



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

“Precipitación de metales pesados provenientes de un efluente de una Planta de Beneficio, del Río Guanache y del Río Siete del Distrito Minero Bella Rica utilizando un consorcio de bacterias sulfato-reductoras del mismo Distrito.”

**TESIS DE GRADO PREVIA A
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO QUÍMICO**

AUTOR:

Darío Alexander Orellana Jaramillo

DIRECTOR:

Ing. Víctor Aurelio Sanmartín

**Loja – Ecuador
2009**

CESIÓN DE DERECHOS

Yo Darío Alexander Orellana Jaramillo declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

Darío Alexander Orellana Jaramillo

CERTIFICACIÓN

Ing. Víctor Sanmartín, Director de Tesis de Grado, que versa sobre el tema:

“Precipitación de metales pesados provenientes de un efluente de una Planta de Beneficio, del Río Guanache y del Río Siete del Distrito Minero Bella Rica utilizando un consorcio de bacterias sulfato-reductoras del mismo Distrito.”

CERTIFICO:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y una vez que ha sido íntegramente revisado y cumple con los requisitos autorizo su presentación.

Ing. Víctor Sanmartín

DIRECTOR DE TESIS

Loja, marzo del 2009

AUTORÍA

La presentación, procedimientos y conceptos vertidos en el presente trabajo de tesis son de responsabilidad absoluta del autor.

Darío Alexander Orellana Jaramillo

AGRADECIMIENTO

Agradezco de manera infinita a Dios por darme fuerza, fortaleza y disposición para seguir siempre adelante y ayudarme a cumplir mis metas.

Por todos los valores cultivados durante toda mi vida, por todo el apoyo incondicional brindado y por la paciencia que me han tenido, agradezco profundamente a mis padres.

A mis hermanos, familiares y amigos les agradezco por apoyarme siempre, por no permitirme que me rinda en el largo caminar de mi vida y sobre todo por la confianza inspirada para con mis sueños.

Al personal del Centro de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica Particular de Loja por la colaboración brindada en el desarrollo de este trabajo y por los consejos brindados.

A mi Director de Tesis Ing. Víctor Sanmartín, por su predisposición y sus sugerencias durante la elaboración de este proyecto.

Finalmente agradezco a mis amigos y compañeros que siempre estuvieron pendientes de mi trabajo y a todas aquellas personas que de una u otra manera hicieron posible la realización de este trabajo.

El Autor.

DEDICATORIA

Con inmensa gratitud y sobre todo cariño dedico este trabajo a Dios, mis padres, hermanos y abuelos, quienes con esfuerzo y comprensión supieron guiarme durante todos mis años de estudio y por ser mis principales ejemplos de constancia, dedicación, amor y sencillez.

	pág.
CESIÓN DE DERECHOS	1
CERTIFICACIÓN	2
AUTORÍA	3
AGRADECIMIENTO	4
DEDICATORIA	5
ÍNDICE	6
RESUMEN	9
I INTRODUCCIÓN	11
1.1 Fin del proyecto	11
1.2 Propósito del proyecto	12
1.3 Componentes del proyecto	12
1.4 Hipótesis del trabajo	12
II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Descripción de la cuenca hidrográfica.	14
<i>2.1.1 Algunos casos de contaminación del Río Siete</i>	15
2.2 Biorremediación	16
2.3 Metales pesados	18
2.4 Características de las bacterias sulfato reductoras	21

III MATERIALES Y MÉTODOS.	25
3.1 Etapa preliminar.	25
3.2 Microorganismos y medios de cultivo.	25
3.3 Producción de H ₂ S.	26
3.4 Precipitación de metales de los efluentes.	27
3.5 Determinación de metales pesados.	27
3.6 Determinación de sulfatos.	27
3.7 Conteo bacteriano.	28
3.8 Diseño experimental y variables de estudio	29
3.8.1 Producción óptima de ácido sulfhídrico	29
3.7 Análisis Estadístico.	32
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1 Análisis Estadístico	34
4.2 Discusión de Resultados	34
4.2.1 Análisis Físico-Químicos	34
4.2.2 Análisis Químicos	36
4.2.3 Reducción de Sulfatos	37
4.2.4 Precipitación de Metales pesados.	41
4.2.4.1 Precipitación de metales en la muestra Minera El Oro	41
4.2.4.2 Precipitación de metales en la muestra Río Guanache	44
4.2.4.3 Precipitación de metales en la muestra Río Siete	46
V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
5.1 Conclusiones.	49
5.2 Recomendaciones.	50

VI BIBLIOGRAFÍA

52

VII ANEXOS

57

RESUMEN

Se evaluó la producción de sulfuro de hidrógeno de un consorcio de bacterias sulfato-reductoras aisladas del distrito minero de Bella Rica con tres concentraciones de sulfatos (10, 20, 30 ppm) y de ácido láctico como fuente de carbono (70, 50, 20 ppm). La mejor producción de sulfuro de hidrógeno se dio con las concentraciones de fuente de carbono de 70 ppm y de 30 ppm de sulfatos como aceptor de electrones, obteniendo una reducción de sulfatos de 30 a 11,13 ppm en 12 horas.

Con la mejor producción de sulfuro de hidrógeno se procedió a la precipitación de los metales presentes en las muestras de los efluentes, obteniendo una precipitación de arsénico de 0,06 ppm a 0 ppm en un tiempo de 18 días, para el cobre se precipitó de 0,02 ppm a 0 ppm en un tiempo de 3 días, mientras que el hierro se precipitó de 1,9 ppm a 0 ppm en 18 días, esto para la muestra de la Minera El Oro. Para la muestra del Río Guanache se obtuvo una precipitación de arsénico de 0,07 ppm a 0 ppm en 21 días, para el cobre se obtuvo una precipitación de 0,01 ppm a 0 ppm en 3 días y para el hierro una precipitación de 1,03 ppm a 0 ppm en un tiempo de 18 días. En el caso de la muestra del Río Siete se obtuvo una precipitación de arsénico de 0,06 ppm a 0 ppm en 18 días mientras que el hierro se precipitó de 1,3 a 0 en un tiempo de 15 días.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La permanente actividad minero-artesanal, produce desechos que se vierten en la cuenca hidrográfica, estos desechos mineros causan gran contaminación ya que frecuentemente se encuentran presentes metales pesados como hierro, cobre, plomo y arsénico, los mismos que causan graves daños debido a su poca o nula degradación y por consiguiente, aumentan el riesgo para la salud humana y el medio ambiente mediante efectos tóxicos sobre plantas, animales y personas. Así estos metales pesados pueden causar daños a los organismos vivos incluso en concentraciones muy pequeñas y frecuentemente inhiben los procesos biológicos durante largos periodos de tiempo. Frente a la problemática de acuíferos contaminados se ha estudiado la acción de bacterias sulfato reductoras, las cuales producen ácido sulfhídrico como producto de su metabolismo. Este ácido al ser liberado a un medio con presencia de metales pesados, reacciona para formar compuestos sulfurados estables de baja solubilidad y biodisponibilidad [33].

1.1. FIN DEL PROYECTO

Contribuir al conocimiento científico para mitigar los efectos de ambientes contaminados por la presencia de metales pesados, usando un consorcio de bacterias sulfato-reductoras aisladas del lugar.

1.2. PROPÓSITO DEL PROYECTO

Evaluar la capacidad de las bacterias sulfato-reductoras aisladas del distrito minero de Bella Rica, para precipitar metales pesados presentes en una muestra de las cuencas hidrográficas del Río Guanache, Río Siete y de una planta de beneficio minero ubicada en la parte alta de este sector.

1.3. COMPONENTES DEL PROYECTO

- Realizar los análisis físico-químicos.
- Determinar las concentraciones óptimas de sulfato y de la fuente de carbono para mejorar la producción de H₂S.
- Determinar el porcentaje de reducción de sulfatos.
- Realizar la precipitación de metales pesados.

1.4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

H1. Las concentraciones de fuente de carbono y sulfato inciden en la producción de ácido sulfhídrico.

H2. La cantidad de ácido sulfhídrico producida por el consorcio de bacterias sulfato reductoras es suficiente para la precipitación de metales pesados de un efluente real.

CAPÍTULO II:
REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 DESCRIPCIÓN DE LA CUENCA HIDROGRÁFICA.

El río 7 nace en la zona de Bella-Rica ubicada en la parte occidental de la provincia del Azuay, y atraviesa la franja baja sirviendo de límite a la Provincia de El Oro y la Provincia del Guayas, regando extensas zonas agrícolas a su paso, para finalmente depositarse en el Océano Pacífico a la altura del Golfo de Guayaquil, es muy conocido su estado de contaminación causada por la descarga de las plantas de beneficio minero que se encuentran asentadas en su ribera en la parte alta de su cuenca.

En la Provincia El Oro, la actividad minera utiliza básicamente dos sistemas de recuperación de oro; el que utiliza la amalgamación con Hg (minería artesanal), y las denominadas plantas de beneficio que utilizan la lixiviación, donde el reactivo principal es el Cianuro de Sodio, produciendo desechos que se vierten en la cuenca hidrográfica, los cuales causan un alto grado de contaminación ya que frecuentemente se encuentran metales pesados como: hierro, cobre, plomo, arsénico, mercurio, entre otros que causan graves daños debido a su poca o nula degradación aun en concentraciones muy pequeñas y por consiguiente aumentan el riesgo para la salud humana y el medio ecológico, a través de, efectos tóxicos sobre plantas, animales y personas [33].

2.1.1 Algunos casos de contaminación del Río Siete:



Fuente: Universidad Técnica de Machala, Centro de Transferencia y Desarrollo de Tecnologías.



Fuente: Universidad Técnica de Machala Centro de Transferencia y Desarrollo de Tecnologías.

Descarga de efluentes en el Río Siete

2.2 BIORREMEDIACIÓN

En las últimas décadas, la liberación de contaminantes al ambiente, producida principalmente como consecuencia del desarrollo industrial, ha superado con creces los mecanismos naturales de reciclaje y autodepuración de los ecosistemas receptores. Este hecho ha conducido a una evidente acumulación de contaminantes en los distintos ecosistemas hasta niveles preocupantes. Por ello, para reducir en todo lo posible la liberación de contaminantes, hoy en día existe la necesidad de indagar en la búsqueda de procesos que aceleren la degradación de los contaminantes presentes en el ambiente. Así, se reducirían de forma progresiva los efectos dañinos que producen sobre los ecosistemas y la salud humana.

En este contexto, la biorremediación, proceso que utiliza las habilidades catalíticas de los organismos vivos para degradar y transformar contaminantes tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, presenta un enorme potencial en la mitigación de la contaminación ambiental. La biorremediación se ha centrado en la explotación de la diversidad genética y versatilidad metabólica que caracteriza a las bacterias para transformar contaminantes en productos inocuos o, en su defecto, menos tóxicos, no obstante, existen casos aislados de utilización de otros tipos de organismos como, por ejemplo, los hongos y, más recientemente, las plantas en la llamada "fitorremediación" [1,2,3].

