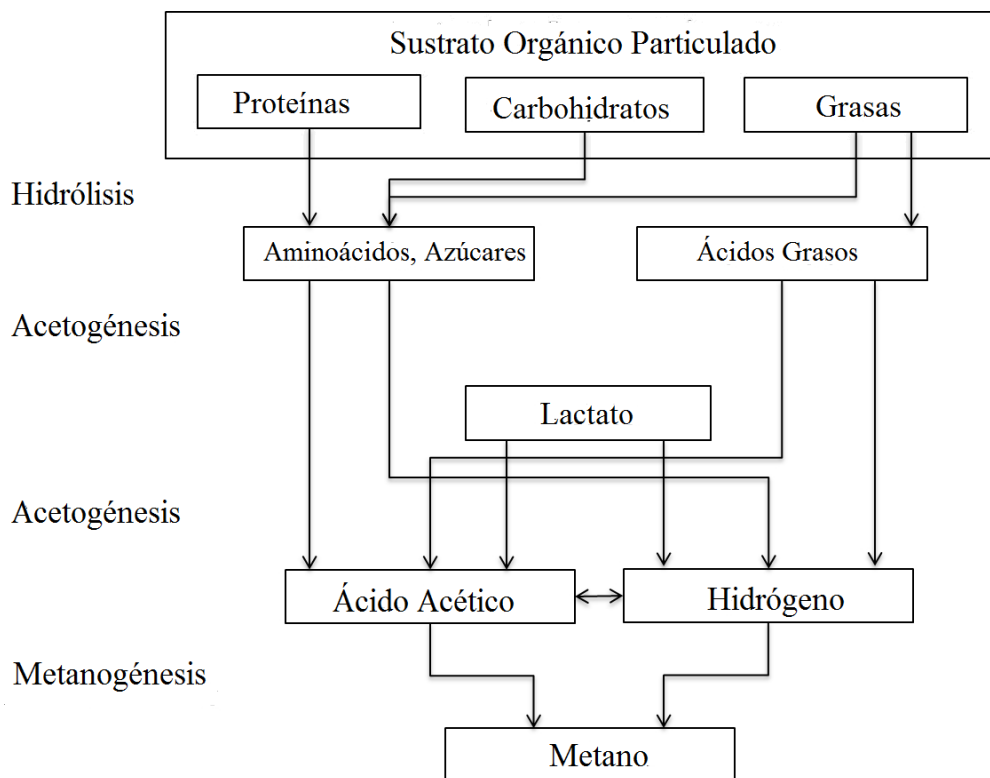


Figura 3. 7. Proceso de la digestión anaerobia.

Fuente: Waste To Energy Research and Technology, www.wtert.eu

El ion de hidrógeno (H^+) y el hidrógeno molecular son producidos por varias bacterias fermentativas diferentes en un biorreactor. Los ejemplos de reacciones fermentativas productoras de hidrógeno incluyen la degradación de lactato para producir etanol, dióxido de carbono e ión hidrógeno por *Lactobacillus* y la degradación de glucosa a butirato, gas

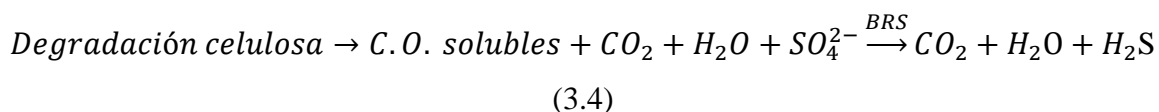
hidrógeno, dióxido de carbono e ion hidrógeno por *Clostridium butyricum*. Se ha encontrado que la actividad biológica de los fermentadores disminuye significativamente a medida que aumenta la actividad de BRS en las etapas iniciales del funcionamiento del sistema de tratamiento pasivo a escala de laboratorio (Logan et al., 2005).

Algunos microorganismos, incluidos los metanógenos (un grupo de Archaea anaeróbica) y algunos géneros de BRS utilizan hidrógeno molecular como donador de electrones. Los estudios han demostrado que los BRS superan a los metanógenos en cuanto al hidrógeno disponible, y no se espera que la actividad metanogénica sea alta en un BCR maduro (Logan et al., 2005).

Si el BCR se expone al oxígeno, las bacterias del género *Thiobacillus* (reclasificadas a Acidithiobacillus, Kelley y Wood 2000) pueden volverse más predominantes (Hiibel et al., 2008). Los tiobacilos son bacterias comunes en las aguas de mina no tratadas, son acidófilos y oxidan aeróbicamente el hierro ferroso al hierro férrico. Además, se pueden usar microorganismos para eliminar metales disueltos u otros contaminantes inorgánicos (como uranio, telurio, selenio y óxidos de cromo). Los microbios tienen la capacidad de incorporar metales a su estructura. Los contaminantes se eliminan de aguas mineras y se absorben en la biomasa dentro del biorreactor. La selección de los microorganismos debe basarse en los requisitos nutricionales de los organismos disponibles en el biorreactor (por ejemplo, fuentes de carbono, nitrógeno, azufre y fósforo). El género y la especie particulares de los organismos son en gran parte irrelevantes, aunque los organismos aislados del sitio (o uno similarmente contaminado) serían más propensos a llevar a cabo la reducción deseada (ITRC, 2012).

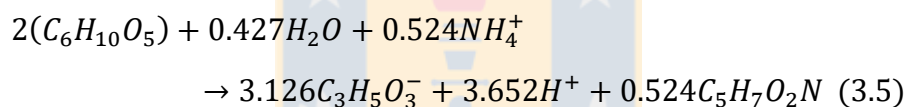
3.5 Ecuaciones de la digestión anaerobia

La cadena alimentaria del BCR que conduce a la producción de sulfuro se puede representar por:

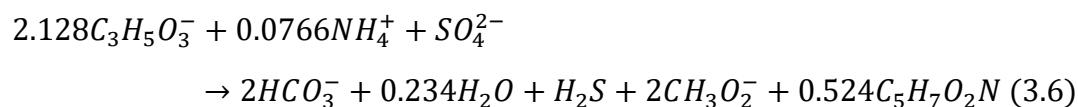


Esta biodegradación anaeróbica de los polisacáridos resulta en compuestos orgánicos solubles pero es lenta.

Para determinar la tasa de producción de sulfuros suponiendo que esta tasa está limitada por el suministro de materia orgánica, se necesitaría conocer la tasa de producción de los orgánicos solubles, la tasa de uso de estos orgánicos por los organismos reductores de sulfatos y la estequiometría, porque el uso orgánico se convierte en generación de sulfuro. Ha habido algunos intentos de determinar estas tasas, por ejemplo, se asumió que la degradación de la materia vegetal en un BCR produjo lactato y se describió usando un conjunto de ecuaciones (Hemsi et al., 2005). La elección del lactato es algo sorprendente ya que pocos anaerobios celulolíticos producen lactato mientras que el etanol, H₂, succinato y propionato son productos fermentativos más comunes (Lynd et al., 2002). La reacción líquida productora de lactato fue informada como:



Donde el último término, C₅H₇O₂N, es la nueva biomasa de degradador de celulosa. El lactato es entonces utilizado por las bacterias reductoras de sulfato (BRS) para formar acetato en la relación estequiométrica, dado como:



Donde el último término es la masa BRS recién formada. Las bacterias reductoras de sulfato, que degradan completamente el lactato, son raras en comparación con la oxidación anterior al acetato (Hemsi et al., 2005).

3.6 Análisis de la bioenergética de la reducción de sulfato

Las bacterias reductoras de sulfato requieren: una fuente de carbono, un donador de electrones y un aceptor de electrones (el sulfato) mostrados en la ecuaciones anteriores. Para determinar la reacción biológica completa, es decir, reducción del aceptor de electrones, oxidación de donador de electrones y síntesis de biomasa en dicha reacción total, es necesario partir de tres semirreacciones, una para cada etapa. En este caso nos basamos en la Figura 3.6 donde se trabaja con acetato como sustrato (donador de electrones) y amonio como fuente de nitrógeno (reacción de síntesis celular), este último elegido por ser la fuente más probable de utilización por los microorganismos (Rittmann y McCarty, 2001). Las semirreacciones correspondientes y sus respectivos valores de energía libre de Gibbs se muestran en la Tabla 3.3. La reacción biológica completa se representa por la siguiente ecuación (Tchobanoglous *et al.*, 2013):

$$R = f_e R_a + f_s R_{cs} - R_d \quad (3.7)$$

Donde:

R: Reacción total balanceada.

f_e : Fracción de donador de electrones usada para energía.

R_a : Semirreacción para el aceptor de electrones.

f_s : Fracción de donador de electrones usada para síntesis celular.

R_{cs} : Semirreacción de síntesis de biomasa.

R_d : Semirreacción para el donador de electrones.

Tabla 3. 3. Semireacciones para reducción biológica de sulfato (Rittman, 2001)

Descripción	Semireacción	ΔG° , KJ/e ⁻ equivalente
Acetato como donador de electrones	$\frac{1}{8}CO_2 + \frac{1}{8}HCO_3^- + H^+ + e^-$ $= \frac{1}{8}CH_3COO^- + \frac{3}{8}H_2O \quad (3.8)$	27,40
Sulfato como aceptador de electrones	$\frac{1}{8}SO_4^{2-} + \frac{19}{16}H^+ + e^-$ $= \frac{1}{16}HS^- + \frac{1}{16}H_2S + \frac{1}{8}H_2O \quad (3.9)$	21,27
Amonio como fuente de nitrógeno, CO ₂ como fuente de carbono	$\frac{1}{5}CO_2 + \frac{1}{20}HCO_3^{3-} + \frac{1}{20}NH_4^+ + H^+ + e^-$ $= \frac{1}{20}C_5H_7O_2N + \frac{9}{20}H_2O \quad (3.10)$	—

El consumo energético para síntesis celular se define por la siguiente fórmula (Tchobanoglous *et al.*, 2013):

$$\Delta G_s = \frac{\Delta G_p}{K^m} + \Delta G_c + \frac{\Delta G_N}{K} \quad (3.11)$$

Donde:

ΔG_s : Energía libre para convertir 1 electrón equivalente (e- eq) de la fuente de carbono a material celular.

ΔG_p : Energía libre para convertir 1 e- equivalente de fuente de carbono a piruvato (forma intermedia de carbono).

K: Fracción de transferencia de energía capturada (eficiencia energética de las bacterias).

m: +1 si ΔG_p es positivo; -1 en caso contrario.

ΔG_c : Energía libre para convertir 1 e- equivalente de piruvato intermediario a 1 e- equivalente de células.

ΔG_N : Energía libre por e- equivalente de células para reducir nitrógeno a amonio.

Asumiendo una eficiencia K de 0,6 (consistente con lo indicado por estos autores y por Tchobanoglous *et al.*, 2013), se pueden conocer los factores f_e y f_s como sigue:

$$K\Delta G_R \left(\frac{f_e}{f_s} \right) = \Delta G_s \quad (3.12)$$

$$f_s + f_e = 1 \quad (3.13)$$

Donde:

ΔG_R : Energía liberada de las reacciones redox, kJ/mol e- transferido.

K: Fracción de energía capturada.

f_e : Moles de e- de sustrato oxidado por mol de e- de sustrato total utilizado.

f_s : Moles de e- de sustrato usado para síntesis celular por mol de e- de sustrato total utilizado.

ΔG_s : Energía utilizada para crecimiento celular, kJ/mol e- transferidos para dicho crecimiento.

Para poder calcular ΔG_p se utilizan las siguientes semireacciones presentadas en la tabla 3.4:

Tabla 3. 4. Calculo del ΔG_p (Rittman, 2001)

Semireacciones	$\Delta G \text{ kJ/mol } e^-$
$\frac{1}{8}CH_3COO^- + \frac{3}{8}H_2O \rightarrow \frac{1}{8}CO_2 + \frac{1}{8}HCO_3^- + H^+ + e^-$ (3.14)	-27.68
$\frac{1}{5}CO_2 + \frac{1}{10}HCO_3^- + H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{10}CH_2COCOO^- + \frac{2}{5}H_2O$ (3.15)	+35.78
$\frac{1}{8}CH_3COO^- + \frac{3}{40}CO_2$ $\rightarrow \frac{1}{10}CH_3COCOO^- + \frac{1}{40}HCO_3^- + \frac{1}{40}H_2O$ (3.16)	8.10

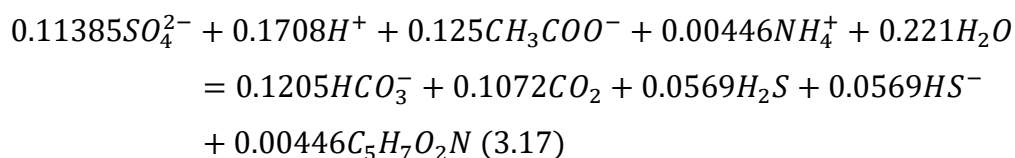
Para calcular la reacción biológica completa se tiene lo siguiente:

$$\Delta G_s = \left(\frac{8.10}{0.6^{+1}} + 31.41 + \frac{0}{0.6} \right) = 44.91 \frac{KJ}{e^-}$$

Remplazando en la ecuación 3.12 resulta:

$$\frac{f_e}{f_s} = 12.21$$

Luego, resolviendo junto a la ecuación 3.13, resulta $f_e = 0.9108$ y $f_s = 0.0892$ con lo que se puede obtener la reacción total balanceada aplicando la ecuación 3.7, y con ello calcular los rendimientos teóricos y consumos por parte de las bacterias reductoras de sulfato. La reacción resultante completa es la siguiente:



3.7 Composición de la materia orgánica de la zona reactiva

Se han realizado investigaciones en reactores tipo Batch o discontinuos para encontrar sustratos económicos que proporcionen materia orgánica a corto y largo plazo como se puede observar en la Tabla 3.5. Los compuestos de origen celulósico como el aserrín, heno, alfalfa y virutas de madera, constituyen una fuente de donadores de electrones a largo plazo, porque su cinética de degradación es lenta. Proporcionan carbohidratos complejos, que deben ser degradados por el consorcio. En cambio, las heces, residuos agrícolas y de cervecería, compost y desechos de animales, proporcionan donadores de electrones de disponibilidad más inmediata o de corto plazo; además, son la fuente de elementos esenciales para el desarrollo de los microorganismos como el nitrógeno y fósforo.

Tabla 3. 5. Materiales reactivos usados en sistemas Batch para tratamiento del DAM

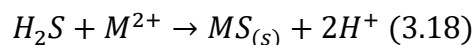
Mezcla	pH		Sulfato		Referencia
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	
Compost, hojas de robles, estiércol de aves de corral, estiércol de ovejas.	2.4	6.0-7.5	1040	<200	Gibert et al, 2004
Estiércol de vaca y mezcla de pastos secos, pastos verdes compostados.	4.2	5.9-6.3	14752	No reportado	Amos y Younger, 2003
Mezclas/fuentes únicas de virutas de madera de <i>maple</i> , turba, aserrín de conífera, compost de hojas, estiércol de aves de corral.	4.0	6.5-8.5	4244	1630	Zugury et al, 2006
Virutas de madera y aserrín.	1.6	5.0-6.0	2500	750-1250	Tasse y Germain 2002
Mezcla de compost de hojas, estiércol de aves de corral y aserrín.	5.5-6.0	7.9	2000-3200	<90	Cocos et al, 2002
Mezcla de astillas de madera y aserrín.	4.5-6.2	6.9-7.5	3500	<90	Lindsay, et al, 2008
Mezcla de chips, heces de vaca, compost de hongos, aserrín.	3.0-6,0	5.0-8.0	1650-3140	<90-2000	Neculita et al., 2011

La composición de la mezcla reactiva es fundamental para la eficiencia del proceso de reducción de sulfato. Investigaciones realizadas sugieren que la mezcla más reactiva es aquella que contiene varias fuentes de carbono (Waybrant et al., 1998; Zagury et al., 2006) y 10% de hierro cerovalente, debido que disminuye el hierro en ese estado es un potencial de oxidación-reducción (ORP), lo que conduce a la formación de un entorno anaeróbico mejorado para las BRS (Lindsay et al., 2008; Kumar et al., 2015). Los sustratos con celulosa han sido confirmados como más eficientes que los lignocelulósicos (Waybrant et al., 1998; Tassé y Germain, 2002). Una mezcla óptima debe contener igual proporción de residuos celulósicos y residuos orgánicos (Neculita et al., 2008). Los residuos orgánicos (compost y estiércol) aceleran la actividad de los reductores de sulfato durante el inicio de los sistemas (McCauley et al., 2009).

3.8 Comportamiento de los metales

3.8.1 Precipitación de metales como sulfuro

El proceso consiste en hacer reaccionar un metal soluble con un reactivo, en este caso el sulfuro producido en la zona reactiva, para formar un complejo sulfurado como se puede mostrar en la siguiente reacción (ITRC, 2012):

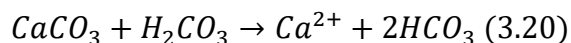
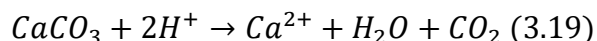


Donde M corresponde al metal divalente (cobre, zinc, hierro ferroso, etc.).

3.8.2 Neutralización con químicos

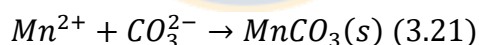
La piedra caliza es de uso normal para el tratamiento de DAM y puede tener una ventaja económica y práctica. El carbonato de calcio aumenta el pH del agua mediante el consumo de iones de hidrógeno y la adición de alcalinidad a través de iones de bicarbonato (Young

et al, 2002). Como el pH del agua acida, los metales pueden precipitarse para formar hidróxidos y oxihidrióxidos:



3.8.3 Manganese

El manganeso puede ser un metal particularmente difícil de eliminar en un bioreactor reductor de sulfato. Este metal es altamente soluble como Mn^{2+} en agua excepto cuando el Eh es alto y el pH está por encima de 7. Un pH sobre 7.6 o más y en condiciones de alto oxígeno disuelto (alto Eh), Mn precipitará como un óxido (en orden decreciente de Eh: MnO_2 , Mn_2O_3 , o Mn_3O_4) o a baja Eh, como hidróxido de manganeso ($Mn(OH)_2$). Hui et al. (2010) mostraron que una parte de la remoción de Mn en los lechos de piedra caliza es biológica, mencionando que los hongos pueden ser los oxidantes biológicos dominantes. El pH al que se forman los sólidos también se ve fuertemente afectado por la presencia de carbonato. En concentraciones moderadas de carbonato y en entornos algo anaeróbicos se forman carbonatos de manganeso como se presenta en la siguiente ecuación (ITRC, 2012):

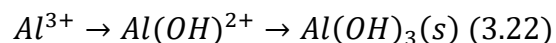


El manganeso no forma sulfuros como otros metales divalentes como el cobre o el zinc. Por lo tanto, para eliminar el manganeso por precipitación, el agua de mina debe ser algo alcalina. Puede que no se pueda amortiguar el DAM a un pH bastante alto por la disolución de la piedra caliza (ITCR, 2012)

3.8.4 Aluminio

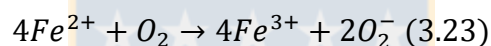
El aluminio, si está presente, es probable que forme óxidos si el DAM es neutralizado, precipitando generalmente en la misma zona que el hierro. Al igual que con el hierro, el

material resultante es a menudo problemático porque puede formar grandes volúmenes de lodo que obstruye los poros. Químicamente, el aluminio tiende a ser pensado en el sistema Al-O-H, determinado por el pH (ITRC, 2012):

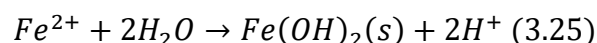


3.8.5 Hierro

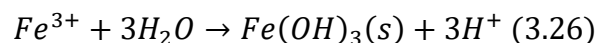
El hierro está a veces presente en el DAM, y casi siempre en la forma ferrosa. El potencial redox determina qué reacciones ocurren con este metal. En presencia de oxígeno, puede ocurrir el siguiente conjunto de reacciones dependiendo de la actividad y el tiempo:



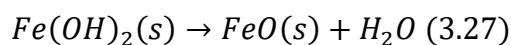
Esta reacción redox es altamente dependiente del Eh, que está relacionada con la fugacidad del oxígeno en el agua. La mayoría de los DAM que contienen hierro y están saturados con oxígeno atmosférico favorecerán la formación de Fe^{3+} , cuando el pH sea superior a 4-5. Si el contenido de oxígeno es bajo, el hierro puede formar hidróxido de hierro (II) como se presenta en la siguiente reacción (ITCR, 2012):



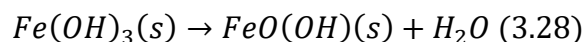
Sobre pH 5, ya con valores redox asociados con oxígeno disuelto, pueden tener lugar una serie de reacciones del ion férrico, que dan lugar a especies de hierro hidratadas de diversas formas:



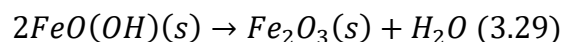
El hierro férrico forma el hidróxido de hierro (III), el comúnmente denominado "yellowboy":



El óxido ferroso puede ser observado como un intermedio:



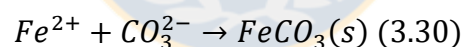
El hidróxido de hierro (III) se convierte en oxihidróxido de hierro:



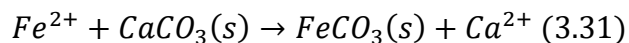
También puede formarse óxido de hierro (III).

