



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ingeniería - Programa de Magíster en Ciencias de la Ingeniería con  
mención en Ingeniería Civil

## **Evaluación de Sistema MBfR para Tratamiento de Aguas Impactadas por la Minería**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias de la Ingeniería con  
mención en Ingeniería Civil

JOSÉ IGNACIO SUÁREZ FIGUEROA  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2019

Profesor Guía: Alex Schwarz Kusch  
Dpto. de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería  
Universidad de Concepción

## RESUMEN

Se probaron dos reactores de biopelícula sobre membrana basados en hidrógeno ( $H_2$ -MBfR), de diferentes tipos de membrana entre sí, en la reducción de sulfato de un agua real de proceso minero caracterizada por su baja alcalinidad y altas concentraciones de calcio y sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) disueltos. Se alcanzaron remociones máximas de sulfato de 99% con un rango óptimo de pH entre 8 y 8,5, lo que minimizó el efecto tóxico del ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) sobre las bacterias reductoras de sulfato (SRB) y el *scaling* de calcita sobre las fibras y en las biopelículas. Pese a que se aplicaron varias estrategias de control de pH y de retrodifusión de gases, no fue posible mantener un alto grado de reducción de sulfato a largo plazo. La causa más probable fue la precipitación de calcita ( $CaCO_3$ ) dentro de la biopelícula y sobre la superficie de las fibras, lo que se demostró mediante análisis SEM-EDS. Otra posible causa fue una caída de pH, llevando a la inhibición por  $H_2S$ . Una mezcla de  $H_2/CO_2$  en el suministro de gas fue capaz de recuperar temporalmente la efectividad de los reactores y estabilizar el pH, ya que el  $CO_2$  suministrado pudo amortiguar el efecto alcalinizante de la reducción de  $SO_4^{2-}$  y desplazar la formación de  $CaCO_3$  hacia el exterior de la biopelícula. El análisis biomolecular mostró que la biopelícula se compuso de un 15 a 20% de SRB, pero también hubo presencia de una gran variedad de bacterias autótrofas y heterótrofas, incluyendo bacterias oxidantes de sulfuro. Estas últimas bacterias pudieron estar presentes debido a la entrada de aire por las paredes de las tuberías flexibles utilizadas, las que fueron cambiadas más tarde por HDPE para contrarrestar dicha presencia, logrando efectivamente una baja en su abundancia relativa. Los resultados también sugieren que el sistema MBfR puede ser optimizado mejorando la transferencia de masa de  $H_2$  usando fibras de mayor permeabilidad a los gases y alimentando una mezcla  $H_2/CO_2$  que sea ajustada automáticamente para control de pH.



*No sabía que una puesta me heriría;  
tantas ansias mezcladas;  
daría años de mi vida por tenerte aquí  
y no perderte otra vez...*

Fernando Ortega, “Flama de Ángel” (fragmento)

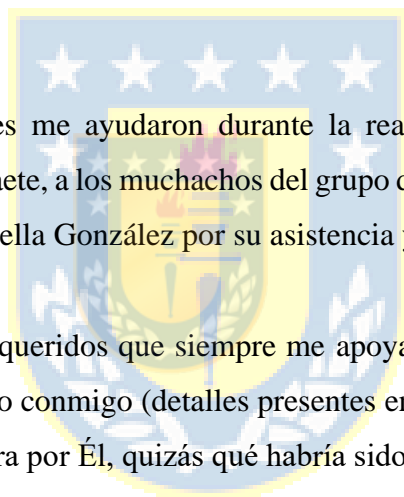
## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CODELCO por otorgarme la Beca PiensaMinería para la realización de esta tesis. También reconozco el aporte de FONDAP/CRHIAM Proyecto 15130015 y del proyecto CodelcoTec 07-18. Los estudios que realicé y no se incluyeron en el presente informe se incluyen en este último proyecto.

Agradezco a los profesores que formaron parte de esta tesis. Al prof. Alex Schwarz, continuamente preocupado por cómo avanzaba todo y siempre presto para ayudar y aconsejar. Así también al prof. Marcelo Aybar, quien con su experiencia aportó gran parte de lo aplicado en los experimentos. Igualmente, al prof. Iván Ñancucheo, gran apoyo en la parte “dura” de la microbiología y biología molecular.

Una especial mención a quienes me ayudaron durante la realización de mis experimentos: a Benjamín Poch, M<sup>a</sup> Alejandra Gaete, a los muchachos del grupo de Tópicos Avanzados; y a Pamela Sanhueza, René Iribarren y Daniella González por su asistencia y buena voluntad en colaborar.

Agradezco a mi familia y seres queridos que siempre me apoyaron este tiempo. Incluso algunos vinieron alguna vez al laboratorio conmigo (detalles presentes en mi mente). Pero principalmente, agradezco a Dios, pues si no fuera por Él, quizás qué habría sido de mí. “Soli Deo Gloria”.



**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

CAPÍTULO 1	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	Motivación .....	1
1.2	Hipótesis de Trabajo .....	1
1.3	Objetivos .....	2
1.3.1	Objetivo General .....	2
1.3.2	Objetivos Específicos .....	2
1.4	Metodología de Trabajo .....	2
1.5	Principales Resultados y Conclusiones .....	3
1.6	Organización de la Tesis .....	3
CAPÍTULO 2	ESTADO DEL ARTE .....	4
2.1	Introducción .....	4
2.2	Revisión de Antecedentes .....	4
2.3	Conclusiones .....	7
CAPÍTULO 3	MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
3.1	Introducción .....	8
3.2	Configuración Experimental .....	8
3.3	Agua de Proceso Minero .....	9
3.4	Inoculación y Puesta en Marcha de los Reactores .....	10
3.5	Condiciones Operacionales .....	11
3.6	Análisis Químicos .....	11
3.7	Estimación de Carga Superficial y <i>Flux</i> de $\text{SO}_4^{2-}$ .....	12
3.8	Análisis Biomolecular .....	12
3.9	Microscopía SEM .....	13
3.10	Conclusiones .....	13
CAPÍTULO 4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
4.1	Introducción .....	14
4.1	Tasas Superficiales de Remoción de $\text{SO}_4^{2-}$ .....	14
4.3	Estrategias de Control de pH y Desempeño .....	16
4.4	Comunidades Microbianas y Examinación Microscópica .....	19

4.5 Otros Factores Relevantes en el Desempeño de los MBfR ..... 23

4.6 Conclusiones ..... 24

CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES Y COMENTARIOS..... 25

REFERENCIAS ..... 27



**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 3.1. Caracterización del agua de proceso minero. ....	10
Tabla 4.1. Fases operacionales de los reactores y <i>fluxes</i> obtenidos. ....	15



**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 4.1. Condiciones operacionales y evolución de pH, ORP, $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{S}^{2-}$ total y $\text{Ca}^{2+}$ afluente y efluente del reactor M1 .....	17
Figura 4.2. Condiciones operacionales y evolución de pH, ORP, $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{S}^{2-}$ total y $\text{Ca}^{2+}$ afluente y efluente del reactor M2.....	18
Figura 4.3. Efecto del pH sobre el <i>flux</i> de sulfato para los reactores M1 y M2 .....	20
Figura 4.4. Resultados de los análisis de secuenciación masiva de las muestras de efluente y de tres porciones de fibra para ambos reactores.....	21
Figura 4.5. Imágenes SEM mostrando la presencia de microorganismos sobre las fibras de M1 y M2.....	23
Figura 4.6. Análisis SEM-EDS de zonas de biopelícula de M1 y M2 .....	24





## **CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Motivación**

La industria minera cuprífera en Chile, al ser la principal actividad industrial del país, tiene grandes responsabilidades y desafíos. Por una parte, está el impacto de esta industria sobre los sistemas naturales (por ejemplo, agua, aire, suelo). Por otra parte, ante la amenaza del cambio climático, y principalmente para los yacimientos ubicados en la cordillera de los Andes (lejos de la costa), se vuelve muy relevante el manejo eficiente del agua en el proceso productivo mismo. En base a estas dos condiciones, surge la necesidad de buscar alternativas que permitan tanto remediar (o mejor aún, evitar) la contaminación de cuerpos de agua como utilizar dicha agua nuevamente en el proceso de obtención de mineral.

Los reactores de biopelícula sobre membrana (MBfR por sus siglas en inglés) son una alternativa promisoría para nuevas aplicaciones de tratamiento de agua. Si bien hay numerosos estudios sobre reducción biológica de sulfato en aguas impactadas por la minería utilizando distintos tipos de reactores, aún no se ha estudiado la aplicación de un MBfR para tratar estas aguas (menos aún si se trata del agua real de proceso minero). Los MBfR tienen potenciales ventajas sobre otros tipos de reactores (por ejemplo, suministro eficiente de sustrato, uso de sustratos limpios y posibles de obtener in situ, como el H<sub>2</sub>; elevada retención de biomasa), por lo tanto, es de especial interés probar el desempeño de estos reactores en agua de proceso minero cuprífero chilena.

### **1.2 Hipótesis de Trabajo**

Los biorreactores de membrana basados en biopelículas (MBfR) son una opción efectiva para remover sulfato del agua de proceso minero de concentración de cobre hasta niveles tolerables por la normativa vigente (NCh1333.Of78-mod87; D.S.90).

### 1.3 Objetivos

#### 1.3.1 Objetivo General

Determinar el desempeño de un sistema MBfR a escala de laboratorio en el tratamiento de agua de proceso minero de concentración de cobre en términos de *flux* y eficiencia de remoción de sulfato.

#### 1.3.2 Objetivos Específicos

- Desarrollar un prototipo de MBfR a escala de laboratorio.
- Determinar *fluxes* de remoción de sulfato y concentraciones efluentes de sulfato, sulfuro, pH, ORP y calcio a distintas condiciones operacionales (tiempos de residencia, presión de hidrógeno, mezcla de gases) en el tratamiento de agua de proceso minero representativa chilena.
- Analizar los valores medidos a fin de obtener condiciones operacionales óptimas de desempeño del biorreactor (combinaciones de presión de gas y carga entrante de  $\text{SO}_4^{2-}$ , uso de  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ ).

### 1.4 Metodología de Trabajo

Se probaron dos sistemas MBfR reductores de sulfato independientes entre sí (M1 y M2), diferentes en el tipo de membrana. Se trabajó mediante distintas etapas experimentales, de las cuales la primera fue de puesta en marcha. Las siguientes etapas consistieron en cambios en la tasa de carga superficial de sulfato, la presión de gas o el tipo de gas suministrado (hidrógeno puro o mezcla de 80% hidrógeno y 20% dióxido de carbono). Se monitoreó periódicamente la concentración de sulfato, sulfuro y calcio, además del pH, el ORP y el oxígeno disuelto.

Al término de las etapas experimentales, se extrajeron muestras de fibra y de agua de cada reactor a fin de realizar análisis de biología molecular y microscopía electrónica, y así conocer la comunidad microbiana y los precipitados presentes en cada reactor.

## 1.5 Principales Resultados y Conclusiones

El sistema MBfR probó ser efectivo en reducir sulfato de aguas de proceso minero de concentración de cobre, alcanzando remociones *peak* de hasta 99% y *fluxes* promedio por etapa de hasta 1,72 g/m<sup>2</sup>-d. Sin embargo, el buen desempeño no pudo mantenerse a largo plazo, posiblemente debido a la alta presencia de calcio que causó la formación de precipitados de calcita bloqueando el paso de gas desde las fibras. También se observó una posible limitación de hidrógeno en el reactor M1, lo que sugiere usar fibras de mayor permeabilidad a los gases. Otro factor relevante es el control fino de pH a fin de proteger a las bacterias tanto de la inhibición por sulfuro como de la autoinhibición por condiciones alcalinas.