El término biorremediación fue acuñado a principios de la década de los '80, se trata fundamentalmente de la aplicación de estrategias de remediación biológicas, basadas en la capacidad de los microorganismos de interaccionar en forma directa con contaminantes. Los microorganismos pueden degradar los desechos en productos menos tóxicos, concentrar e inmovilizar sustancias tóxicas tales como metales pesados; minimizar desechos industriales y rehabilitar áreas afectadas con

diversos contaminantes. De este modo la biorremediación permite mejorar los ecosistemas dañados, acelerando algunos procesos naturales [4].

El tratamiento biológico de residuos tiene algunas ventajas, cuando es comparado con técnicas tradicionales utilizadas con este fin, entre dichas ventajas se encuentran [5, 6]:

- Bajo costo del tratamiento.
- Tratamiento *in situ*, no hay gastos de transporte.
- Reducción y eliminación de subproductos finales.
- Eliminación de un costoso equipamiento y atención frecuente del operador.
- Eliminación de un seguimiento a perpetuidad.

La aplicación de la biorremediación para solucionar los graves problemas de deterioro ambiental se ha incrementado notablemente en los últimos años; no obstante, el terreno más importante de aplicación ha sido el del tratamiento de contaminantes de tipo orgánico, en particular, de hidrocarburos [5].

A diferencia de lo que puede ocurrir con compuestos orgánicos contaminantes, los metales pesados no pueden ser degradados. Las posibilidades para el tratamiento de contaminaciones producidas por ellos se reducen a inmovilizarlos (si se encuentran en una fase líquida o gaseosa) o movilizarlos (para extraerlos desde matrices sólidas) de forma tal de reducir su toxicidad [7, 8, 9, 10].

El grado de peligrosidad de los metales pesados va ligado a dos propiedades principales: su toxicidad y su persistencia lo que provoca un fuerte impacto sobre el medio ambiente, produciendo un efecto a largo plazo sobre los eslabones más expuestos de la cadena alimentaria, incluido el hombre.

2.3 METALES PESADOS

Se considera metal pesado a aquel elemento que tiene una densidad igual o superior a 5 g/cm³ cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% y casi siempre menor al 0,01%. Junto a estos metales pesados hay otros elementos químicos que, aunque son metales ligeros o no metales, se suelen englobar con ellos por presentar orígenes y comportamientos asociados; este es el caso del arsénico, boro, bario y selenio [11, 12, 13, 14].

Lo que hace tóxicos a los metales pesados no son en general sus características esenciales, sino las concentraciones en las que pueden presentarse, y casi más importante aún, el tipo de especie que forman en un determinado medio. Cabe recordar que de hecho los seres vivos “necesitan” (en pequeñas concentraciones) a muchos de éstos elementos para funcionar adecuadamente. Ejemplos de metales requeridos por el organismo incluyen el cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, vanadio, estroncio, y zinc. El caso del hierro es notable entre éstos, siendo vital para la formación de hemoglobina [30].

Dentro de los metales pesados hay dos grupos:

Oligoelementos o micronutrientes, que son los requeridos en pequeñas cantidades, o cantidades traza, por plantas y animales, y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. Estos mismos elementos por encima de cierto umbral se vuelven tóxicos. Dentro de este grupo están: arsénico, boro, cobalto, cromo, cobre, molibdeno, manganeso, níquel, selenio y zinc.

Metales pesados sin función biológica conocida, cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos lleva aparejadas disfunciones en el funcionamiento de sus

organismos. Resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos. Son principalmente: cadmio, mercurio, plomo, cobre, níquel, antimonio y bismuto.

La actividad humana incrementa el contenido de metales en el suelo en cantidades considerables, siendo esta, sin duda, la causa más frecuente de las concentraciones tóxicas. Esto sucede debido a los vertidos de origen antropogénico, procedentes de vertidos industriales, de actividades mineras y de la aplicación de plaguicidas [15, 16, 17, 18, 5, 6, 9].

Dependiendo de la fase en la que se encuentra el metal, de su estado de oxidación y de la especie que esté conformando, la acción de un microorganismo puede responder a una de las siguientes alternativas:

La primera correspondería a la movilización del metal, denominada *lixiviación*, la que puede ser definida como un proceso de disolución de un compuesto contenido en una matriz sólida por acción de microorganismos. El término *lixiviación bacteriana* se reserva para el caso de que los microorganismos sean bacterias. Existen distintos mecanismos de lixiviación [19], entre los cuales se destacan:

- Producción de ácidos orgánicos (cítrico, oxálico) o inorgánicos (sulfúrico).
- Óxido-reducción de los metales.
- Metilación de metales.
- Producción de sideróforos.

La segunda alternativa aplicable al tratamiento de metales presentes principalmente en efluentes líquidos, corresponde a la *inmovilización del metal*, es decir, al pasaje de un estado soluble inicial, a uno insoluble final [6].

La inmovilización con bacterias es una alternativa a los métodos fisicoquímicos tradicionales [18]. Entre ellos, el más relevante para la eliminación de metales pesados que se encuentran en solución, es la alcalinización del efluente (comúnmente con carbonato o soda cáustica). El aumento de pH provoca la precipitación de los metales pesados como hidróxidos.

Estos últimos suelen ser precipitados coloidales, por lo que ocupan grandes volúmenes y, además, coprecipitan con otros elementos. La generación de grandes volúmenes de hidróxidos es claramente un inconveniente en este proceso. Otras limitaciones de este método son el tratamiento de efluentes diluidos, la presencia de elementos anfóteros o complejantes en la solución, la necesidad de trabajar con pH muy altos y la baja selectividad [17].

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y tolerantes a metales. La habilidad de los microorganismos para sobrevivir a un ambiente con metales pesados, implica mecanismos que potencialmente podrían ser utilizados para el tratamiento de las contaminaciones con esos metales, a través de procesos de inmovilización [20].

Probablemente los dos procesos biológicos más relevantes en la inmovilización de metales son la biosorción y la bioprecipitación [6]. Para que estos procesos biológicos puedan ser utilizados a escala industrial, es conveniente que los microorganismos sean previamente inmovilizados sobre un soporte inerte de modo que no sean eliminados junto con los efluentes o con los precipitados [8].

El fenómeno de biosorción consiste en un incremento de la concentración de los metales sobre la superficie o en el interior de la célula a través de variados mecanismos; de los cuales, sin dudas, el más importante es el mecanismo de intercambio iónico, donde el microorganismo actúa de modo semejante a una resina

de intercambio iónico [4, 6, 20, 21]. La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el cadmio, cromo, plomo, níquel, zinc y cobre.

En la bioprecipitación se utilizan microorganismos capaces de generar metabolitos que precipitan con muchos de los metales pesados [22]. Un grupo importante de estos microorganismos son las bacterias denominadas sulfato-reductoras (SRB) [23, 17, 18]. Estas son bacterias anaeróbicas (crecen en ambientes reductores y en ausencia de oxígeno) que son capaces de formar sulfuros a partir de la reducción de sulfatos. Los sulfuros pueden precipitar con metales presentes en el medio y, de ese modo, pueden ser separados del medio líquido.

2.4 CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS

La producción biológica de sulfuro de hidrógeno en ambientes acuáticos se conoce desde el siglo pasado. Las bacterias sulfato reductoras (SRB) forman un grupo especializado de procariotas que tienen la capacidad de usar sulfato como aceptor final de electrones en la respiración [24].

Características relevantes de estas bacterias:

Fisiológicamente se pueden dividir en tres grupos celulares básicos:

- Eubacterias gram negativas
- Eubacterias gram positivas
- Arqueo bacterias

Las características morfológicas de estas células varían considerablemente. Se han descrito distintos tipos celulares, entre los que se encuentran: bacilos, vibrios, cocos, espirilos, etc. [26].

Las capacidades oxidativas y metabólicas de las SRB varían de acuerdo al género. Actualmente se han reconocido 18 géneros, subdivididos en dos grandes grupos según si oxidan o no el acetato como fuente de carbono y energía:

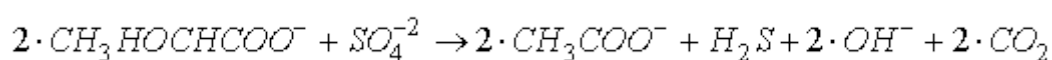
➤ Géneros *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfomaculum*, *Desulfobulbus*:
Utilizan fundamentalmente lactato, piruvato y etanol como fuente de energía y de carbono, reduciendo el sulfato a sulfuro de hidrógeno.

Géneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* y *Desulfonema*:
Están particularmente especializados en la oxidación de acetato, reduciendo el sulfato a sulfuro.

➤ Géneros *reductoras de azufre*:

- ✓ *Desulfuromonas*: Bacilos gram-negativos, no reducen los sulfatos anaeróbicos obligados; tres especies.
- ✓ *Campylobacter*: Bacilos gram-negativos, aerobios facultativos.

Entre las primeras propiedades se observó que este tipo de bacterias tenía la capacidad de reducir sulfato en forma no asimilatoria, con consumo de orgánicos del tipo lactato; con la estequiometría [25, 31]:



Es decir, la reducción biológica de un mol de sulfato (SO₄) requiere de dos moles de lactato y produce dos moles de acetato y un mol de sulfuro de hidrógeno (H₂S, también conocido como ácido sulfhídrico). La utilización de esta ruta bioquímica conduce a procesos que son técnicamente factibles pero extraordinariamente costosos [31].

Estas bacterias proporcionan un mecanismo que puede resultar útil en un número importante de aplicaciones industriales, por ejemplo, *Desulfovibrio desulfuricans* cataliza la reducción del sulfato por el hidrógeno de acuerdo con la reacción [32]:



La reacción es significativamente cuantitativa. Se ha calculado que en el fondo del Gran Lago Salado las bacterias liberan azufre en forma de H₂S en una cantidad que equivale a las 104 Ton/año [32].

Entre los compuestos orgánicos más utilizados como fuente de carbono se encuentran: lactato, acetato, piruvato, etanol, propanol y glucosa [27]. Los medios más utilizados para el crecimiento de SRB son los diseñados por J.R. Postgate (denominados medios B y C de Postgate) que poseen lactato como fuente de carbono.

Las bacterias sulfato-reductoras son estrictamente anaerobias y por lo general, son muy sensibles a los medios tóxicos, muriendo de forma más o menos rápida cuando son expuestas a ese tipo de medios [28].

Las SRB requieren ausencia de oxígeno para su crecimiento y también un potencial redox bajo (de aproximadamente 0 a -100 mV) [27].