Debido a la gama de combinaciones hierro/agua, los geoquímicos tienden a utilizar términos amplios como el oxihidróxido de hierro. El oxihidróxido de hierro formado en BCR puede ser amorfo o puede formar una serie de minerales. Estos minerales pueden incluir otros aniones tales como carbonatos y sulfatos. La Goethita ($FeO(OH)$) se observa a menudo en el BCR, pero también pueden ocurrir polimorfos de goethita, así como otros minerales como hematita (Fe_2O_3) (ITCR, 2012).

Además de la formación de oxihidróxidos de hierro, la química del agua puede dar lugar a otras reacciones del hierro. A pH casi neutro, y en presencia de carbonatos, se puede formar la siderita (carbonato de hierro (II)):



El intercambio iónico con carbonato de calcio, frecuentemente presente como grava de piedra caliza en el sustrato BCR, también puede formar siderita:



Si el carbonato de hierro fue expuesto posteriormente a Eh elevado, como por ejemplo cambiando de condiciones anaeróbicas a aeróbicas, la siderita es impulsada por consideraciones de equilibrio para formar magnetita (Fe_3O_4) (ITCR, 2012).

3.8.6 Tasa de remoción de metales

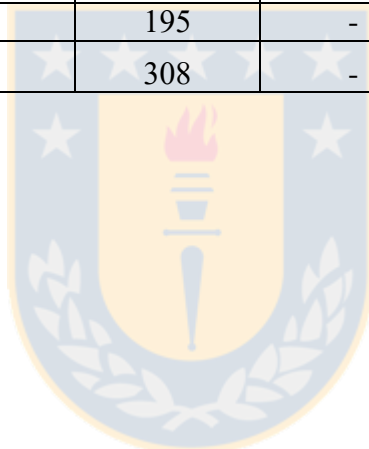
Para el dimensionamiento de los BRS se utiliza como criterio la tasa de remoción de metales ($\text{mol}/\text{m}^3/\text{día}$), la cual se obtiene de forma experimental en ensayos de laboratorio y está relacionada con la tasa de reducción de sulfato del BRS. En la Tabla 3.6 se muestran algunas tasas de remoción de metales considerando aquellos que precipitan como sulfuros, hidróxidos y carbonatos. La tasa de remoción anotada con * corresponde solo a aquellos metales que precipitan como sulfuros. También aparece la relación entre la tasa de remoción de metales (aquellos que precipitan como sulfuro) y la tasa de remoción de sulfatos, donde aquellas investigaciones que utilizan un sistema de intercambio difusivo (SID) presentan una mayor tasa, al contrario del sistema BCR y SAPS. Las investigaciones que trabajaron con un SID tienen una gran capacidad de trabajar a altas concentraciones de cobre (aproximadamente de 630 mg/L) a diferencia los otros sistemas de tratamiento, esto porque los SID presentan dos zonas una conductiva y otra reactiva (ver Tabla 3.7). Esto permite que la última zona mencionada se pueda proteger del transporte advectivo y difusivo del DAM.

Tabla 3. 6. Tasa de remoción de sulfatos y de metales.

Tasa de remoción de metales ($\text{mol}/\text{m}^3/\text{día}$)	Tasa de remoción de metales ($\text{mol}/\text{m}^3/\text{día}$)*	Tasa de remoción de sulfatos ($\text{mol}/\text{m}^3/\text{día}$)	Tasa remoción de metales*/Tasa de remoción de sulfatos	Tipo de sistema	Fuente
0.40	0.33	0.39	0.85	SID	(Perez, 2015a)
0.36	0.28	0.31	0.93	SID	(Gaete, 2017)
0.24	0.12	0.25	0.48	BCR	(Kenneth, 2005)
0.46	0.3	0.44	0.68	BCR	(Al-Abed, 2017)
0.24	0.13	0.30	0.43	BCR	(Uster, 2014)
0.5	0.24	0.35	0.69	SAPS	(Neculita, 2014)
0.8	0.29	0.38	0.76	BCR	(McCauley, 2009)

Tabla 3. 7. Concentraciones de metales (mg/L) de los DAM de distintos autores.

Resumen de datos	Gaete, 2017	Pérez, 2016 ^a	Neculita, 2012	McCauley, 2009	Al-Abed, 2017	Uster, 2014
SO ₄ ²⁻	2600	3890	2495	608	1986	1800
Zn ²⁺	67.05	85	-	1.12	72.9	4.8
Ni	-	-	-	0.21	0.06	1.3
Cd	-	-	-	0.02	0.296	0.004
Cu	633.5	528	-	0.12	17.1	0.3
Mn	198.85	-	1.8	1.65	1.67	18
Fe	10.51	0.77	158	65.8	24.0	60
Al	116.55	95	67	46.5	17.0	21
K ⁺	-	5.5	-	-	-	-
Cl ⁻	61.77	61	-	-	-	-
Ca	127.7	-	195	-	81.7	-
Mg ²⁺	-	-	308	-	20.7	-



CAPÍTULO 4

DISEÑO DE REACTORES Y MÉTODOS DE ANÁLISIS

4.1 Introducción

En este capítulo se muestran los equipos que se utilizaron en este proyecto y posteriormente la construcción y diseño de los reactores especificando la composición de la zona conductiva y reactiva. Además se muestra la composición del drenaje ácido sintético y los análisis que se llevaron a cabo ya sean biológicos o químicos.

4.2 Equipos

Los equipos que se utilizaron para esta investigación fueron los siguientes:

- Electrodo del laboratorio modelo advanced PerpHect LagR pH/ISE Orion 370.
- Medidor de pH de terreno con electrodo HACH, modelo HQ40d
- Espectrofotómetro HACH modelo DR 2800
- Espectrómetro para absorción atómica modelo Perkin Elmer A400.
- Microscopio Japan Optical Co modelo XTL-2310
- Contador de colonia Suntex ColonyCounter 570.
- Termociclador Eppendorf AG 22331 Hamburg.

4.3 Diseño de reactor

Para este proyecto se utilizaron 6 reactores de banco con un volumen de 15.6 L de capacidad cuyas dimensiones son de 80x6.5x30 y cuyo material fue de plexiglás con 1 cm de grosor. Estos reactores se comenzaron a armar el mes de Enero del 2017 y se comenzó a operar el mes de febrero del mismo año. En este experimento se varió el grosor de la capa de la zona reactiva en los siguiente espesores en duplicado: 7.5 cm, 5 cm y 2.5 cm, como se

puede apreciar en las figuras 4.1, 4.2 y 4.3, respectivamente. La alimentación se realizó de forma manual con un caudal de 0.14 L/d el cual se agregaba en la parte superior de la criba (ver anexo Figura A.1). El drenaje sintético fluye de forma horizontal cruzando la zona de distribución que es de 4 cm de ancho, para luego cruzar el área del lecho que corresponde a la zona de contacto entre las zonas conductivas y reactivas, la cual posee un volumen vacío de 11.4 L. Finalmente, el drenaje termina en un frasco de laboratorio con tapa rosca de 500 mL. Los nombres de cada uno de los reactores se presenta a continuación: R 2.5 A y R 2.5 B corresponden al duplicado de reactores de capa 2.5 cm, R 5 A y R 5 B corresponde al duplicado de los reactores de capa de 5 cm y, por último, los reactores R 7.5 A y R 7.5 B corresponden a los reactores con capa de 7.5 cm de grosor.

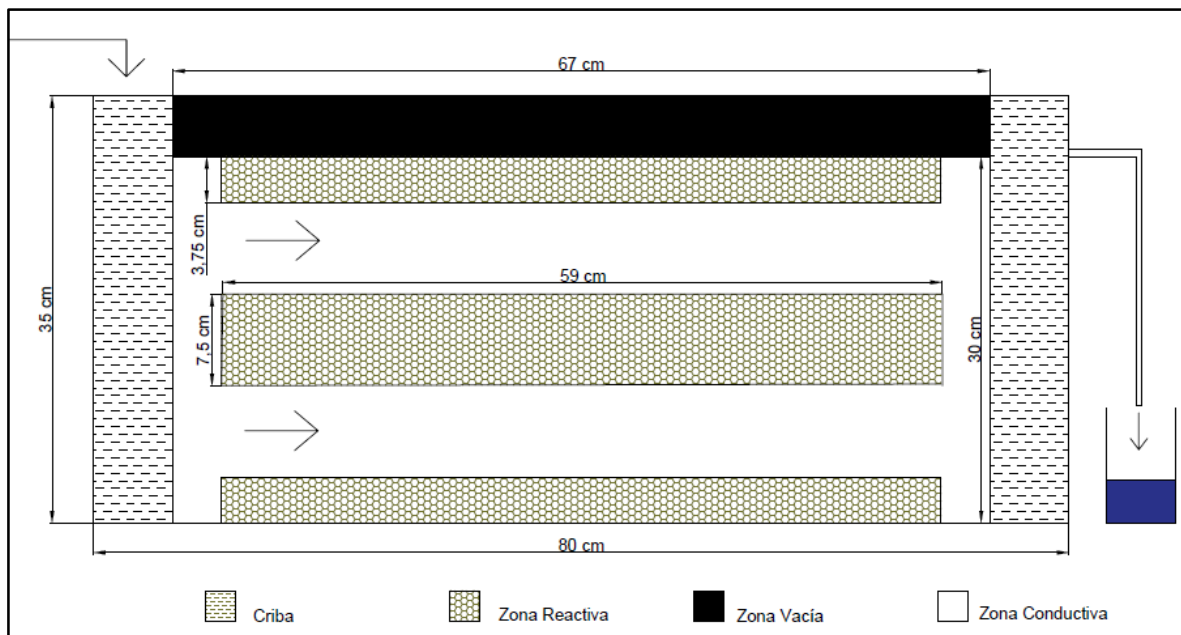


Figura 4. 1. Diseño de reactor de capa de 7.5 cm (Fuente: Elaboración propia).

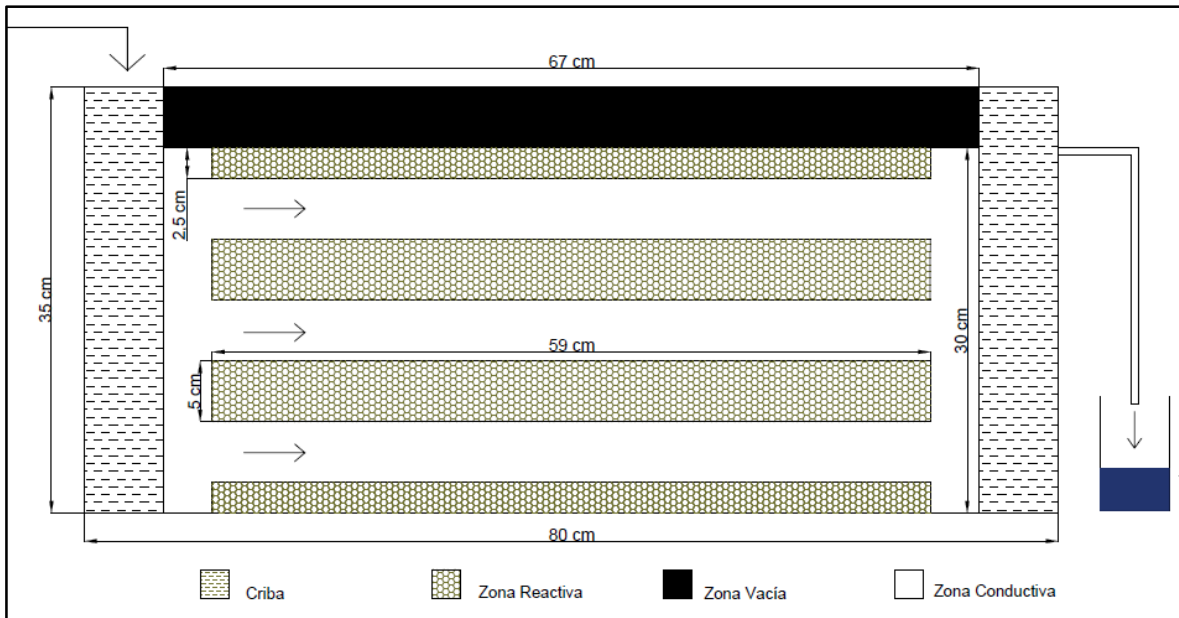


Figura 4. 2. Diseño de reactor de capa de 5 cm (Fuente: Elaboración propia).

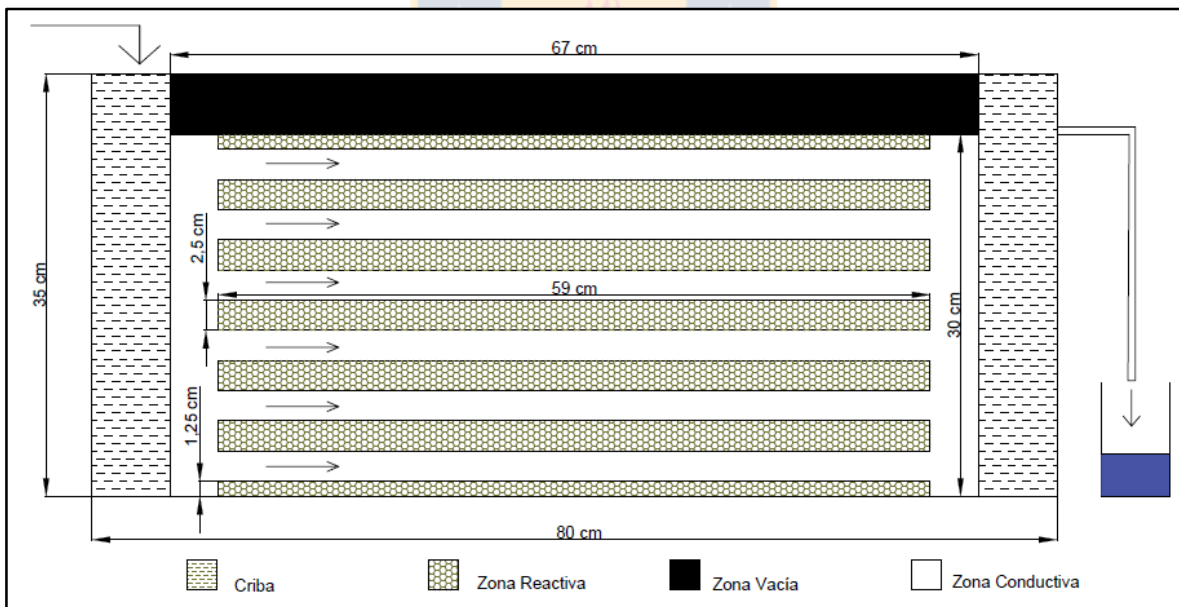


Figura 4. 3. Diseño de reactor de capa de 2.5 cm (Fuente: Elaboración propia).

4.3.1 Zona conductiva

La zona conductiva está compuesta por arena suministrada por cementos Biobío cuyo tamaño del grano está entre 1.1 mm y 1.5 mm y cuya porosidad es de 0.4. La criba tiene un diámetro interior de 5.08 cm con una altura de 35 cm y cuya ranura de perforación es de 1 mm. El volumen total de la zona conductiva considerando todo el reactor (zona de cribas, distribución y del lecho con porosidad) es de 6.1 L, mientras que el lecho conductivo es de 2.54 L.

4.3.2 Zona Reactiva

La materia orgánica está constituida por los siguientes componentes como se muestra en la Tabla 4.1:

Tabla 4. 1. Composición de la porción orgánica del sustrato (Chaparro, 2015).

Componente orgánico	% del peso total de los orgánicos
Fibra de celulosa no deslignificada	50
Tierra vegetal	31.75
Estiércol fresco	18.25

La mezcla orgánica sirvió de base para calcular el contenido de polvo de caliza, el cual se agregaría a 15% del peso de los orgánicos. La tierra vegetal fue obtenida de los viveros de la Universidad de Concepción, mientras que el estiércol fresco se obtuvo de la lechería de San Carlos, de la Octava región. Se usó como inóculo lodos anaerobios provenientes de la planta de tratamiento de Essbio de Hualpén, en una cantidad de 1.5 L por cada kilogramo de materia orgánica (Pérez, 2015).

4.3.3 Composición del DAM

La alimentación con drenaje ácido sintético fue preparada en base a los datos entregados por el análisis de una muestra de DAM proveniente de la planta HDS (plantas de lodos de alta densidad) CODELCO en su división Andina. Se agregó concentración de cloro la cual proviene del cloruro de calcio agregado para tener un nivel de calcio representativo, y del HCl usado para bajar el pH de la mezcla como se muestra en la Tabla 4.2:

Tabla 4. 2. Caracterización química del DAM preparado en el laboratorio (Fuente: Elaboración propia).

Metal	C. prom. mg/L
Al	116.55
Cu	633.5
Fe	10
Mn	198.85
Zn	67.05
Ca	127.7
Cl	61.87
Sulfato	2600
pH	2.8
conductividad (mS/cm)	6.4
ORP (mV)	318.8

La carga de metales basándose en la Tabla 4.2 utilizando una caudal de $Q=0.14$ L/d es de: 16.32 mg/día de aluminio, 88.69 mg/día de cobre, 1.4 mg/día de hierro, 27.84 mg/día de manganeso, 9.387 mg/día de zinc y 17.88 mg/día de calcio, más un agregado de 8.66 mg/día de cloro. La solución de ácido clorhídrico fue de 0.12 molar, la cual se agregó a aproximadamente 30 ml por cada 10 litros de DAM sintético. La alimentación se preparaba una vez por semana para llenar el bidón del afluente usando los reactivos del laboratorio de hidráulica y medioambiente cumpliendo las concentraciones de la Tabla 4.3 (ver Tabla 4.2).

Tabla 4. 3. Componentes del drenaje ácido preparado en el laboratorio de hidráulica y medio ambiente (Fuente: Elaboración propia).