## 1.6 Organización de la Tesis

En el capítulo 2 se introduce el tema del agua de proceso minero y la reducción biológica de sulfato, y se explica el sistema MBfR y sus potenciales ventajas para tratamiento de estas aguas.

En el capítulo 3 se describe la metodología utilizada para llevar a cabo los experimentos, la configuración de los reactores, las fases experimentales y las variables monitoreadas. También se mencionan los análisis posteriores al fin de las fases experimentales.

En el capítulo 4 se dan a conocer los principales hallazgos del estudio junto a sus posibles causas, y se discuten en virtud de lo observado en otros estudios anteriores.

Por último, el capítulo 5 cierra el cuerpo principal del estudio indicando las principales conclusiones encontradas, se mencionan los aspectos que quedaron fuera de lo realizado y, en base a ello, se dan sugerencias de futuras investigaciones sobre el tema.

## CAPÍTULO 2 ESTADO DEL ARTE

### 2.1 Introducción

En el presente capítulo se aborda el problema del manejo del agua en la minería, la necesidad de tratamiento de estas aguas y se introduce el sistema de reactor de biopelícula sobre membrana como una alternativa novedosa y ventajosa a los tratamientos convencionales.

### 2.2 Revisión de Antecedentes

Las operaciones de la industria minera generan efluentes que contienen altas concentraciones de sulfato y, en cierta medida, metales como Cu, Zn, Al, Fe y Mn. El mal manejo del agua de relaves y el drenaje ácido de minas ha causado graves efectos adversos sobre la calidad de las aguas superficiales y subterráneas en todo el mundo (Schwarzenbach *et al.*, 2010). Las tendencias actuales para contrarrestar este problema incluyen el tratamiento de dichas aguas contaminadas, así como la obtención de una mayor eficiencia del uso del agua en los procesos mineros, por ejemplo, mediante recirculación y reutilización (COCHILCO, 2018; Gunson *et al.*, 2012; Lottermoser, 2011). Esto último es de especial importancia cuando los depósitos de mineral se encuentran en zonas áridas. Por lo tanto, es necesario desarrollar procesos de tratamiento rentables que permitan la reutilización del agua dentro de la misma operación minera.

Las aguas de proceso de las minas de cobre se caracterizan por altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  (del orden de cientos y miles de mg/L, respectivamente), principalmente debido a la adición de  $\text{CaO}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{NaHS}$  durante la flotación de mineral (Wills y Finch, 2015). No es adecuada la descarga directa de estas aguas residuales al ambiente, ya que su muy alta dureza y sulfato pueden tener efectos adversos en los ecosistemas acuáticos (Elphick *et al.*, 2011; Lamers *et al.*, 1998). No obstante, debido a que estas aguas de proceso normalmente carecen de metales disueltos, su tratamiento puede centrarse solamente en la eliminación de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ .

El sulfato presente en estas aguas puede tratarse mediante procesos abióticos y biológicos (Kaksonen y Puhakka, 2007; Obrequé-Contreras *et al.*, 2015). Los métodos físico-químicos

probados incluyen la nanofiltración (Andalajt *et al.*, 2018) y la precipitación como sulfato de bario (Rene *et al.*, 2017). Sin embargo, estos métodos están asociados a altos costos de reactivos químicos, alto consumo de energía o generación de productos tóxicos (Kaksonen y Puhakka, 2007). La eliminación biológica de sulfato, que no sufre de los mismos inconvenientes que los procesos físico-químicos, está mediada por bacterias reductoras de sulfato (*Sulfate-Reducing Bacteria*, SRB), que utilizan sulfato como aceptor de electrones, reduciéndolo por completo a sulfuro, junto con la oxidación de un donante de electrones orgánico o inorgánico. Con hidrógeno gaseoso ( $H_2$ ) como sustrato donante de electrones, la reacción es:



Al igual que todas las reacciones de reducción de sulfato, la ecuación 2.1 consume protones ( $H^+$ ), lo que aumenta la alcalinidad y el pH. Debido a dicha generación de alcalinidad, la reducción de sulfato requiere la adición continua de ácido para prevenir la inhibición de alto pH (Qian *et al.*, 2018). La adición de ácido debe estar bajo un estricto control, ya que el exceso de ácido conduce a una reducción del pH y a la especiación de ion bisulfuro ( $HS^-$ ) a ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ,  $pK_a \sim 7$ ), lo que es tóxico para la SRB a  $\geq 40$  mg  $H_2S/L$  (Schippers *et al.*, 2014).

El tratamiento biológico de aguas sulfatadas ha sido bien estudiado (revisado en Hao *et al.*, 2014; Kaksonen y Puhakka, 2007; Nancuqueo *et al.* 2017; Qian *et al.* 2018 o Suárez, 2016). También hay sistemas disponibles comercialmente, como el Sulfateq<sup>TM</sup>, ofrecido por Paques BV (Países Bajos). Sulfateq usa  $H_2$  como donante de electrones y controla el pH mediante adición de  $CO_2$  gaseoso e inyección de ácido o base (Schröder-Wolthoorn *et al.*, 2008).

El reactor de biopelícula sobre membrana (*Membrane Biofilm Reactor*, MBfR) (Nerenberg, 2016) es otra opción para la eliminación biológica de sulfato, potencialmente más eficiente en su entrega de sustrato y control de pH. El MBfR consiste en un grupo de membranas hidrofóbicas de fibra hueca. Un sustrato gaseoso (generalmente  $H_2$  u  $O_2$ ) se suministra al lumen de las fibras y se transfiere por difusión hacia una biopelícula que se acumula en la superficie externa de la membrana (Martin y Nerenberg, 2012; Nerenberg, 2016; Rittmann, 2018; Zhou *et al.*, 2019). Numerosos estudios han documentado la aplicabilidad del MBfR basado en  $H_2$  para el tratamiento

de agua potable, aguas subterráneas y aguas residuales mediante la reducción y eliminación de nitrato, perclorato, arsenato, tricloroetano y selenato entre otros (Chung *et al.*, 2006; Ontiveros-Valencia *et al.*, 2013, 2016; Zhao *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Ziv-El y Rittmann, 2009). De especial interés son los estudios que muestran la co-ocurrencia de la reducción del sulfato y la oxidación de sulfuro (Ontiveros-Valencia *et al.*, 2016; Sahinkaya *et al.*, 2011).

Los principales factores que afectan a la eficiencia del tratamiento de los MBfR son el tipo y la cantidad de fibras, la carga superficial, la capacidad de entrega de  $H_2$  y el control de la acumulación de biomasa y suciedad (*fouling*) inorgánica (Martin y Nerenberg, 2012; Zhou *et al.*, 2019). En este contexto, la alta concentración de  $Ca^{2+}$  en el agua de proceso minero favorecería la precipitación de  $CaCO_3$  si la generación de alcalinidad conduce a un aumento del pH. La formación de  $CaCO_3$  en las fibras disminuye la transferencia de  $H_2$  al biofilm (Lee y Rittmann, 2002; Ziv-El y Rittmann, 2009); por lo tanto, el control del pH es esencial para minimizar este problema.

Las posibles ventajas del MBfR para el tratamiento sulfidogénico son: i) El donante de electrones ( $H_2$ ) se suministra de manera eficiente y bajo demanda directamente a la biopelícula; ii) El  $H_2$  es limpio y no tóxico, y se puede generar *in situ*, por ejemplo, mediante electrólisis de agua y reformado de gas natural (Acar y Dincer, 2018; da Silva Veras *et al.*, 2017); iii) El  $H_2$  tiene un costo más bajo que casi todos los demás sustratos donantes de electrones (Bijmans *et al.*, 2011; Kaksonen y Puhakka, 2007); iii) Buena retención de biomasa de SRBs autotróficas de crecimiento lento; iv) El  $H_2$  se puede suministrar en combinación con  $CO_2$  como medio para controlar el pH y evitar la precipitación de  $CaCO_{3(s)}$  (Saran, *et al.*, 2018); v) El MBfR basado en  $H_2$  se puede acoplar a un MBfR basado en  $O_2$  para oxidar el sulfuro y formar  $S^0$  (Camiloti *et al.*, 2018; Sahinkaya *et al.*, 2011).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la viabilidad de tratar las aguas reales del proceso de minería de cobre, con una alta concentración de sulfato, mediante el MBfR basado en  $H_2$ . Se evaluaron experimentalmente las condiciones de funcionamiento controlables (es decir, carga superficial, pH y presión de suministro de gas), la resistencia a la transferencia de masa de membrana y la suciedad inorgánica para conocer su impacto en el rendimiento de MBfR para la reducción del sulfato.

### 2.3 Conclusiones

La eficiencia en el uso del agua en la minería puede mejorarse mediante tratamientos que remuevan el sulfato de estas aguas. El sistema MBfR basado en hidrógeno ha demostrado ser una alternativa limpia y eficiente en otras aplicaciones, por lo que puede aplicarse a aguas de proceso minero considerando una serie de potenciales ventajas. La presente investigación es pionera en aplicar este sistema a aguas de proceso minero reales chilenas.



## CAPÍTULO 3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Introducción

En este capítulo se describe la metodología utilizada durante la realización de la tesis, el número y la configuración de los reactores, las fases de operación, las características del agua de proceso minero utilizada y los análisis hechos a fin de determinar el desempeño de los MBfR durante su funcionamiento. También se describen los estudios hechos luego del término de las fases experimentales (secuenciación de ADN microbiano y microscopía electrónica) a fin de entender mejor los fenómenos observados.

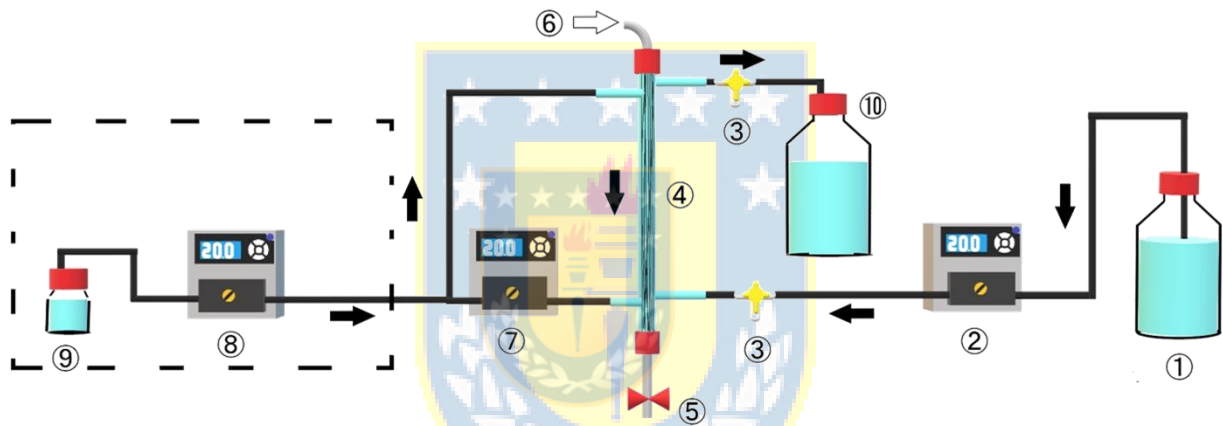


Figura 3.1. Configuración MBfR implementada para reducción de sulfato (volumen 25 mL) en cada sistema. ①: botella afluyente; ②: bomba de alimentación; ③: puerto de muestreo; ④: reactor MBfR; ⑤: válvula de salida de gas; ⑥: suministro de  $H_2$  o  $H_2/CO_2$ ; ⑦: bomba de recirculación; ⑧: bomba de HCl; ⑨: botella de HCl; ⑩: botella efluente. El HCl se agregó desde el día 67 a ambos reactores. En M1, la tubería de recirculación (flexible) se cambió por HDPE el día 196.