Las SRB crecen mejor bajo condiciones levemente alcalinas, en un relativamente estrecho rango de pH (entre 7,0 y 7,8). Sin embargo, se han encontrado SRB con capacidad de tolerar ambientes levemente ácidos (pH 4,0) así como también especies con capacidad de desarrollarse en ambientes alcalinos (pH 9,5).

Un factor muy importante en la actividad de las bacterias sulfato reductoras es la temperatura del sistema. La mayoría de las SRB son mesófilas, es decir, con un crecimiento óptimo en el rango de temperatura de 25 a 40 °C [29].

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Etapa preliminar.

Para el desarrollo de este trabajo fue necesaria la implementación de una etapa preliminar, la cual sirvió de entrenamiento en el manejo de las bacterias sulfato – reductoras; este entrenamiento consistió en la preparación de los medios de cultivo con su debida anaerobiosis, el repique de las bacterias y la familiarización con las técnicas analíticas a utilizar.

3.2 Microorganismos y medios de cultivo.

Para las experiencias realizadas se trabajó con una cepa de bacterias sulfato - reductoras, las cuales fueron aisladas del distrito minero de “Bella Rica”.

Estas bacterias fueron mantenidas en viales de 10 ml con medio lactato B (ver tabla 3.1) a 30 °C.

Tabla 3.1: Composición del medio lactato B

Compuesto	Cantidad
Solución al 50 % de lactato de sodio	5,5 ml
CaSO ₄	1,0 gr
NH ₄ Cl	1,0 gr
KH ₂ PO ₄	0,5 gr
MgSO ₄ *7H ₂ O	2,0 gr
Extracto de levadura	1,0 gr

-Estos pesos están en función a un litro.

Tabla 3.2: Composición de la solución reductora

Compuesto	Cantidad
Ácido ascórbico	0,1 gr
Tioglicolato de sodio	0,1 gr
Agua destilada	10 ml

El cultivo se lo realiza de la siguiente manera:

Primero se fija la cantidad de medio B que se va a preparar, luego de autoclavar el medio a 120 °C y 25 psi durante 60 minutos se le añade mediante filtración de membrana 10 ml (en base a 1 litro de medio) de la solución reductora (ver tabla 3.2), se procede a controlar el pH el mismo que debe estar entre 7 y 7.5, luego de esto se añade mediante filtración de membrana 10 ml (en base a 1 litro de medio) de una solución al 5% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ disuelto en 0.1 M de H_2SO_4 para prevenir su auto oxidación. En seguida se coloca en los viales de 10 ml, 9 ml de medio B y 1 ml de bacteria, se los sella con el tapón de goma y la virola metálica, posteriormente se lo incubaba a 30° C.

3.3 Producción de H_2S .

Para las experiencias de producción de H_2S se tomó un cultivo en medio B, se lo filtró en papel filtro, luego 1 ml del filtrado se colocó en un vial de 10 ml el mismo que contenía 9 ml de medio C. Este medio contiene 0,06 gr de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,3 gr de Citrato de sodio, 1 gr de NH_4Cl , 0,5 gr de KH_2PO_4 y 1 gr de extracto de levadura (estos pesos están basados para 1 litro de medio), estos viales fueron incubados a 30° C.

En esta experiencia se trabajó con tres variaciones en las concentraciones de sulfatos (30 ppm, 20 ppm y 10 ppm de Na_2SO_4) como receptor de electrones y tres variaciones

en la fuente de carbono (70 ppm, 50 ppm y 20 ppm de ácido láctico), determinando así las concentraciones adecuadas para una mejor producción de H₂S.

3.4 Precipitación de metales de los efluentes.

Para esta experiencia se trabajó en viales de 50 ml en los cuales se coloca 44 ml de medio Lactato C modificado, esto es con la concentración de sulfato y de ácido láctico que dio una mejor producción de H₂S, luego se agrega 1 ml de efluente y 5 ml de inóculo, se sella en total anoxia previo burbujeo de nitrógeno y posteriormente se somete a diferentes tiempos de contacto.

3.5 Determinación de metales pesados.

Después de cada tiempo de contacto la solución se filtra y se le realiza los análisis de metales pesados (As, Cu y Fe) mediante espectrofotometría de absorción atómica, dichos análisis se realizaron en el laboratorio CETTIA de la UTPL en un equipo de absorción atómica marca Perkin Elmer AAnalyst 400 acoplado a un generador de hidruros marca Perkin Elmer MHS 15 mercury Hydride System.

Los resultados obtenidos para el caso del arsénico y cobre son comparados con la norma INEN 2178 "Aguas minerales, naturales requisitos" en la que los límites máximos permisibles son 0.01 ppm y 1 ppm respectivamente, mientras que para el caso del hierro se comparó con la Norma de Calidad Ambiental y De Descarga De Efluentes: Recurso Agua, cuyo límite máximo permisible es 10 ppm.

3.6 Determinación de sulfatos.

Se utilizó un método turbidimétrico que se basa en la reacción del ión sulfato con el bario en medio ácido, para formar sulfato de bario sólido en forma de cristales de tamaño uniforme. La luz absorbida por la suspensión es medida en un espectrofotómetro y la concentración de sulfato es determinada por comparación de la lectura con respecto a una curva estándar.

Para la determinación de sulfato se colocó 0,5 ml de muestra en un balón de aforo de 25 ml, se lo afora, se pasa el contenido a un frasco de 50 ml, se adiciona 1 ml de buffer (ver tabla 3.3), luego se agregó una pizca de BaCl₂, se agitó vigorosamente durante 2 minutos (de forma manual) y se midió en una celda de 1 centímetro de camino óptico contra el blanco (agua destilada). La lectura se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro, se repite el mismo procedimiento para las muestras y los controles.

Tabla 3.3: Composición del Buffer para sulfatos

Compuesto	Cantidad
Agua destilada	45 ml
HCl concentrado	4,5 ml
Etanol de 96 grados	15 ml
Glicerina	7,5 ml
NaCl	11,25 gr

3.7 Conteo bacteriano.

La forma más obvia de determinar el número de células es por recuento directo. Para esto se utilizó una cámara de Newbauer. Esta cámara posee una rejilla dividida en 25 campos grabada en el fondo de la cámara; cada uno de los campos está subdividido en una cuadrícula de 16 cuadraditos (Figura 3.1). Una vez que se ha cargado la cámara con la muestra (un cubreobjeto hace de tope superior). Se usó el microscopio de contraste de fase para contar las bacterias de sólo 5 de los 25 campos (preferentemente se cuentan los cuadrados de los cuatro extremos y el del centro). Se puede calcular el número de microorganismos en una muestra, a partir del volumen de la cámara y las diluciones de la muestra que sean necesarias. La ecuación a utilizar para esta determinación es:

Número de bacterias/ml = Bacterias contadas en los 5 campos \times dilución \times 1,3

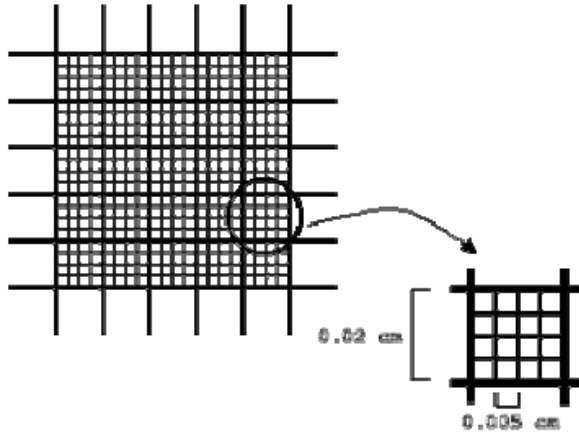


Figura 3.1: Cámara de conteo de Neubauer. Vista aumentada de la rejilla.

3.8 Diseño experimental y variables de estudio

El diseño a utilizar es el diseño factorial.

- Producción óptima de ácido sulfhídrico.
- Precipitación de metales pesados en los efluentes.

3.8.1 Producción óptima de ácido sulfhídrico

Reducción de Sulfatos

Variables independientes:

Concentración de Ácido láctico: 70, 50, 20 ppm.

Concentración de Sulfatos: 30, 20, 10 ppm.

Tiempo: 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 días

Variables dependientes:

Producción de H₂S.

Valores Constantes:

- pH.
- Medio de cultivo.
- Cantidad de inóculo.
- Temperatura.

Nomenclatura:

A = SRB

L1 = Concentración de Ácido Láctico de 70 ppm.

L 2 = Concentración de Ácido Láctico de 50 ppm.

L 3 = Concentración de Ácido Láctico de 20 ppm.

S1 = Concentración de Sulfatos de 30 ppm.

S 2 = Concentración de Sulfatos de 20 ppm.

S 3 = Concentración de Sulfatos de 10 ppm.

T = Número de mediciones.

R = Repeticiones.

Experimentos: A * L (70, 50, 20) * S (30, 20, 10) * T (7) * R (3)

Total de Experimentos = $3 * 3 * 7 * 3$

Total de Experimentos = 189

Precipitación de metales pesados.

Variables independientes:

Efluentes: Se trabaja con tres muestras (Minera El Oro, Río Guanache, Río Siete).

Tiempo: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 días.

Variables dependientes:

Precipitación de metales.

Valores Constantes:

- pH.
- Medio de cultivo.
- Concentración de inóculo.
- Temperatura.

Nomenclatura:

A = SRB

E 1 = Minera El Oro.

E 2 = Quebrada.

E 3 = Río Siete.

T = Número de mediciones.

R = Repeticiones.