Compuesto	Fórmula	Cantidad por 10 L de DAM (g)
Sulfato de cobre	$\text{Cu}(\text{SO}_4) * 5\text{H}_2\text{O}$	24.9
Sulfato de hierro	$\text{Fe}(\text{SO}_4) * 7\text{H}_2\text{O}$	0.49
Sulfato de manganeso	$\text{Mn}(\text{SO}_4) * 7 \text{H}_2\text{O}$	10.1
Sulfato de zinc	$\text{Zn}(\text{SO}_4) * 7\text{H}_2\text{O}$	2.95
Sulfato de sodio	$\text{Na}_2(\text{SO}_4)$	8.1
Sulfato de aluminio	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 * 18\text{H}_2\text{O}$	14.46
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 * 2\text{H}_2\text{O}$	4.68

4.3.4 Caudal de alimentación

Para el cálculo del caudal de alimentación en los reactores se utiliza el tiempo de residencia hidráulico (TRH) y el volumen del lecho vacío del bioreactor como se muestra en la ecuación 4.1:

$$Q = \frac{V}{H} \quad (4.1)$$

Donde:

Q: Caudal (L/d)

V: Volumen (L)

H: Tiempo (d)

La Tabla 4.4 muestra los distintos caudales obtenidos a partir de la ecuación 4.1. Se utilizó los tiempos de residencia de las investigaciones aplicadas en el laboratorio de hidráulica y medio ambiente de la Universidad de Concepción. Se relacionó el volumen del lecho vacío del reactor presentado en la Figura 4.1 cuyo volumen es de 11.5 L y el volumen de la zona conductiva del lecho de 2.56 L.

Tabla 4. 4. Caudales según el tiempo de residencia de distintas investigaciones.

Tipo de volumen	Autores	Tiempo de residencia (Días)	Q (L/d)
Volumen total del lecho vacío (L)	(Chaparro, 2015)	19	0.606
	(Gaete, 2017)	39	0.295
	(Perez, 2015a)	41	0.281
	(Perez, 2015b)	28.2	0.408
Volumen de la zona conductiva del lecho con porosidad (L)	(Chaparro, 2015)	2	1.266
	(Gaete, 2017)	4	0.633
	(Perez, 2015a) SDS 1	3	0.844
	(Perez, 2015a) SDS 2	5	0.506
	(Perez, 2015a) SDS 3	2.5	1.012
	(Perez, 2015b)	14	0.181
* SDS 1, SDS 2 y SDS 3, son reactores con distinta distribución y volumen de la zona conductiva del lecho.			

Mientras que la Tabla 4.5 muestra el resumen de los datos obtenidos de las investigaciones de (Chaparro, 2015), (Gaete, 2017), (Perez, 2015a) y (Perez, 2015b):

Tabla 4. 5. Resumen de datos de las investigaciones presentados en el laboratorio de hidráulica y medio ambiente.

Resumen de datos	Unidades	Chaparro, 2015	Gaete, 2017	Pérez, 2015 ^a			Pérez, 2015 b
				SDS 1	SDS 2	SDS 3	
Tasa de reducción de sulfato (1)	(mol/m ³ /d)	0.23	0.31	0.30	0.30	0.33	0.18
Tasa de reducción de sulfato (2)	(mol/m ³ /d)	-	-	0.27		0.39	-
Volumen total del lecho Vacío	(L)	57	29.24	152.6	152.6	152.6	59.4
TDH DAM (Basado en lecho vacío) (1)	(d)	19	39	40.70	40.70	40.70	28.2
TDH DAM (Basado en el lecho vacío) (2)	(d)	-	-	20.35	20.35	20.35	-
Caudal 1	(L/d)	3	0.752	3.75	3.75	3.75	2.15
Caudal 2	(L/d)	-	-	7.5	7.5	7.5	-
(Tasa de remoción de metales/tasa de remoción de sulfatos)	-	2.04	0.94	0.9	0.9	0.82	0.83
Tasa de remoción de metales (1)	(mol/m ³ /d)	0.296	0.28	0.27	0.27	0.27	0.15
Tasa de remoción de metales (2)	(mol/m ³ /d)	-	-	0.2	No	0.33	
Razón vol.Conductivo/Vol. Reactivo	-	0.096	0.096	0.067	0.125	0.06	0.3

Sin embargo, al utilizarse el tiempo de residencia para la determinación del caudal, no se considera algunas variables importantes como el volumen de la zona reactiva, la tasa de remoción de metales y sulfatos (ver Tabla 4.5), ni tampoco las carga de metales que se le alimenta al reactor (ver Tabla 4.2). Por lo tanto, para la determinación del volumen de alimentación del reactor se basará en las variables ya mencionadas. La ecuación 4.2 representa el cálculo de la eficiencia basado en las concentraciones de afluente y efluente, la ecuación 4.3 corresponde a la diferencia del afluente y el efluente basado en la tasa de remoción de metales y el volumen reactivo y, por último, la ecuación 4.4 muestra el cálculo de tasa de remoción de metales basado en la relación de la tasa de remoción de sulfatos.

$$\eta_m = \frac{\sum C_{Aflu} - \sum C_{Eflu}}{\sum C_{Aflu}} \quad (4.2)$$

$$\sum C_{Aflu} - \sum C_{Eflu} = \frac{R_{metales} * V_{reactivo}}{Q * 1000} \quad (4.3)$$

$$R_{metales} = F * R_{sulfatos} \quad (4.4)$$

Donde:

Q: Caudal (L/d)

C_{Aflu} : Concentración afluente (mol/L)

C_{Eflu} : Concentración de efluente (mol/L)

η_m : Eficiencia

$V_{Reactivo}$: Volumen de sustrato reactivo (L)

$R_{metales}$: Tasa de remoción volumétrica de metales

$R_{sulfatos}$: Tasa de remoción volumétrica de sulfatos

F: Razón de $R_{metales}/R_{sulfatos}$

Combinando las ecuaciones (4.2), (4.3) y (4.4) resulta como se muestra en la ecuación 4.5:

$$\eta_m = \frac{R_{sulfato} * F * V_{Reactivo}}{\sum C_{Aflu} * Q * 1000} \quad (4.5)$$

Despejando la ecuación 4.5 respecto al caudal resulta:

$$Q = \frac{R_{\text{sulfatos}} * F * V_{\text{Reactivo}}}{\sum C_{\text{Aflu}} * \eta_m * 1000} \quad (4.6)$$

Entonces las suposiciones que se realizan son los siguientes: La tasa de remoción de sulfatos es de $0.3 \text{ mol/m}^3/\text{d}$ basándose en la Tabla 4.3, la relación de la tasa de remoción de sulfatos y metales es de 0.9 y el 100% de los metales que reaccionan como sulfuro (cobre y zinc). La Figura 4.4 se muestra la representación del comportamiento de la eficiencia utilizando las siguientes tasas de remoción de sulfato 0.1 , 0.2 y $0.3 \text{ mol/m}^3/\text{d}$. El caudal resultante utilizando las suposiciones anteriores resulta de 0.14 L/d .

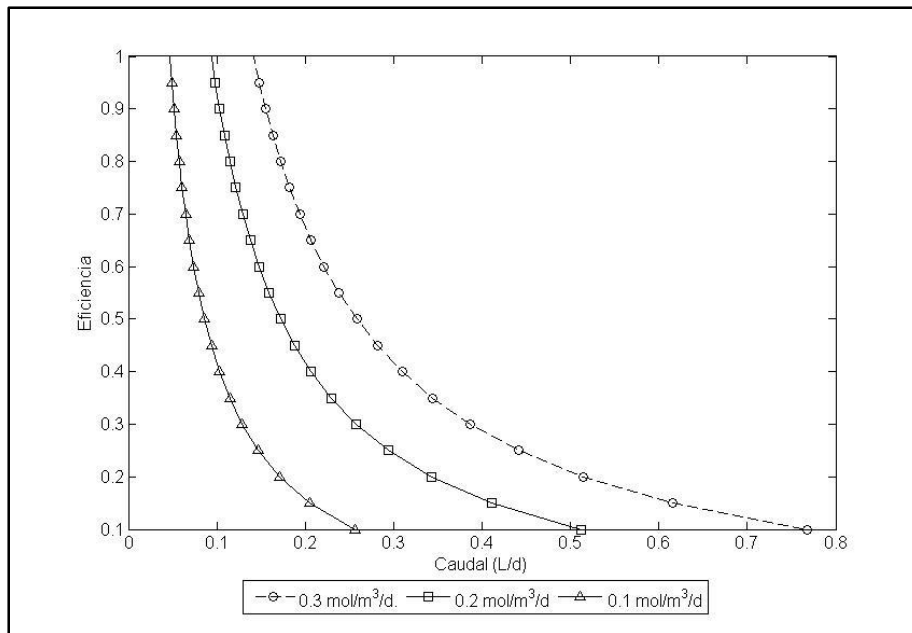


Figura 4. 4. Representa el comportamiento de la eficiencia utilizando distintas tasas de remoción (Fuente: Elaboración propia).

4.3.5 Criterio de uso del DAPRB

A partir de los datos mencionados como el caudal, concentración de metales dentro del DAM, se evalúa el criterio para confirmar si se requiere un DAPRB utilizando la ecuación 3.2 (Schwarz y Rittman, 2006a). Evaluando la ecuación con los datos de diseño del reactor donde u_{M0} es igual a 10 mol m^{-3} , D_L es igual a $10^{-4} \text{ m}^2 \text{ d}^{-1}$, v es igual a 0.00158 m d^{-1} y r es $0.3 \text{ mol m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ resulta que q_A es de 0.015, lo que indica que un PRB uniforme no podrá desintoxicar y que se requiere un DAPRB.

Para realizar el cálculo del criterio de estabilidad de un sistema dominado por la difusión se usa la ecuación 3.1 usando los siguientes valores: r igual a $0.3 \text{ mol m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, D_M es $10^{-4} \text{ m}^2 \text{ d}^{-1}$ y u_{M0} 10 mol m^{-3} , para espesores de 2.5 cm, 5 cm y 7.5 cm resulta de 0.047, 0.189 y 0.426 respectivamente. Bajo esas condiciones ninguno de los reactores cumple con ese criterio. Mientras que el espesor mínimo de capa es de 0.115 m.

4.4 Ensayo experimental

La Figura 4.5 muestra las etapas del proceso experimental. La primera fase fue la adaptación que comenzó a operar el día 02/02/2017 con la alimentación de la solución de sulfato de sodio de 2600 mg/L de concentración, cuyo objetivo es que las bacterias presentes en la digestión anaerobia produzcan sulfuro usando el sulfato como aceptador de electrones. Luego viene la segunda fase que es el proceso batch que comenzó a realizarse en el mes de Marzo, donde se vació el líquido del reactor lo máximo posible a través de una bomba de trasvasije y se rellenó con la misma solución del proceso anterior. En esta fase se analizaron la concentración de sulfato, ORP, pH y sulfuros. La tercera etapa es el proceso continuo que comienza a partir del 04/04/2017 con la alimentación manual con un caudal de 0,14 L/d, realizando mediciones cada 7 días aproximadamente realizando los mismos análisis del proceso anterior. La cuarta etapa es la alimentación con drenaje ácido sintético a partir del mes de Junio hasta el mes de noviembre completando 166 días en total. Dentro de esta parte del proceso se realizaron los siguientes análisis: ORP, pH, conductividad, oxígeno disuelto, concentración de sulfatos, sulfuros y alcalinidad. También se realizaron

monitoreos de la población microbiana cada 31 días aproximadamente y aislamiento e identificación de BRS y anaeróbicas. En las últimas 8 semanas de experimentos se realizaron análisis de pH y ORP a las capas reactivas de los siguientes reactores: R 2.5, R 5 A y R 7.5 A, mientras que en la última semana se analizó la concentración de metales de dichas capas.

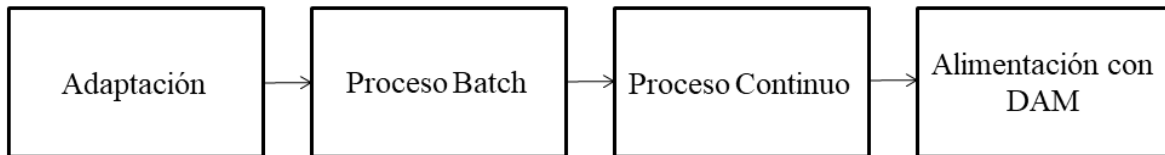


Figura 4. 5. Etapas del proceso experimental (Fuente: Elaboración propia).

4.4.1 ORP

Se mide a partir de la etapa del proceso batch del mes de marzo hasta terminada la etapa de alimentación continua del DAM en el mes de noviembre. Se usa el electrodo del laboratorio, modelo advanced PerpHect LagR pH/ISE Orion 370.

4.4.2 pH

Se mide a partir de la etapa del proceso batch hasta la etapa de la alimentación continua del DAM. También se mide el pH del afluente en etapa de alimentación continua de sulfato y de drenaje ácido. Se usa el medidor de pH de terreno con electrodo HACH, modelo HQ40d.

4.4.3 Sulfato

Se midió sulfato mediante el método 4500-SO₄²⁻ de HACH (método turbidimétrico), recomendado por las normas APHA. Este método usa Sulfaver 4 con cloruro de bario como indicador, y para medir las concentraciones se usó un espectrofotómetro HACH modelo DR 2800. Esta medición se utilizó para todas las etapas. La muestra se diluía de 1 a 100, es decir, una parte de muestra y 99 partes de agua desionizada. La dilución era de 10 mL (100 µL de muestra en 9.9 mL de agua), como exige el método, usando cubetas de cristal de cuarzo para medir en el espectrofotómetro.

4.4.4 Sulfuro

Para medir sulfuro en los reactores biológicos se usó el reactivo azul de metileno (4500-S²⁻D) de HACH, que es lo que recomienda la norma APHA. El método contiene un reactivo que reacciona con el hidrógeno sulfurado, cambiando su color a azul si hay presencia de sulfuro. Este se midió cada semana, hasta la etapa de alimentación con DAM, en que se midió cada dos semanas. Se medía en una dilución de 1 a 100.

4.4.5 Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica es útil para detectar metales en las diluciones. Se midió en el efluente y en el afluente, dos veces a la semana hasta el último mes del experimento, en el cual se midió sólo una vez a la semana. Se usó para esto un electrodo conectado al medidor de pH, modelo HQ40d de HACH.

4.4.6 Metales Disueltos

En la etapa de alimentación con DAM se tomaron muestras de 50 mL de cada reactor para medir metales disueltos, luego se filtraban con filtros desechables de celulosa y se almacenaban en tubos de plástico con tapa rosca en el refrigerador hasta su posterior

análisis. Esto se realizaba cada semana para los primeros dos puntos y a partir del mes de Julio se realizaba cada 14 días aproximadamente. Para medir las concentraciones se usó un espectrómetro de absorción atómica modelo Perkin Elmer A400.

4.4.7 Cuantificación Celular

El análisis microbiológico del efluente de los bioreactores comienza con la alimentación del drenaje ácido sintético, tomando muestras cada 31 días aproximadamente. Para aplicar este método, primero se realiza la dilución seriada y después se deposita la muestra diluida sobre la placa con medio MV o medio 641. Luego, se deposita las placas en el recipiente anaerobio abriendo el sobre absorbente de oxígeno y el indicador anaerobio. Después se deja incubando a 30°C durante 21 días. Terminado el tiempo de incubación se procede al conteo para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) (ver Figura 4.6), lo cual representa el número total de bacterias viables en el efluente utilizando la siguiente ecuación:

$$C = \frac{N * D * 1000}{VA} \quad (4.7)$$

Donde:

C: Representa la unidad formadora de colonias (UFC/ml)

N: Número de colonias en la placa

D: Tasa de dilución

VA: Alícuota agregada en la placa lo que corresponde de 50µL



Figura 4. 6. Equipo de contador de colonias cuya marca es SUNTEX colony counter 570

(Fuente: Elaboración propia).

4.4.8 Identificación molecular de bacterias en el efluente

La Figura 4.7 muestra el procedimiento de identificación molecular de bacterias, donde el primer paso muestra bacterias en un medio *Desulfovidrio* (DSMZ 63) para poder aislar bacterias reductoras de sulfatos mostradas de color negro debido a la presencia de sulfato de hierro. El paso B corresponde a la lisis celular donde se agrega un buffer (0.05 M NaOH/0.25% SDS) con el objetivo de romper la pared celular y liberar el material genético. El paso C muestra el equipo que se encarga de hacer la PCR, que sirvió para la amplificación de los genes 16S ARN ribosomal (Rowe et al., 2007) usando los cebadores 27F (Lane, 1991) y 1492R (Marchesi et al., 1998). El paso D representa la electroforesis para comprobar si se tiene material genético, luego el paso E se manda a secuenciar (Macrogen, Inc., Corea). Por último, F es el cual analiza la secuencia a través del software en línea BLAST (NCBI) y se compararon con los contenidos en la base de datos de Genbank.

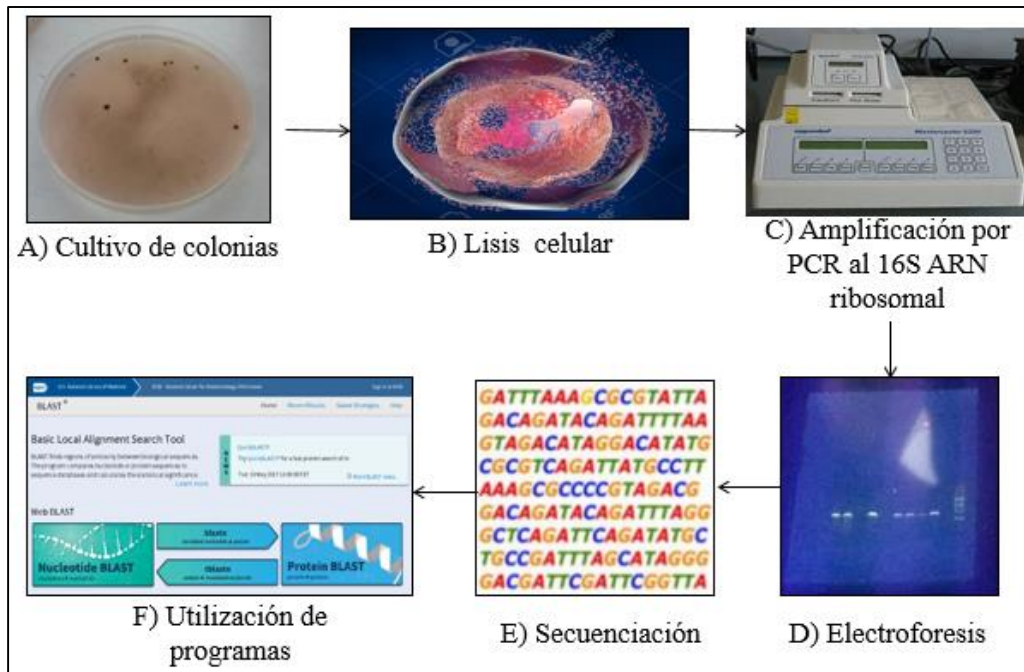


Figura 4. 7. Procedimiento de identificación de bacterias (Fuente: Elaboración propia).

4.5 Análisis de las capas reactivas

A partir del día 116 de alimentación de drenaje ácido sintético se realiza perforaciones en las capas reactivas a los siguiente reactores: R.2.5 A, R 5 A y R 7.5 A. El total de puntos de muestros fueron 5 rotulados de la siguiente manera: PM 1, PM 2, PM 3, PM 4 y PM 5. El primer punto corresponde a aquel que se encuentra más cerca de la criba de alimentación de drenaje ácido mientras que el quinto es el más alejado (ver Figura 4.8). Durante cada semana se toman muestras para realizar análisis de pH y ORP, mientras que el día 166 se agrega otro análisis que es la medición de concentración de sulfatos.