### 3.2 Configuración Experimental

Como se ilustra en la Figura 3.1, cada uno de los dos módulos MBfR consistió en tubos de vidrio de 9 mm de diámetro interior y 40 cm de longitud, y se conectaron con tubos flexibles Norprene (Masterflex, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EE.UU.), *fittings* de plástico y válvulas de tres vías



para muestreo de afluentes y efluentes. Un sistema (M1) tuvo 80 fibras huecas de polipropileno no poroso de 200  $\mu\text{m}$  de diámetro exterior (APTwater, Pittsburg, CA, EE.UU.), utilizadas en estudios anteriores (Ontiveros-Valencia *et al.*, 2012, 2014, 2016; Zhao *et al.*, 2013b; Zhou *et al.*, 2016). El otro sistema (M2) tuvo cuatro *cords*, cada uno con 48 fibras de polimetilpenteno no poroso de 80  $\mu\text{m}$  de diámetro exterior (Suez Water Technologies, Treviso, PA, EE.UU.), que no se han aplicado antes en sistemas anaeróbicos (Stamatelatos y Tsagarakis, 2015). El número de fibras seleccionadas en ambos casos dio lugar a una superficie específica de fibra similar (790 y 759  $\text{m}^2/\text{m}^3$ , respectivamente), resultando valores altos para sistemas *bench-scale* (Martin y Nerenberg, 2012).

Se suministró  $\text{H}_2$  presurizado o una mezcla de 80%  $\text{H}_2$  y 20% de  $\text{CO}_2$  en un extremo de las fibras. El otro extremo se dejó sin salida (cerrado) o abierto (para un posible venteo). El  $\text{CO}_2$  en la mezcla se utilizó para el control del pH y como fuente de carbono para las SRB autotróficas (Xia *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2016).

En ambos sistemas, se utilizaron bombas peristálticas (Masterflex L/S, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EE.UU.) para el afluente y la recirculación, esto último para garantizar un comportamiento de mezcla completa dentro de los reactores. El día 196 de funcionamiento, los tubos de recirculación del reactor M1 fueron reemplazados por tubos de HDPE semirrígidos (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EE.UU.) con el fin de reducir la entrada de oxígeno en el sistema.

### 3.3 Agua de Proceso Minero

Se obtuvo agua real de proceso minero (con altas concentraciones de sulfato y calcio y baja alcalinidad) de una mina de cobre en la zona central de Chile. Dicha agua fue aireada por dos días para permitir el equilibrio con el  $\text{CO}_2$  atmosférico, lo que hizo bajar el pH desde 11 hasta  $\sim 7,8$ . En la Tabla 3.1 se muestra la composición química de la muestra de agua de proceso.

El afluente siempre fue previamente burbujado y presurizado a fin de minimizar la entrada de oxígeno a los reactores. El gas inicialmente usado para el afluente fue una mezcla de 80%  $\text{N}_2$  y 20%  $\text{CO}_2$ , pero se cambió a  $\text{N}_2$  puro desde el día 139. También se agregaron al afluente  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

(7 mg/L) y soluciones de micronutrientes SL-10 (1 mL/L) y selenito-tungstato (1 mL/L) (Atlas, 2010) a través de todo el experimento.

Tabla 3.1. Caracterización del agua de proceso minero.

Parámetro	Unidad	Valor	Parámetro	Unidad	Valor
Alcalinidad	meq/L	0,59	Magnesio	μM	19
Aluminio, Total	μM	13	Nitrato	mM	0,13
Boro	μM	9,9	Potasio	mM	2,0
Calcio	mM	16	Silicio	mM	0,17
Cloruro	mM	1,7	Sodio	mM	2,9
Cobalto	μM	26	Sulfato	mM	16
Cobre	μM	2,0	Zinc	μM	0,28
Fluoruro	μM	51	Conductividad	mS/cm	2,2
Fosfato	μM	<0,42	pH (equilibrio atmosférico)	—	7,8
Hierro	μM	0,72			

### 3.4 Inoculación y Puesta en Marcha de los Reactores

Los dos sistemas MBfR se pusieron en marcha con una solución compuesta de agua de proceso de minería previamente burbujeada durante 30 minutos con una mezcla de gas de 80% N<sub>2</sub> y 20% de CO<sub>2</sub>, 20 mg/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> como fuente de fósforo, y 500 mg/L de L-cisteína-HCl como agente reductor. El pH de la solución se ajustó a 7,5 con NaOH (para contrarrestar el efecto acidificante de la L-cisteína), y posteriormente se inoculó con lodo de digester anaeróbico de la planta de tratamiento de aguas servidas de ESSBIO en Hualpén (5% v/v). La puesta en marcha del reactor fue en modo *batch* con recirculación durante 24 horas, luego de las cuales inició la operación continua con agua de proceso minero. La fase de puesta en marcha, destinada a lograr una buena acumulación de biopelícula y un mínimo crecimiento suspendido, continuó hasta que el ORP disminuyó abruptamente a ~ -300 mV, lo que coincidió con la aparición de una acumulación de sulfuro significativa en los reactores.

### 3.5 Condiciones Operacionales

Los MBfR fueron operados de acuerdo a las condiciones mostradas en las Figuras 4.1, 4.2 y la Tabla 4.1 (en el capítulo 4). Cada reactor fue operado por debajo de las presiones máximas de gas recomendadas por los fabricantes, 12 psig para M2 y 30 psig para M1. Las fases involucraron cambios en la presión de gas, la tasa de carga superficial de  $\text{SO}_4^{2-}$  (2,8 y 1,9 g  $\text{SO}_4/\text{m}^2\text{-d}$ ) y la mezcla de suministro de gas ( $\text{H}_2$  puro vs. 80%  $\text{H}_2$  y 20%  $\text{CO}_2$ ). Los MBfR operaron a temperatura ambiente ( $21 \pm 3$  °C), mientras que el pH fue controlado manualmente para mantenerse en el rango de 7,7 a 8,3.

Con el fin de minimizar el vapor de agua y la retrodifusión de gases en el lumen de las fibras (Perez-Calleja *et al.*, 2017), se venteeó el gas por el extremo libre de ellas (modo abierto), ya fuera periódica como continuamente (Tabla 4.1).

### 3.6 Análisis Químicos

Se tomaron muestras periódicamente al afluente y efluente de cada reactor con jeringas de 10 mL para determinar pH, ORP (potencial redox) y OD (oxígeno disuelto). El pH se midió con un medidor HQ40d (HACH, Loveland, CO, EE.UU.) y el ORP con un medidor Orion 370 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), ambos periódicamente calibrados. El OD se midió con un medidor Orion Versa Star (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), también calibrado apropiadamente. Debido a las altas concentraciones de sulfuro en los reactores, el OD efluente se asumió insignificante (Ontiveros-Valencia *et al.*, 2016; Ziv-El y Rittmann, 2009).

La concentración total de  $\text{S}^{2-}$  se midió utilizando kits de azul de metileno HACH (4500-S2-D, APHA, 2005). Las muestras se filtraron a través de filtros de membrana estériles de tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Gotinga, Alemania) para medir  $\text{SO}_4^{2-}$  (HACH, Sulfaver, método 4500 E, APHA, 2005) y  $\text{Ca}^{2+}$  disuelto por espectrometría de absorción atómica (método 3500, APHA, 2005).

Además, se midió acetato efluente por HPLC (González *et al.*, 2019) como un indicador de acetogénesis en los reactores, pero no se detectó en ningún momento durante el experimento.

### 3.7 Estimación de Carga Superficial y *Flux* de $\text{SO}_4^{2-}$

La tasa de carga superficial de aceptor de electrones (*Surface Loading Rate*, SLR) y la tasa superficial de remoción (*Flux*, J) se calcularon para cada fase de funcionamiento de acuerdo a las ecuaciones 3.1 y 3.2 (en g  $\text{SO}_4/\text{m}^2\cdot\text{d}$ ):

$$\text{SLR} = Q \cdot S_0 / A \quad (3.1)$$

$$J = Q \cdot (S_0 - S) / A \quad (3.2)$$

donde Q es el caudal (L/día), A es la superficie de la membrana ( $\text{m}^2$ ), y  $S_0$  y S son las concentraciones afluente y efluente de la especie, respectivamente (g/L).

### 3.8 Análisis Biomolecular

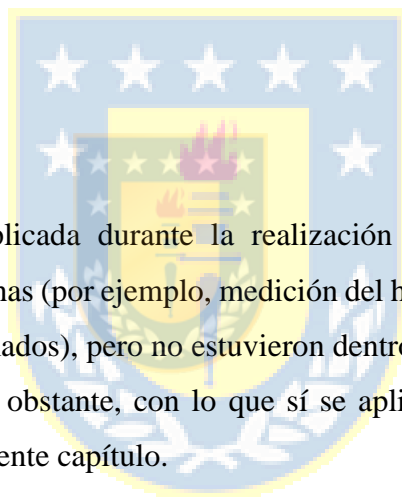
Al final del experimento, se removieron fibras o *cords* de cada MBfR y se dividieron en tres partes de igual longitud. El efluente también fue muestreado para analizar la biomasa suspendida. De cada porción de fibra y efluente, se extrajo ADN utilizando Kits de Aislamiento de ADN MoBio Ultraclean Soil de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se midió utilizando una placa Take3 con un sistema de espectrofotómetro (Epoch, Biotek, Wakefield, MA, EE.UU.). El análisis de la comunidad microbiana de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Procesos Hidrometalúrgicos y Biotecnológicos (PHB) de CodelcoTech, Chile. El procedimiento implicó ejecuciones de secuenciación masiva dirigidas a la región hipervariable V4 del gen ARNr 16S utilizando los *primers* 515F/806R y el kit MiSeq Reagent Micro Kit v2. Las reacciones se llevaron a cabo en una plataforma Illumina Miseq® (Illumina Inc., San Diego, CA, EE.UU.). Para el procesamiento bioinformático de los datos, se utilizó QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology).

### 3.9 Microscopía SEM

Se extrajeron fibras o *cords* de cada MBfR y se cortaron en tres partes iguales. Estas muestras se fijaron en glutaraldehído 2,5% <sub>(aq)</sub> (González *et al.*, 2019), para tiempo después ser deshidratadas en etanol (15 minutos cada una de 25%, 50%, 75% y tres veces 100% etanol) y luego sometidas a secado de punto crítico en CO<sub>2</sub> líquido en un dispositivo Quorum K850 (Quorum Technologies, Laughton, Reino Unido). Las muestras secas fueron recubiertas con oro (SPI-Module Sputter Coater, West Chester, PA, EE.UU.) y colocadas en portamuestras con adhesivo de carbono. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Jeol JSM 6380LV (Jeol Ltd., Tokyo, Japón) y la composición elemental del material observado en las biopelículas se determinó mediante espectrometría de rayos X de dispersión de energía (EDS, Oxford Instruments 7582, Concord, MA, EE.UU.).

### 3.10 Conclusiones

Se presentó la metodología aplicada durante la realización de la tesis. Pudieron realizarse mediciones adicionales a las hechas (por ejemplo, medición del hidrógeno en el agua, otros análisis a la biomasa y a los sólidos formados), pero no estuvieron dentro del alcance del estudio ni dentro de los recursos disponibles. No obstante, con lo que sí se aplicó, se pudo obtener información valiosa, como se verá en el siguiente capítulo.



## CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Introducción

En este capítulo se muestran los resultados de las distintas fases de operación, las eficiencias de cada sistema, los fenómenos observados y los análisis posteriores a los experimentos, a medida que se van comparando con la información disponible en otros estudios.

