

07



AISLAR Y APLICAR BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS PARA LA DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES DE LA MINA DEL CENTRO MINERO.

ISOLATE AND APPLY BACTERIA SULFATO REDUCTORAS FOR THE DEPURATION OF WASTE WATER FROM THE MINE OF THE MINING CENTER.

Vilma Useche-Castro¹, Constanza Sáenz-Orjuela², Yanneth López- Chaparro³, Amalia León-Gallo⁴ *

¹Grupo de Investigación GICEMIN, Centro Minero, Servicio Nacional de Aprendizaje, Sogamoso, Colombia. vilmarocio_useche@misena.edu.co. Ingeniera Química, experiencia como analista químico en el área ambiental específicamente en aguas; docente catedrático e instructora del área de química en el Sena Centro Minero.

²Grupo de Investigación GICEMIN, Centro Minero, Servicio Nacional de Aprendizaje, Sogamoso, Colombia. constanzasaez@misena.edu.co. Ingeniera Química, desempeño en el sector productivo durante 5 años a cargo del laboratorio químico e instructora del área de Química en el Sena Centro Minero.

³Grupo de Investigación GICEMIN, Centro Minero, Servicio Nacional de Aprendizaje, Sogamoso, Colombia. yannethlopez@misena.edu.co. Bióloga con especialización en Derecho Ambiental, trabajo en diferentes campos de Investigación, ecología, proyectos productivos, trabajo con la Comunidad, e instructora del área Ambiental en el Sena Centro Minero.

⁴Grupo de Investigación GICEMIN, Centro Minero, Servicio Nacional de Aprendizaje, Sogamoso, Colombia. fernandagallos@outlook.com. Microbióloga Industrial con Maestría en Ciencias en Bioprocesos, experiencia en desarrollo y gestión de proyectos de investigación.

* Autor para correspondencia: Centro Minero. Servicio Nacional de Aprendizaje, Sogamoso - Km7 Vereda Morca. Celular: 3172978138

RESUMEN

Las aguas residuales generadas y vertidas en recursos hídricos, provenientes de la explotación del carbón contienen metales pesados los cuales pueden ser oxidados por la acción del aire y microorganismos, formando altas concentraciones de sulfatos y metales pesados que se denominan Drenajes Ácidos de Minas (DAM). Las Bacterias sulfato reductoras (BSR) son bacterias anaeróbicas que se encuentran ampliamente distribuidas en medios libres de oxígeno, tanto acuáticas como terrestres, que favorecen la descomposición de la materia orgánica siendo un proceso continuo. En la Mina Didáctica del Centro Minero se desarrollan actividades de formación que incluyen la explotación del mineral, generando impactos ambientales en el ecosistema y para esto se plantea la aplicación de BSR en el tratamiento de las aguas de la Mina, estas fueron aisladas y posteriormente repicadas para la generación de suficiente Biomasa que permitió realizar el tratamiento con un Biorreactor prototipo. Se aplicó el tratamiento con las bacterias tomando en cuenta su ciclo de vida, donde se pudo evidenciar el descenso de la carga contaminante debido al metabolismo y desarrollo de las BSR sobre las muestras experimentales.

PALABRAS CLAVES: Bacterias Sulfatoreductoras (BSR), Drenajes Ácidos de Mina (DAM), Metales Pesados, Biorreactor, Prototipo

ABSTRACT

Wastewater from coal exploitation contains heavy metals which can be oxidized by the action of air and microorganisms, forming high concentrations of sulfates and heavy metal called Minas Acid Drains (DAM). Reducing sulfate bacteria (BSR) are anaerobic bacteria that are widely distributed in oxygen-free media, both aquatic and terrestrial, that favor the decomposition of organic matter being a continuous process. Training activities are carried out in the Mining Center of the Mining Center, which include the exploitation of the mineral, generating environmental impacts on the ecosystem and for this, the application of BSR in the treatment of the waters of the mine is proposed, these were isolated and subsequently replicated. For the generation of enough Biomass that allowed the treatment with a prototype bioreactor. The treatment with the bacteria was applied taking into account their life cycle, where it was possible to demonstrate the decrease of the contaminant load due to the metabolism and development of the BSR on the experimental samples.

KEYWORDS:

Sulfate-Reducing Bacteria (BSR), Mine Acid Drains (DAM), Heavy Metals, Bioreactor, Prototype.