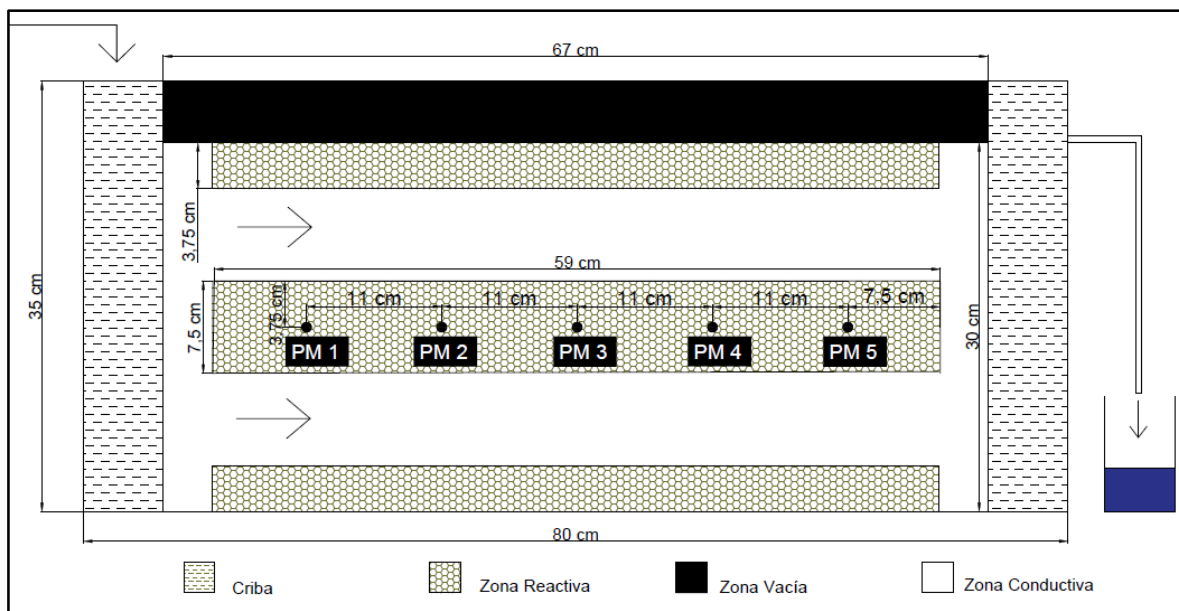


Figura 4. 8. Puntos de muestreo de la zona reactiva del reactor R 7.5 A (Fuente: Elaboración propia).



CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Proceso batch

5.1.1 Análisis de consumo de sulfato

La Figura 5.1 muestra los gráficos de consumo de solución de sulfato de sodio con una concentración de 2600 mg/L.

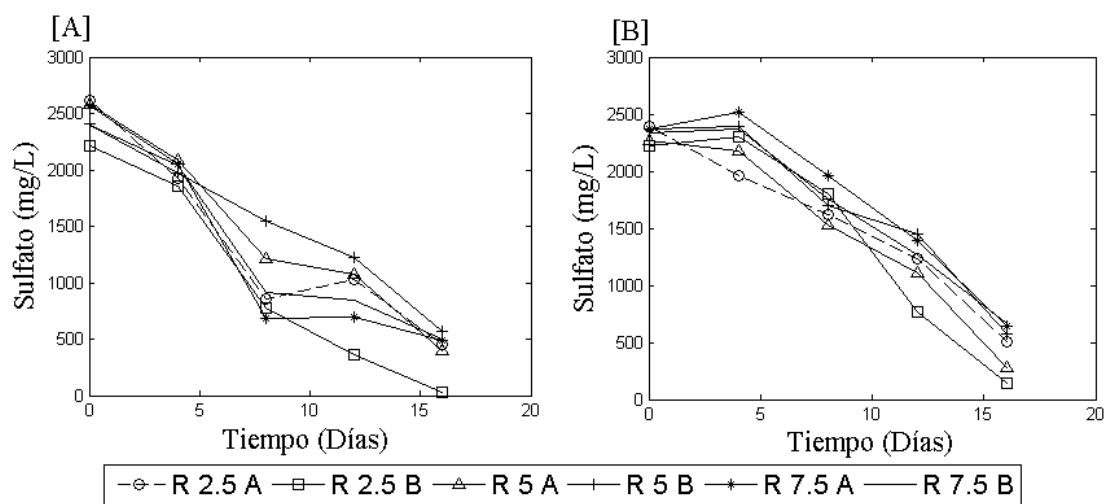


Figura 5. 1. Consumo de solución sulfatada en el proceso batch. La letra A corresponde al primer batch realizado en todos los reactores: R 2.5 A, R 2.5 B, R 5 A, R 5 B, R 7.5 A y R 7.5 B con un volumen aproximado de 4.9 L. Mientras que la letra B es del segundo batch realizado con la misma solución y aplicando a los mismos reactores (Fuente: Elaboración propia).

La Tabla 5.1 muestra la media de la concentración de sulfato de la mezcla que proviene del vaciado de todos los reactores realizado con la bomba de trasvasije.

Tabla 5. 1. Medición concentración de sulfato de la mezcla (Fuente: Elaboración propia).

Reactores	Media de la mezcla	Media de las cribas batch 2
R 2.5	180	321.8
R 5	276.5	424.8
R 7.5	396.8	652

Mientras que los rangos de pH ocurridos en ambos batch estuvieron entre 6.5 y 7.5. El potencial óxido reducción (ORP) para ambos casos se mantuvo con valores negativos inferiores a -100 mV.

La Figura 5.1 muestra el consumo de sulfato dentro de los reactores biológicos, que aproximadamente resulta de 16 días. Estos están en un ambiente reductor y a pH superior a 6.2 lo cual es óptimo para el crecimiento de bacterias celulolíticas (González y Segui, 2016). Pero esas muestras se tomaron directamente de la criba por lo que hubo que vaciar el reactor para comprobar el consumo total de este compuesto, cuyos resultados se encuentran en la Tabla 5.1.

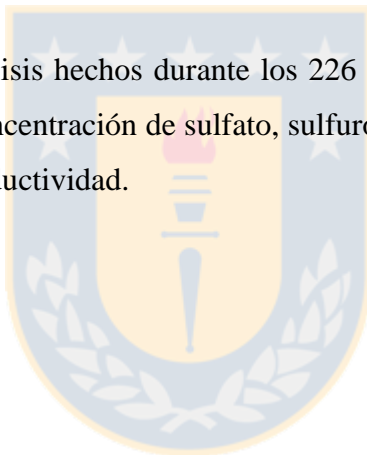
Los promedios de concentración de la mezcla son menores a los de la criba porque esta considera el vaciado de los reactores que incluye la solución ubicado en contacto directo con la zona reactiva. También se puede observar que la media de la concentración de la mezcla y la criba del reactor con grosor de 2.5 cm es menor en comparación a los otros reactores, esto debido que tienen un área específica de 0.4797 m^2 mientras que, los reactores de grosor de 5 y de 7.5 cm tienen 0.2496 m^2 y 0.1729 m^2 , respectivamente.

5.2 Análisis de Efluente

En este subcapítulo se muestran los resultados del análisis de efluentes, de sulfatos, sulfuro, pH, ORP durante todo el proceso continuo, es decir, con alimentación de solución sulfatada y con drenaje ácido presentados en el punto 5.2.1. Mientras que en el punto 5.2.2 se muestra el análisis de metales durante los 166 días de alimentación de drenaje ácido. Por último, el punto 5.2.3 muestra la variación de concentración celular a partir de la alimentación con DAM.

5.2.1 Análisis de sulfatos y otros del efluente

La Figura 5.2 muestra los análisis hechos durante los 226 días de proceso continuos a los reactores. Estos incluyen la concentración de sulfato, sulfuro, ORP, pH, la tasa de remoción de sulfatos ($\text{mol/m}^3/\text{día}$) y conductividad.



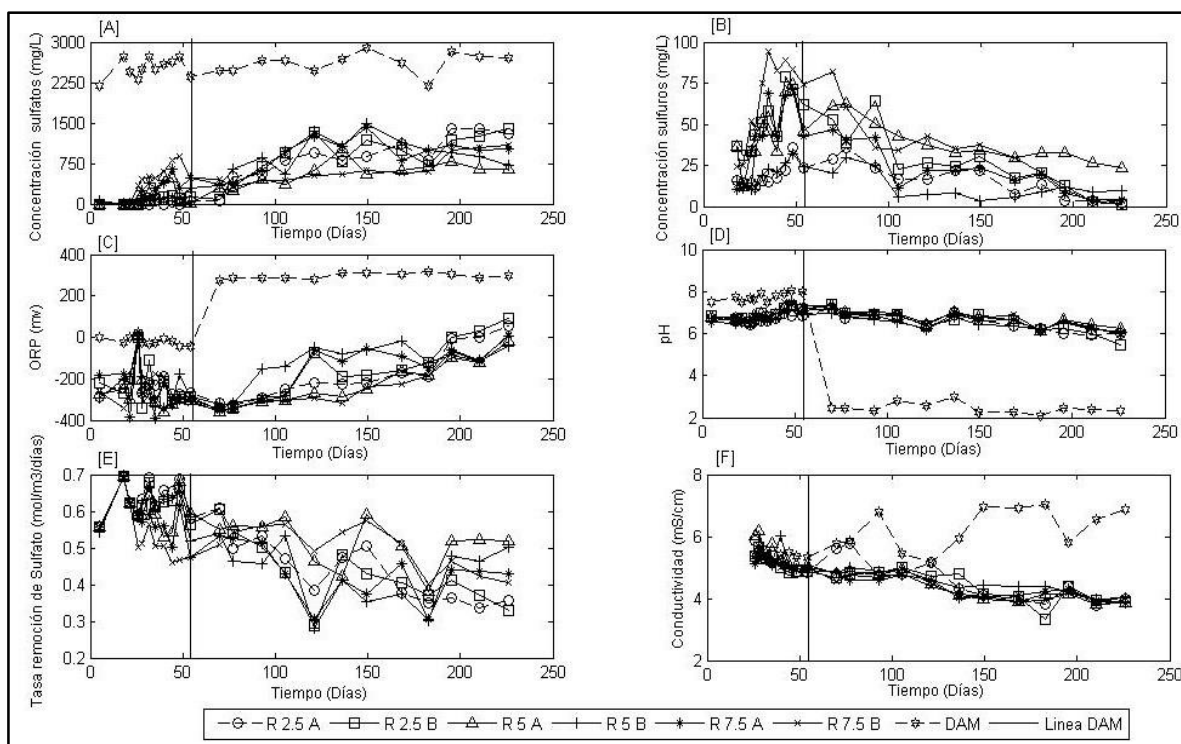


Figura 5. 2. Variaciones de concentraciones de sulfatos y sulfuros, pH, ORP, tasa de remoción de sulfatos y conductividad. La letra A corresponde a la variación de sulfato en mg/L, la letra B muestra la variación de concentración de sulfuros en mg/L, C es la variación del ORP en mV, D corresponde a la variación de pH, mientras que la letra E es la variación de la tasa de remoción de sulfatos en mol/m³/día y por último F corresponde al análisis de la conductividad en mS/cm. La línea continua vertical corresponde a la separación entre la alimentación de solución sulfatada y el DAM, ubicada en el día 55 (Fuente: Elaboración propia).

La Tabla 5.2 muestra el resumen estadístico de la tasa de remoción de sulfatos (mol/m³/día) con alimentación de solución sulfatada analizando un total de 11 muestras con un intervalo de confianza del 95%, mientras que, la Tabla 5.3 muestra las remociones de sulfato a partir de la alimentación con DAM con un total de 12 muestras.

Tabla 5. 2. Tasa de remoción de sulfatos con alimentación sulfatada (Fuente: Elaboración propia).

Ítem	R 2.5 A	R 2.5 B	R 5 A	R 5 B	R 7.5 A	R 7.5 B
Media	0.6347	0.6212	0.6025	0.6164	0.5746	0.5328
Desviación estándar	0.0469	0.0432	0.0534	0.0510	0.0592	0.0706
Varianza de la muestra	0.0022	0.0019	0.0029	0.0026	0.0035	0.0050
Mínimo	0.5573	0.5573	0.5280	0.5196	0.4725	0.4590
Máximo	0.6934	0.6934	0.6934	0.6934	0.6934	0.6911
Mediana	0.6311	0.6209	0.5928	0.6210	0.5710	0.5067
Valor p (Test de normalidad Shapiro-Wilk)	0.4730	0.7165	0.5405	0.7922	0.8985	0.0778
Grado de significancia (Valor P)	0.5150		0.5401		0.1491	

Tabla 5. 3. Tasa de remoción de sulfatos con alimentación de DAM (Fuente: Elaboración propia)

Ítem	R 2.5 A	R 2.5 B	R 5 A	R 5 B	R 7.5 A	R 7.5 B
Media	0.4385	0.4312	0.5148	0.4296	0.4294	0.4994
Desviación estándar	0.0886	0.0894	0.0640	0.0855	0.0752	0.0623
Varianza de la muestra	0.0079	0.0080	0.0041	0.0073	0.0057	0.0039
Mínimo	0.3370	0.2886	0.3808	0.2815	0.3048	0.4031
Máximo	0.6103	0.6037	0.5928	0.5404	0.5328	0.5746
Mediana	0.4271	0.4222	0.5210	0.4598	0.4331	0.5106
Valor p (Test de normalidad Shapiro-Wilk)	0.1541	0.9876	0.2808	0.4180	0.2811	0.1590
Grado de significancia	0.8425		0.012		0.022	

La Tabla 5.4 muestra las combinaciones del valor “p” del ANOVA para la tasa de remoción de sulfatos con alimentación sulfatada. Mientras que la Tabla 5.5 muestra las combinaciones del valor “p” pero para la alimentación con DAM. Por último, la Tabla 5.6 se observa el efecto de inhibición del DAM comparando las tasas de remoción de sulfato de con alimentación de solución sulfatada y el drenaje sintético.

Tabla 5. 4. Combinaciones del valor p para la tasa de remoción de sulfatos con alimentación sulfatada (Fuente: Elaboración propia).

Reactores	R 2.5 A	R 2.5 B	R 5 A	R 5 B	R 7.5 A	R 7.5 B
R 2.5 A		0.8999	0.7131	0.8568	0.0161	0.0010
R 2.5 B	0.8999		0.3586	0.7844	0.0429	0.0023
R 5 A	0.7131	0.3586		0.5401	0.2593	0.0172
R 5 B	0.8568	0.7844	0.5401		0.1737	0.0052
R 7.5 A	0.0161	0.0429	0.2593	0.1737		0.1491
R7.5 B	0.0010	0.0023	0.0172	0.0052	0.1491	

Tabla 5. 5. Combinaciones para la tasa de remoción de sulfatos con alimentación con DAM (Fuente: Elaboración propia).

Reactores	R 2.5 A	R 2.5 B	R 5 A	R 5 B	R 7.5 A	R 7.5 B
R 2.5 A		0.8425	0.0252	0.8049	0.7889	0.0658
R 2.5 B	0.8425		0.0159	0.9650	0.9581	0.0424
R 5 A	0.0252	0.0159		0.012	0.0069	0.5558
R 5 B	0.8049	0.9650	0.012		0.9949	0.0334
R 7.5 A	0.7889	0.9581	0.0069	0.9949		0.022
R7.5 B	0.0658	0.0424	0.5558	0.0334	0.022	

Tabla 5. 6. Efecto de inhibición de alimentación con DAM (Fuente: Elaboración propia).

Reactores	Inhibición (%)
R 2.5 A	31.0
R 2.5 B	30.6
R 5 A	14.6
R 5 B	30.3
R 7.5 A	25.3
R 7.5 B	6.3

En la Figura 5.2, en su gráfico B se puede observar que comienza a disminuir la concentración de sulfuro en el efluente una vez que se comienza la alimentación con DAM. Esto ocurre porque aquellos metales divalentes como el cobre, zinc y hierro ferroso presentes en el drenaje sintético reaccionan con el sulfuro producido por las BRS, en la zona reactiva precipitando como CuS , ZnS y FeS , verificándose así el mecanismo de bioprotección (Schwarz y Rittmann, 2006a; ITCR, 2012).

En la Tabla 5.2 se puede apreciar las medias de los reactores: R 2.5 A, R 2.5 B, R 5 A, R 5 B, R 7.5 A y R7.5 B cuyos resultados fueron: 0.6347, 0.6212, 0.6025, 0.6164, 0.5746 y 0.5328, respectivamente. Estos valores son superiores al reportado por Al-Abed (2017) que fue de $0.44 \text{ mol/m}^3/\text{día}$. Sin embargo, como se trata de una alimentación de sulfato de sodio, que presentan un ORP entre 5 y -5 mV (ver Figura 5.2c) y un pH superior a 6.5 (ver Figura 5.2d) que es el rango recomendado por Contreras y Molero (2011) para un crecimiento óptimo de bacterias celulíticas, tengan la ventaja que la alimentación no es toxica para toda la comunidad microbiana. Por lo tanto, bajo las condiciones mencionadas anteriormente, puede crecer una biopelícula dentro de la zona conductiva de los reactores. Una vez que comenzó la alimentación con drenaje ácido, la tasa de remoción de sulfatos disminuyó debido a la toxicidad que presenta, donde los reactores que se vieron más afectados fueron los R 2.5 A y R 2.5 B presentando una disminución del 31% y 30.6%, respectivamente (ver Tabla 5.6). Esto ocurrió porque dichos reactores presentaban la mayor

área específica de reacción (las tasas de remoción de sulfato más altas) y al momento de alimentar con drenaje sintético, la tasa comenzó a disminuir a medida que transcurrían los días, llegando a presentar las más bajas a partir del día 135 de alimentación con DAM o el día 195 del proceso continuo (ver Figura 5.2e). Demostrando así, que el mecanismo de bioprotección comenzó a fallar en los reactores de capas más delgadas.

Las tasas de remoción de sulfatos con alimentación de solución sulfatada no presentan ninguna diferencia significativa al realizar el ANOVA a los duplicados, debido a que el valor $p > 0.05$ (ver tabla 5.2). La comparación del R 2.5 A y R 5 A, no presentan diferencias, sin embargo, para el caso del reactor R 2.5 A y R 7.5 A se da el caso contrario ($p < 0.05$) (ver Tabla 5.4). Esto puede deberse que los reactores de 2.5 cm de grosor vertical poseen una mayor superficie (4797 cm^2) de difusión de la solución sulfatada a la zona reactiva en comparación a los reactores que presentan un grosor de capa de 7.5 cm cuya superficie es 1729 cm^2 .

Las tasas de remoción de sulfatos promedio con alimentación con DAM para los reactores R 2.5 A, R 2.5 B, R 5 A, R 5 B, R 7.5 A y R 7.5 B fueron: 0.4385, 0.4312, 0.5148, 0.4296, 0.4294 y 0.4994, respectivamente (ver Tabla 5.3). Estos valores son superiores a los reportados por Gusek (2002) y Neculita et al (2007) que reportaron que la eliminación de sulfato es aproximadamente de $0.3 \text{ mol/m}^3/\text{día}$ para bioreactores con una mezcla de materia orgánica y caliza molida. También son superiores al valor exhibidos por McCauley (2009) de $0.38 \text{ mol/m}^3/\text{día}$. No obstante, también se ha reportado tasas de remoción de sulfato de $0.44 \text{ mol/m}^3/\text{día}$, que es un valor similar a los obtenidos en esta investigación (Al-Abed, 2017).

El resumen estadístico de las tasas de remoción de sulfato de la alimentación de DAM de la Tabla 5.3, donde se analizaron 12 muestras, indican el comportamiento de una distribución normal debido que el valor p del test de normalidad de *Shapiro-Wilk* es mayor a 0.05. Por lo tanto, se puede emplear el ANOVA con el objetivo de ver si se presenta diferencias significativas entre los reactores en duplicado (uso de software SPSS). El caso de los reactores R 2.5 A y R 2.5 B no presenta una diferencia significativa debido a que el p es mayor que 0.05. Sin embargo, los reactores con mayores grosores de capas verticales presentaron un valor $p < 0.05$ por lo que sí tienen diferencias entre los duplicados. Si se

observa el comportamiento del reactor R 5 B en la Figura 5.2e, se aprecia que, entre los días 10 y 123 de alimentación con DAM que presenta tasas de remoción más bajas que los demás reactores. Pero después del día 135 el reactor mejoró acercándose al comportamiento del reactor R 5 A, demostrando así, que el sistema se puede autorregular. Mientras que para el comportamiento del reactor R 7.5 B se observa que a partir del día 135 de alimentación con DAM la tasa de remoción de sulfato disminuye por lo que se comporta de manera similar al reactor R 7.5 A. Sin embargo, debido a que se analizaron las 12 muestras para el ANOVA, se presentaron diferencias significativas entre los duplicados (ver Tabla 5.5). Una posible explicación para el deterioro temporal de la calidad efluente sería el flujo no balanceado a través de las diferentes capas de los reactores, con tiempos de residencia insuficientes en algunas capas. A su vez, la recuperación de la calidad efluente podría deberse al rebalanceo de los flujos de las capas, debido a que mayores caudales conllevan temporalmente mayor carga de metales y formación de precipitados, equilibrándose la mayor permeabilidad temporal con las demás.