Experimentos: A * E (1, 2, 3) * T (7) * R(3)

Total de Experimentos = $3 * 7 * 3$

Total de Experimentos = 63

3.9 Análisis Estadístico.

Para la realización del Análisis estadístico utilizamos el programa XLSTAT versión 7.5

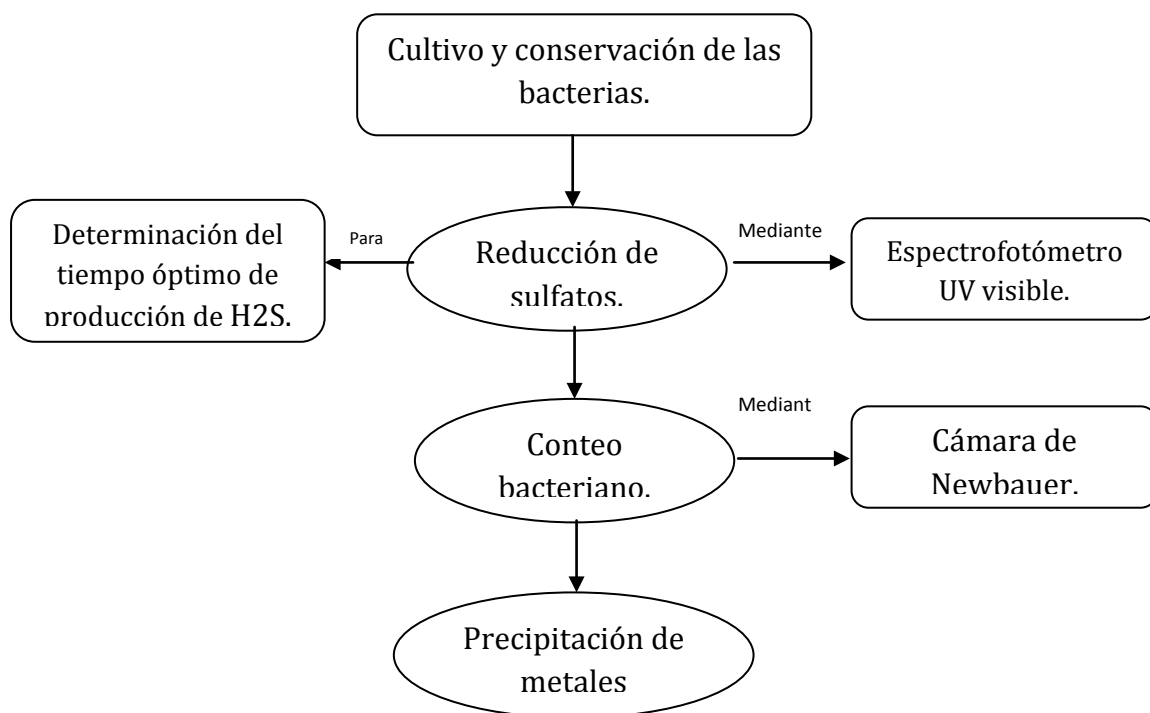


Figura 3.2: Diagrama de la Metodología.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis Estadístico

Conociendo el método para la producción de H₂S mediante la reducción de sulfatos, se sometió a las bacterias sulfato-reductoras aisladas del Distrito Minero de Bella Rica a tres concentraciones de sulfatos y ácido láctico, evaluando así los resultados mediante el programa estadístico XLSTAT versión 7.5 realizando las pruebas de Duncan y Tukey con un intervalo de confianza de 95 %.

4.2 Discusión de Resultados

4.2.1 Análisis Físico-Químicos

Las muestras se analizaron en el laboratorio CETTIA de la UTPL, obteniendo los siguientes resultados:

Para la muestra “Minera el Oro” tenemos:

Determinación	Unidad	Resultado
pH	–	7,52
Sólidos Totales Disueltos	mg/l	1157
Turbiedad	NTU	0,829
Hierro	mg/l	0,04
Sulfatos	mg/l	1725
Color	U,Co.Pt	7,94
Cianuros	mg/l	0,002
Sólidos Totales	mg/l	7226
Sólidos Suspendidos	mg/l	8

Conductividad Eléctrica	mg/l	2,23
DBO	mg/l	19,4
DQO	mg/l	48,5

Para la muestra “Río Guanache” tenemos:

Determinación	Unidad	Resultado
pH	–	7,1
Sólidos Totales Disueltos	mg/l	127
Turbiedad	NTU	17,5
Hierro	mg/l	0,94
Sulfatos	mg/l	140
Color	U,Co.Pt	69,4
Cianuros	mg/l	0,004
Sólidos Totales	mg/l	1033
Sólidos Suspendidos	mg/l	26,9
Conductividad Eléctrica	mg/l	241
DBO	mg/l	14,4
DQO	mg/l	36

Para la muestra “Río Siete” tenemos:

Determinación	Unidad	Resultado
pH	–	7,28
Sólidos Totales Disueltos	mg/l	131,2
Turbiedad	NTU	11,5
Hierro	mg/l	0,39
Sulfatos	mg/l	110
Color	U,Co.Pt	31,4
Cianuros	mg/l	0,027
Sólidos Totales	mg/l	347
Sólidos Suspendidos	mg/l	15,1
Conductividad Eléctrica	mg/l	253
DBO	mg/l	54,4
DQO	mg/l	136

4.2.2 Análisis Químicos

Las muestras se analizaron en el laboratorio CETTIA de la UTPL, obteniendo los siguientes resultados:

Para la muestra “Minera el Oro” tenemos:

Determinación	Unidad	Resultado
Arsénico	mg/l	0,08
Cobre	mg/l	0,020
Hierro	mg/l	0,665

Para la muestra “Río Guanache” tenemos:

Determinación	Unidad	Resultado
Arsénico	mg/l	0,012
Cobre	mg/l	0,010
Hierro	mg/l	0,902

Para la muestra “Río Siete” tenemos:

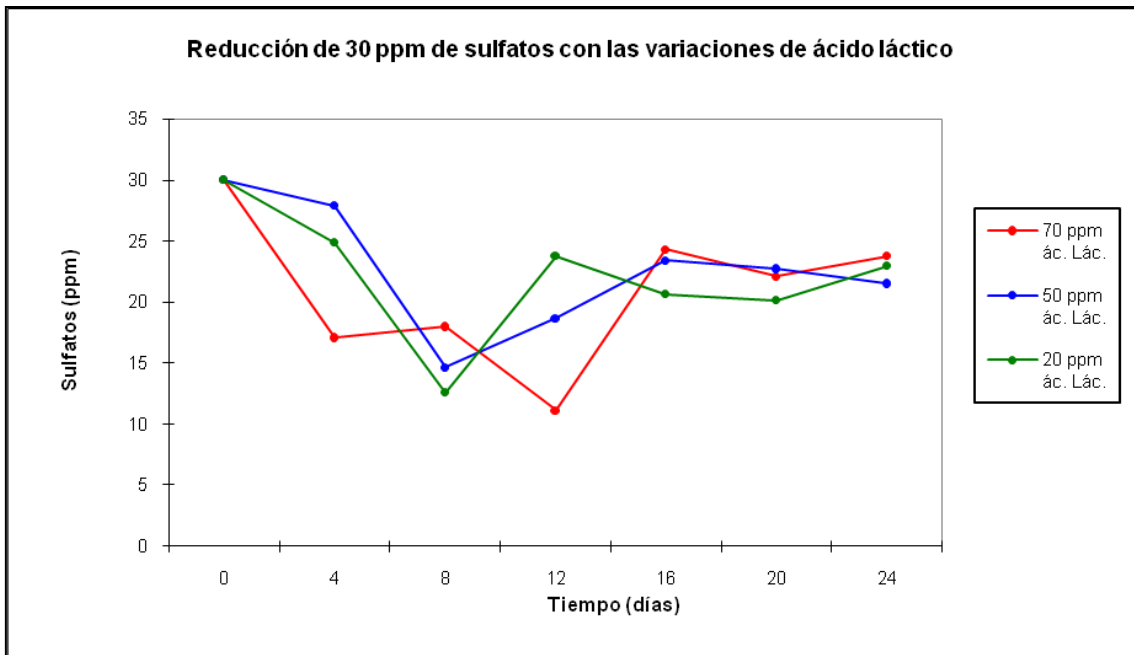
Determinación	Unidad	Resultado
Arsénico	mg/l	0,181
Cobre	mg/l	< LDD
Hierro	mg/l	0,673

- LDD = 0,4

4.2.3 Reducción de Sulfatos

Categoría	Media estimada	Grupos	
50 ppm de ác. Lác.	22,684	A	
20 ppm de ác. Lác.	22,133	A	
70 ppm de ác. Lác.	20,912		B

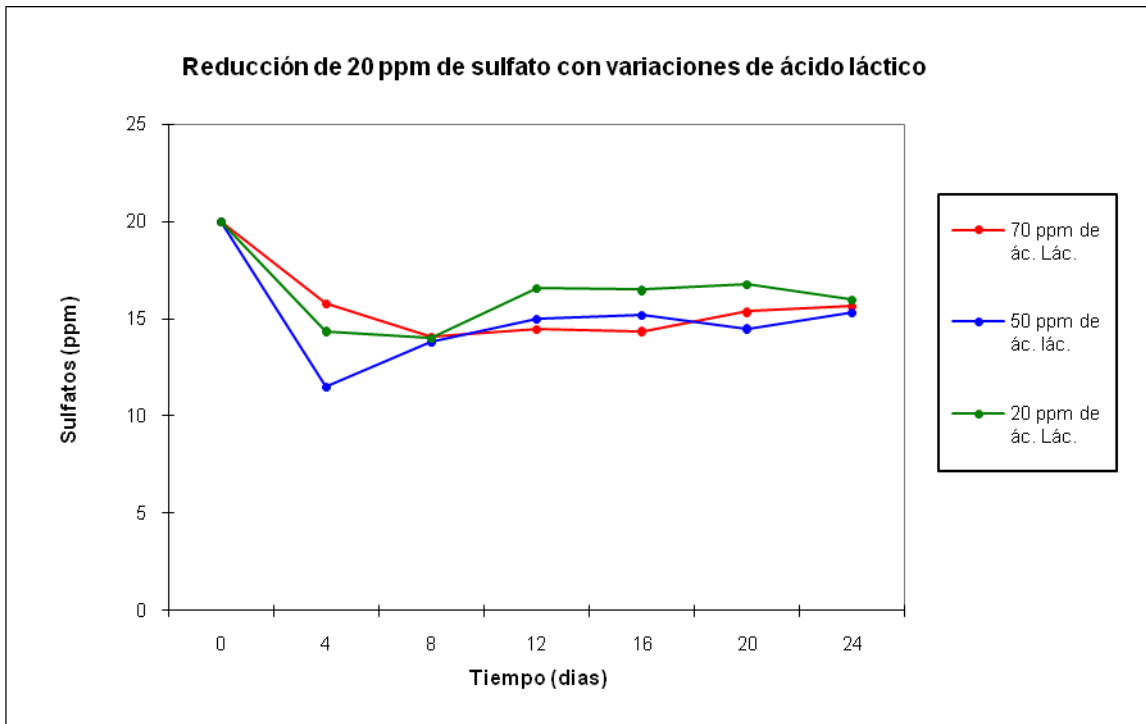
Tabla 4.1. Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95 % para 30 ppm de sulfatos.



Gráfica 1. Producción de H_2S mediante la reducción de 30 ppm de Sulfatos variando las concentraciones de ácido láctico.