1. INTRODUCCIÓN

Como producto de la actividad minera, el drenaje ácido de mina (DAM) se convierte en la dificultad de manejo no solo industrial sino ambiental, dada la contaminación de los ecosistemas terrestres y acuáticos, situación que es generalizada en dichos procesos alrededor del mundo. En este tipo de proceso se generan una serie compleja de reacciones geoquímicas que se producen cuando los minerales sulfurosos son expuestos a la atmósfera bajo un ambiente oxidante, produciendo aguas contaminadas fuertemente ácidas[1], estos residuos mineros son ricos en sulfuros, principalmente debido a altos contenidos de sulfuro de hierro como la pirita (FeS_2) y la pirrolita ($\text{Fe}1 - \text{xS}$), a su vez se

encuentra la presencia de elementos traza como Arsénico, Silicio, Cobre, Zinc, Níquel, Cobalto, Molibdeno y Cromo. El control para la formación de DAM es impredecible ya que los contenidos de los minerales y demás elementos son altamente variables de un sitio a otro, siendo difícil de tratar y elevando costos de estabilización en más de miles de millones de dólares [2]. Particularmente, la minería de carbón ha generado gran preocupación puesto que el nivel de extracción ha aumentado en gran cantidad para satisfacer la demanda industrial a nivel mundial como ha sido reportado para China y Estados Unidos[3].

El tratamiento tradicional de los DAM ha permitido mitigar el impacto que estos generan, aunque presenta

varias desventajas como es alto costo de instalación, mantenimiento y formación de subproductos como lodos.

Por lo anterior, se han estudiado tecnologías ambientalmente amigables que utilizan microorganismos como las bacterias sulfato reductoras (BSR) para la remoción de metales pesados, lo que ha sido ampliamente reportado, como en el caso de, biosorción de cadmio [4] y otros metales [5]. Las BSR son microorganismos anaerobios gram negativos, los cuales pueden reducir el sulfato a sulfuro en una fuente de carbono adecuada. El sulfuro así generado, es capaz de eliminar metales formando precipitados metálicos. El uso de las BSR, para generar sulfuros a partir de sulfatos y tratar la contaminación por metales como Cu, Zn, Ni, Cr, U, Fe, Mn y Cd, se ha estudiado durante décadas [6], [7]. El metabolismo de estas bacterias tiene como resultado la producción de sulfuros, generación de alcalinidad y la precipitación química de los metales. Este trabajo se enfocó en aislar especies de BSR: *Desulfobacter* spp para la remoción de metales de soluciones acuosas, con el fin de estudiar su posible aplicación en el tratamiento de DAM, [8],[9] en el área de influencia del Centro Minero.

El objetivo de este estudio fue investigar el potencial de las bacterias sulfato reductoras en la remoción de metales pesados para el tratamiento del drenaje ácido de la mina didáctica de carbón (Centro minero SENA, Boyacá).

2. METODOLOGÍA

(Materiales y Métodos)

El presente trabajo se realizó en la Mina Didáctica del SENA Centro Minero, la cual se encuentra ubicada en el Km 7 del Centro Poblado de Morca, sector Bata, al noreste del municipio de Sogamoso, con una altura promedio de 2665 m.s.n.m., según levantamiento topográfico presenta las siguientes coordenadas N 1°125.553,37 E 1°131.173,88

2.1 Recolección de muestras y análisis

El punto de muestreo se localizó en el pozo de la mina donde se recolecta, todo el flujo de agua generada en el proceso de la extracción minera, el muestreo fue efectuado de acuerdo al protocolo del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM, instructivo para la toma de muestras de aguas-residuales, teniendo en cuenta todos los requerimientos

e instrucciones establecidos en el protocolo, las muestras fueron depositadas, en frascos de vidrio de 1000 mL, conservado a 4°C hasta llegar al laboratorio. Después de bombear el agua almacenada en el pozo, se tomaron las muestras de lodos en forma aleatoria para garantizar su representatividad, a una profundidad de 70 cm y fueron recolectadas en frascos de 250 mL y conservados a 4 °C.