5.2.2 Análisis de metales del efluente

La Figura 5.3 muestra los análisis de metales medidos durante los 166 días de proceso continuo con alimentación de drenaje ácido para todos los reactores, agregando el análisis del afluente, presentado con una concentración de mg/L. Mientras que la Tabla 5.7 muestra la estadística descriptiva de la tasa de remoción de metales ($\text{mol}/\text{m}^3/\text{día}$) usando una cantidad de 12 muestras y con un intervalo de confianza del 95%.

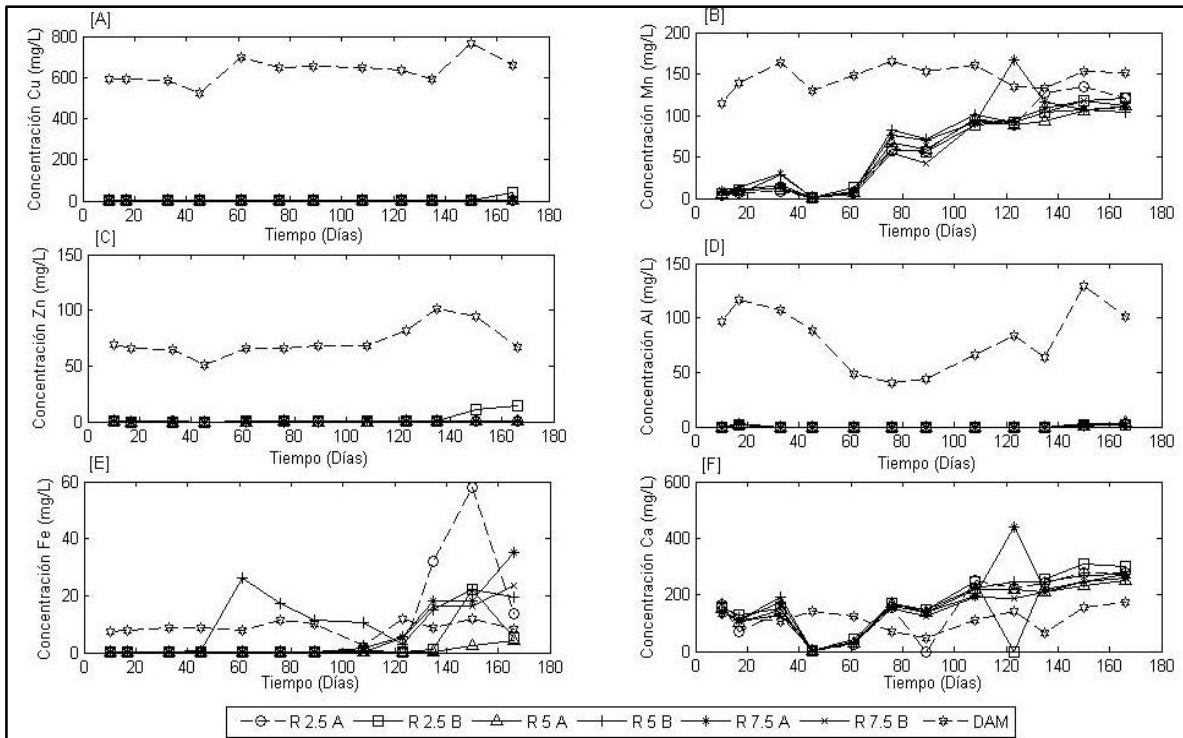


Figura 5. 3. Variaciones de concentraciones de metales. La letra A corresponde a la variación de concentración de cobre, B muestra la variación de manganeso, C corresponde a la variación de zinc, D muestra la variación del aluminio, E muestra la variación del hierro y por último la letra F corresponde a la variación del Calcio (Fuente: Elaboración propia).

Tabla 5. 7. Estadística descriptiva de la tasa de remoción de metales ($\text{mol}/\text{m}^3/\text{día}$) (Fuente: Elaboración propia).

Ítem	R 2.5 A	R 2.5 B	R 5 A	R 5 B	R 7.5 A	R 7.5 B
Media	0.3817	0.3836	0.3874	0.3811	0.3799	0.3842
Desviación estándar	0.0330	0.0326	0.0356	0.0365	0.0388	0.0330
Varianza de la muestra	0.0011	0.0011	0.0013	0.0013	0.0015	0.0011
Mínimo	0.3159	0.3389	0.3446	0.3336	0.3267	0.3310
Máximo	0.4334	0.4525	0.4717	0.4624	0.4632	0.4578
Valor p (Test de normalidad Shapiro-Wilk)	0.6077	0.2161	0.1421	0.5406	0.5634	0.4601
Grado de significancia	0.8935		0.6740		0.7781	

El promedio de las tasas de remoción de metales, para los reactores: R 2.5 A, R 2.5 B, R 5 A, R 5 B, R 7.5 B y R 7.5 A fueron: 0.3817, 0.3836, 0.3874, 0.3811, 0.3799 y 0.3842 $\text{mol}/\text{m}^3/\text{día}$, respectivamente (ver Tabla 5.7). Estos son valores superiores a la tasa típica presentada en los reactores reductores de sulfato cuyo valor es $0.3 \text{ mol}/\text{m}^3/\text{día}$ (ITRC, 2012; Wildeman et al. 2006).

La media de la tasa de remoción de metales no presenta ninguna diferencia significativa al realizar el ANOVA en los duplicados debido a que el valor $p > 0.05$ (para todos los casos) (ver Tabla 5.7). La comparación del reactor R 2.5 A con R 5 A o R 2.5 A con R 7.5 A no muestra una diferencia ($p > 0.05$). Este comportamiento similar en todos los reactores se puede apreciar en la Figura 5.3 en el análisis de efluente de cobre, zinc, manganeso y aluminio. Sin embargo, a partir del día 150 comenzó a salir concentración de zinc en el reactor R 2.5 B (ver figura 5.3c) y concentración de cobre en el día 166, por lo que presenta una falla en el mecanismo de bioprotección (ver Figura 5.3a). Pero en el análisis de ANOVA se evaluaron las doce muestras por lo que no se pudo apreciar esta una diferencia significativa entre todos los reactores.

5.2.3 Cambio microbiológico

La Figura 5.4 muestra la variación de la cuantificación celular (UFC/ml) en el efluente de los reactores: R 2.5 A, R 2.5 B, R 5 A, R 5 B, R 7.5 A y R 7.5 B. Esto se realiza durante los 166 días de alimentación de drenaje ácido.

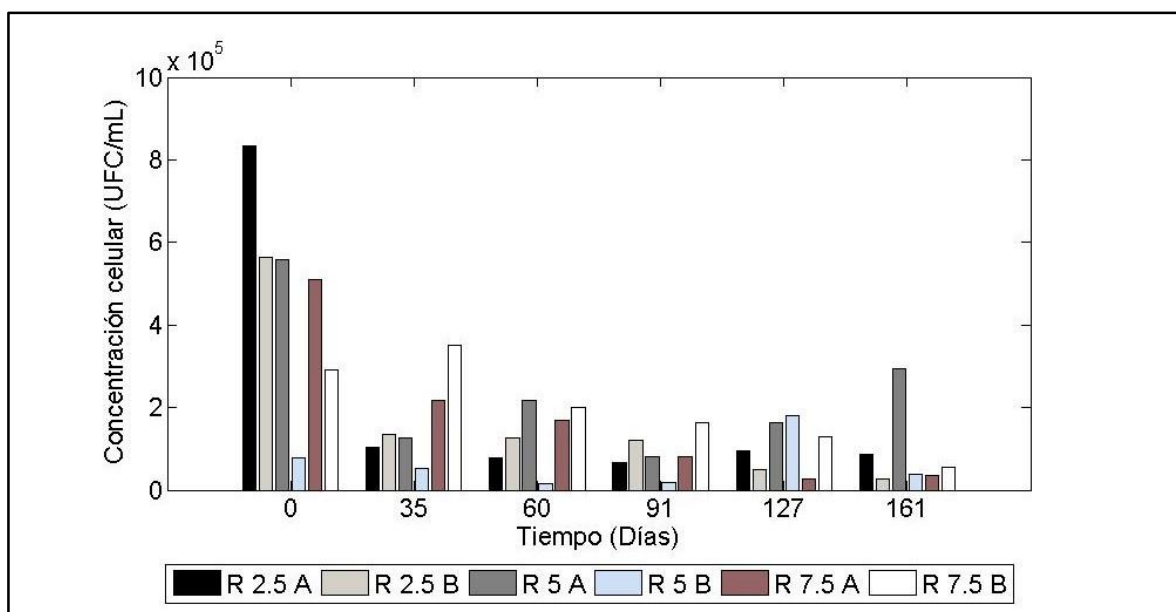


Figura 5. 4. Variación de la cuantificación celular (UFC/ml) en el efluente con DAM (Fuente: Elaboración propia).

En la Tabla 5.8 muestra la comparación de concentración celular (UFC/mL) del efluente en todos los reactores entre el tiempo cero y el día 161.

Tabla 5. 8. Disminución de la concentración celular (UFC/mL) (Fuente: Elaboración propia).

Reactores	Disminución (%)
R 2.5 A	89.6
R 2.5 B	95.3
R 5 A	47.2
R 5 B	48.1
R 7.5 A	92.9
R 7.5 B	81.1

La Figura 5.4 muestra una disminución de concentración celular (UFC/ml) de todos los reactores, lo que ocurre porque la muestra se tomó del efluente que proviene de la zona conductiva de los reactores, que está expuesta a los efectos de la advección por la alimentación del DAM (Schwarz y Rittmann, 2010).

La Tabla 5.8 se muestra la comparación entre el tiempo cero y el día 161, donde se aprecia que el reactor R 2.5 B presenta el mayor porcentaje de disminución de concentración celular del efluente. Esto ocurre porque en este reactor comenzó aparecer aproximadamente 10 mg/L de zinc en el día 150 (ver Figura 5.2c) el cual es un metal tóxico para los microorganismos (Hoa, 2010). También se puede apreciar en la Figura 5.4 que el reactor R 2.5 B en el día 161 de alimentación presenta la menor concentración celular en comparación a los demás reactores debido a la presencia de este metal.

5.3 Análisis de capas

En este subcapítulo se muestra los resultados de análisis de capas a partir de los puntos de muestreo presentados en la Figura 4.8. A partir de aquella figura se analiza pH y ORP durante los periodos de 116 días hasta 166 días de alimentación de drenaje ácido presentados en el punto 5.3.1. Mientras que el análisis de metales y sulfatos se realiza en el último día de alimentación de DAM lo cual está presentado en el punto 5.3.2. Por último, la medición de cuantificación celular (UFC/ml) solo se realizó en los primeros dos puntos de muestreo lo cual se presenta en el punto 5.3.3.

5.3.1 Análisis de pH y ORP

La Figura 5.5 muestra los análisis de pH y ORP en las capas entre los días 116 y 166 días de alimentación con DAM en los puntos de muestreos: PM 1, PM 2, PM 3, PM 4, PM5. Solo se analizaron los siguientes reactores: R 2.5 A, R 5 A y R 7.5 A.

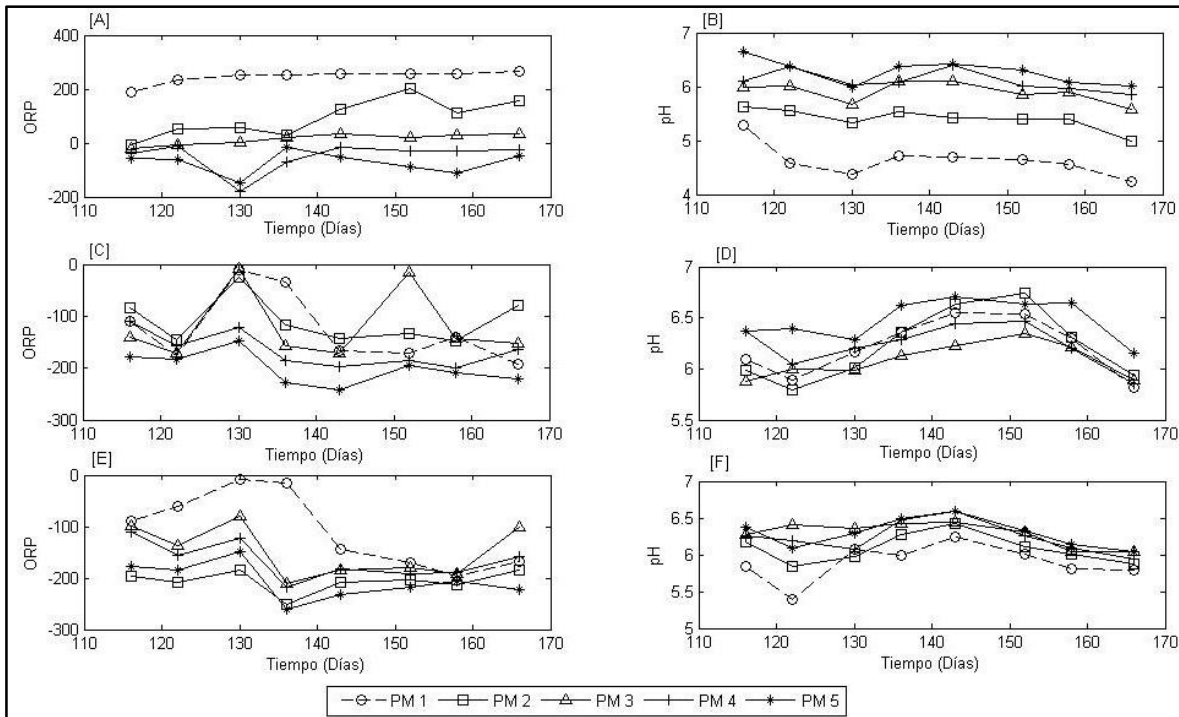


Figura 5. 5. Análisis de capas de pH y ORP. Las letras A y B corresponde a la variación de ORP (mV) y pH para el reactor R 2.5 A, respectivamente. Las letras C y D corresponde a la variación de ORP y pH para el reactor R 5 A, por último las letras E y F corresponde a la variación de ORP y pH para el reactor R 7.5 A (Fuente: Elaboración propia).

Como podemos observar en la Figura 5.5 en el gráfico A, que corresponde al reactor R 2.5 A, se puede apreciar que en los primeros puntos de muestreo (PM 1 y PM2) el ORP es alto y se encuentra en un medio oxidado. Para los reactores biológicos reductores de sulfato se requiere que el ambiente sea reductor, es decir, con valores de ORP negativos para que predomine la reducción del aceptador de electrones. La pareja redox $\text{SO}_4^{2-}/\text{S}^{2-}$ ocurre en el rango de -100 mV a -250 mV por lo que en estos puntos no se cumple este criterio haciendo que se dificulte el ambiente para los microorganismos (Peres, 2015a). Mientras que los gráficos C y E, que corresponden a los reactores R 5 A y R 7.5 A respectivamente, se mantienen con ORP en rangos negativos, lo que significa que se mantiene un ambiente reductor, siendo esta una condición óptima para la comunidad microbiana anaerobia.

En la Figura 5.5 se puede apreciar en el gráfico B, que corresponde a la evaluación del pH del reactor R 2.5 A, que este presenta valores de pH inferiores a 5 para el primer punto de muestreo (PM 1) y el segundo PM2 está entre 5 y 6. Cuando el pH es inferior a 6, las bacterias degradadoras de celulosa comienzan a inhibir su crecimiento debido a que son sensibles a esta variable y crecen a $6.5 \text{ pH} >$ (Contreras y Molero, 2011). Mientras que según González y Segui (2016), las bacterias celulíticas, protozoarios, bacterias metanógenas (productoras de metano) requieren un pH de 6.2 o mayor; y las bacterias amilolíticas son activas en condiciones más ácidas, cerca de pH 5.8. Estas bacterias son importantes dentro de la digestión anaerobia ya que sin estas no se podría degradar estos polisacáridos complejos por lo que las bacterias reductoras de sulfatos se quedarían sin donador de electrones para poder completar su metabolismo (ver Figura 3.6) (Logan, 2005). Ahora, si observamos los gráficos D y F, que corresponden al análisis de pH de las capas para los reactores R 5 A y R 7.5 A, respectivamente, en estos reactores el pH se encuentra entre 6 y 6.8 por lo que las bacterias celulíticas pueden crecer y degradar los polisacáridos para reducirlos a compuestos más simples y completar el proceso de la digestión anaerobia para que la BRS puedan completar su función.

5.3.2 Análisis de metales y sulfato

La Figura 5.6 muestra el análisis de capas de metales y sulfatos de los puntos de muestreo: PM 1, PM 2, PM 3, PM 4 y PM 5, de los reactores R 2.5 A, R 5 A y R 7.5 A.

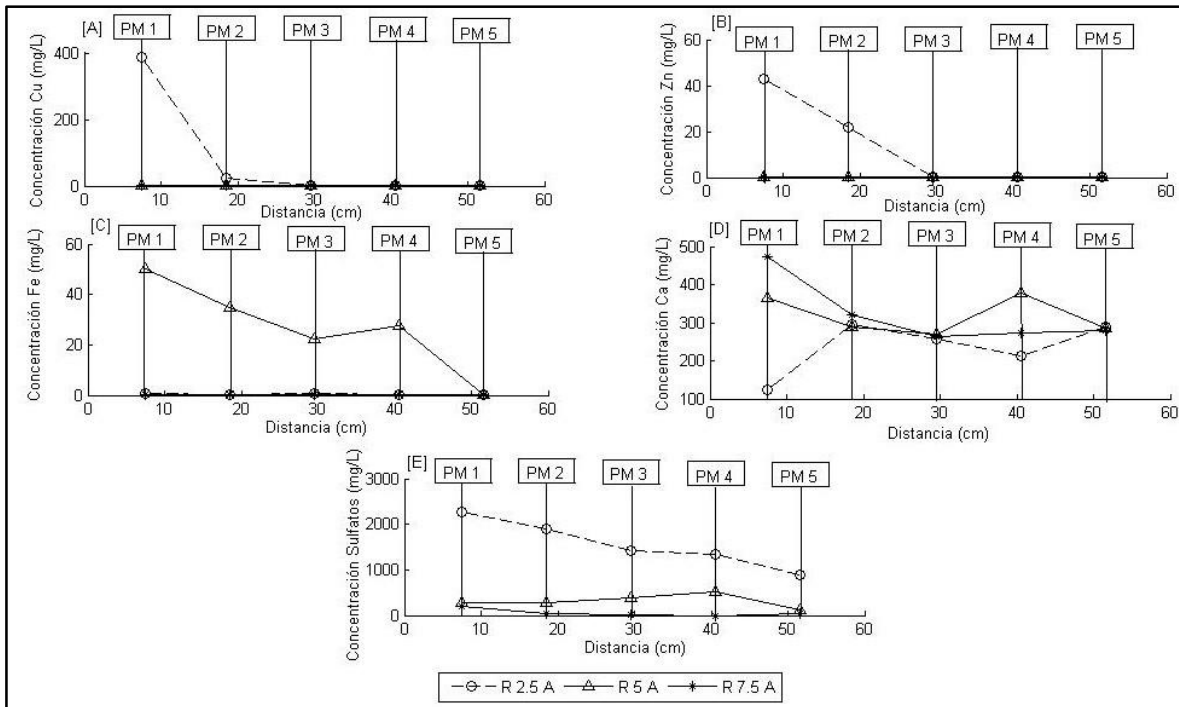


Figura 5. 6. Análisis de concentración de metales y sulfato. La letra A corresponde a la variación de concentración de cobre para todos los reactores, la letra B muestra la variación de concentración de zinc de los distintos puntos de muestreo, la letra C corresponde a la variación de concentración de hierro, en D se observa la variación de concentración de calcio y por último la letra D corresponde a la variación de concentración de sulfatos (Fuente: Elaboración propia).