Categoría	Media estimada	Grupos		
20 ppm de ác. Lác.	16,310	A		
70 ppm de ác. Lác.	15,659		B	
50 ppm de ác. Lác.	15,052			C

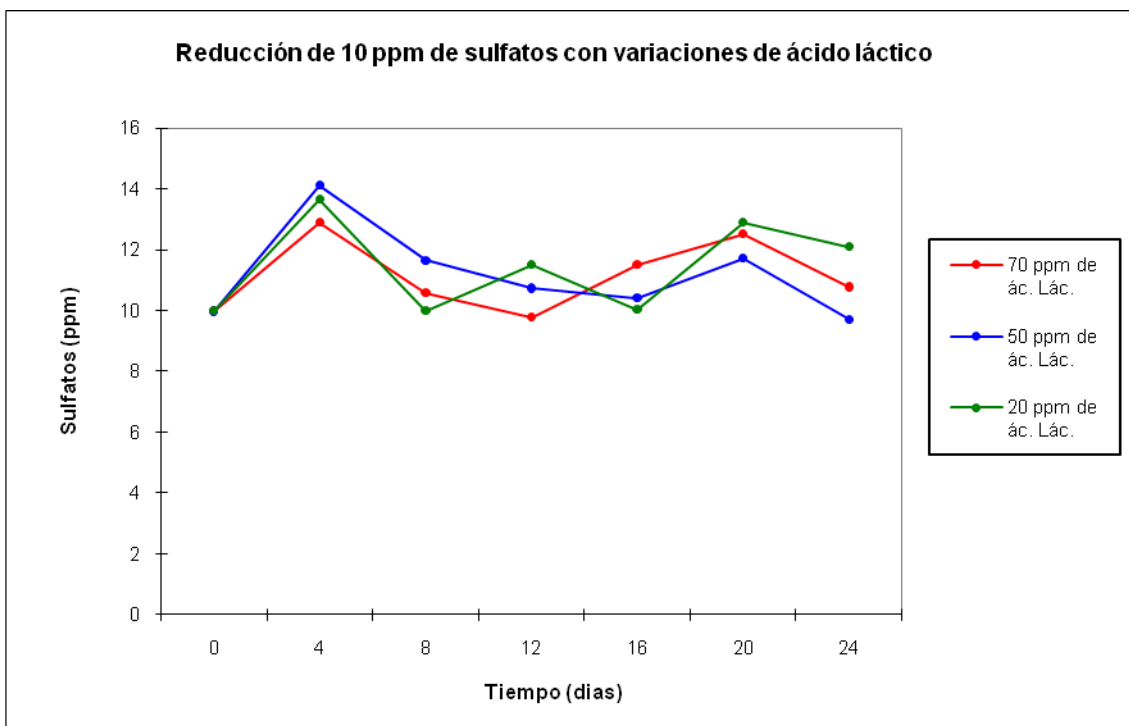
Tabla 4.2. Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95 % para 20 ppm de sulfatos.



Gráfica 2. Producción de H₂S mediante la reducción de 20 ppm de Sulfatos variando las concentraciones de ácido láctico.

Categoría	Media estimada	Grupos
20 ppm de ác. Lác.	11,458	A
50 ppm de ác. Lác.	11,198	A
70 ppm de ác. Lác.	11,150	A

Tabla 4.3. Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95 % para 10 ppm de sulfatos.



Gráfica 3. Producción de H_2S mediante la reducción de 10 ppm de Sulfatos variando las concentraciones de ácido láctico.

En la gráfica 3 se muestra la reducción de 10 ppm de sulfatos variando las tres concentraciones de ácido láctico, para este caso no se muestra una diferencia significativa en la producción de H_2S como lo muestra la tabla 4.3, esto quiere decir que las concentraciones de ácido láctico (70 ppm, 50 ppm y 20 ppm) no inciden en la producción del ácido sulfhídrico.

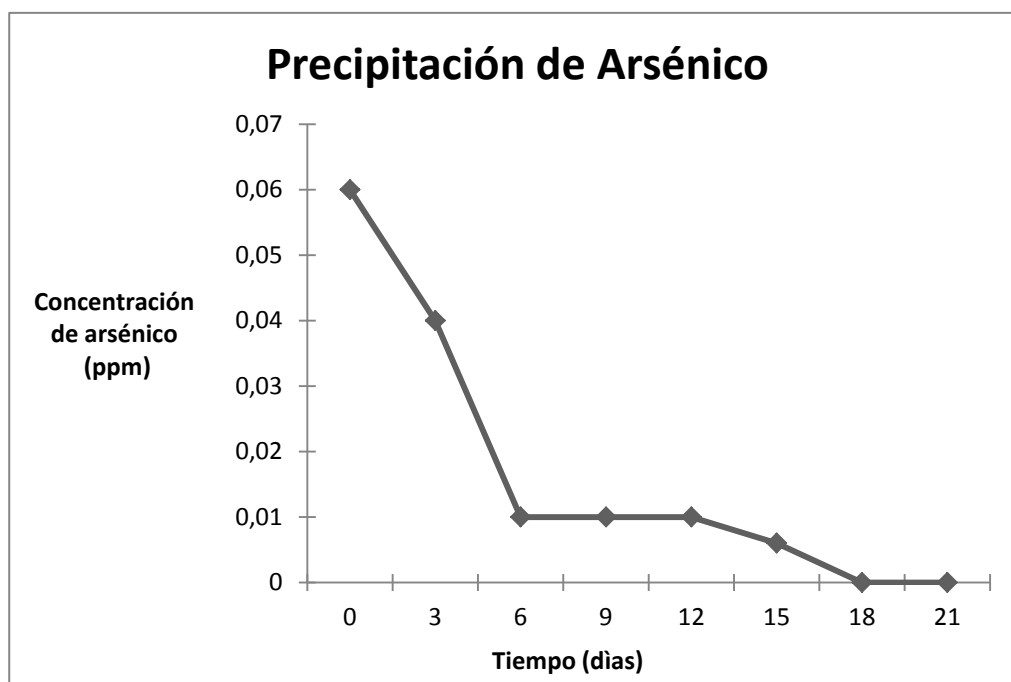
Para el caso que se muestra en la gráfica 2 que es la reducción de 20 ppm de sulfatos podemos observar que las concentraciones de ácido láctico inciden en la producción de H_2S , como se observa en la tabla 4.2 existe una diferencia significativa en la producción de ácido sulfhídrico aplicando las distintas concentraciones de ácido láctico, obteniendo una mejor producción de ácido sulfhídrico con 50 ppm de ácido láctico y un tiempo de contacto de 4 días para este caso.

En la gráfica 1 que nos muestra la reducción de 30 ppm de sulfatos se observa una marcada diferencia en la reducción de sulfatos al utilizar las tres concentraciones de ácido láctico, esto se afirma en la tabla 4.1, la cual nos muestra una diferencia significativa en la producción de ácido sulfhídrico al aplicar las distintas concentraciones de ácido láctico, obteniendo una mejor producción de ácido sulfhídrico con 70 ppm de ácido láctico. Este es el mejor resultado obtenido en este ensayo ya que se logró reducir los sulfatos de 30 ppm a 11.13 ppm en un tiempo de 12 días.

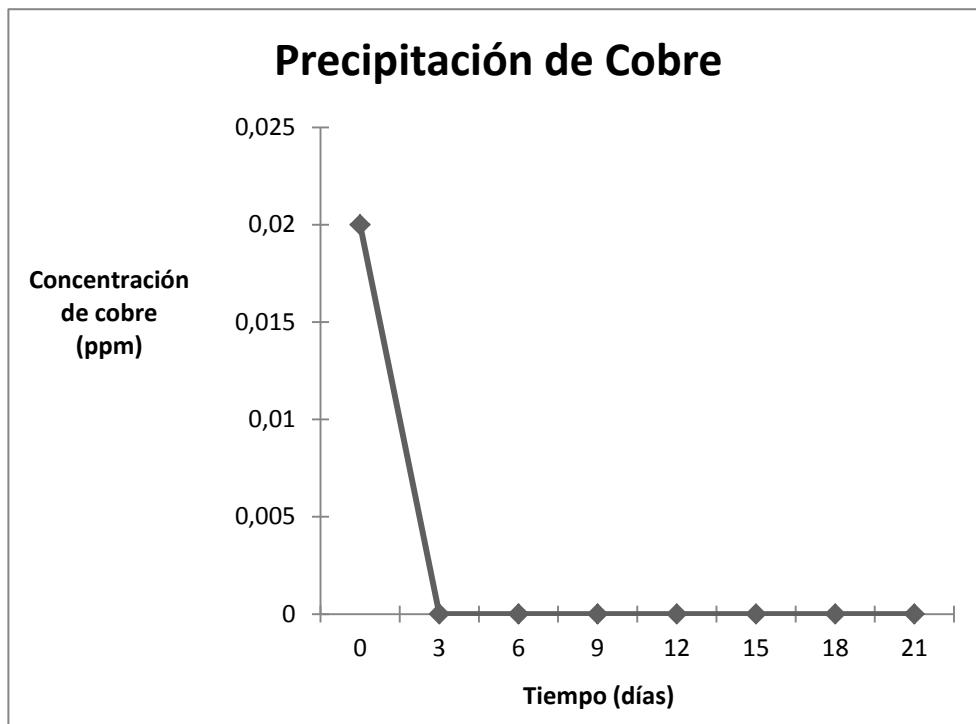
De esto se deduce como señala la bibliografía [34, 35, 37], que las concentraciones de fuente de carbono y sulfatos inciden en la producción de H₂S, esto es cuanto mayor es la reducción de sulfatos mayor es la producción de H₂S. Con esto damos respuesta a la primera hipótesis planteada.

4.2.4 Precipitación de Metales pesados.

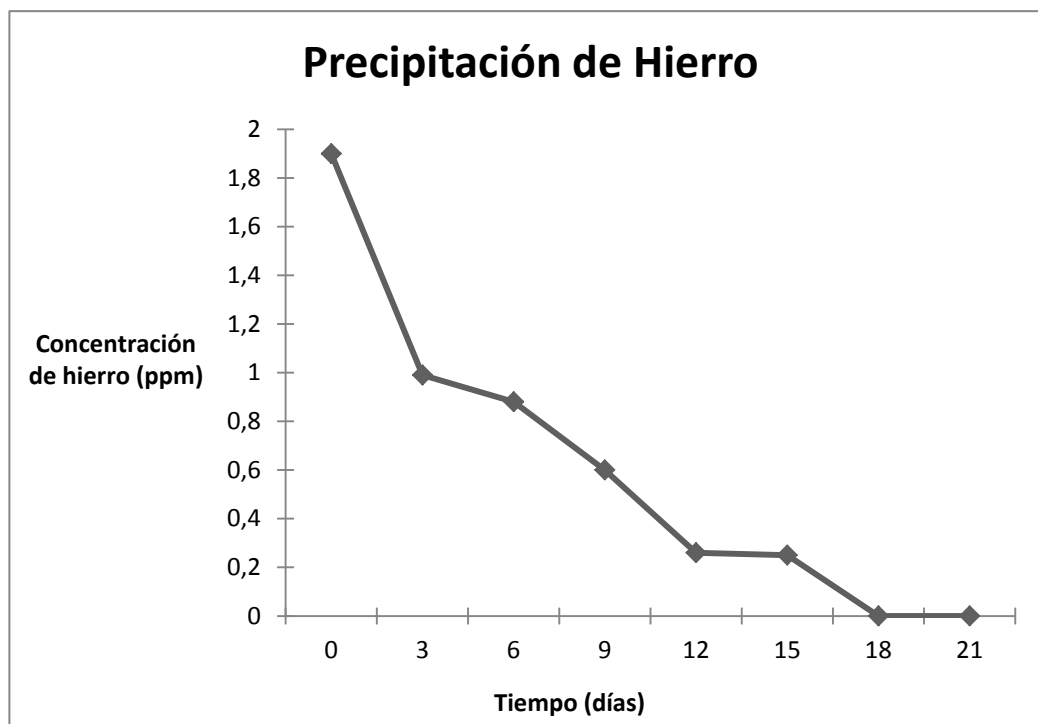
4.2.4.1 Precipitación de metales pesados presentes en la muestra Minera El Oro



Gráfica 4. Precipitación de arsénico en la muestra de la Minera El Oro.