#### 4.1 Tasas Superficiales de Remoción de $\text{SO}_4^{2-}$

En las Figuras 4.1 y 4.2 se muestran los valores medidos de pH, ORP,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{S}^{2-}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  para M1 y M2 respectivamente. En la Tabla 4.1 se muestran los *fluxes* para cada condición operativa, aunque no siempre fue posible alcanzar un estado estacionario claro. En ambos MBfR, la reducción significativa de  $\text{SO}_4^{2-}$  se produjo inmediatamente después de la fase de puesta en marcha. El reactor M2 comenzó en el día 42, mientras que el reactor M1 empezó más tarde, el día 59 (aumento de la remoción de  $\text{SO}_4^{2-}$  de 7 a 17% en tres días), poco después del inicio del venteo periódico (día 56). El menor rendimiento de M1 en esta fase de puesta en marcha se podría explicar por la acumulación de  $\text{CO}_2$  en el lumen de las fibras debido a una menor permeabilidad de  $\text{CO}_2$  en comparación con  $\text{H}_2$  (Tang *et al.*, 2012) y un mayor consumo de  $\text{H}_2$  en la biopelícula, ya que fue el donante de  $e^-$  para la reducción de  $\text{SO}_4^{2-}$ . El venteo periódico alivió en parte el problema de la acumulación excesiva de  $\text{CO}_2$ . Por su mayor permeabilidad para ambos gases, las fibras de M2 no se vieron tan afectadas por la acumulación de  $\text{CO}_2$ ; no obstante, el inicio del venteo permanente el día 46 también le causó una mejora en la remoción de  $\text{SO}_4^{2-}$  (de 18 a 32% tres días). Además, los *cords* en M2 pueden haber provisto mejores sitios de colonización para las biopelículas, y las presiones de  $\text{H}_2$  elegidas inicialmente pueden haber resultado en mayor disponibilidad relativa de  $\text{H}_2$  en este reactor.

La lentitud en el inicio de una reducción significativa del sulfato puede atribuirse a que el inóculo de digester anaeróbico tenía una población baja de SRB autotróficas, que son de crecimiento lento (Barton y Hamilton, 2007; Rittmann y McCarty, 2001). El retraso se acentuó por la alta concentración de sulfato a eliminar, en comparación con estudios anteriores de MBfR (Ontiveros-Valencia *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014).

Tabla 4.1. Fases operacionales de los reactores y *fluxes* obtenidos<sup>a,b</sup>.

<b>Etap</b>	<b>SLR SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b> <b>(g SO<sub>4</sub>/m<sup>2</sup>-</b> <b>d)</b>	<b>Suministro</b> <b>de gas</b>	<b>Días de</b> <b>operación</b>	<b>Presión</b> <b>de gas</b> <b>(psig)</b>	<b>pH efluente</b> <b>promedio ±</b> <b>desv. est.</b>	<b>Flux SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b> <b>(g SO<sub>4</sub>/m<sup>2</sup>-d)</b> <b>± desv. est.</b>	<b>Donor de e<sup>-</sup></b> <b>consumido (e<sup>-</sup></b> <b>meq/m<sup>2</sup>-d)<sup>c</sup></b>	<b>CaCO<sub>3</sub> formado</b> <b>(g CaCO<sub>3</sub>/m<sup>2</sup>-d)</b> <b>± desv. est.</b>
M1-0 ( <i>Start-up</i> )	Variable	Variable	0-58	Variable	—	— <sup>d</sup>	—	—
M1-1	2,8	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	59-80 <sup>e</sup>	20	7,69 ± 0,72	0,48 ± 0,14	40 ± 12	0,02 ± 0,18
M1-2	2,8	H <sub>2</sub>	81-107	20	7,50 ± 1,33	0,72 ± 0,27	60 ± 22	0,21 ± 0,26
M1-3	1,9	H <sub>2</sub>	108-146	20	8,43 ± 0,43	0,83 ± 0,21	69 ± 17	0,37 ± 0,19
M1-4	1,9	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	147-227	20	7,83 ± 0,74	1,24 ± 0,49	103 ± 41	0,56 ± 0,44
M2-0 ( <i>Start-up</i> )	Variable	Variable	0-41	Variable	—	— <sup>d</sup>	—	—
M2-1	2,8	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	42-80 <sup>f</sup>	5	7,80 ± 0,42	0,88 ± 0,24	73 ± 20	0,24 ± 0,28
M2-2	2,8	H <sub>2</sub>	81-87	5	7,88 ± 0,35	1,40 ± 0,29	117 ± 24	0,42 ± 0,12
M2-3	2,8	H <sub>2</sub>	88-103	10	8,07 ± 0,53	1,72 ± 0,39	143 ± 33	0,22 ± 0,09
M2-4	1,9	H <sub>2</sub>	104-150	10	8,12 ± 0,64	1,16 ± 0,45	97 ± 38	0,17 ± 0,16

<sup>a</sup>Burbujeo de afluente con N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> desde el día 38 hasta el día 139 (ambos reactores).

<sup>b</sup>Adición of HCl implementada a la recirculación para control adicional de pH desde el día 67 (ambos reactores).

<sup>c</sup>Calculado multiplicando el *flux* de SO<sub>4</sub> por 83,3 e<sup>-</sup> meq/g SO<sub>4</sub> reducido.

<sup>d</sup>Las fases de puesta en marcha no tuvieron remoción significativa de sulfato.

<sup>e</sup>Se aplicó venteo periódico desde el día 56 hasta el día 88, y venteo continuo desde el día 88 hasta el final del experimento.

<sup>f</sup>Se aplicó venteo continuo desde el día 46 hasta el día 56, y venteo periódico desde el día 56 hasta el final del experimento.

Cuando en M2 el suministro de gas fue cambiado desde mezcla  $H_2 + CO_2$  a  $H_2$  puro y la presión fue aumentada a 10 psig (días 81 y 88, respectivamente), el desempeño mejoró sostenidamente, alcanzando una remoción máxima de  $SO_4^{2-}$  el día 108 (95%). Sin embargo, esta alta remoción de sulfato no se mantuvo más allá de dos semanas, incluso con la disminución en la SLR de 2,8 a 1,9  $g SO_4/m^2-d$ . Esta pérdida de rendimiento al largo plazo fue posiblemente causada por *fouling* de precipitados de calcita sobre las fibras, un aspecto que es explorado más adelante en el capítulo.

Respecto a las tasas superficiales de remoción en la Tabla 4.1, estudios previos hechos por (Ontiveros-Valencia *et al.*, 2012, 2016) obtuvieron *fluxes* de 5,1 y 3,3  $g SO_4/m^2-d$ , valores más altos que los alcanzados en el presente estudio (0,48-1,72  $g SO_4/m^2-d$ ); de nuevo, la mayor diferencia es probablemente el *fouling* por calcita en el presente estudio. (Zhao *et al.*, 2013b) obtuvieron tasas de consumo de  $H_2$  (reduciendo varios aceptores de electrones en simultáneo) de hasta 190  $e^- meq/m^2-d$ , similares a los obtenidos en M1 usando las mismas fibras. Por otro lado, usando membranas de mayor permeabilidad a los gases, (Zhao *et al.*, 2013a) obtuvieron tasas de consumo de  $H_2$  de hasta 550  $e^- meq/m^2-d$ , aproximadamente el doble de las obtenidas en M2. Esto apunta a la idea de usar membranas de mayor permeabilidad a los gases.

### 4.3 Estrategias de Control de pH y Desempeño

En primer lugar, los resultados de las estrategias de control de pH, ya sea alimentación de gas ácido o solución ácida para contrarrestar el consumo de protones del proceso de reducción de sulfato (ec. 2.1), variaron considerablemente con respecto al tipo de membrana. En M2, el pH promedio se pudo mantener en el rango objetivo (7,7-8,3) sin importar el modo de control de pH, y en base a las desviaciones estándar, la variabilidad del pH fue en promedio menor con alimentación de  $CO_2$  (M2-1, Tabla 4.1). En M1, por otro lado, sólo la alimentación de  $CO_2$  (M1-1 y M1-4) permitió alcanzar los objetivos de pH. Similar a M2, el pH en M1 fue en promedio menos variable con suministro de  $CO_2$ , pero en menor grado que M2. Además, los eventos de sobredosis de ácido deterioraron severamente el desempeño del reactor M1, ocurriendo dos veces (días 101 y 150). La



mejor amortiguación de pH en M2 y bajo suministro de CO<sub>2</sub> puede explicarse por la mayor alcalinidad de bicarbonato disponible, ya que en M2 se disolvió más CO<sub>2</sub>.

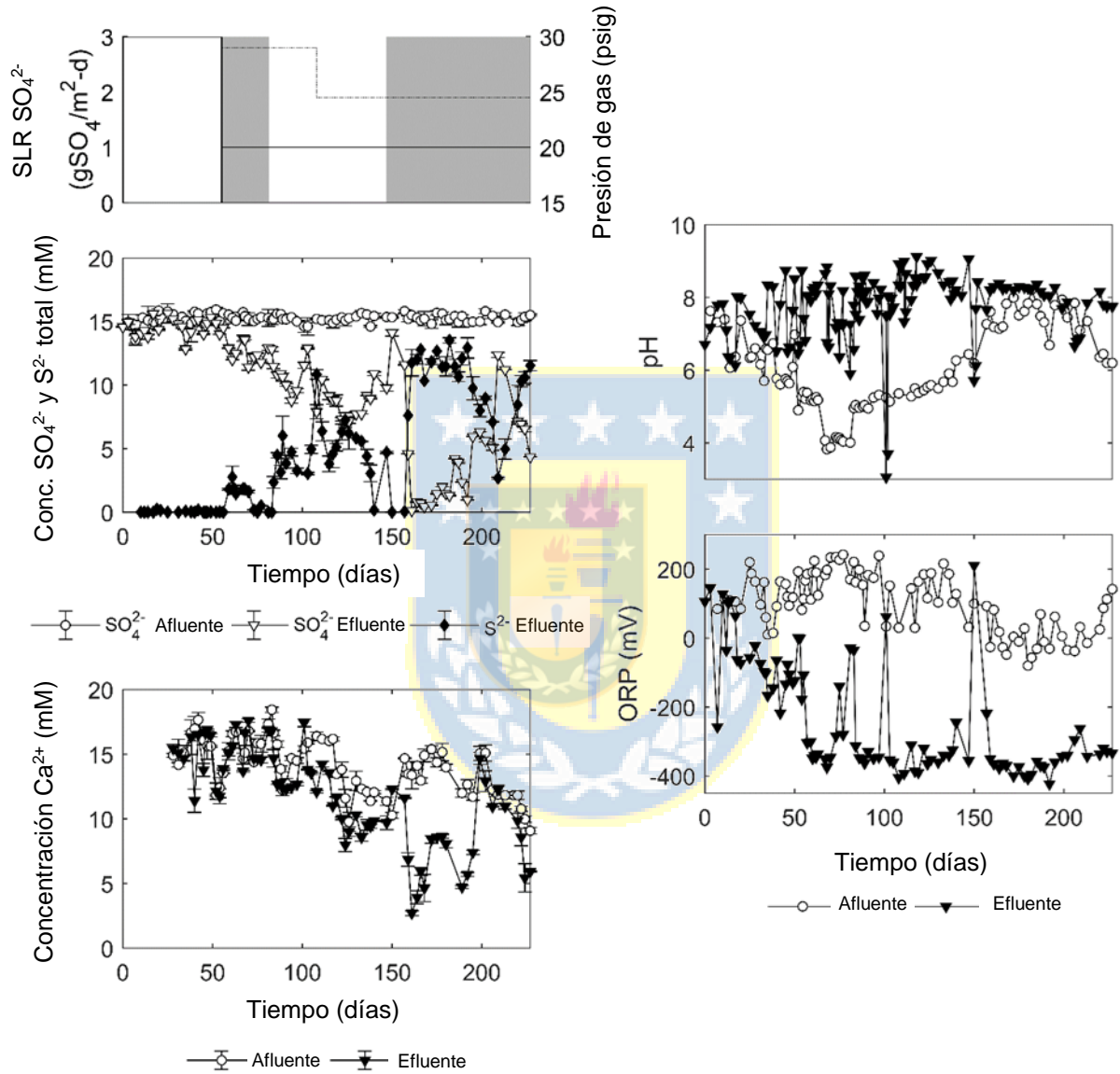


Figura 4.1. Condiciones operacionales y evolución de pH, ORP, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, S<sup>2-</sup> total y Ca<sup>2+</sup> afluente y efluente del reactor M1. El área inicial en blanco en el gráfico superior izquierdo corresponde a la fase de puesta en marcha. El área sombreada indica los períodos de suministro de 80% H<sub>2</sub> + 20% CO<sub>2</sub>, la línea sólida indica la presión de gas, y la línea segmentada indica la tasa de carga superficial de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