En la Figura 5.6, en su gráfico A, se puede apreciar la variación de cobre de los puntos de muestreo: PM1, PM2, PM3, PM4 y PM5. El primer punto muestra una alta concentración de cobre dentro de la capa del reactor R 2.5 A superando los 350 mg/L de este metal, lo que significa que se tiene un alto grado de toxicidad sobre la comunidad microbiana. Según Hoa (2010), la concentración de inhibición para las BRS es de 7.5 mg/L de cobre (considerando que esta investigación tenía una mezcla con 7.5 mg/L zinc, 7.5 mg/L Ni y 7.5 mg/L Cr), mientras que, según Jin (2007) la contracción de inhibición es de 30 mg/L de cobre, por lo que el PM1 del R 2.5 A supera claramente estos niveles, al contrarios de los reactores R 5 A y R 7.5 A que no presentan concentración de este metal divalente.

Continuando el análisis de la Figura 5.6, pero en su gráfico B, se puede apreciar que los puntos de muestro PM1 y PM2 del reactor R 2.5 A superan los 20 mg/L de zinc. Según Hoa (2010), la concentración de inhibición para las bacterias reductoras de sulfato es de 7.5 mg/L de zinc (considerando que esta investigación tenía una mezcla con 7.5 mg/L Cu, 7.5 mg/L Ni y 7.5 mg/L Cr), mientras que, según Poulson (1997), la concentración de inhibición es de 13 mg/L de zinc para cultivos de bacterias *Desulfovibrio desulfuricans*. Por lo tanto, los niveles de este metal son altos para los puntos mencionados por los que el sistema de bioprotección está fallando en este reactor. Por el contrario los reactores R 5 A y R 7.5 A, no presentan ninguna concentración del metal.

Por otro lado, en el gráfico D, que presenta las concentraciones de Ca en la capas, se observa que el reactor R 2.5 A presenta la menor concentración de este metal en el punto de muestro PM 1 en comparación a los otros reactores con mayor grosor vertical. Según ITRC (2012) hay metales divalentes, por ejemplo el hierro ferroso que puede precipitar como carbonato o como sulfuro dentro de los BCR. Pero como el mecanismo de bioprotección está fallando en este reactor, entonces los metales divalentes que precipitaban como sulfuro ahora lo hacen como carbonato consumiendo más caliza. Como consecuencia se tiene una menor concentración de este compuesto en comparación a los reactores R 5 A y R 7.5 A. Además, la acidez acelera la disolución de la caliza y la desaparición del Ca.

Por último, en el grafico E se observa la acumulación de sulfato en la capa reactiva del reactor R 2.5 A, otro síntoma de inhibición, el cual se observa en toda la capa a consecuencia a la falla del sistema de bioprotección.

5.3.3 Análisis biológico

En la Figura 5.7 se puede observar la concentración celular de bacterias anaerobias presentes en los puntos de muestro PM 1 y PM 2 de los reactores R 2.5 A, R 5 A y R 7.5 A.

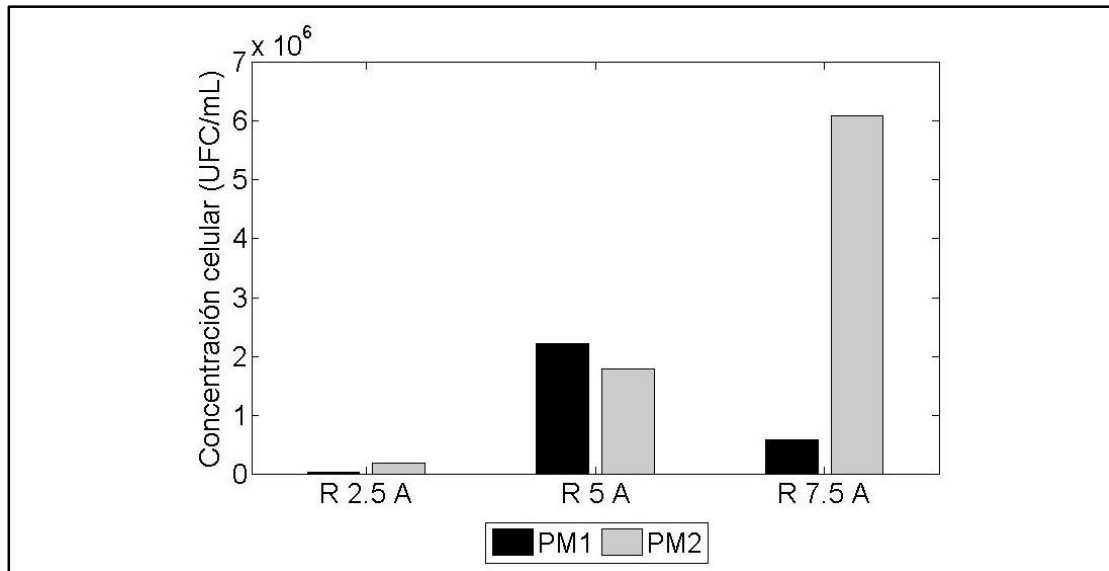


Figura 5. 7. Concentración celular de los reactores R 2.5 A, R 5 A y R 7.5 A. El color negro muestra el punto de muestreo PM 1 y el plomo corresponde al punto de muestreo PM 2 (Fuente: Elaboración propia).

En la Figura 5.7 se puede apreciar que el reactor R 2.5 A presenta la menor concentración celular en sus puntos PM1 y PM2 (UFC/ml) en comparación con los reactores R 5 A y R 7.5 A. Esto debido a que las bacterias de la digestión anaerobia estaban en un ambiente con alto ORP y un pH inferior a 6.2. Según González y Segui (2016), las bacterias celulolíticas requieren un pH mayor al presentado. También se debe a la alta concentración de metales tóxicos como el cobre y el zinc los cuales tienen efectos negativos en el crecimiento de bacterias reductoras de sulfato (Hao 1994; Poulson ,1997; Hoa, 2010).

5.3.4 Evaluación del mecanismo de bioprotección

Al analizar la estabilidad por difusión de los reactores R2.5A, R5A y R7.5A, utilizando las tasas de remoción de sulfato presentadas en la Tabla 5.3, resulta que en todos los reactores el mecanismo de bioprotección debió haber fallado ($q_D < 1$). Sin embargo, los reactores de grosor 5 y 7.5 cm no presentaron problemas (Figs. 5 y 6). Esto pudo deberse a la lentitud del proceso de falla, en parte debido al elevado tiempo de residencia de los reactores, tal como ocurrió con el reactor R2.5A, para el cual el breakthrough de los metales comenzó a

ocurrir recién a partir del día 150. Por lo tanto, podría requerirse un mayor tiempo de operación para observar la falla del mecanismo de bioprotección en los reactores R5A y R7.5A.

5.4 Detección de bacterias

La Tabla 5.9 muestra las bacterias encontradas en los reactores biológicos, las cuales son: *Desulfovodrio desulfuricans*, *Propionicimonas paludicola*, *Paenibacillus typhae* y *Bacteroides graminisolvens*, donde se describen la temperatura de crecimiento, su fuente de carbono y sus productos.



Tabla 5.9. Microorganismos de los reactores (Fuente: Elaboración propia).

pH	Fuente de carbono y electrones	Producto	Más cercano	Identidad (%)	Longitud producto amplificado	GenBank
6.8 - 8.2	H ₂ , CO ₂ , acetato, lactato, carbohidratos (Kuever, 2015)	H ₂ S, HS ⁻ (Kuever, 2015)	<i>Desulfovibrio desulfuricans strain ATCC 27774</i> (H. Oyaizu y C. R. Woese, 1985)	99	1361	MG210585
4.5 - 7.5	Arabinosa, xilosa, fructosa, galactosa, glucosa, Celobiosa (Akasaka ,et al, 2013)	Acetato, propionato, lactato, succinato CO ₂ (Akasaka ,et al, 2013)	<i>Propionicimona paludicola strain Wd</i> (Akasaka ,et al, 2013)	98	1308	MG867725
6- 10	Almidón, Celobiosa maltosa, lactosa	D-galactosa D-manitol Gentiobiose D-Ribosa (Kong, et. al, 2013)	<i>Paenibacillus typhae strain xj7</i> (Kong, et. al, 2013)	99	1378	MG868981
6.1 - 8.2	Almidón, pectina, Xilano (componente mayoritario de la hemicelulosa) Celobiosa (Nishiyama, et al, 2009)	Acetato, propionato, succinato. (Nishiyama, et al, 2009)	<i>Bacteroides graminisolvens strain JCM 15093</i> (Sakamoto y Ohkuma, 2010)	99	1375	MG859671

La primera especie que se encontró fue una bacteria reductora de sulfato. Esta es una de las responsables en la producción de sulfuro (ver Figura 5.2). Esta bacteria fue encontrada del efluente del reactor R 2.5 A el día 14/07/2017 cuyo $\text{pH} > 6$. Si este microorganismo estuviese en las condiciones presentadas en la Figura 5.5b en el punto de muestreo PM1, estaría inhibido debido a que el rango de pH es inferior a 5, y él estaba oxidado (ver Figura 5.5a). También, si se aprecia la Figura 5.6b, en el mismo punto de muestreo, se presenta una alta concentración de zinc, lo cual es un factor negativo para el crecimiento de la bacteria reductora de sulfato encontrada, porque según Poulson (1997), la concentración de inhibición es de 13 mg/L de zinc para cultivos de bacterias *Desulfovibrio desulfuricans*.

Las bacterias *Paenibacillus typhae* y *Bacteroides graminisolvens* presentadas en la Tabla 5.9 se aislaron a partir del punto de muestreo PM2 del reactor R 2.5 A. Estas bacterias utilizan la celobiosa. Este disacárido proviene de la hidrólisis de la celulosa, la cual, corresponde a un intermediario dentro de la etapa hidrolítica de la digestión anaerobia (logan, 2005). Según Nishiyama et al. (2009), los *Bacteroides graminisolvens* pueden degradar polisacáridos más complejos de origen vegetal, con los cuales realizan un gran aporte en el proceso de hidrólisis. Esta etapa es fundamental para la obtención de compuestos carbonados más simples para toda la comunidad microbiana, sobre todo para las BRS.

La *Propionicimonas paludicola* usa como fuente de carbono la glucosa, fructosa e incluso la celobiosa proveniente de la hidrólisis de la celulosa (ver Tabla 5.4). Dentro de sus productos están el lactato, el cual es una fuente de carbono para las BRS, el que pueden usar para completar su metabolismo como se ha mostrado en otras investigaciones (Hemsi et al., 2005).

5.5 Comportamiento de flujos

La Tabla 5.10 muestra los resultados del comportamiento de flujo medido por el trazador (rodamina WT) para todos los reactores. El coeficiente de difusión y el número de Peclet fue calculado a partir de los ajustes de parámetros de los datos experimentales.

Tabla 5.10. Comportamiento de flujos (Fuente: Elaboración propia).

Tipo de Reactor	N° de Peclet	N° número de Levenspiel	Tiempo de residencia teórico (min)	Coefficiente de difusión (m ² /h)
R 2.5 A	5.815	0.172	73.2	0.094
R 2.5 B	14.91	0.067	73.2	0.037
R 5 A	4.300	0.233	73.2	0.127
R 5 B	11.25	0.089	73.2	0.048
R 7.5 A	5.478	0.183	73.2	0.100

El número de Levenspiel o número de dispersión del reactor (RDN) (inverso del Peclet) da una medida directa del grado de mezcla del reactor por simple comparación con valores intermedios de éste entre sus extremos de flujo pistón y mezcla perfecta. Los reactores R 2.5 A, R 5 A y R 7.5 A, tienen un alto grado de dispersión debido a que el número de Levenspiel es cercano o superior a 0.2, mientras que, los reactores R 2.5 B y R 5 B tienen una mediana dispersión debido a que se encuentra entre 0.05 y 0.1 (ver Tabla 5.5) (Hill, 1977). Mientras que el reactor R 7.5 B no se encuentra presente en este análisis debido a que, el tiempo de residencia producido en el experimento fue de 90 min aproximadamente, lo cual resultó muy superior al presentado en la Tabla 5.5. Estos valores fueron evaluados una vez finalizado el proceso de alimentación con DAM, y por lo tanto, no consideran el

comportamiento de todo el periodo del proceso continuo. Es decir, por ejemplo en el caso del reactor R 2.5 B el comportamiento de la tasa de remoción de sulfato durante el periodo 10-123 días fue de las más bajas en comparación a los demás reactores, sin embargo, a partir del día 135 la tasa de remoción mejoró igualando a la tasa del reactor R 5 A. Esto pudo ocurrir porque pudo cambiar el comportamiento de flujo dentro del reactor disminuyendo el grado de dispersión (entre otros factores). El mismo caso pudo ocurrir en el reactor R 5 A, que presentó un alto grado de dispersión, sin embargo, presentó una alta tasa de remoción de sulfato como se puede apreciar en la Figura 5.2e. Al momento de realizar el análisis con el trazador, la zona conductiva pudo estar interferida por algunos metales que precipitaron.



CAPITULO 6

CONCLUSIONES Y COMENTARIOS

6.1 Conclusiones

En un proceso batch, el reactor que presentó un mejor comportamiento en la reducción de sulfato es el reactor R 2.5 debido a que presenta una mayor área específica de reacción en comparación de los reactores de grosor de 5 cm y 7.5 cm.

Las tasas de remoción de sulfato con alimentación sulfatada en todos los reactores son mayores a las tasas con alimentación con drenaje sintético debido a su baja toxicidad. Mientras que, los reactores que presentaron un mayor impacto al cambio en la alimentación son aquellos que tienen un menor grosor de capas reactivas verticales.

En el análisis del ANOVA para las medias de la tasa de remoción de sulfato con alimentación con DAM, los reactores R 2.5 A y R 2.5 B no presentaron diferencias significativas con los reactores R 5 B y R 7.5 A, por lo tanto, no se pudo apreciar la falla del mecanismo de bioprotección a través de esta variable.

Todos los reactores presentaron una disminución de la concentración celular (UFC/mL) debido a los efectos de la advección de la alimentación del DAM. Sin embargo el reactor R 2.5 B presentó una salida de cobre y zinc evidenciando la falla del mecanismo de bioprotección de dicho reactor, el cual además presenta la menor concentración celular respecto a los demás reactores.

En el análisis de capas reactivas, el reactor R 2.5 A en su punto PM1 presentó elevadas concentraciones de cobre y zinc, lo cual dificulta al crecimiento de la comunidad microbiana al ser metales tóxicos para el ambiente biológico. Se demostró el efecto de esta toxicidad al presentar una baja concentración celular (UFC/mL). Mientras que los puntos de muestreo PM1 y PM2 presentaron ORP altos, pH inferiores a 5 y una alta concentración

de sulfato, por lo que estos parámetros demuestran el mal funcionamiento del mecanismo de bioprotección al contrario a lo que pasa con los reactores R 5 A y R 7.5 A.

Se logró aislar la *Desulfovibrio desulfuricans* la cual es la responsable en la generación de sulfuro para que reaccione con aquellos metales como el cobre y el zinc, demostrando así el funcionamiento del mecanismo de bioprotección. Sin embargo, en los reactores de menor grosor de la capa reactiva en los puntos de muestreo PM1, es muy difícil que sobreviva esta bacteria bajo las condiciones de alta concentración de metales, ORP y un pH inferior a 5. Esto debido al corto trayecto que se tiene en la difusión del sulfuro para mantener este mecanismo de bioprotección.

Respecto del comportamiento del flujo en los reactores R 2.5 A, R 5 A y R 7.5 A mostró un alto grado de dispersión ya que el número de Levenspiel fue 0.2, mientras que los reactores R 2.5 B y R 5 B tuvieron una mediana dispersión debió a que se encuentran entre 0.05 y 0.1. Sin embargo, estos valores fueron evaluados una vez finalizado el proceso de alimentación con DAM, por lo tanto, no considera el comportamiento de todo el periodo del proceso continuo en el estudio de la variabilidad de la tasa de remoción de sulfato.

6.2 Recomendaciones

Las siguientes líneas deben ser investigadas para complementar el estudio realizado:

- Realizar el análisis de carbono orgánico total del sustrato reactivo antes de la operación del reactor y luego del término del proceso, debido a que se podría estimar una tasa de degradación de la celulosa y relacionarla con la vida útil de estos reactores biológicos.

- Realizar un perfil de concentraciones de las zonas reactiva y conductiva a los reactores para observar y analizar los gradientes químicos que presentan los diferentes grosores de capas verticales.
- Disminuir el tiempo de residencia hidráulico en la alimentación del DAM para observar si se presentan mayores cambios en la tasa de remoción de metales como también de sulfatos.



CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

Akasaka. H., Ueki. A ., Hanada. S., Kamagata. Y., Ueki. K., 2003 ., *Propionicimonas paludicola* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, Gram-positive, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, Yamagata University., Japan. 53 pp

Carretero, Isabel., Pozo Manuel; 2007; *Mineralogía Aplicada Salud y Medioambiente*; Ediciones Parininfo S.A; Madrid; España; página 348.

Chaparro, G; 2015; *Sistema de Intercambio difusivo para el tratamiento de Drenajes Ácidos con elevadas concentraciones de cobre*; Universidad de Concepción, Chile

Cochilco, 2014. *Anuario de Estadísticas del Cobre y Otros Minerales 1994-2013.*

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*, 32: 167–177.

Contreras A., Molero M., 2011. *Ciencia y Tecnología del Medio Ambiente.* Universidad Nacional de Educación Distancia Madrid., España., 213 pp.

Doshi, S.M. 2006. *Bioremediation of acid mine drainage using sulfate-reducing bacteria.* US Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response and Office of Superfund Remediation and Technology Innovation, 65.

González, María Andrea; Segui, Ricardo; 2016; *Condiciones de acidez-pH de silaje destinado a la alimentación de rumiantes*; Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires; Argentina; 7 pp.

Gusek, J.J., 2002, Sulfate-reducing bioreactor design and operating issues: is this the passive treatment technology for your mine drainage? In: Proceedings of the 2002 National Association of Abandoned Mine Land Programs Annual Conference. Park City, UT.

Hao, O.J., Huang, L., Chen, J.M., Buglass, R.L. 1994. Effects of metal addition on sulphate reduction activity in wastewater. *Toxicol. Environ. Chem.*, 46: 197–212.

Hiibel, S.R., Pereyra, L.P., Inman, L.Y., Tischer, A., Reisman, D.J., Reardon, K.F. and Pruden, A. 2008. "Microbial community analysis of two field-scale sulfate-reducing bioreactors treating mine drainage." *Environmental Microbiology* 10(8), p. 2087-2097.

Hoa, T.Q. 2010. Heavy metal removal by a highly heavy metal tolerant sulfidogenic consortium in anaerobic semi-continuous stirred tank reactors (CSTR): Changes of microbial community structure and abundance. Tesis para optar al título de Doctor. Department of Civil Engineering and Geodesy, Technische Universität München. Alemania. 99 p.

Instituto de Asuntos Públicos; 2012; Estado del Medio Ambiente en Chile; Universidad de Chile; Santiago, Chile.

ITRC (2012) Biochemical Reactor for Mining-Influenced Water. Interstate Technology & Regulatory Council, Biochemical Reactor for Mining-Influenced Waste Team. Washington, DC. EEUU. pp 1.

Jamil, I.N. y W.P. Clarke (2013). Bioremediation for acid mine drainage: Organic solid waste as carbon sources for sulfate-reducing bacteria: A review. *Journal of Mechanical Engineering and Sciences (JMES)*, 5(1). 569-581.

J. Kuever, F. A. Rainey, and F. Widdel, "Desulfovibrio," in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, John Wiley & Sons, Ltd, 2015.