Foto 1. Toma de muestra lodos pozo mina

2.3 Aislamiento y enriquecimiento de BSR

El aislamiento de las bacterias sulfato reductoras BSR, fue realizado a partir de las muestras de lodos, tomando 5 mL de sedimento e inoculando inmediatamente con 25 mL de medio modificado API fórmula recomendada por el American Petroleum Institute (API) para monitorear BRS en sistemas de petróleo y gas, cuyo medio es estrictamente anaeróbico con una temperatura de incubación de 30 ° C. La preparación del medio fue realizada tomando las siguientes cantidades: 0,01 g L-1 K₂HPO₄; 0,2 g L-1 (NH₄)₂Fe(SO₄)₂•6H₂O; 10 g L-1 NaCl; 0,2 g L-1 MgSO₄ •7H₂O; 0,001 g L-1 Resazurina de sodio; 0,1 g L-1 Ácido Ascórbico; 4.0 g L-1 lactato de sodio; 1,0 g L-1 Extracto de levadura 1 L; pH 7,0). Después del aislamiento para la producción de BSR se usó el medio de cultivo Postgate C [10], bajo condiciones anaerobias, preparando 3 cultivos sucesivos bajo las mismas condiciones para minimizar riesgo de bacterias contaminantes. Posteriormente se realizó una verificación morfológica utilizando coloración de Gram por medio de microscopía óptica(MO).

Tras realizar el aislamiento de las bacterias BSR, se procedió mediante repiques en medio Postgate C, a la multiplicación de la población de bacterias, con el fin de contar con suficiente material para la experimentación, las cuales fueron conservadas en solución salina al 0,85% de NaCl.



Foto 2. Inoculación y aislamiento de las bacterias Sulfato Reductoras BSR

Para determinar la concentración de bacterias producidas, se utilizó el método de la escala de McFarland (método cualitativo) y posteriormente se midió la absorbancia mediante espectrofotometría UV-VIS, con el objeto que todas las pruebas a desarrollar, contengan el mismo número de bacterias y observar su comportamiento en las muestras tomadas.



2.4 Ensayo de precipitación de Hierro

La verificación de precipitación de hierro se llevó a cabo como lo menciona Zhang [11]. Se prepararon soluciones diluidas (4:1000) de agua residual de la mina, inoculando con 20 ml de cultivo líquido de BSR a

200 ml de agua diluida, en condiciones anaerobias por 4 horas en agitación constante a 300 rpm y 30 °C, posteriormente se realizó las pruebas por duplicado para verificar la reducción de hierro, mediante espectrofotometría ultravioleta con 1,10 fenantrolina, de acuerdo al Standar Methods Cód. 2120-84.



Foto 2. Medición de hierro por método espectrofotométrico

2.5 Evaluación de prototipo a escala laboratorio

Se diseñó un prototipo a escala laboratorio, creando condiciones anaerobias para el crecimiento de las bacterias, la evolución de las BRS, pudo observarse mediante una curva de crecimiento, efectuada en medio Postgate C, tomando 400 ml de agua de la mina sin diluir e inoculando con 30 ml de bacterias BSR producidas con 30 ml de medio C, bajo condiciones anaerobias, agitación 300 rpm y 30 °C, la depuración del agua de la mina se efectuó durante 4 días, paralelo se llevó a cabo el experimento control o blanco, el cual presenta las mismas condiciones excepto el inóculo de BSR y sus nutrientes [12]. Este experimento fue realizado por triplicado y se tomaron muestras para análisis de parámetros fisicoquímicos cada 24 horas. Los análisis están referenciados por el Standar Methods: acidez, método por titulación Cód. D 1067, alcalinidad, método por titulación Cód. 10112, Dureza total, método por titulación Cód. 10603 Cloruros, método por titulación Cód. 073-2001 Hierro, método espectrofotometría ultravioleta con 1,10 fenantrolina Cód. 2120-84 Sulfatos, método espectrofotometría ultravioleta por turbidimetría Cód. 16302.



Foto 3. Prototipo a escala laboratorio y evolución del crecimiento de las BSR en agua de la mina

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Morfología de bacterias

Los lodos sedimentables del pozo minero presentan alta variedad de consorcios microbianos capaces de crecer en presencia de altas concentraciones de metales, a partir de estos solidos se logró el enriquecimiento y aislamiento de BSR en el laboratorio, cultivado bajo condiciones anaerobias, en el medio de cultivo selectivo Postgate C, ampliamente usado para este tipo de bacterias con lactato de sodio como fuente de carbono, para el crecimiento microbiano el cual fue identificado microscópicamente. En la morfología observada por microscopia óptica de las BSR, se observaron bacilos Gram negativos; debido a su delgada pared celular y metabolismo, así mismo, el crecimiento de las bacterias en este medio selectivo observó una coloración negra, debido a la presencia de sulfato de amonio y magnesio, nutrientes propios de este medio para la producción de sulfuro. [13]–[15].