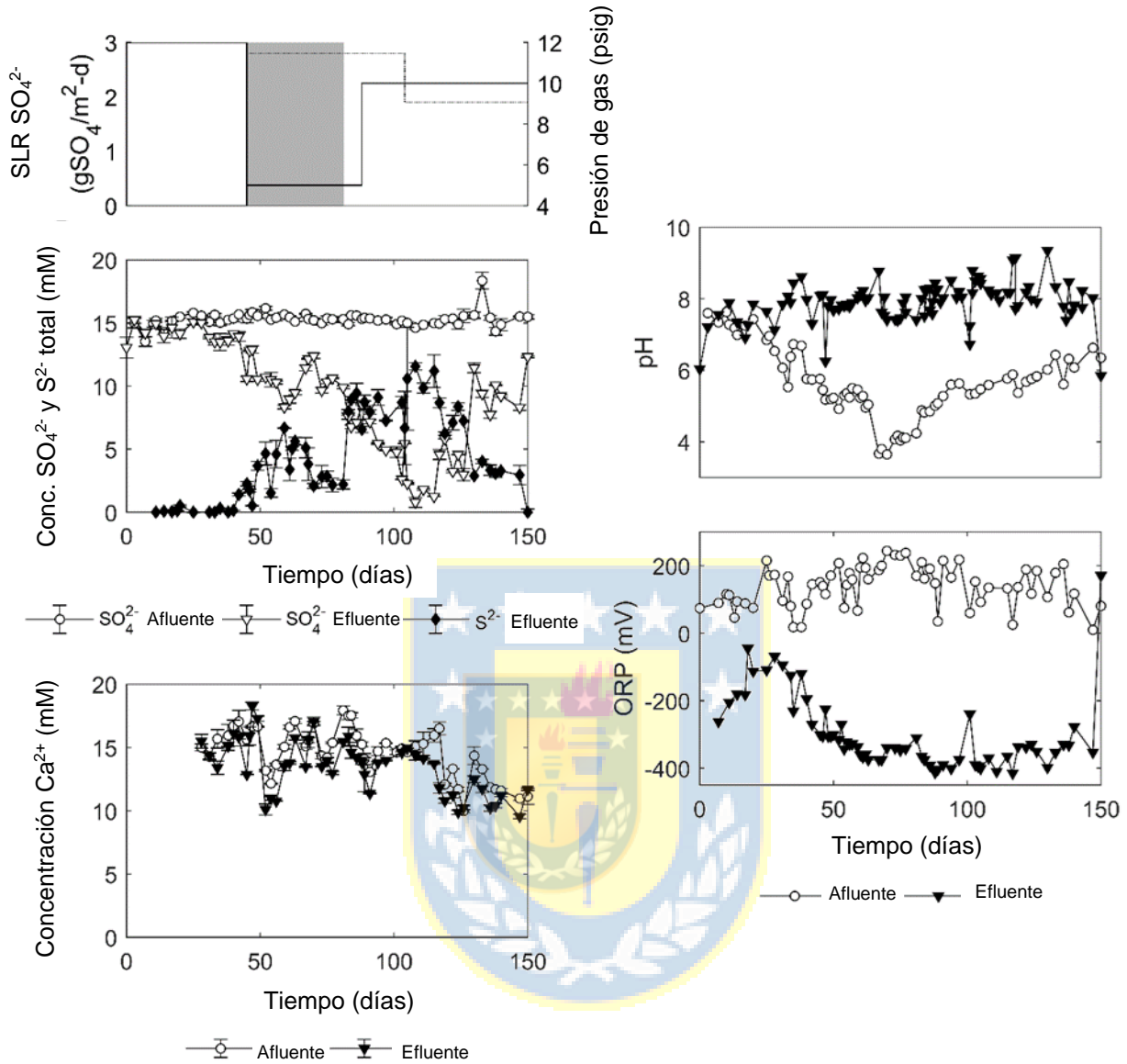


Figura 4.2. Condiciones operacionales y evolución de pH, ORP,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{S}^{2-}$  total y  $\text{Ca}^{2+}$  afluente y efluente del reactor M2. El área inicial en blanco en el gráfico superior izquierdo corresponde a la fase de puesta en marcha. El área sombreada indica los períodos de suministro de 80%  $\text{H}_2$  + 20%  $\text{CO}_2$ , la línea sólida indica la presión de gas, y la línea segmentada indica la tasa de carga superficial de  $\text{SO}_4^{2-}$ .

La relación entre pH, estrategia de control de pH y desempeño es compleja. La precipitación de  $\text{CaCO}_3$  en la biopelícula parece haber sido un fenómeno central, ya que el  $\text{Ca}^{2+}$  afluente fue alto. Los procesos puramente físico-químicos (es decir, mayores pH y mayores concentraciones de carbonato total asociadas a mayores presiones parciales de  $\text{CO}_2$  debieran favorecer la formación

de  $\text{CaCO}_3$ ) no explican totalmente las tendencias de precipitación de calcio (Tabla 4.1). El  $\text{Ca}^{2+}$  exhibió tasas superficiales de precipitación positivas (contando precipitados de Ca retenidos y efluentes) en ambos reactores incluso cuando no se estaba suministrando  $\text{CO}_2$ , probablemente porque el burbujeo de afluente con  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  también fue una fuente significativa de carbonato. Todo el calcio precipitado formaría capas extremadamente gruesas de 205 y 77  $\mu\text{m}$  en M1 y M2 respectivamente que no fueron visualizadas y, por lo tanto, la mayoría debe haberse ido en el efluente. La acumulación de  $\text{CaCO}_3$  sobre las fibras tuvo efectos positivos y negativos. Por un lado, el *buffering* por  $\text{CaCO}_3$  probablemente facilitó la recuperación del desempeño de M1 después de los eventos de acidificación, pero el *scaling* de las membranas afectó la entrega de  $\text{H}_2$ . Por ejemplo, M1 experimentó un período de tres días (etapa M1-3, días 124-126) a alto pH ( $\sim 9$ ), después de los cuales el sulfuro efluente disminuyó constantemente hasta desaparecer por dos semanas (M1-3, días 130-140). Sin embargo, el efecto negativo del *scaling* de  $\text{CaCO}_3$  pudo ser revertido por la alimentación de  $\text{CO}_2$  (M1-4, día 159 en adelante).

En la Figura 4.3 se muestra el efecto del pH sobre el *flux* de sulfato para ambos reactores a través de las fases operacionales. Se observa que los mejores rendimientos se obtuvieron a pH entre 8 y 8,5, lo que favorece la formación de  $\text{HS}^-$  en vez de  $\text{H}_2\text{S}$  y limita la saturación de  $\text{CaCO}_3$ . El pH controlado de esta forma contribuyó a disminuir la toxicidad del sulfuro, limitando niveles inhibitorios de  $\text{H}_2\text{S}_{(\text{aq})}$  (Hao et al., 2014; Rabus et al., 2013). Aunque otros estudios ya han aplicado  $\text{CO}_2$  gaseoso como estrategia de control en sistemas MBfR (Tang et al., 2011; Xia et al., 2015, 2016), en este estudio fue de particular importancia. El  $\text{CO}_2$  suministrado junto al  $\text{H}_2$  parece haber limitado el fouling por  $\text{CaCO}_3$  sobre las fibras, posiblemente a través de un gradiente de pH que causó que la calcita no se saturara en la biopelícula cercana a la fibra sino en el exterior de la biopelícula (sin embargo, se requieren otras técnicas para confirmar este postulado, por ejemplo, microsensores de pH).

#### 4.4 Comunidades Microbianas y Examinación Microscópica

Los resultados de la secuenciación mostraron la presencia de una diversa comunidad biológica en ambos reactores (Figura 4.4). En ambos casos las principales bacterias reductoras de sulfato pertenecen a los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*, ambos del orden *Desulfovibrionales*

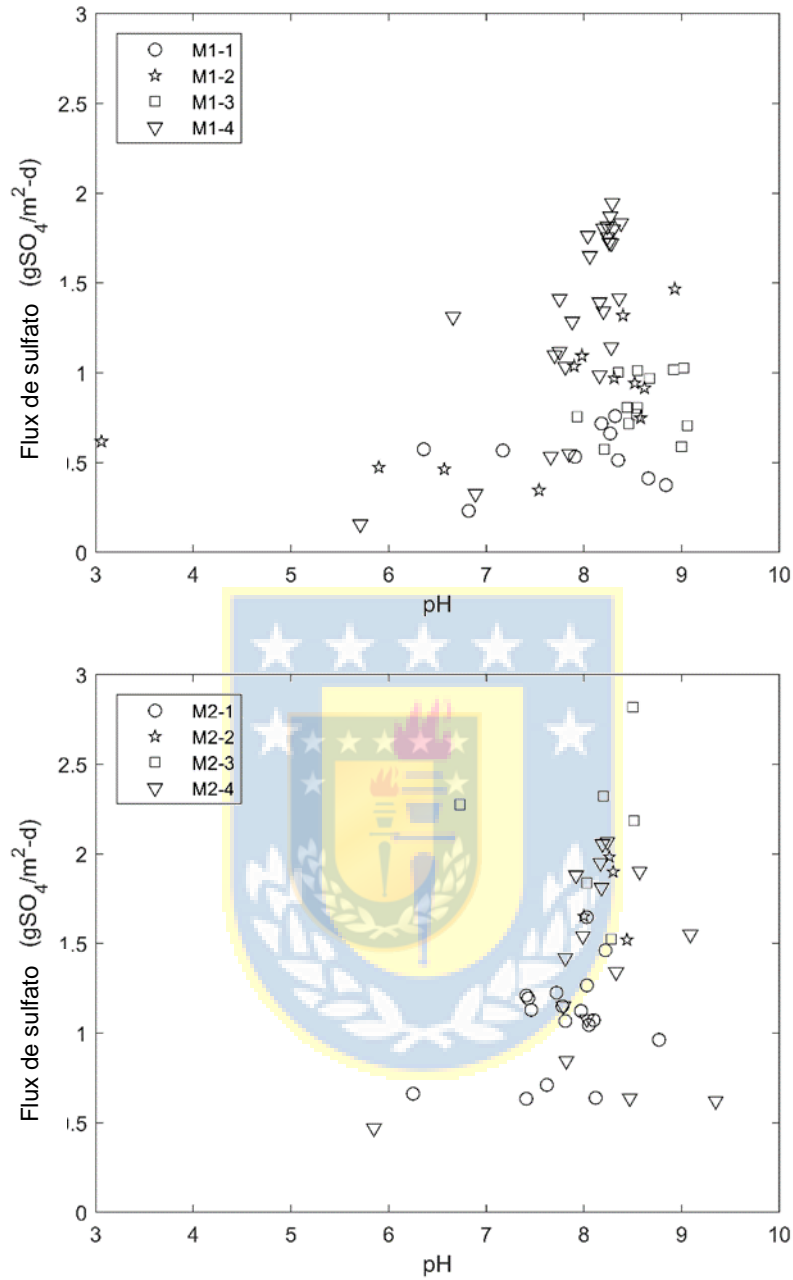


Figura 4.3. Efecto del pH sobre el *flux* de sulfato para los reactores M1 (arriba) y M2 (abajo). Cada símbolo indica una diferente fase operacional. Las fases están descritas en la Tabla 4.1.