Gráfica 5. Precipitación de cobre en la muestra de la Minera El Oro.



Gráfica 6. Precipitación de hierro en la muestra de la Minera El Oro.

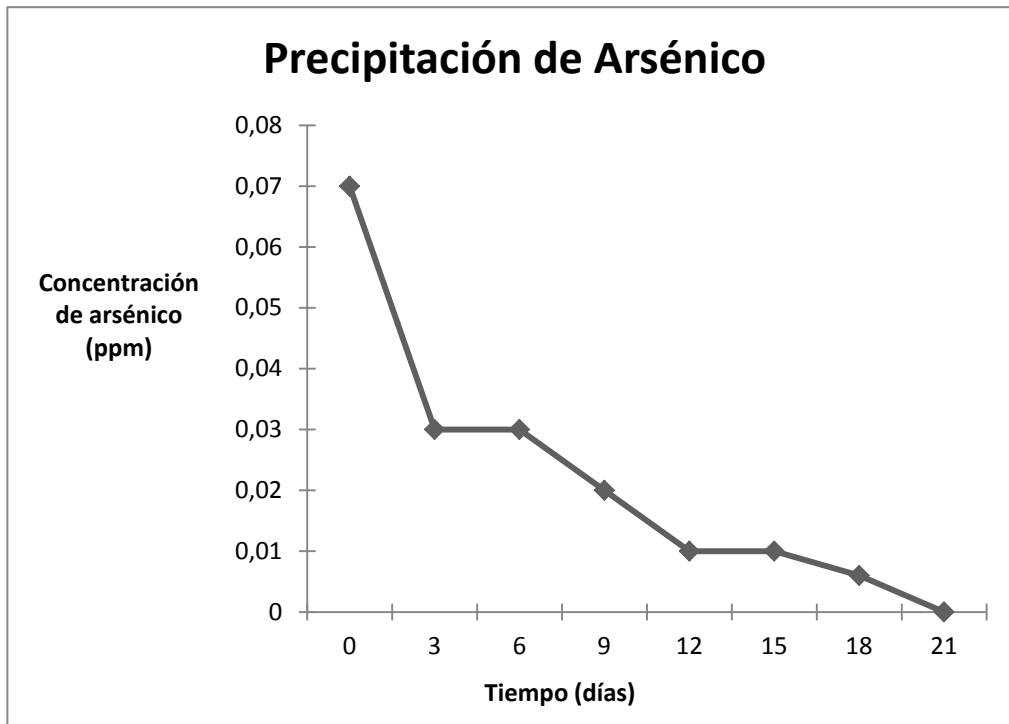
En las **gráficas 4, 5 y 6** se muestra la recuperación de los metales pesados en forma de sulfuros estables por las bacterias sulfato-reductoras aisladas del Distrito Minero De Bella Rica en la muestra de la Minera El Oro.

Para la *gráfica 4* tenemos que la precipitación de arsénico es buena en un tiempo de 6 días, pasando de 0,06 ppm a 0,01 ppm y en un tiempo de 18 días la concentración pasa a 0 ppm. Otros estudios realizados muestran que los resultados obtenidos están dentro de un rango aceptable **[36]**.

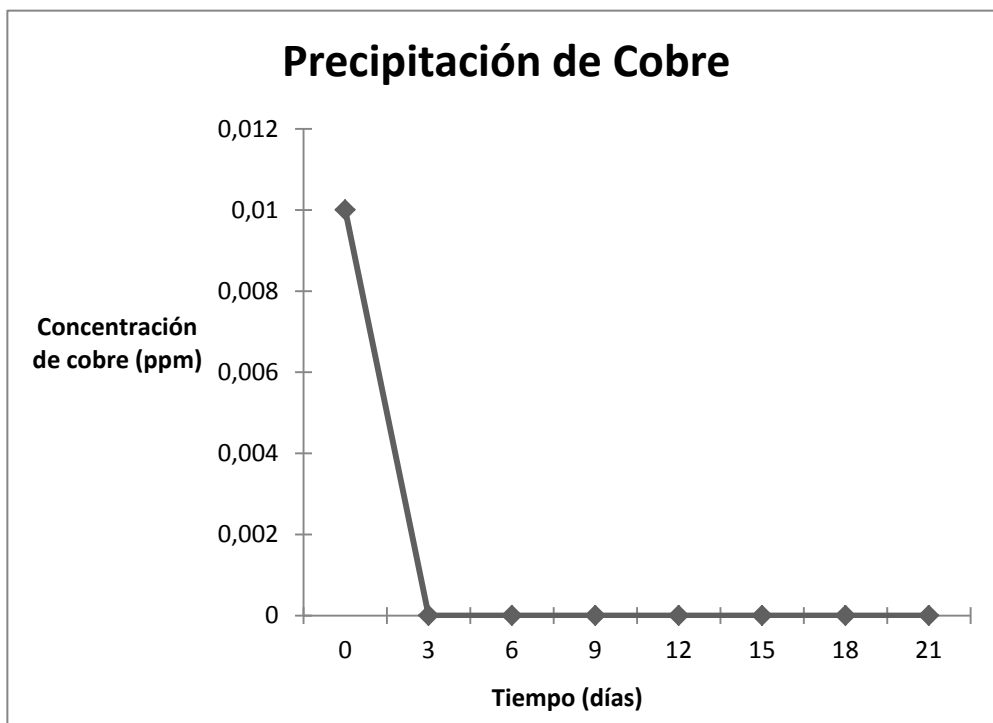
Para la *gráfica 5* tenemos que la recuperación de cobre en forma de sulfuro estable se da en un tiempo de 3 días precipitándose de 0,02 ppm a 0 ppm. De acuerdo a la literatura reportada los valores de cobre precipitado en este ensayo esta dentro del rango obtenido en otros ensayos **[34, 35]**.

Para la *gráfica 6* la precipitación de hierro se da de manera significativa en un tiempo de 12 días precipitando el hierro de 1.9 ppm a 2.6 ppm y a 0 ppm en un tiempo de 18 días. Comparando con la bibliografía se tiene que estamos dentro de los rangos de precipitación **[36]**.

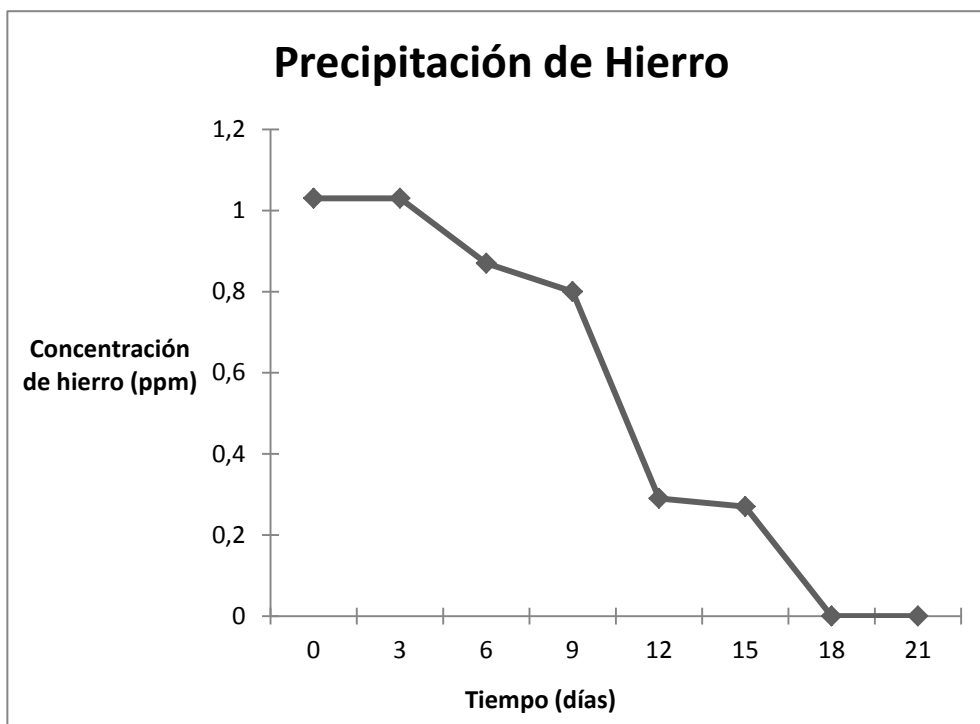
4.2.4.2 Precipitación de metales pesados presentes en la muestra Río Guanache



Gráfica 7. Precipitación de arsénico en la muestra del Río Guanache.



Gráfica 8. Precipitación de cobre en la muestra del Río Guanache.



Gráfica 9. Precipitación de hierro en la muestra del Río Guanache.

En las *gráficas 7,8 y9* se muestra la recuperación de los metales pesados en forma de sulfuros estables por las bacterias sulfato-reductoras aisladas del Distrito Minero De Bella Rica en la muestra del Río Guanache.

Para la *gráfica 7* tenemos que la precipitación de arsénico da buenos resultados en un tiempo de 3 días precipitándose de 0,07 ppm a 0,03 ppm y pasando a una concentración de 0 ppm en un tiempo de 21 días. En contraste con la bibliografía se muestra que los resultados obtenidos están dentro de los rangos aceptables [36].