3.2 Características de agua de la mina

En general, la calidad del efluente del agua de DAM mostró un efecto adverso típico tal como alta acidez y

altas concentraciones de hierro, sulfatos, cloruros y dureza y presencia de alcalinidad, particularmente el agua presenta pH bajo a nivel de 3,50, similar a lo reportado por Balistrieri [16] quien reporta niveles de pH igual a 4,95 y además sale de los límites permitidos por la normatividad, así como el hierro y sulfatos, con niveles 163,78 mg /L con límite de 2 mg /L y 2626,05 mg/L con límite de 1200,0 mg /L respectivamente. En cuanto los demás parámetros se observan que no se encuentran en un rango aceptable, causando impacto ambiental significativo, de acuerdo a los valores establecidos por la resolución 631 de 2015. La tabla 1 muestra los análisis de parámetros de agua sin tratamiento bacteriano.

Parametro	Técnica	Unidad	Resultado	Parametros permisibles Según la resolución 0631
Acidez	Titulométrico	mg/L CaCO ₃	380,80	Análisis y reporte
Alcalinidad	Titulométrico	mg/L CaCO ₃	94,5	Análisis y reporte
Cloruros	Volumétrico	mg/L CL	4480,5	500
DQO	Reflujo cerrado	mg/L O ₂	4080	150
Dureza Total	Volumétrico	mg/L CaCO ₃	4221	Análisis y reporte
Hierro Total	Colorimétrico visible	mg/L	163,78	2,00
pH	Electrométrico	unidades de pH	3,50	6,00 a 9,00
Sulfatos	Colorimétrico	mg/L	2626,05	1200,00
Temperatura	Electrométrico	°C	14,8	Análisis y reporte

Foto 1. Toma de muestra lodos pozo mina

3.3 Análisis de precipitación de hierro

Durante las pruebas efectuadas con el prototipo a nivel laboratorio, se observó disminución significativa de los parámetros fisicoquímicos analizados hasta el día dos; durante los demás días de prueba no se presentaron variaciones significativas en los análisis realizados al agua tratada con las BSR, según se muestra en la tabla 2.

Condiciones	Tiempo de prueba (días)	pH	Acidez mg/L CaCO ₃	Alcalinidad mg/L CaCO ₃	Dureza mg/L CaCO ₃	Ppm de SO ₄ =	Ppm de Hierro Total
Con BSR y medio Postgate C	Día 0	3,5	444,26	126,0	2412	2702,31	151,39
	Día 1	6,56	190,40	189,0	2211	2383,16	41,35
	Día 2	6,47	190,40	189,0	2211	2405,76	38,46
	Día 3	6,64	190,40	315,0	2211	2566,74	38,78
Sin BSR y medio Postgate C	Día 0	3,5	380,80	0,0	4221	2626,05	163,78
	Día 1	3,96	333,20	0,0	3618	2609,11	125,17
	Día 2	3,63	380,80	0,0	2412	2579,45	125,0
	Día 3	3,35	285,60	0,0	1809	2578,98	124,0

Tabla 2. Parámetros físico-químicos del agua con tratamiento BSR.

El uso de medio Postgate C permitió reducir la fase de adaptación de las BSR y mejorar su crecimiento.

En cuanto al comportamiento de los parámetros fisicoquímicos se observó el incremento en el pH del agua de

la mina, partiendo de un valor de 3,50 a 6,47 y una reducción de la acidez de 444,26 a 190,40 mg/L CaCO₃ con porcentaje de remoción de 42,85%. En cuanto al hierro total se inicia con un valor de 151,39, quedando en 38,46 ppm obteniendo una remoción de 74,59% y con respecto a los sulfatos hubo una disminución de un 10,97 % de remoción.

4.CONCLUSIONES

Se logro aislar y aplicar las bacterias sulfato reductoras en las aguas acidas provenientes de la mina del centro minero, y realizar ensayos a nivel de laboratorio, que permitió ver la aplicabilidad de un tratamiento No convencional en los tratamientos de vertimientos ácidos

Las pruebas realizadas presentan una reducción en los parámetros fisicoquímicos por acción del inóculo de las BSR, sin embargo estos no alcanzan los valores permisibles contemplados en la Resolución 631 de 2015 sobre vertimientos puntuales, por lo que se hace necesario la implementación de un tratamiento complementario para lograr el cumplimiento de la norma.