(Kuever *et al.*, 2015b). Su abundancia relativa total no va más allá del 15% en M2 y 20% en M1. Cabe destacar que el pH óptimo de la mayoría de las especies pertenecientes a estos dos géneros es ~7,2 (Rosenberg *et al.*, 2014), diferente del óptimo alcanzado en el presente experimento (~8,2).

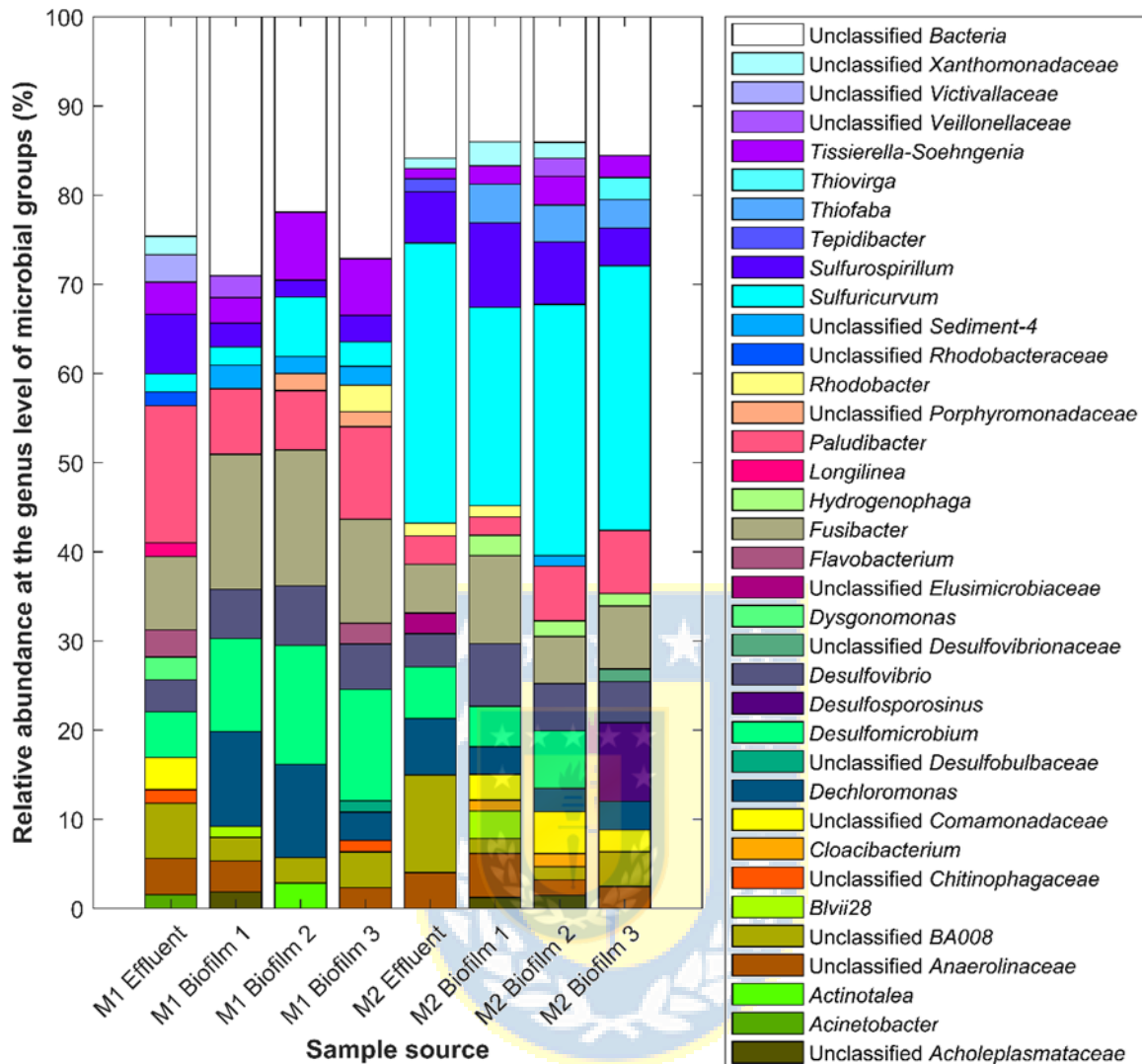


Figura 4.4. Resultados de los análisis de secuenciación masiva de las muestras de efluente y de tres porciones de fibra para ambos reactores. El eje Y indica los porcentajes de abundancia relativa de cada género microbiano detectado.

La razón de esta diferencia de pH puede ser la necesidad de alejarse de niveles críticos de H<sub>2</sub>S capaces de causar inhibición microbiana, como se mencionó en el capítulo 2.

Sorprendentemente, la abundancia del género oxidante de sulfuro *Sulfuricurvum*, del orden *Campylobacterales* (hasta 28,8% en el efluente de M2) fue notoria. Este género es conocido por su capacidad de oxidar sulfuro en condiciones anóxicas y microaerófilas, y es capaz incluso de utilizar hidrógeno como donador de electrones (Mitchell *et al.*, 2014). Ya que no hubo otros aceptores

de electrones en el afluente, se cree que la abundancia de *Sulfuricurvum* en M2 fue debida a un artefacto causado por la permeabilidad al oxígeno de las tuberías flexibles Norprene usadas en el reactor, además de los bajos caudales usados. Esta idea se apoya en el hecho de que en M1, donde se tomó la precaución de cambiar estos tubos por otros mucho menos permeables a los gases, su abundancia fue mucho menor, con un máximo de 6,3% en la sección 2.

Otros dos géneros de bacterias se destacan: la microaerofílica *Sulfurospirillum*, del orden *Campylobacteriales*, y la anaerobia estricta *Fusibacter*, del orden *Clostridiales*, ambas con la capacidad de reducir especies de azufre distintas del sulfato (como tiosulfato y azufre elemental) a sulfuro (Ravot *et al.*, 2015; Stolz *et al.*, 2015). El rol de estas bacterias no está claro, pero quizás ayudaron a contrarrestar el efecto de *Sulfuricurvum* o una oxidación química parcial de sulfuro (Lin *et al.*, 2018). De esta manera, se podría observar un ciclo del azufre cuya producción neta estuvo inclinada al sulfuro. Este ciclo no es deseado porque la presencia de oxidantes de H<sub>2</sub>S genera ineficiencias en el proceso, forzando a suministrar más donador de electrones para “re-reducir” el azufre oxidado producido. Además, las oxidantes de H<sub>2</sub>S compiten por nutrientes y espacio con las SRB. Las bacterias oxidantes de sulfuro pueden sobrepasar a las reductoras de sulfato por su crecimiento más rápido (Ontiveros-Valencia *et al.*, 2016). Esto refuerza la idea de maximizar la anaerobiosis en este tipo de estudios.

La gran variedad de géneros de bacterias heterotróficas no reductoras de sulfato encontradas (tales como *Fusibacter*, *Paludibacter*, *Tissierella-Soehngenia* entre otros) puede explicarse por la cinética lenta de las SRB, junto con la alta producción de productos microbianos solubles (los que sirven de sustrato para las primeras) que ya ha sido detectada previamente en reactores MBfR con reducción de sulfato (Ontiveros-Valencia *et al.*, 2018). Además, se sabe que *Fusibacter* produce acetato a partir de la oxidación de carbohidratos (Ravot *et al.*, 2015), el que puede ser usado por *Desulfovibrio* como fuente de carbono además del CO<sub>2</sub> (Kuever *et al.*, 2015a; Zhou *et al.*, 2014); pese a ello, no se detectó acetato en el efluente, porque pudo ser rápidamente consumido por los heterótrofos.

En la Figura 4.5 se muestran micrografías SEM de los microorganismos encontrados sobre las fibras de ambos reactores, con la presencia de *clusters* mineralizados de sustancias poliméricas

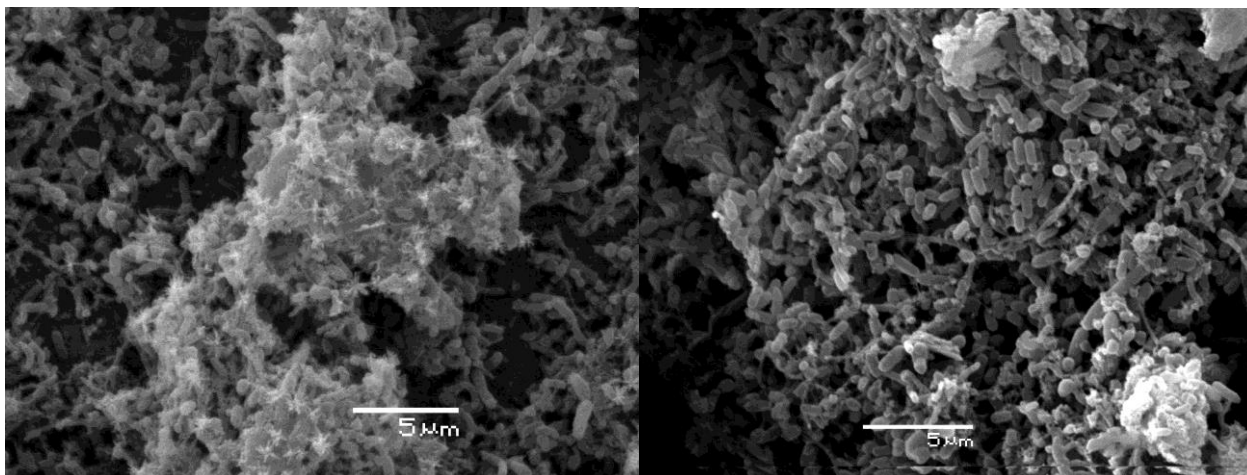


Figura 4.5. Imágenes SEM mostrando la presencia de microorganismos sobre las fibras de M1 (izquierda) y M2 (derecha).

extracelulares (EPS por sus siglas en inglés). Los análisis EDS en la Figura 4.6 muestran la presencia de precipitados de calcio, mayormente en M1 (donde parece haber mineralización significativa de la biopelícula), lo que confirma la complejidad de lidiar con agua de muy alta dureza en términos de la vida útil del sistema y posibles estrategias de limpieza para los reactores.

#### 4.5 Otros Factores Relevantes en el Desempeño de los MBfR

Como se mencionó en la sección de condiciones operacionales, un problema conocido en la implementación de reactores MBfR es la retrodifusión de gases desde el líquido hacia el lumen de las membranas, acumulándose dentro de ellas (en el modo cerrado), disminuyendo la tasa de transferencia de  $H_2$  y causando una distribución desigual de la biomasa a lo largo de las fibras (Martin y Nerenberg, 2012; Zhou *et al.*, 2019). Pese a que este problema podría abordarse en parte a través del venteo periódico (se detectó el típico olor de  $H_2S$  en el gas de salida), aún queda pendiente un estudio más sistemático de estrategias de venteo (Perez-Calleja *et al.*, 2017). Tanto el  $H_2$  como el  $H_2S$  son gases que requieren un manejo cuidadoso ya que es riesgoso liberarlos al ambiente, además de introducir un gasto de sustrato considerablemente mayor.