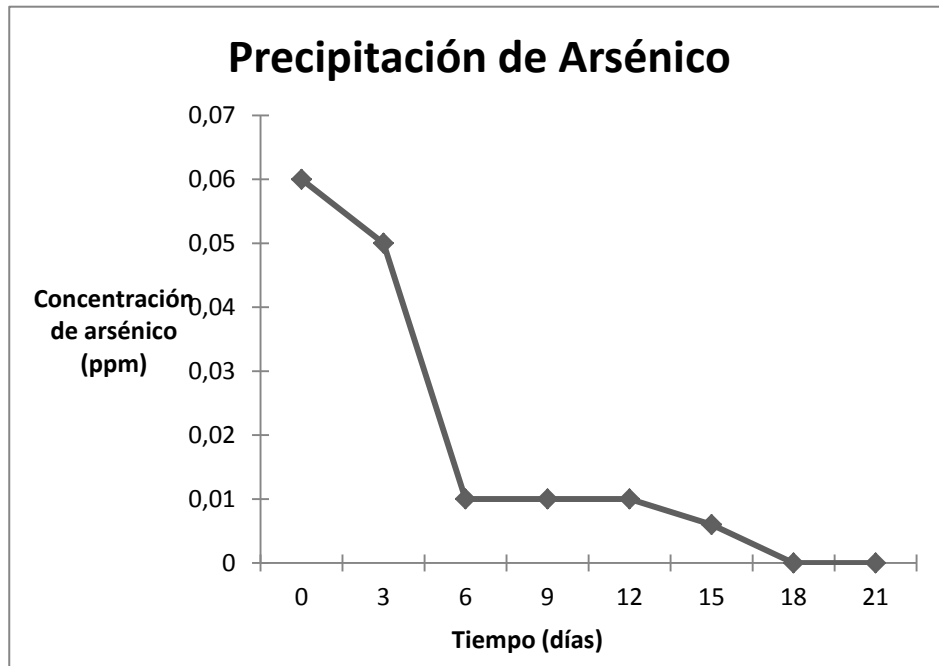
En la *gráfica 8* observamos que la recuperación de cobre en forma de sulfuro se da en un tiempo de 3 días precipitándose de 0,01 ppm a 0 ppm. De acuerdo a la literatura reportada los valores de cobre precipitado se encuentra dentro de los porcentajes reportados en otros ensayos [34, 35].

Para la *gráfica 9* tenemos que la precipitación de hierro se da de manera significativa en un tiempo de 12 días precipitándose de 1,03 ppm a 0,29 ppm y pasando a 0 ppm

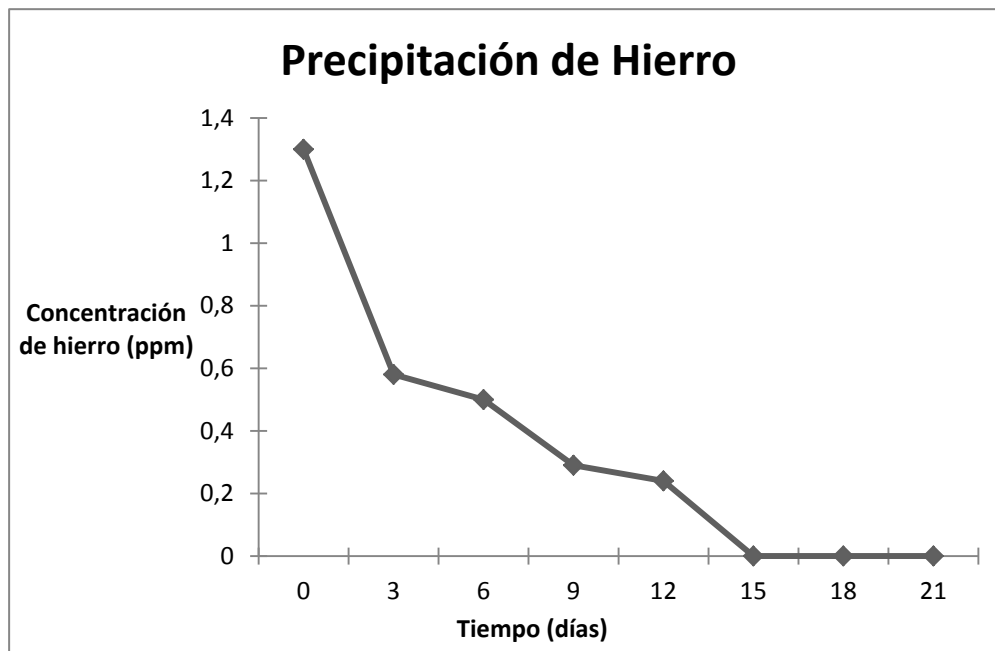
en un tiempo de 18 días. Comparando con la bibliografía se tiene que los datos obtenidos se encuentran en un rango aceptable [36].

4.2.4.3 Precipitación de metales pesados presentes en la muestra Río

Siete



Gráfica 10. Precipitación de arsénico en la muestra del Río Siete.



Gráfica 11. Precipitación de hierro en la muestra del Río Siete.

En las **gráficas 10 y 11** se muestra la recuperación de los metales pesados en forma de sulfuros estables por las bacterias sulfato-reductoras aisladas del Distrito Minero De Bella Rica en la muestra del Río Siete.

En la *gráfica 10* observamos que la precipitación de arsénico se da en un tiempo de 6 días precipitando el arsénico de 0,06 a 0,01 y pasando a una concentración de 0 ppm en un tiempo de 18 días. Comparando con la bibliografía se encontró que estos datos entran en un rango aceptable de precipitación **[36]**.

Para la *gráfica 11* tenemos que la precipitación de hierro se da de manera significativa precipitándose de 1,3 a 0,5 en un tiempo de 6 días y alcanzando una concentración de 0 ppm en 15 días. Comparando con la bibliografía se determinó que los resultados obtenidos están dentro de un rango aceptable **[36]**.

Con estos resultados se obtiene que la cantidad de ácido sulfhídrico producido por estas bacterias es suficiente para precipitar completamente el arsénico, cobre y hierro presentes en los efluentes reales. Dando respuesta así a la segunda hipótesis planteada.

**CAPÍTULO V:
CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES**

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones.

- Las condiciones adecuadas para el óptimo crecimiento de las bacterias sulfato reductoras aisladas del distrito Minero de Bella Rica es un pH de 6.9 a 7.3, una temperatura de 30 °C y con un medio específico de crecimiento (medio lactato B).
- El Medio Lactato C fue modificado con variaciones en las concentraciones de ácido láctico y sulfatos para determinar la mejor producción de H₂S medida a partir de la reducción de sulfatos, obteniendo las mejores concentraciones con 30 ppm de sulfatos y 70 ppm de ácido láctico. El mejor resultado de reducción de sulfatos se dio de 30 ppm a 11.13 ppm de sulfatos en un tiempo de 12 días.
- Para la precipitación de metales pesados en la muestra de La Minera El Oro se obtuvo una precipitación de arsénico de 0,06 ppm a 0 ppm en un tiempo de 18 días, para el cobre se obtuvo una precipitación de 0,02 ppm a 0 ppm en un tiempo de 3 días y para el caso del hierro se obtuvo una precipitación de 1.9 ppm a 0 ppm en un tiempo de 18 días.
- En la precipitación de metales de la muestra del Río Guanache se obtuvo una precipitación de arsénico de 0,07 ppm a 0 ppm en un tiempo de 21 días, para el cobre se obtuvo una precipitación de 0,01 ppm a 0 ppm en un tiempo de 3 días y para el caso del hierro se obtuvo una precipitación de 1,03 ppm a 0 ppm en un tiempo de 18 días.
- Para la precipitación de los metales en la muestra del Río Siete se obtuvo una precipitación de arsénico de 0,06 ppm a 0 ppm en un tiempo de 18 días y para el hierro la precipitación se dio de 1,3 ppm a 0 ppm en 15 días.

5.2 Recomendaciones.

- Se debe mantener las condiciones óptimas de temperatura (30 °C), pH (6,8 – 7,3) y completa anoxia.
- Se debe realizar el cultivo en viales adecuados, esto es en viales transparentes ya que facilita la identificación del precipitado y deben ser aptos para un sellado con virola metálica.
- Se debería realizar más investigaciones sobre fuentes de carbono económicas que puedan reemplazar al ácido láctico y de esta manera poder aplicar estos procedimientos a gran escala ya sea en medio sumergido o mediante burbujeo.
- En un medio sumergido no se puede manipular las concentraciones de metales como en el caso de las soluciones modelo, es por ello que se debe realizar ensayos error para determinar las concentraciones adecuadas del efluente de manera que no presente inhibición en el crecimiento bacteriano.
- Se podría aplicar este estudio específicamente en las plantas de beneficio minero, primero inmovilizando las bacterias sobre un soporte inerte de modo que no se eliminen con los efluentes o los precipitados, luego utilizando 30 ppm de sulfatos y 70 ppm de ácido láctico manteniendo en contacto con el efluente contaminado por un tiempo de 21 días con lo cual se aseguraría la precipitación de los metales pesados y por lo tanto una fácil remoción de los mismos antes de realizar la descarga de los efluentes, cumpliendo de esta manera con las normas ambientales vigentes.

CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Wikipedia, 2008. **Biorremediación**. www.es.wikipedia.org/biorremediación.com
2. Holding B.V., Lenntech, 2006. **Tipos de Biorremediación**. www.biorremediacion.org/indice.php
3. Holding B.V., Lenntech, 2008. **Biorremediación- desarrollo minero**. www.biorremediacion.org/mineria
4. Whiteley C.G., Lee D.-J. (2006) **Enzyme technology and biological remediation**. *Enzyme and Microbial Technology*: 291–316.
5. Tomotada I., Masao N. (2001) **Current bioremediation practice and perspective**. *Journal of Bioscience and Bioengineering*: 1-8.
6. Veglio F., Beolchini F. (1997) **Removal of metals by biosorption: a review**. *Hydrometallurgy*: 301- 316.
7. Ledin M. (2000) **Accumulation of metals by microorganisms-processes and importance for soil systems**. *Earth-Science Reviews*: 1-31.
8. Nagpal S., Chuichulcherm S., Peeva L., Livingston A. (2000) **Microbial Sulphate Reduction in a Liquid-Solid Fluidised Bed Reactor**. *Biotechnology and Bioengineering*: 370-380.
9. Tsukamoto T. K., Killion H. A., Miller G. C. (2004) **Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations**. *Water Research*: 1405 - 1418.
10. Viera M., Donati E.R. (2004) **Microbial processes for metal recovery from waste products**. *Current Topics in Biotechnology*: 117-127.
11. Holding B.V., Lenntech, 2006. **Metales pesados**. www.lenntech.com/espanol/metalespesados.html
12. Wikipedia, 2009. **Metal pesado**. www.wikipedia.org/wiki/Metal_pesado

13. Atsdr, 2008, **Metales pesados**. www.atsdr.cdc.gov/es/Metal_pesado
14. Atsdr, 2000, **Metal Pesado-Toxicidad**. www.atsdr.cdc.gov/es/toxicidad
15. Bosecker K. (2001) **Microbial leaching in environmental clean-up programmers**. *Hydrometallurgy*: 245–248.
16. Endafologia, 2000, **Metales pesados**; www.edafologia.ugr.es/conta/tema15/introd.htm
17. Jong T., Parry D.L. (2003) **Removal of sulphate and heavy metal by sulphate reducing bacteria in short-term beach scale upflow anaerobic packed bed reactor runs**. *Water Research*: 3379-3389.
18. Moosa S., Nemati M., Harrison S.T.L. (2002) a kinetic study on anaerobic reduction of sulphate, part I: **Effects of sulphate concentration**. *Chemical Engineering Science*: 2773-2780.
19. Krebs W., Brombacher C., Bosshard P.P., Bachofen R., Brandl H. (1997) **Microbial recovery of metals from solids**. *FEMS Microbiology Reviews*: 605-617.
20. Vullo D.L. (2003). **Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente**. *Química Viva* 2. Disponible en quimicaviva@qb.fcen.uba.ar
21. Davis T. A., Volesky B., Mucci A. (2003) **A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae**. *Water Research*: 4311–4330.
22. Malik A. (2004) **Metal bioremediation through growing cells**. *Environment International*: 261-278.
23. White C., Gadd G.M. (1996) **a comparison of carbon/energy and complex nitrogen sources for bacterial sulphate-reduction: potential applications to bioprecipitation of toxic metals as sulphides**. *Journal of Industrial Microbiology*: 116-123.