- Jin, S., Drever, J.I., Colberg, J.S. 2007. Effects of Copper on Sulfate Reduction in Bacterial Consortia Enriched from Metal-Contaminated and Uncontaminated Sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26 (2): 225–230.
- Kong, B.H., Liu, Q.F., Liu, M., Liu, Y., Liu, L., Li, C.L., Yu, R. and Li, Y.H. 2011; *Paenibacillus typhae* sp. nov., isolated from roots of *Typha angustifolia* L.
- Kurmar, N., Chaurand, P., Rose, J., Diels, L., Bastiaens, L., 2015. Synergistic effects of sulfate reducing bacteria and zero valent iron on zinc removal and stability in aquifer sediment. *Chem. Eng. J.* 260, 83-89.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Goodfellow, M., Stackebrandt, E. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley Publishing, pp. 115–175.
- Lewis, A. (2010). Review of metal sulphide precipitation. *Hydrometallurgy*, 104(2). 222-234.
- 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: 2214–2225.
- Logan, M.V., Reardon, K.F., Figueroa, L.A., McLain, J.E.T, Ahmann, D.M. 2005. "Microbial community activities during establishment, performance and decline of bench-scale passive treatment systems for mine drainage." *Water Research* 39, p. 4537-4551.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., and I.S. Pretorius. 2002. "Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:3, 506-577.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P. 2012. *Brock Biology of Microorganisms*, Benjamin Cummings, Chapter 14

Matthies, R., Aplin, A. & Jarvis, A. 2010. Performance of a passive treatment system for net-acidic coal mine drainage over five years of operation. *Science of the Total Environment* 408, pp. 4877-4885.

Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Dymock, D., Wade, W.G., 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2): 795–799.

McCauley, C.A., O’Sullivan, A.D., Milke, M.W., Weber, P.A., Trumm, D.A. 2009. Sulfate and metal removal in bioreactors treating acid mine drainage dominated with iron and aluminum. *Water Research*, 43: 961-970.

Neculita, C.M., Yim, G.-J., Lee, G., Ji, S.W., Jung, J., Park, H.S., Song, H. 2011. Comparative effectiveness of mixed organic substrates to mushroom compost for treatment of mine drainage in passive bioreactors. *Chemosphere*, 83: 76–82.

Neculita, C.M., Zagury, G.J. 2008. Biological treatment of highly contaminated acid mine drainage in batch reactors: Long-term treatment and reactive mixture characterization. *Journal of Hazardous Materials*, 157 : 358–366.

Neculita, C.M., Zagury, G.J., Bussiere, B. 2007. "Passive Treatment of Acid Mine Drainage in Bioreactors using Sulfate-Reducing Bacteria: Critical Review and Research Needs." *Journal Environ. Qual.* 36, p. 1-16.

Perez, N; 2015a; Desempeño de tres sistemas difusivos a escala de banco durante el tratamiento de drenaje ácido con elevada concentración de cobre, Universidad de Concepción, Chile.

Perez, N; 2015b; Tratamiento biológico del drenaje ácido en un reactor a escala banco tipo barrera permeable reactiva con zonas reactivas de baja conductividad hidráulica, Universidad de Concepción, Chile.

Poulson, S.R., Colberg, P.J.S., Drever, J.I. 1997. Toxicity of heavy metals (Ni, Zn) to *Desulfovibrio desulfuricans*, *Geomicrobiology Journal*, 14: 41–49.

Rittmann, B.E. y P.L. McCarty (2001). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. McGraw-Hill. Boston.

Rowe, O. F., Sanchez, J., Hallberg, K. B., Johnson, D.B., 2007. Microbial communities and geochemical dynamics in an extremely acidic, metal-rich stream at an abandoned sulfide mine (Huelva, Spain) underpinned by two functional primary production systems. *Environ. Microbiol.* 9 (7):1761–1771.

Sakamoto, M. and Ohkuma, M. 2010. Usefulness of the *hsp60* gene for the identification and classification of Gram-negative anaerobic rods.

Servicio Nacional de Geología y Minería (Sernageomin), 2015, Anuario de la minería en Chile 2015; pag 27.

Schwarz, A.O., Rittmann, B.E. 2010. The diffusion-active permeable reactive barrier. *Journal of Contaminant Hydrology*, 112: 155–162.

Schwarz, A.O., Rittmann, B.E., 2006a. Analytical-modeling analysis of how pore-water gradients of toxic metals confer community resistance. *Advances in Water Resources* 30, 1562–1570.

Schwarz, A.O., Rittmann, B.E., 2006b. A biogeochemical framework for metal detoxification in sulfidic systems. *Biodegradation* 18, 675–692.

Schwarz, A.O., Rittmann, B.E., 2006c. Modeling bio-protection and the gradient-resistance mechanism. *Biodegradation* 18, 693–701.

Tassé, N., Germain, D. 2002. Evaluation de la performance de divers types de résidus forestiers pour le traitement du drainage minier acide. *Proc. of the Rouyn-Noranda Symp.*,

Rouyn-Noranda, QC, Canada (pp. 3-5).

Tchobanoglous, G., H.D. Stensel, R. Tsuchihashi, F.L. Burton, M. Abu-Orf, G. Bowden y W. Pfrang (2013). *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery*. Quinta edición. Metcalf & Eddy/AECOM. McGraw-Hill. Nueva York.

Uster, Benjamin, Aisling D. O'Sullivan; 2014; *The Use of Mussel Shells in Upward-Flow Sulfate-Reducing Bioreactors Treating Acid Mine Drainage*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg; Germany

Waste to Energy Research and Technology Council Web site (WTERT), The Biopole Project: Design, Construction, and Start-up of a 75,000 tap MSW (Municipal Solid Waste) Facility.

Waybrant, K., Blowes, D., Ptacek, C. 1998. Selection of Reactive Mixtures for Use in Permeable Reactive Walls for Treatment of Mine Drainage. *Environmental Science and Technology*, 32; 1972-1979.

Wildeman, T.R., Gusek, J.J., Higgins, J., 2006. Passive treatment of mine influenced waters. In: Course Material for the ARD Treatment Short Course presented at the 7th International Conference on Acid Rock Drainage (ICARD). St. Louis, MO.

Yarza,P., Euzeby,J., Sproeer,C., Klenk,H.P. and Crouch,A., 2013, Sequencing Orphan Species: filling the gaps in the 16S rRNA gene sequence database for all classified species with validly published names.

Younger, P., S.A. Banwat and R.S. Hedin. 2002. *Mine Water: Hydrology, pollution, remediation*. Academic Press, Kluwer, The Netherlands.

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: 944–954.



CAPÍTULO A

ANEXOS

A.1 Materiales usados para el proyecto

En la Figura A.1 muestra la jeringa de alimentación manual de la solución de sulfato de sodio como también de DAM cuyo volumen es de 60 ml. Mientras que la Figura A.2 muestra la bomba de trasvasije que se usó para el vacío de los reactores para el proceso batch. La Figura A.3 muestra la caja anaerobia rotulada como la letra A, mientras que la letra B corresponde a la jarra anaerobia utilizada para los cultivos de microorganismos. La figura A.4 las perforaciones para los puntos de muestreo en los reactores R 2.5 A, R 5 A y R 7.5 A.



Figura A. 1. Jeringa de alimentación.



Figura A. 2. Bomba de trasvasije.

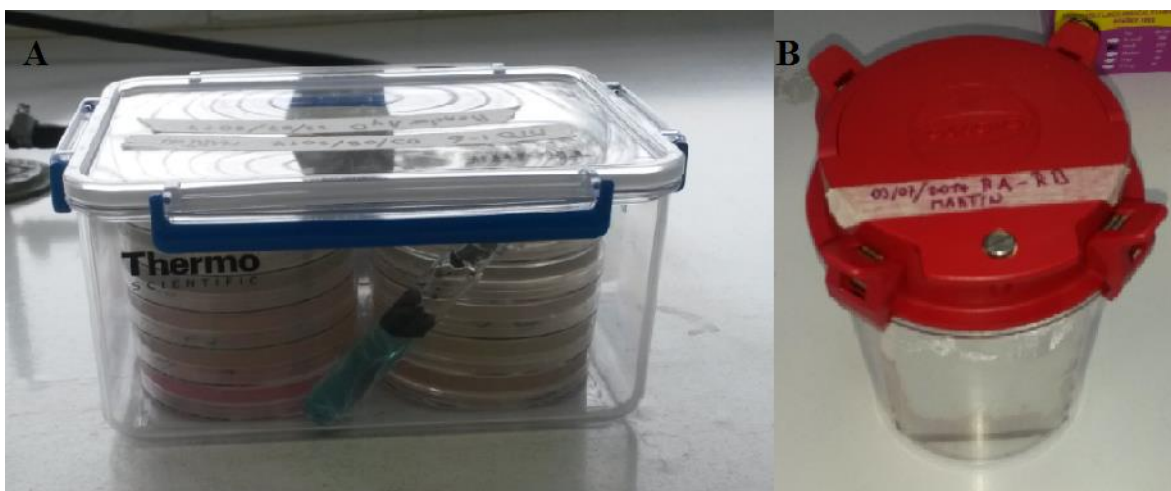


Figura A. 3. Caja y jarra anaerobia (Fuente: Elaboración propia).



Figura A. 4. Perforaciones para los puntos de muestreo en los reactores R 2.5 A, R 5 A y R 7.5 A (Fuente: Elaboración propia).

A.2 Tablas de resultados

A.2.1 Proceso Batch

En la Tabla A.1 muestra los resultados de la concentración promedio de sulfatos tomados en la criba del afluente como el del efluente para el primer proceso batch, mientras que la Tabla A.2 muestra la concentración promedio de sulfato para el segundo proceso batch.

Tabla A. 1. Resultados de sulfatos (mg/L) batch 1 (Fuente: Elaboración propia).

R 2.5		R 5		R 7.5		Días
A	B	A	B	A	B	
2616	2214.5	2579.5	2405	2572.5	2399.5	0
1925	1857.5	2086.5	1973.5	2047	2042	4
1665.5	1597.5	1521	1853	1505	1624	6
861	771.5	1214.5	1545	683	913	8
1029	362	1072	1223	783.5	850	12
700	207.5	761	1071.5	677	677	14
450	30	395	566.5	492	505	16

Tabla A. 2. Resultados de sulfatos (mg/L) batch 2 (Fuente: Elaboración propia).

R 2.5		R 5		R 7.5		Días
A	B	A	B	A	B	
2391.5	2220	2270	2370	2364	2330	0
1956.5	2305	2171	2389	2518.5	2370.5	3
1622.5	1800	1526	1694.5	1960	1756.5	6
1235.5	767	1106.5	1450	1391	1267.5	11
502	141.5	275	574.5	640.5	663.5	16

A.2.2 Análisis de efluente

La Tabla A.3 muestra los resultados de la alimentación continua de DAM y solución sulfatadas en un total de 226 días. La Tabla A.4 muestra los resultados de la tasa de remoción de sulfato ($\text{mol}/\text{m}^3/\text{día}$) para todos los reactores, mientras que la Tabla A.5 muestra los resultados de ORP (mV) para todo el proceso continuo (DAM y solución sulfatada). Las Tablas A.6 y A.7 muestran los resultados de pH y conductividad, respectivamente.

Tabla A. 3. Resultados de alimentación continua de DAM y solución sulfatada (mg/L)
(Fuente: Elaboración propia).

Sulfato (Afluente)	Reactor 2.5		Reactor 5		Reactor 7.5		Días
	A	B	A	B	A	B	
2200	0	0	0	50	35	8	5
2737	0	0	0	0	0	9	18
2451	0	0	0	0	0	0	21
2320	0	0	0	0	0	333	26
2491	0	67	174	41	237	466	28
2730	0	60	196	100	397	509	32
2490	55	75	150	110	290	490	35
2593	0	124	509	99	384	601	40
2627	45	148	490	111	641	815	44
2720	0	105	26	137	293	871	48
2355	56	130	10	304	490	479	54
2466	57	83	297	333	363	461	70
2469	500	327	253	644	396	324	77
2655	549	680	454	850	628	445	93
2663	803	950	360	562	962	436	105
2465	953	1326	629	1354	1260	523	121
2683	813	787	1014	1062	1062	546	136
2890	890	1190	550	1490	1420	622	149
2603	1119	998	613	1130	805	577	168
2193	806	724	690	1001	990	602	183
2820	1383	1187	777	940	1090	989	195
2720	1390	1256	655	890	1002	1050	210
2699	1295	1396	651	723	1011	1099	226

Tabla A. 4. Resultados de tasa de remoción de sulfato ($\text{mol/m}^3/\text{días}$) (Fuente: Elaboración propia)

Días	Remoción					
	Reactor 2.5		Reactor 5		Reactor 7.5	
	A	B	A	B	A	B
5	0.5574	0.5574	0.5574	0.5447	0.5485	0.5554
18	0.6934	0.6934	0.6934	0.6934	0.6934	0.6912
21	0.6210	0.6210	0.6210	0.6210	0.6210	0.6210
26	0.5878	0.5878	0.5878	0.5878	0.5878	0.5034
28	0.6311	0.6141	0.5870	0.6207	0.5711	0.5130
32	0.6917	0.6765	0.6420	0.6663	0.5911	0.5627
35	0.6169	0.6119	0.5928	0.6030	0.5574	0.5067
40	0.6569	0.6255	0.5280	0.6319	0.5597	0.5047
44	0.6542	0.6281	0.5414	0.6374	0.5032	0.4591
48	0.6891	0.6625	0.6825	0.6544	0.6149	0.4685
54	0.5825	0.5637	0.5941	0.5196	0.4725	0.4753
70	0.6103	0.6037	0.5495	0.5404	0.5328	0.5080
77	0.4989	0.5427	0.5614	0.4624	0.5252	0.5434
93	0.5336	0.5004	0.5576	0.4573	0.5135	0.5599
105	0.4712	0.4340	0.5835	0.5323	0.4310	0.5642
121	0.3831	0.2886	0.4652	0.2815	0.3053	0.4920
136	0.4738	0.4804	0.4228	0.4107	0.4107	0.5414
149	0.5067	0.4307	0.5928	0.3547	0.3724	0.5746
168	0.3760	0.4066	0.5042	0.3732	0.4555	0.5133
183	0.3514	0.3722	0.3808	0.3020	0.3048	0.4031
195	0.3641	0.4137	0.5176	0.4763	0.4383	0.4639
210	0.3370	0.3709	0.5232	0.4636	0.4353	0.4231
226	0.3557	0.3301	0.5189	0.5006	0.4277	0.4054

Tabla A. 5. Resultados de ORP (mV) (Fuente: Elaboración propia).

Solución	Reactor 2.5		Reactor 5		Reactor 7.5		Días
	A	B	A	B	A	B	
1.3	-289.9	-222.2	-273.7	-290.1	-184.6	-260.2	5
-25.1	-222.2	-270	-249.2	-202.2	-178	-343.6	18
-1.5	-194.1	-198.7	-299.7	-190.7	-382.2	-307.2	21
23.4	6.4	1.1	10.1	3.8	5.9	22.9	26
-26.3	-270.1	-340.2	-210.1	-190.2	-270.2	-230.7	28
-31.2	-222.7	-110.4	-300.1	-226	-250.9	-200.1	32
-22.3	-229.9	-310.7	-311.5	-330.3	-390	-180.1	35
-7	-190.2	-211.2	-360.4	-220.7	-340.7	-190.2	40
-20	-276.2	-300.2	-323.7	-303.6	-322.2	-330.2	44
-40.2	-273.4	-285.5	-299.3	-176.2	-298.3	-288.2	48
-40.9	-270.6	-288.6	-305.5	-288.5	-299	-320.2	54
277.2	-318.2	-357.2	-359.2	-324.2	-348.5	-355.1	70
289.1	-332.2	-343.2	-340	-321.4	-320.1	-342.5	77
288.2	-290.1	-305.1	-312.1	-151.2	-291.3	-303.9	93
284.1	-252.2	-285.2	-306.3	-142.3	-279.4	-306.1	105
283	-217.1	-75.3	-268.1	-48.1	-62.2	-290.2	121
311	-227.9	-190.1	-285.1	-79	-118.2	-318.1	136
310	-220.1	-181.1	-251.2	-64.1	-54.2	-235.2	149
308	-168.2	-160.2	-162.1	-18.2	-90.1	-225.1	168
318	-190.2	-120	-182	-120.1	-146.1	-180.3	183
303	-3.4	-0.89	-99.98	-86.3	-59.4	-69.8	195
290	2.3	31.5	-120.1	-114.9	-106.9	-118.2	210
297	54.3	89	-15.5	-42.5	3.3	9.8	226

Tabla A. 6. Resultados de pH (Fuente: Elaboración propia).

Sulfato	Reactor 2.5		Reactor 5		Reactor 7.5		Días
	A	B	A	B	A	B	
7.51	6.7	6.82	6.81	6.72	6.54	6.67	5
7.75	6.58	6.64	6.72	6.61	6.49	6.85	18
7,52	6.6	6.71	6.68	6.67	6.52	6.55	21
7.68	6.45	6.54	6.52	6.55	6.47	6.65	26
7.64	6.59	6.73	6.86	6.65	6.64	6.83	28
7.91	6.61	6.94	6.94	6.72	6.69	6.75	32
7.51	6.6	6.81	6.81	6.67	6.6	6.77	35
7.8	6.71	6.91	6.91	6.74	6.72	7.02	40
7.95	6.99	7.22	7.22	7.06	7.02	7.52	44
8.04	6.83	7.3	7.3	7.4	7.49	7.5	48
7.96	6.87	7.14	7.14	6.93	7.08	7.35	54
2.43	7.18	7.36	7.34	6.99	7.22	7.34	70
2.43	6.72	6.95	7.01	6.76	6.91	7.04	77
2.35	6.88	6.9	6.93	6.69	6.83	7.05	93
2.84	6.86	6.91	6.83	6.52	6.62	6.98	105
2.59	6.42	6.37	6.44	6.23	6.19	6.48	121
3.01	7	6.67	7	6.81	6.96	7.05	136
2.3	6.66	6.89	6.76	6.45	6.61	6.74	149
2.29	6.38	6.59	6.64	6.38	6.69	6.92	168
2,1	6.23	6.16	6.13	6.17	6.1	6.15	183
2.47	5.97	6.22	6.66	6.55	6.58	6.62	195
2.4	5.95	5.99	6.4	6.21	6.22	6.28	210
2.34	6	5.44	6.26	6.15	6.01	5.93	226

Tabla A. 7. Resultados de Conductividad (Fuente: Elaboración propia).

Sulfato	Reactor 2.5		Reactor 5		Reactor 7.5		Días
	A	B	A	B	A	B	
5.43	5.86	5.37	6.02	5.27	5.14	5.23	26
5.31	5.48	5.66	6.19	5.33	5.68	5.57	28
5.5	5.55	5.32	5.26	5.3	5.26	5.21	32
5.18	5.15	5.36	5.78	5.17	5.07	5.18	35
5.41	5.19	5.02	5.19	6.03	5.13	5	40
5.5	4.9	4.85	5.09	5.02	5.03	5.06	44
5.35	4.82	4.86	5.09	4.94	4.95	4.95	48
5.33	4.83	4.86	5.08	4.98	4.93	4.98	54
5.78	5.6	4.66	4.78	4.82	4.82	4.54	70
5.85	5.77	4.8	4.89	5	4.59	4.74	77
6.79	4.72	4.84	4.77	4.87	4.61	4.68	93
5.44	4.78	4.98	4.94	4.92	4.75	4.78	105
5.18	5.15	4.72	4.45	4.61	4.61	4.38	121
5.95	4.31	4.78	4.12	4.35	4.04	4.14	136
6.95	4.09	4.14	3.98	4.42	4.08	4.06	149
6,91	4	4.07	3.9	4.39	4.1	3.91	168
7.03	3.83	3.31	4.13	4.38	4.23	3.92	183
5.81	4.37	4.4	4.15	4.22	4.3	4.17	195
6.56	3.79	3.93	3.8	3.99	3.9	3.94	210
6.86	3.98	3.91	3.85	4.01	3.84	4.04	226

A.2.3 Metales en el efluente

La tabla A.8 muestra los resultados del cobre (mg/L) en el afluente con un periodo total de 166 días. Mientras que las tablas A.9, A.10, A.11, A.12 y A.13 muestran los resultados de manganeso, hierro, aluminio, zinc y calcio, respectivamente.