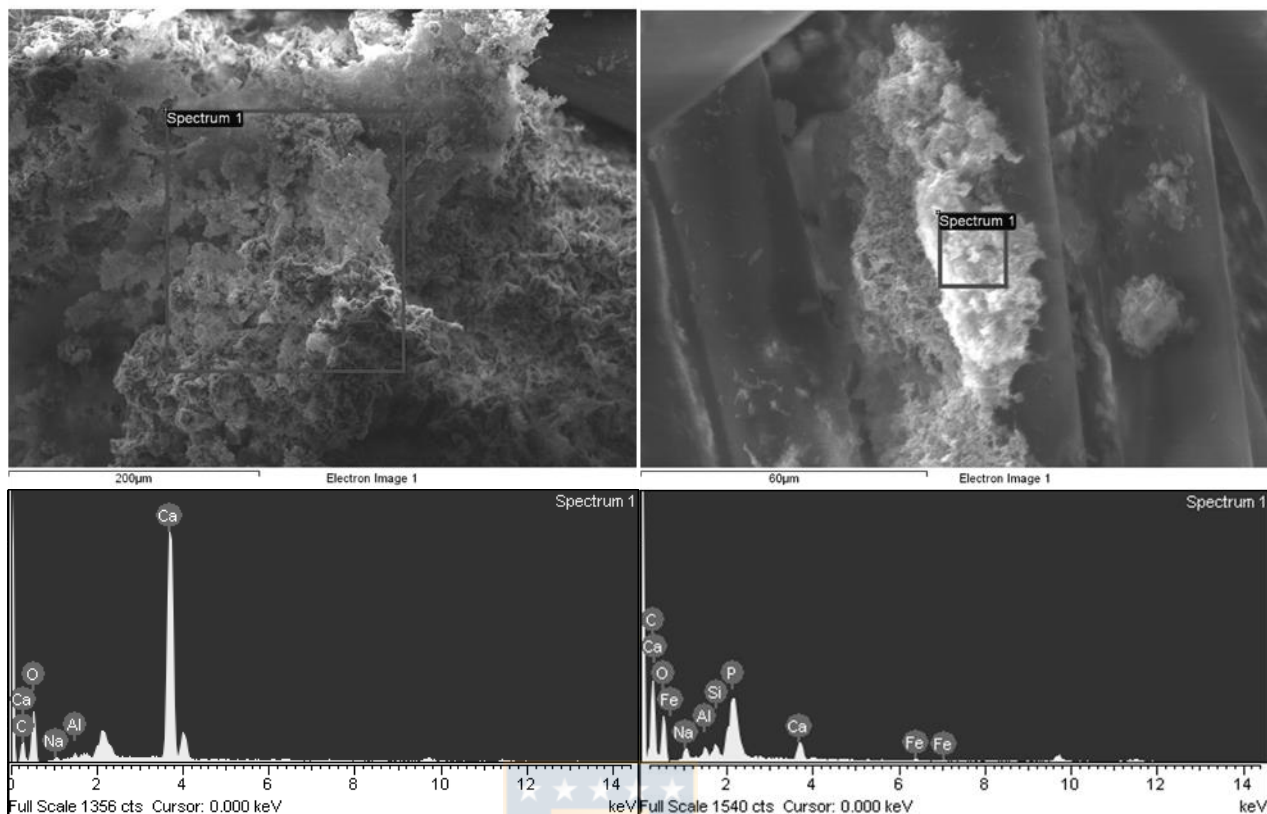


Figura 4.6. Análisis SEM-EDS de zonas de biopelícula de M1 (izquierda) y M2 (derecha). Se destaca la importante mineralización (posiblemente por  $\text{CaCO}_3$ ) en M1, mientras en M2 parece dominar la biomasa, con presencia de calcio en menor grado.

#### 4.6 Conclusiones

Se presentaron los resultados obtenidos en los experimentos y los análisis posteriores. Se pudo observar que el concepto básico de remoción de sulfato funciona en los reactores MBfR, pero la abundancia de calcio en el agua de proceso minero causó problemas en el desempeño del tratamiento. En el siguiente capítulo se ahondará en las conclusiones y comentarios obtenidos a partir de la evidencia encontrada en el presente estudio.



## CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES Y COMENTARIOS

Se probaron dos sistemas MBfR basados en hidrógeno con fibras de diferentes materiales para remover sulfato de un agua real de proceso minero con altas concentraciones de sulfato (~1500 mg/L) y calcio (~600 mg/L). Hasta donde se sabe, no hay estudios previos de MBfR que hayan trabajado con tales niveles de concentraciones de  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Después de una fase de puesta en marcha (59 y 42 días para M1 y M2, respectivamente), los dos sistemas alcanzaron altas remociones *peak* de  $\text{SO}_4^{2-}$  (99 y 95%, con concentraciones efluentes de sulfato de 12 y 75 mg/L) con 2,8 y 1,9 g  $\text{SO}_4/\text{m}^2\text{-d}$ , pero no sostuvieron el buen desempeño a largo plazo. Fue necesario suministrar acidez a los reactores ( $\text{CO}_2$  ó  $\text{HCl}$ ) para contrarrestar el aumento del pH debido a la reducción de sulfato. El  $\text{CO}_2$  mostró ser un método adecuado para controlar el pH, probablemente evitando el *fouling* por calcita sobre las fibras, aunque este fenómeno debe ser estudiado en más detalle. También se recomienda controlar de manera independiente la razón  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ , por la baja capacidad de amortiguación de pH del agua de proceso minero. En el presente estudio, esto no se implementó, porque no se disponía de sistemas de control a la pequeña escala requerida. Sin embargo, el sistema MBfR probó ser eficiente, robusto y capaz de una rápida recuperación luego de eventos de acidificación.

El presente trabajo reveló varios aspectos relevantes. Uno fue la necesidad de control fino de pH en un rango que minimice la toxicidad del  $\text{H}_2\text{S}$  y la auto-inhibición de las SRB, además de limitar la saturación de  $\text{CaCO}_3$ . Otro fue la necesidad de usar fibras de alta permeabilidad a gases (y a una alta superficie específica) para evitar la limitación de  $\text{H}_2$ , en particular con aguas que contienen altas concentraciones de sulfato. Mejorando estos dos factores, el desempeño de un sistema MBfR puede ser optimizado, permitiendo subir la tasa de carga superficial mientras se logra una operación a pH estable. También se sugiere un estudio de estrategias de control de *fouling* por  $\text{CaCO}_3$ , ya que este es el principal riesgo de disminución de la eficiencia en el tratamiento de estas aguas. Además, el venteo de las fibras mostró ser útil para acelerar la puesta en marcha en ambos reactores y, por ende, se necesita probar estrategias más detalladas de venteo y control de la liberación de  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  y otros gases acumulados en el lumen de las fibras. El sulfuro producido en estos reactores podría ser usado en una siguiente etapa, por ejemplo, para precipitar metales pesados o ser oxidado a azufre elemental.

Las comunidades microbianas fueron muy diversas en ambos reactores, con un 15 a 20% de abundancia de SRB (principalmente *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*). Se recomienda inocular estos reactores con cultivos previamente enriquecidos de estas bacterias, para superar el problema de su lento crecimiento y lograr una puesta en marcha más rápida. También es necesario minimizar lo más posible la entrada de oxígeno a los reactores, para evitar la reoxidación de sulfuro a sulfato y la muerte de las SRB.



**REFERENCIAS**

Acar, C. e I. Dincer (2018). Hydrogen Production. En I. Dincer (ed.). **Comprehensive Energy Systems. Vol. 3.** Elsevier.

Andalaft, Javier, Alex Schwarz, Luis Pino, Paula Fuentes, Rodrigo Bórquez y Marcelo Aybar (2018). Assessment and Modeling of Nanofiltration of Acid Mine Drainage. **Industrial & Engineering Chemistry Research** **57(43)**. 14727–14739.

APHA (2005). **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, Centennial Edition.** 21st ed. American Public Health Association. Washington D.C.

Atlas, Ronald (2010). **Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition.** CRC Press.

Barton, Larry L. y W. Allan Hamilton (2007). **Sulphate-Reducing Bacteria.** 1st ed. Cambridge University Press. Cambridge.

Bijmans, M. F. M., C. J. N. Buisman, R. J. W. Meulepas, y P. N. L. Lens (2011). Sulfate Reduction for Inorganic Waste and Process Water Treatment. En M. Moo-Young (ed.). **Comprehensive Biotechnology. Vol. 6.** Elsevier.

Camiloti, Priscila Rosseto, Freddy Valdés, Tiago Palladino Delforno, Jan Bartacek, Marcelo Zaiat y David Jeison (2018). A Membrane Aerated Biofilm Reactor for Sulfide Control from Anaerobically Treated Wastewater. **Environmental Technology (United Kingdom)** **3330**. 1–10.

Chung, Jinwook, Robert Nerenberg, y Bruce E. Rittmann (2006). Bio-Reduction of Soluble Chromate Using a Hydrogen-Based Membrane Biofilm Reactor. **Water Research** **40(8)**. 1634–1642.

COCHILCO (2018). **Consumo de Agua En La Minería Del Cobre Al 2017.** Comisión Chilena del Cobre. Santiago.

Elphick, James R., Martin Davies, Guy Gilron, Edmund C. Canaria, Bonnie Lo y Howard C. Bailey (2011). An Aquatic Toxicological Evaluation of Sulfate: The Case for Considering Hardness as a Modifying Factor in Setting Water Quality Guidelines. **Environmental Toxicology and Chemistry** **30(1)**. 247–253.

González, Daniella, Yun Liu, Denys Villa, Gordon Southam, Sabrina Hedrich, Pedro Galleguillos, Camila Colipai e Ivan Nancucho (2019). Performance of a Sulfidogenic Bioreactor Inoculated with Indigenous Acidic Communities for Treating an Extremely Acidic Mine Water. **Minerals Engineering** **131(Noviembre 2018)**. 370–375.

Gunson, A. J., B. Klein, M. Veiga y S. Dunbar (2012). Reducing Mine Water Requirements. **Journal of Cleaner Production** **21(1)**. 71–82.

Hao, Tian wei, Peng yu Xiang, Hamish R. Mackey, Kun Chi, Hui Lu, Ho kwong Chui, Mark C. M. van Loosdrecht y Guang Hao Chen (2014). A Review of Biological Sulfate Conversions in Wastewater Treatment. **Water Research** **65**. 1–21.

Kaksonen, Anna H. y J. A. Puhakka (2007). Sulfate Reduction Based Bioprocesses for the Treatment of Acid Mine Drainage and the Recovery of Metals. **Engineering in Life Sciences** **7(6)**. 541–564.

Kuever, Jan, Fred A. Rainey y Friedrich Widdel (2015a). Desulfovibrio. En **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, Reino Unido.

Kuever, Jan, Fred A. Rainey y Friedrich Widdel (2015b). Desulfovibrionales Ord. Nov. En **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, Reino Unido.

Lamers, Leon P. M., Hilde B. M. Tomassen y Jan G. M. Roelofs (1998). Sulfate-Induced Eutrophication and Phytotoxicity in Freshwater Wetlands. **Environmental Science and Technology** **32(2)**. 199–205.

Lee, Kuan-Chun y Bruce E. Rittmann (2002). Applying a Novel Autohydrogenotrophic Hollow-Fiber Membrane Biofilm Reactor for Denitrification of Drinking Water. **Water Research** **36(8)**. 2040–2052.