24. Mudryk Z. J., Podgórska B., Ameryk A., Bolałek J. (2000) **The occurrence and activity of sulphatereducing bacteria in the bottom sediments of the Gulf of Gdańsk.** *Oceanología*: 105–117.
25. Postgate J. R. (1954) **Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria.** *Bacteriological Reviews*: 425-441.
26. Widdel F., Bak F. (1992) **Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria.** In: *The Prokaryote, IV* (Eds: Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K-H.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 3352-3378.
27. Gibson G.R. (1990) **Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria.** *Journal of Applied Bacteriology*: 769-797.
28. Barton L.L., Tomei F.A. (1995) **Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria.** In: *Sulfate- Reducing Bacteria* (Ed: Baron I.L.), Plenum Press, New York, pp. 1-32.
29. Okabe S., Characklis W. G. (1992) **Effects of temperature and phosphorous concentration on Microbial Sulfate Reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*.** *Biotechnology and Bioengineering*: 1031-1042.
30. Higuera P. y Oyarzun R., 2002. **Minerales, metales, gases y la salud humana y ambiental.** Departamento de Ingeniería Geológica y Minera, Escuela Universitaria Politécnica de Almadén, Universidad de Castilla - La Mancha, España.
31. Dexter Dyer, Betsey. 2003. **A Field Guide to Bacteria,** Comstock Publishing Associates/Cornell University Press.
32. Mathews C.K., Van Holde K.E., Arhen K.G., 2002. *Bioquímica: La cadena respiratoria de bacterias,* Pearson Educacion, Madrid. Tercera Edición.
33. Paula Suarez y Rosa Reyes. ***La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente.***

34. Luptakova A, Kusnierova M, Besovska and fecko. 2003. **The precipitation of Heavy Metals by Sulphate-Reducing Bacteria. Slovak Republic.**
35. Kumar R., Sani, Brent M., Peyton and Brown L. 2001. **Copper-Induced Inhibition of Growth of Desulfovibrio sulfuricans G20: Assessment of Its Toxicity and Correlation with Those of Zinc and Lead**, Washington USA.
36. Jonathan R. Lloyd and Ronald S. Oremland 2006, **Microbial Transformations of Arsenic in the Environment: From Soda Lakes to Aquifers.**
37. Guerrero J & Oliviera S. 1999. **Environmental Biotechnology for Mining and Metallurgy.** Lima-Perú.

CAPÍTULO VII:

ANEXOS

VII. ANEXOS

Precipitación de Metales pesados.

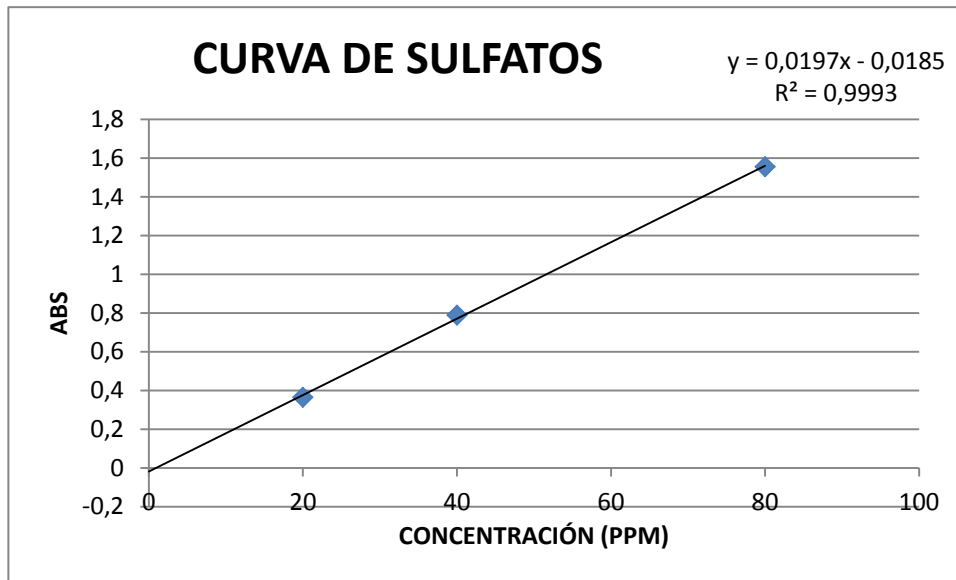
En el siguiente cuadro se muestran los resultados de los tres efluentes sometidos a la precipitación de metales pesados utilizando un consorcio de bacterias sulfato-reductoras aisladas del Distrito Minero de Bella Rica.

Los efluentes fueron estudiados durante 21 días, realizando los análisis químicos con un intervalo de 3 días y en el día cero como referencia.

Día	Muestra	Arsénico (LDD= 0,005)	Cobre (LDD=0,4)	Hierro (LDD=0,5)
0	R. Guanache	0,07	0,4	1,03
0	M. El oro	0,06	0,5	1,9
0	R. Siete	0,06	< LDD	1,3
3	R. Guanache	0,03	< LDD	1,03
3	M. El oro	0,04	< LDD	0,99
3	R. Siete	0,05	< LDD	0,58
6	R. Guanache	0,03	< LDD	0,87
6	M. El oro	0,01	< LDD	0,88
6	R. Siete	0,01	< LDD	0,5
9	R. Guanache	0,02	< LDD	0,8
9	M. El oro	0,01	< LDD	0,6
9	R. Siete	0,01	< LDD	0,29
12	R. Guanache	0,01	< LDD	0,29
12	M. El oro	0,01	< LDD	0,26
12	R. Siete	0,01	< LDD	0,24
15	R. Guanache	0,01	< LDD	0,27
15	M. El oro	0,006	< LDD	0,25
15	R. Siete	0,006	< LDD	< LDD
18	R. Guanache	0,006	< LDD	< LDD
18	M. El oro	< LDD	< LDD	< LDD
18	R. Siete	< LDD	< LDD	< LDD
21	R. Guanache	< LDD	< LDD	< LDD
21	M. El oro	< LDD	< LDD	< LDD
21	R. Siete	< LDD	< LDD	< LDD

Reducción de Sulfatos.

A continuación se muestra la curva de calibración de sulfatos, que nos permite realizar la transformación de las medidas de absorbancia a concentraciones de sulfatos (ppm) y así poder realizar las gráficas de reducción de sulfatos.



Para la transformación de absorbancia a ppm se realiza lo siguiente:

A partir de la ecuación presente en la curva de sulfatos procedemos a despejar la variable x que representa a los ppm de sulfatos mientras que la variable y representa las absorbancias, se ejemplifica a continuación:

$$\text{Ecuación de la curva de sulfatos} \quad Y=0.019X-0.018$$

$$\text{Despejamos ppm de sulfatos (X)} \quad X=(Y+0.018)/0.019$$

Si tenemos una absorbancia de 0.552 y aplicado a la fórmula tenemos:

$$X=(0.552+0.018)/0.019$$

Por lo tanto tenemos una concentración de sulfatos de 30 ppm.

En las tablas siguientes se muestran los datos de la reducción de sulfatos con las variaciones de ácido láctico.

Datos de reducción de 30 ppm de sulfatos.

Tiempo	ppm de sulfatos		
	70 ppm ác. Lác.	50 ppm ác. Lác	20 ppm ác. Lác.
0	30,00	30,00	30,00
0	30,00	30,00	30,00
0	30,00	30,00	30,00
4	13,74	30,24	25,50
4	17,21	27,42	24,89
4	20,34	26,03	24,18
8	18,84	18,29	12,79
8	18,03	14,50	12,74
8	17,13	21,08	12,21
12	8,58	20,03	23,84
12	11,13	18,66	23,74
12	13,68	17,32	23,74
16	24,21	23,42	20,61
16	24,32	23,34	20,58
16	24,37	23,39	20,76
20	20,79	22,79	19,79
20	22,24	22,53	20,13
20	23,21	22,79	20,50
24	23,76	21,84	23,00
24	23,71	21,53	22,76
24	23,87	21,16	23,03

Datos de reducción de 20 ppm de sulfatos.

Tiempo	ppm de sulfatos		
	70 ppm de ác. Lác.	50 ppm de ác. Lác.	20 ppm de ác. Lác.
0	20,00	20,00	20,00
0	20,00	20,00	20,00
0	20,00	20,00	20,00
4	15,95	11,58	14,26
4	15,74	11,58	14,37
4	15,68	11,37	14,42
8	14,58	13,89	14,11
8	14,05	13,84	14,00
8	13,53	13,71	13,89
12	14,84	14,21	16,76
12	14,00	14,97	16,55
12	14,45	15,87	16,37
16	14,42	14,84	17,37
16	14,26	15,26	15,58
16	14,37	15,55	16,47
20	15,29	14,58	17,13
20	15,37	14,50	16,76
20	15,37	14,42	16,47
24	16,61	14,68	16,26
24	15,21	16,11	15,45
24	15,11	15,13	16,29

Datos de reducción de 10 ppm de sulfatos.

Tiempo	ppm de sulfatos		
	70 ppm de ác. Lác.	50 ppm de ác. Lác.	20 ppm de ác. Lác.
0	10,00	10,00	10,00
0	10,00	10,00	10,00
0	10,00	10,00	10,00
4	13,97	14,89	14,18
4	12,92	14,11	13,61
4	11,79	13,32	13,21
8	12,82	12,13	10,00
8	10,29	11,66	10,18
8	8,61	11,18	9,79
12	9,76	12,61	12,97
12	9,76	10,71	11,50
12	9,84	8,92	10,05
16	10,68	10,89	11,87
16	11,50	10,58	9,53
16	12,32	9,79	8,68
20	12,11	11,37	12,97
20	12,34	11,92	13,00
20	13,11	11,89	12,74
24	11,95	10,61	12,58
24	10,71	9,79	12,05
24	9,66	8,79	11,71

Crecimiento de Biomasa con las concentraciones óptimas de fuente de carbono y sulfatos para la mejor producción de H₂S.

Tiempo	# Bact./ml	Prom. De conteo
0	28860	1110
3	117780	4530
6	190840	7340
9	263640	10140
12	284440	10940
15	289718	11143
18	294840	11340
21	296946	11421