Tabla A. 8. Resultados de cobre en el efluente (mg/L) (Fuente: Elaboración propia).

DAM	R 2.5		R 5		R 7.5		Días
	A	B	A	B	A	B	
594,225	0.316	0.4185	0.359	0.3175	0.4155	0.7885	10
593.175	0.0715	0.0645	0.0665	0.073	0.0985	0.2165	17
588.075	0.06	0.063	0.0755	0.059	0.0825	0.126	33
521.775	0.2425	0.294	0.2185	0.221	0.2715	0.2925	45
698.85	0.4275	0.3115	0.2955	0.298	0.2935	0.5085	61
650.25	0.0945	0.089	0.253	0.084	0.0875	0.1075	76
652	0.1205	0.118	0.126	0.093	0.098	0.122	89
645.975	0.0655	0.0605	0.0735	0.123	0.047	0.0735	108
638	0.181	0.157	0.1635	0.152	0.2055	0.1845	123
594.225	0.3095	0.8425	0.163	0.1645	0.178	0.18	135
768.375	0.036	1.5	0.0235	0.0205	0.0385	0.1135	150
660	0.546	38.75	0.058	0.0355	0.0455	0.04	166

Tabla A. 9. Resultados de Manganeso en el efluente (mg/L) (Fuente: Elaboración propia).

DAM	R 2.5		R 5		R 7.5		Días
	A	B	A	B	A	B	
114.30	4.05	5.45	5.30	4.35	8.00	9.50	10
139.05	6.55	9.85	8.65	5.40	9.45	13.60	17
164.10	8.15	11.85	12.65	27.90	15.95	29.85	33
129.30	0.16	0.21	0.26	0.55	0.42	0.24	45
147.70	6.69	13.30	6.42	8.74	8.27	5.08	61
166.02	58.43	59.06	66.50	82.09	75.73	54.69	76
153.30	57.57	56.58	59.12	70.96	70.13	42.37	89
160.28	95.68	88.23	94.33	100.40	91.23	89.35	108
134.85	88.40	92.03	88.40	92.03	167.33	95.20	123
132.90	126.85	104.53	93.23	103.43	115.73	108.13	135
153.38	134.18	117.03	105.88	107.03	106.98	118.33	150
151.05	121.15	120.55	111.05	104.05	109.55	112.23	166

Tabla A. 10. Resultados de hierro en el efluente (mg/L) (Fuente: Elaboración propia).

DAM	R 2.5		R 5		R 7.5		Días
	A	B	A	B	A	B	
7.228	0.2195	0.2815	0.158	0.211	0.217	0.2565	10
7.8125	0.0955	0.052	0.05	0.0575	0.0655	0.1025	17
8.886	0.138	0.0805	0.0885	0.1435	0.0925	0.0915	33
8.8475	0.177	0.1455	0.1055	0.587	0.1515	0.108	45
7.95	0.1845	0.429	0.441	26.1	0.1815	0.0295	61
11.5	0.28	0.2695	0.1505	17.08	0.3985	0.0305	76
10.0775	0.1205	0.104	0.123	11.615	0.4135	0.0865	89
2.411	0.5525	0.744	0.067	10.685	1.7455	0.188	108
11.685	0.1305	0.028	0.038	2.7985	5.4	5.13	123
8.7115	31.795	1.065	0.191	15.025	18.25	16.175	135
11.865	58.175	22.1	2.395	22.1	18.25	16.175	150
8.327	13.75	5.1	4.39	19.35	35.175	23.325	166

Tabla A. 11. Resultados de Aluminio en el efluente (mg/L) (Fuente: Elaboración propia).

DAM	R 2.5		R 5		R 7.5		Días
	A	B	A	B	A	B	
97.02	0	0	0	0	0	0	10
116.95	1.7675	2.0725	1.98	2.442	3.101	2.7735	17
107.6	0	0	0	0	0	0	33
88.955	0	0	0	0	0	0	45
49.08	0	0	0	0	0	0	61
40.335	0	0	0	0	0	0	76
43.73	0	0	0	0	0	0	89
65.955	0	0	0	0	0	0	108
83.55	0	0	0	0	0	0	123
64,235	0	0	0	0	0	0	135
129,775	1.658	1.526	0.117	0.392	1.356	2.833	150
100.88	2.603	2.148	3.66	2.463	2.372	3.2	166

Tabla A. 12. Resultados de Zinc en el efluente (mg/L) (Fuente: Elaboración propia).

DAM	R 2.5		R 5		R 7.5		Días
	A	B	A	B	A	B	
69.675	0.1585	0.202	0.1735	0.1215	0.1335	0.201	10
65.325	0	0	0	0	0	0.0315	17
64.65	0.011	0	0	0	0	0.01	33
51.525	0	0	0	0	0	0	45
66	0.004	0.002	0	0.017	0	0.0415	61
66.3	0.016	0.0115	0.075	0.024	0	0.0155	76
68.175	0.0115	0.001	0	0	0	0	89
67.8	0.0255	0.01	0	0.1105	0.0845	0.0155	108
81.75	0.0725	0.0145	0.007	0.0125	0.0365	0.0255	123
101.485	0.158	0.3785	0.032	0.1345	0.187	0.0175	135
94.575	0.086	10.495	0.127	0.0405	0.0505	0.0595	150
66.825	0.3415	13.89	0.004	0.0035	0.743	1.111	166

Tabla A. 13. Resultados de Calcio en el efluente (mg/L) (Fuente: Elaboración propia).

DAM	R 2.5		R 5		R 7.5		Días
	A	B	A	B	A	B	
131.6	163.6	157.45	152.2	170.55	136.05	135.75	10
119.9	71.279	129.7	101.05	109	112.2	106.7	17
107.9	138.3	149.65	146.25	189.8	175.7	129.65	33
142.4	1.812	2.0125	2.2065	2.2465	2.517	2.298	45
125	25.04	45.03	29.05	33.74	29.18	30.56	61
70.239	155.377	168.146	167.728	162.722	160.497	153.101	76
45.75	0	147.57	136.11	147.57	136.44	123.02	89
112.125	250.3	246.3	219.125	221.6	197.925	192.55	108
142.35	222.125	0	220.9	245.025	441.625	186.925	123
66.675	241.725	255.35	207.95	245.05	218.575	209.95	135
153.45	278.575	309.25	233.875	268.4	244.3	246.4	150
173.25	279.125	299.1	252.025	274.575	261.075	271.7	166

A.3 Análisis de capas

A.3.1 Metales y sulfatos en las capas

La Tabla A.15 muestra la concentración de cobre (mg/L) en las capas a partir de los puntos de muestreos PM1, PM2, PM3, PM4 y PM5. Mientras que las tablas A.14, A.15, A.16 y A.17 muestran las concentraciones de zinc, hierro, calcio y sulfatos, respectivamente.

Tabla A. 14. Concentración de cobre en las capas (Fuente: Elaboración propia).

Cu (mg/L)	R2.5 A	R 5 A	R 7.5 A
PM1	387.5	0.285	0.24
PM2	24.91	2.239	0.1
PM3	0.086	0.139	0.091
PM4	0.064	0.1	0.094
PM5	0.059	0.137	0.103

Tabla A. 15. Concentración de Zinc en las capas (Fuente: Elaboración propia).

Zn (mg/L)	R2.5 A	R 5 A	R 7.5 A
PM1	43.1	0.092	0.433
PM2	21.8	0.449	0.024
PM3	0.224	0.042	0
PM4	0.006	0.018	0.003
PM5	0.003	0.009	0.002

Tabla A. 16. Concentración de hierro en las capas (Fuente: Elaboración propia).

Fe (mg/L)	R2.5 A	R 5 A	R 7.5 A
PM1	0.644	50.1	0.287
PM2	0.469	34.85	0.241
PM3	0.757	22.1	0.195
PM4	0.282	27.4	0.36
PM5	0.459	0.083	0.468

Tabla A. 17. Concentración de calcio en las capas (Fuente: Elaboración propia).

Ca (mg/L)	R2.5 A	R 5 A	R 7.5 A
PM1	122.3	365.45	473.55
PM2	295.1	289.85	321.35
PM3	256.25	270.75	262.75
PM4	211.25	378.2	271.7
PM5	289.45	285.15	280.45

Tabla A. 18. Concentración de sulfatos en las capas (Fuente: Elaboración propia).

SO ₄ ²⁻ (mg/L)	R 2.5 A	R 5 A	R 7.5 A
PM1	2262	286	191
PM2	1901	278	29
PM3	1420	379	13
PM4	1350	507	0
PM5	890	121	39

A.3.2 Análisis de ORP y pH en las capas.

Las tablas A.20 y A.21 muestran los análisis de ORP (mV) y pH a partir de los puntos de muestreos: PM1, PM2, PM3, PM4 y PM5. Estos análisis comenzaron el día 29 de septiembre del 2017 y termina el 4 de noviembre del mismo año.

Tabla A. 19. Análisis de ORP (Fuente: Elaboración propia).

R 2.5 A					R 5 A					R 7.5 A					Fecha
PM1	PM2	PM3	PM4	PM5	PM1	PM2	PM3	PM4	PM5	PM1	PM2	PM3	PM4	PM5	
190	-5.4	-21.1	-40.1	-55.2	-110.5	-85	-140	-110.1	-178.5	-90.1	-197.2	-99.9	-110.1	-178.5	29-09-2017
236.3	50.1	-8	-10	-60.2	-176.6	-146	-171	-156.9	-184.2	-60	-209.2	-137.7	-156.9	-184.2	05-10-2017
254.4	58.2	2.6	-178.6	-149.6	-10.1	-25.2	-7.4	-122.2	-148.4	-7.5	-183.4	-79.4	-122.2	-148.4	13-10-2017
250.7	31.4	19.1	-70.2	-15.1	-34.2	-117	-157	-185.9	-228.2	-15.2	-251.3	-210.4	-217.9	-261.7	19-10-2017
256.9	125.4	35.4	-14.5	-54.5	-167.2	-143.2	-170	-197.2	-242.1	-145.2	-208.2	-184.3	-182.4	-233.3	26-10-2017
255.9	201.5	20.3	-27.6	-90.1	-170.2	-132.4	-14.6	-184.5	-195.6	-171.4	-202.5	-179.1	-190.9	-216.9	04-11-2017
256.8	110.5	28.9	-31.2	-110.2	-139.5	-147.3	-143	-199.6	-208.4	-195.4	-212.5	-191.5	-188.9	-206.5	10-11-2017
264.4	154.6	32.1	-24.5	-48.6	-193.4	-78	-152	-164.4	-221.8	-168.2	-184.3	-101.1	-157.8	-223.5	18-11-2017

Tabla A. 20. Análisis de pH (Fuente: Elaboración propia).

R 2.5 A					R 5 A					R 7.5 A					Fecha
PM1	PM2	PM3	PM4	PM5	PM1	PM2	PM3	PM4	PM5	PM1	PM2	PM3	PM4	PM5	
5.28	5.62	5.99	6.1	6.65	6.09	5.98	5.88	6.37	6.37	5.84	6.17	6.28	6.26	6.38	29-09-2017
4.57	5.56	6.02	6.38	6.38	5.89	5.79	6	6.05	6.39	5.39	5.84	6.41	6.19	6.1	05-10-2017
4.38	5.32	5.67	6.03	5.99	6.17	6.01	5.99	6.2	6.29	6.07	5.97	6.36	6.07	6.29	13-10-2017
4.71	5.54	6.1	6.09	6.38	6.36	6.36	6.13	6.29	6.62	5.99	6.27	6.43	6.47	6.49	19-10-2017
4.7	5.41	6.11	6.4	6.41	6.55	6.63	6.23	6.44	6.71	6.25	6.43	6.44	6.59	6.6	26-10-2017
4.65	5.39	5.85	6.02	6.3	6.54	6.74	6.35	6.47	6.63	6.01	6.11	6.31	6.26	6.32	04-11-2017
4.55	5.4	5.89	5.97	6.07	6.3	6.31	6.21	6.2	6.65	5.81	6.01	6.04	6.1	6.15	10-11-2017
4.23	4.98	5.58	5.85	6.01	5.82	5.94	5.89	5.86	6.15	5.79	5.87	6.05	5.95	6.05	18-11-2017

A.3.3 Código genético

En la tabla A.22 muestra el código genético del 16S ribosomal de las muestras extraídas en los reactores biológicos.

Tabla A. 21. Código genético del 16S ribosomal (Fuente: Elaboración propia)

Especie	16S ribosomal
<i>Desulfovidio desulfuricans</i>	<p>GTCGAACGCGAAAGGGACTTCGGTCTGAGTAAAGTGGCGCACGGGTGA GTAACGCGTGGATAATCTGCCCTTATGATCGGGATAACAGTTGGAAACGG CTGCTAATACCGGATACGCTCAAATGAACTTTTTGAGGAAAGATGGCCT CTGCTTGCATGCTATCGCGTAAGGATGAGTCCGCGTCCCATTAGCTTGTG GCGGGGTAACGGCCCACCAAGGCAACGATGGGTAGCCGATTTGAGAGGA TGATCGGCCACACTGGAAGTAAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC AGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCC GCGTGAGGGATGAAGTTTTCGGATCGTAAACCTCTGTCAGAAGGGAAG AAACTACATTGTGCTAATCAGCAGTGTACTGACGGTACCTTCAAAGGAAG CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGC GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCTGTAGTGTAAGTC AGGGGTGAAATCCCACGGCTCAACCGTGAAGTGCCTTTGATACTGCACA ACTTGAATCCGGGAGAGGGTGGCGGAATTCCAGGTGTAGGAGTGAAATC CGTAGATATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACCGG TATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACC CTGGTAGTCCACGCTGTAACCGATGGATGCTAGATGTCCGGGAGTATTCT TCGGTGTCTAGTTAACGCGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCCG AAGGCTGAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGT ATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGTTTTGACATC CACGGAACCCTCCGAAAAGGAGGGGTGCCCTTCGGGGAGCCGTGAGAC AGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT CCCGCAACGAGCGCAACCCCTATGGATAGTTGCCAGCAAGTAATGTTGGG CACTCTATTCAGACTGCCCGGGTTAACCGGGAGGAAGGTGGGGACGACG TCAAGTCATCATGGCCCTTACGCCTAGGGCTACACACGTACAATAAGGCG GCGCACAAAGGGGAGCGAGACCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAAAAAAC GCGTCCCAGTCCGGATTGCACTGCAACTCGACTGCATGAAGTTGGAAT CGCTAGTAATTCGAGATCAGCATGCTCGGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTT GTACACACCGCCCGTACACCACGAAAGTCGGTTTTACCCGAAGCCGGTG AGCCAACCAGCAATGGAGGCAGCCGT</p>
<i>Paenibacillus typhae</i>	<p>GCGGACGGGTGAGTAAACAGTAGGCAACCTGCCCTTAGCCTGGGATAA CTACCGGAAACGGTAGCTAATACCGGATAATCCCTTTCCCTCGCCTGAGGA AAGGATGAAAGGCGGAGCAATCTGTCGATAAAGGATGGGCCTGCGGCGC ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCG ACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGAC GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT GCCAGGGAAGAACGTCCGGTAGAGTAACTGCTACCGGAGTGACGGTACC TGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCG GCTATTTAAGTCTGGTGTTTAAACCTTGGGCTCAACCTGAGGTGCGACTG GAAACTGGGTGGCTTGAAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCACGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT TTCTGGGCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAGGTGTTA GGGGTTTTGATACCCCTTGGTGCCGAAGTTAACACAGTAAGCACTCCGCCT GGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCG CACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA</p>

	<p>CCAGGTCTTGACATCCCTCTGAATCCTCTAGAGATAGAGGCGGCCTTCGG GACAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGAT GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGACTTTAGTTGCCAGCA GGTAAGGCTGGGCACTCTAGAGTGACTGCCGGTGACAAACGGGAGGAAG GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGGTACACACG TACTACAATGGCCGGTACAACGGGAAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAA TCCCAGCAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCA TGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG TTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTACAACAC CCGAAGTCGGTGGGGTAACCCGCAAGGGAGCCAGCCGCCGA</p>
<p><i>Propionicimonas paludicola</i></p>	<p>CAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTACCCTTGACTCTGGG ATAACAGTTGGAAACAGCTGCTAATACCGGATACGACCCTGGCGGGC TGCCGGGGTGGAAAGCTCCGACGGTCAGGGATGGGCTCGCGGCCTATCA GCTTGTGGCGGGGTAACGGCCACCAAGGCATCGACGGGTAGCCGGCCT GAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAG CAACGCCGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCAGCA GGGACGAAGGGTTTCTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTGATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTA TTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTCCGTTGCGTCGGAAGTGA AAAACCTCGGGCTTAACCCGAGCCTGCTTTCGATACGGGCGGACTTGAGGGATGTA GGGGAGAACGGAATTCCTGGTGGAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGA GGAACACCAGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGACATTCCTGACGCTGAGAA GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGACCATTCCACGGGTTCCGTGCCGT AGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATT AATTCGATGCAACCGCAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCGGAAA CATCTGGAGACAGGTGCCCCGCAAGGTCCGGTATACAGGTGGTGCATGGCT GTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA ACCCTCGTTCTATGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGAACTCATAGAAGACTG CCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCC CTTATGTCCAGGGCTTACGCATGCTACAATGGCTGGTACAAAGGGCTGC AATATCGCAAGATGGAGCGAATCCAGAAAGCCAGTCTCAGTTCGGATTG GGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC AGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA AGTCATGAAAGTCGGTA</p>
<p><i>Bacteroides graminisolvens</i></p>	<p>GGGGCAGCATTGGAGTAGCAATACTTCAGATGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTA ACACGTATCCAACCTGCCGTTACTCGGGGATAGCCTTTCGAAAGAAAGATTAATA CCCGATGGTATAAAGAGTTCGCATGTTCTTTATTAAGAATTCGGTAAGCGAT GGGGATGCGTTCATTAGATAGTTGGCGGGTAACGGCCCACCAAGTCTACGATG GATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAAGTACGACACGGTCCAAAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGAGAGTCTGAACCA GCCAAGTAGCGTGAAGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTTTTATAAGGG AATAAAGTGAGGGACGTGTCCCTTTTTGTATGTACCTTATGAATAAGGATCGGCTA ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCGGATTTAT TGGGTTTAAAGGGAGCGTAGGTTGACATATAAGTCAGCTGTGAAAGTTTACGGCT CAACCGTGAAATTGCAGTTGATACTGTATGTCTTGAGTGTACAAGAGGTGGGCGG AATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCAGAAAGAACTCCAATTGCGAA GGCAGCTCACTGGGGTACAACGACTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACA GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACAGTAAACGATGAATACTCGCTGTTTGCAT ATACAGTAAGCGGCCAAGCGAAAGCATTAAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGCCGG</p>

	CAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGAGGAACATGT GGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAATTGCAGAGGAAC ATAGTTGAAAGATTATGGCCGCAAGGTCTCTGTGAAGGTGCTGCATGGTTGTCGT CAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCTTATCAT TAGTTACTAACAGGTCATGCTGAGGACTCTAGTGAGACTGCCGTCGTAAGATGTG AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTACGTCCGGGGGCTACACA CGTGTTACAATGGGGGTACAGAGGGCAGCTACCGGGCGACCGGATGCCAATCC CAAAAACCTCTCTCAGTTCGGATCGAAGTCTGCAACCCGACTTCGTGAAGCTGGAT TCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCACGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA CACACCGCCCGTCAAGCCATGGGAGCCGGGGGTACCTGAAGTACGTAACCGCAA
--	---