Lin, Sen, Hamish R. Mackey, Tianwei Hao, Gang Guo, Mark C. M. van Loosdrecht y Guanghao Chen (2018). Biological Sulfur Oxidation in Wastewater Treatment: A Review of Emerging Opportunities. **Water Research** **143**. 399–415.

Lottermoser, Bernd G (2011). Recycling, Reuse and Rehabilitation of Mine Wastes. **Elements** **7(6)**. 405–410.

Martin, Kelly J. y Robert Nerenberg (2012). The Membrane Biofilm Reactor (MBfR) for Water and Wastewater Treatment: Principles, Applications, and Recent Developments. **Bioresource Technology** **122**. 83–94.

Mitchell, Hazel M., Gifone A. Rocha, Nadeem O. Kaakoush, Jani L. O'Rourke y Dulciene M. M. Queiroz (2014). The Family Helicobacteraceae. En F. Thompson, E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, and E. Stackebrandt (eds.). **The Prokaryotes**. Springer Berlin Heidelberg. Berlín, Alemania.

Nancuqueo, Ivan, José A. P. Bitencourt, Prafulla K. Sahoo, Joner Oliveira Alves, José O. Siqueira y Guilherme Oliveira (2017). Recent Developments for Remediating Acidic Mine Waters Using Sulfidogenic Bacteria. **BioMed Research International** **2017(Figure 1)**. 1–17.

Nerenberg, Robert (2016). The Membrane-Biofilm Reactor (MBfR) as a Counter-Diffusional Biofilm Process. **Current Opinion in Biotechnology** **38**. 131–136.

Obrique-Contreras, Johanna, Danilo Pérez-Flores y Pamela Gutiérrez (2015). Acid Mine Drainage in Chile: An Opportunity to Apply Bioremediation Technology. **Journal of Waste Water Treatment & Analysis** **06(03)**.

Ontiveros-Valencia, A., C. Zhou, H. P. Zhao, R. Krajmalnik-Brown, Y. Tang y B. E. Rittmann

(2018). Managing Microbial Communities in Membrane Biofilm Reactors. **Applied Microbiology and Biotechnology** **102(21)**. 9003–9014.

Ontiveros-Valencia, Aura, Christopher R. Penton, Rosa Krajmalnik-Brown y Bruce E. Rittmann (2016). Hydrogen-Fed Biofilm Reactors Reducing Selenate and Sulfate: Community Structure and Capture of Elemental Selenium within the Biofilm. **Biotechnology and Bioengineering** **113(8)**. 1736–1744.

Ontiveros-Valencia, Aura, Youneng Tang, Rosa Krajmalnik-Brown y Bruce E. Rittmann (2013). Perchlorate Reduction from a Highly Contaminated Groundwater in the Presence of Sulfate-Reducing Bacteria in a Hydrogen-Fed Biofilm. **Biotechnology and Bioengineering** **110(12)**. 3139–3147.

Ontiveros-Valencia, Aura, Youneng Tang, Rosa Krajmalnik-Brown y Bruce E. Rittmann (2014). Managing the Interactions between Sulfate- and Perchlorate-Reducing Bacteria When Using Hydrogen-Fed Biofilms to Treat a Groundwater with a High Perchlorate Concentration. **Water Research** **55**. 215–24.

Ontiveros-Valencia, Aura, Michal Ziv-El, He Ping Zhao, Liang Feng, Bruce E. Rittmann y Rosa Krajmalnik-Brown (2012). Interactions between Nitrate-Reducing and Sulfate-Reducing Bacteria Coexisting in a Hydrogen-Fed Biofilm. **Environmental Science and Technology** **46(20)**. 11289–11298.

Perez-Calleja, P., M. Aybar, C. Picioreanu, A. L. Esteban-Garcia, K. J. Martin y R. Nerenberg (2017). Periodic Venting of MABR Lumen Allows High Removal Rates and High Gas-Transfer Efficiencies. **Water Research** **121**. 349–360.

Qian, Zeng, Hao Tianwei, Hamish Robert Mackey, Mark C. M. van Loosdrecht y Chen Guanghao (2018). Recent Advances in Dissimilatory Sulfate Reduction: From Metabolic Study to Application. **Water Research** **150**. 162–181.

Rabus, Ralf, Theo A. Hansen y Friedrich Widdel (2013). Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. En E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson (eds.). **The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry**, Springer Berlin Heidelberg. Berlín, Alemania.

Ravot, Gilles, Jean-Louis Garcia, Michel Magot y Bernard Ollivier (2015). Fusibacter. En **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, Reino Unido.

Rene, Eldon R., Erkan Sahinkaya, Alison Lewis y Piet N. L. Lens (2017). **Sustainable Heavy Metal Remediation. Vol. 8**. Springer International Publishing.

Rittmann, Bruce E. (2018). Biofilms, Active Substrata, and Me. **Water Research** **132**. 135–145.

Rittmann, Bruce E. y Perry L. McCarty (2001). **Environmental Biotechnology: Principles and Applications**. 1st ed. McGraw-Hill. Boston.

Rosenberg, Eugene, Edward F. DeLong, Stephen Lory, Erko Stackebrandt y Fabiano Thompson (2014). **The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria**. 4th ed. Springer Berlin Heidelberg. Berlín, Alemania.

Sahinkaya, Erkan, Halil Hasar, Anna H. Kaksonen y Bruce E. Rittmann (2011). Performance of a Sulfide-Oxidizing, Sulfur-Producing Membrane Biofilm Reactor Treating Sulfide-Containing Bioreactor Effluent. **Environmental Science and Technology** **45(9)**. 4080–4087.

Saran, Rishabh Kumar, Vijeta Arora y Shashikant Yadav (2018). CO<sub>2</sub> Sequestration by Mineral Carbonation: A Review. **Global NEST Journal** **20(3)**. 497–503.

Schippers, Axel, Franz Glombitza y Wolfgang Sand (2014). **Geobiotechnology I. Vol. 141**. Springer Berlin Heidelberg. Berlín, Alemania.

Schröder-Wolthoorn, Anke, Simon Kuitert, Henk Dijkman y Jacco L. Huisman (2008). Application of Sulfate Reduction for the Biological Conversion of Anglesite (PbSO<sub>4</sub>) to Galena (PbS). **Hydrometallurgy** **94**(1–4). 105–109.

Schwarzenbach, René P., Thomas Egli, Thomas B. Hofstetter, Urs von Gunten y Bernhard Wehrli (2010). Global Water Pollution and Human Health. **Annual Review of Environment and Resources** **35**(1). 109–136.

da Silva Veras, Tatiane, Thiago Simonato Mozer, Danielle da Costa Rubim Messeder dos Santos y Aldara da Silva César (2017). Hydrogen: Trends, Production and Characterization of the Main Process Worldwide. **International Journal of Hydrogen Energy** **42**(4). 2018–2033.

Stamatelatou, Katerina y Konstantinos P. Tsagarakis (2015). ***Sewage Treatment Plants: Economic Evaluation of Innovative Technologies for Energy Efficiency***. 1st ed. IWA Publishing. Londres, Reino Unido.

Stolz, John F., Ronald S. Oremland, Bruce J. Paster', Floyd E. Dewhirst y Peter Vandamme (2015). Sulfurospirillum. En ***Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria***. Vol. 1216. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, Reino Unido.

Suárez, José Ignacio (2016). **Biorreactor Para Tratamiento de Drenaje Ácido de Minería y Detoxificación de Metales**. Memoria de Título Ingeniero Civil. Universidad de Concepción, Concepción.

Tang, Youneng, Chen Zhou, Steven W. Van Ginkel, Aura Ontiveros-Valencia, Junghun Shin y Bruce E. Rittmann (2012). Hydrogen Permeability of the Hollow Fibers Used in H<sub>2</sub>-Based Membrane Biofilm Reactors. **Journal of Membrane Science** **407–408**. 176–183.

Tang, Youneng, Chen Zhou, Michal Ziv-El y Bruce E. Rittmann (2011). A PH-Control Model for Heterotrophic and Hydrogen-Based Autotrophic Denitrification. **Water Research** **45**(1). 232–240.



Wills, Barry A. y James A. Finch (2015). **Wills' Mineral Processing Technology: An Introduction to the Practical Aspects of Ore Treatment and Mineral Recovery**. 8th ed. Butterworth-Heinemann. Waltham.

Xia, Siqing, Chenhui Wang, Xiaoyin Xu, Youneng Tang, Zuowei Wang, Zaoli Gu y Yun Zhou (2015). Bioreduction of Nitrate in a Hydrogen-Based Membrane Biofilm Reactor Using CO<sub>2</sub> for PH Control and as Carbon Source. **Chemical Engineering Journal** **276**. 59–64.

Xia, Siqing, Xiaoyin Xu, Chen Zhou, Chenhui Wang, Lijie Zhou y Bruce E. Rittmann (2016). Direct Delivery of CO<sub>2</sub> into a Hydrogen-Based Membrane Biofilm Reactor and Model Development. **Chemical Engineering Journal** **290**. 154–160.

Zhao, He-Ping, Zehra Esra Ilhan, Aura Ontiveros-Valencia, Youneng Tang, Bruce E. Rittmann y Rosa Krajmalnik-Brown (2013a). Effects of Multiple Electron Acceptors on Microbial Interactions in a Hydrogen-Based Biofilm. **Environmental Science & Technology** **47(13)**. 7396–7403.

Zhao, He-Ping, Aura Ontiveros-Valencia, Youneng Tang, Bi O. Kim, Zehra Esra Ilhan, Rosa Krajmalnik-Brown y Bruce E. Rittmann (2013b). Using a Two-Stage Hydrogen-Based Membrane Biofilm Reactor (MBfR) to Achieve Complete Perchlorate Reduction in the Presence of Nitrate and Sulfate. **Environmental Science and Technology** **47(3)**. 1565–1572.

Zhao, He-Ping, Aura Ontiveros-Valencia, Youneng Tang, Bi O. Kim, Steven VanGinkel, David Friese, Ryan Overstreet, Jennifer Smith, Patrick Evans, Rosa Krajmalnik-Brown y Bruce E. Rittmann (2014). Removal of Multiple Electron Acceptors by Pilot-Scale, Two-Stage Membrane Biofilm Reactors. **Water Research** **54**. 115–122.

Zhou, Chen, Aura Ontiveros-Valencia, Louis Cornette de Saint Cyr, Alexander S. Zevin, Sara E. Carey, Rosa Krajmalnik-Brown y Bruce E. Rittmann (2014). Uranium Removal and Microbial Community in a H<sub>2</sub>-Based Membrane Biofilm Reactor. **Water Research** **64**. 255–264.

Zhou, Chen, Aura Ontiveros-Valencia, Robert Nerenberg, Youneng Tang, David Friese, Rosa

Krajmalnik-Brown y Bruce E. Rittmann (2019). Hydrogenotrophic Microbial Reduction of Oxyanions With the Membrane Biofilm Reactor. **Frontiers in Microbiology** **9(Enero)**. 1-14.

Zhou, Chen, Aura Ontiveros-Valencia, Zhaocheng Wang, Juan Maldonado, He Ping Zhao, Rosa Krajmalnik-Brown y Bruce E. Rittmann (2016). Palladium Recovery in a H<sub>2</sub>-Based Membrane Biofilm Reactor: Formation of Pd(0) Nanoparticles through Enzymatic and Autocatalytic Reductions. **Environmental Science and Technology** **50(5)**. 2546–2555.

Ziv-El, Michal C. y Bruce E. Rittmann (2009). Systematic Evaluation of Nitrate and Perchlorate Bioreduction Kinetics in Groundwater Using a Hydrogen-Based Membrane Biofilm Reactor. **Water Research** **43(1)**. 173–181.