Para el tratamiento de agua acidas de la mina del Centro minero es necesario utilizar sistemas complementarios, como la aplicación de un consorcio microbiano y/o tratamientos fisicoquímicos convencionales, que permitan un mayor porcentaje de remoción de contaminantes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Servicio Nacional de Aprendizaje y en particular al Sistema de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación (SENNOVA) por el apoyo de investigación e instalaciones instrumentales proporcionadas.

REFERENCIAS

- [1] C. A. Ríos, C. D. Williams, and C. L. Roberts, "Removal of heavy metals from acid mine drainage (AMD) using coal fly ash, natural clinker and synthetic zeolites," *J. Hazard. Mater.*, vol. 156, no. 1–3, pp. 23–35, 2008.
- [2] U. Epa and O. of Wetlands, "Technical Document: Acid Mine Drainage Prediction," 1994.
- [3] D. Turney and V. Fthenakis, "Environmental impacts from the installation and operation of large-scale solar power plants," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 15, no. 6, pp. 3261–3270, 2011.
- [4] F. Pagnanelli, C. Cruz Viggi, and L. Toro, "Isolation and quantification of cadmium removal mechanisms in batch reactors inoculated by sulphate reducing bacteria: Biosorption versus bioprecipitation," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 9, pp. 2981–2987, 2010.
- [5] S. Azabou, T. Mechichi, and S. Sayadi, "Zinc precipitation by heavy-metal tolerant sulfate-reducing bacteria enriched on phosphogypsum as a sulfate source," *Miner. Eng.*, vol. 20, no. 2, pp. 173–178, 2007.
- [6] A. Angelov, S. Bratkova, and A. Loukanov, "Microbial fuel cell based on electroactive sulfate-reducing biofilm," *Energy Convers. Manag.*, vol. 67, pp. 283–286, 2013.
- [7] A. M. Sanchez-Salazar, J. W. Arboleda-Valencia, H. F. Rivera-Gutierrez, and R. H. Valle-Molinares, "Análisis de coliformes y bacterias reductoras de sulfato en reservorios acuíferos de Corrales de San Luis Beltrán, Atlántico, Colombia," *Med. Lab.*, vol. 20, no. 9–10, pp. 453–466, 2014.
- [8] C. García, D. A. Moreno, A. Ballester, M. L. Blázquez, and F. González, "Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria," *Miner. Eng.*, vol. 14, no. 9, pp. 997–1008, Sep. 2001.
- [9] M. Santana, "Presence and expression of terminal oxygen reductases in strictly anaerobic sulfate-reducing bacteria isolated from salt-marsh sediments," 2008.
- [10] J. R. Postgate, *The Sulfate-Reducing Bacteria*. Cambridge University Press, Cambridge, 1984, 1984.
- [11] G. Zhang, X. Ouyang, H. Li, Z. Fu, and J. Chen, "Bioremoval of antimony from contaminated waters by a mixed batch culture of sulfate-reducing bacteria," *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 115, pp. 148–155, Nov. 2016.
- [12] A. Luptáková, I. Kotuličová, E. Mačingová, and J. Jenčárová, "Bacterial Elimination of Sulphates from Mine Waters," *Chem. Eng. Trans.*, vol. 35, pp. 853–858, 2013.

- [13] C.-H. Kang, Y.-J. Kwon, and J.-S. So, "Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures," *Ecol. Eng.*, vol. 89, pp. 64–69, 2016.
- [14] T. Jong and D. L. Parry, "Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs," *Water Res.*, vol. 37, no. 14, pp. 3379–3389, Aug. 2003.
- [15] H. T. Q. Kieu, E. Müller, and H. Horn, "Heavy metal removal in anaerobic semi-continuous stirred tank reactors by a consortium of sulfate-reducing bacteria," *Water Res.*, vol. 45, no. 13, pp. 3863–3870, Jul. 2011.
- [16] L. S. Balistrieri, R. R. Seal, N. M. Piatak, and B. Paul, "Assessing the concentration, speciation, and toxicity of dissolved metals during mixing of acid-mine drainage and ambient river water downstream of the Elizabeth Copper Mine, Vermont, USA," *Appl. Geochemistry*, vol. 22, no. 5, pp. 930–952, May 2007.