

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS**  
**Y BIOTECNOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA**  
**BIOTECNOLÓGICA**



**BIOPRECIPITACIÓN DE METALES PESADOS UTILIZANDO**  
**BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO (BRS) PARA SU**  
**APLICACIÓN EN UN BIOREACTOR SULFIDOGÉNICO**

**Presentado por la Bachiller en Ingeniería**  
**Biotecnológica.**

VALDIVIA TEJADA, Francine

**Para optar el Título Profesional de Ingeniero**  
**Biotecnológico.**

**Asesor:**

Ing. Javier Roque Rodríguez

**AREQUIPA – PERÚ**

**2017**



*A Dios por estar en mi vida y guiar cada paso que doy en el camino,  
A mis Padres Roxana y Emilio por su amor, apoyo incondicional y por  
haberme dado todo durante toda mi vida  
A mi hermana Laura por su amor y paciencia*

*Francine Valdivia*

## AGRADECIMIENTOS

*Al Ing. Francisco Javier Roque Rodríguez, asesor de tesis, por su disposición para transmitir su conocimiento y experiencia, por su tiempo invertido en esta tesis.*

*Al Ing. Cifrido Zaravia Sánchez, al Mgter. Fredy Nicolás Molina Rodríguez y a la Ing. Cinthia Córdova Barrios, miembros del tribunal de tesis, por su colaboración en todo momento, por sus sugerencias, por su tiempo y apoyo en la consecución de mis metas.*

*A la Universidad Católica de Santa María y a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas y a todos sus profesores, por abrirme las puertas, por trasmitirme sus conocimientos entregando siempre lo mejor en la formación de todos sus estudiantes.*

*A mis padres y mi hermana, por su apoyo incondicional, por su amor y por haberme dado todo, por regalarme las alegrías más grandes, por ser una bendición en mi vida.*

*A Edson Segovia, por su amor incondicional, por sus palabras de ánimo y aliento en todo momento y por estar siempre ahí para mí.*

*A mis amigas, que me han acompañado a lo largo de toda la carrera haciendo que todo sea inolvidable, fácil y feliz.*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

CAPITULO I:

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... 3

1.1 JUSTIFICACIÓN..... 3

1.2 HIPOTESIS..... 3

1.3 OBJETIVO GENERAL..... 4

1.3.1 Objetivos Específicos..... 4

1.4 VARIABLES E INDICADORES..... 5

CAPITULO II:

MARCO TEÓRICO ..... 6

2.1 METALES PESADOS ..... 6

2.2 BIOPRECIPITACIÓN ..... 12

2.3 BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO (BRS)..... 14

2.4 REACTORES SULFIDOGENICOS ..... 23

CAPITULO III:

MATERIALES Y MÉTODOS..... 28

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN..... 28

3.2 MATERIAL DE LABORATORIO Y REACTIVOS..... 28

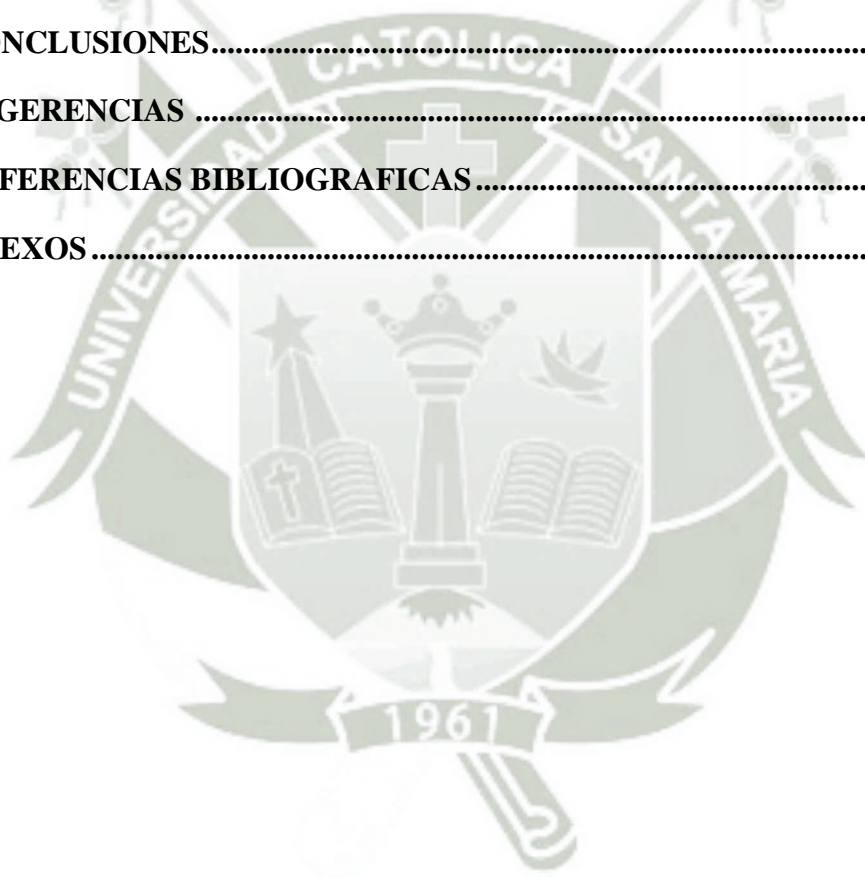
3.3 METODOLOGIA..... 31

CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS ..... 31

EFFECTO DE LOS METALES PESADOS ..... 39

ARMADO DE BIOREACTOR TIPO TANQUE ..... 39

<b>METODOS ANALITICOS .....</b>	<b>40</b>
<b>CAPITULO IV:</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS         MICROBIANOS REDUCTORES DE SULFATO .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 CINETICA DE CRECIMIENTO .....</b>	<b>68</b>
<b>4.3 BIOPRECIPITACIÓN DE METALES PESADOS .....</b>	<b>77</b>
<b>4.4 TRATAMIENTO DE RELAVE MINERO EN UN BIOREACTOR         SULFIDOGENICO .....</b>	<b>102</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>120</b>
<b>SUGERENCIAS .....</b>	<b>122</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>132</b>



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Plombemia y manifestaciones clínicas. ....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 2. Ciclo del azufre (Muyzer y Stams, 2008) .....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 3. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial del gen ARNr 16S de especies descritas de BRS (Muyzer y Stams, 2008) .....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 4. Representación esquemática de la reducción de sulfato acoplada a la utilización de lactato en <i>Desulfovibrio</i> por el mecanismo del ciclo del hidrogeno (Matias <i>et al.</i>, 2005) .....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 5. Algunos biorreactores sulfidogénicos .....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 6. Siembra de bacterias reductoras de sulfato en medio líquido Postgate B .....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 7. Método de extracción directa de ADN genómico .....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 8. Diagrama esquemático del dispositivo utilizado para el cultivo batch</b>	<b>40</b>
<b>Figura 9. Sitios de origen de las muestras.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 10. a) Crecimiento de bacterias reductoras de sulfato en medio líquido. b) Precipitado de Sulfuro de Hierro .....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 11. Crecimiento de BRS en anaerobiosis.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 12. Crecimiento macroscópico de las colonias de las muestras 007 y 008 en medios Postgate C sólido.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 13. Crecimiento macroscópico de las colonias de las muestras 002 y 003 en medios Postgate C sólido.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 14. Crecimiento macroscópico de las colonias de las muestras 004 y 006 en medios Postgate C sólido.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 15. Determinación de indol en aislados.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 16. Determinación de Desulfoviridina en BRS aisladas .....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 17. Población Bacteriana según tiempo de evaluación (Días).....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 18. Población bacteriana según tipo de cepas .....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 19. Crecimiento poblacional de bacteria según cepas y tiempo de evaluación.....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 20. Absorbancia según tiempo de evaluación (Días) .....</b>	<b>71</b>

<b>Figura 21. Absorbancia según Tipos de cepas.....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 22. Absorbancia según cepas y tiempo de evaluación .....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 23. Determinación de <math>\mu_{m\acute{a}xima}</math>.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 24. Reducción de Sulfatos según tiempo de evaluación (Días) .....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 25. Reducción de Sulfatos según cepas .....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 26. Reducción de Sulfatos según cepas y tiempo de evaluación .....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 27. Bioprecipitación de plomo, cromo y cadmio. ....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 28. Ácido Láctico según consorcio bacteriano .....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 29. Ácido láctico según días de evaluación .....</b>	<b>80</b>
<b>Figura 30. Ácido láctico según metal pesado y días de evaluación.....</b>	<b>80</b>
<b>Figura 31. Niveles de ácido láctico por cepas.....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 32. Niveles de ácido láctico por metal pesado .....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 33. Niveles de ácido láctico por días .....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 34. Niveles de ácido láctico según cepa y metal pesado.....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 35. Niveles de ácido láctico según cepa y días .....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 36. Niveles de ácido láctico según metal pesado y días.....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 37. Cinética de metabolización del ácido láctico en presencia de metales pesados y por cada cepa .....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 38. Comparación de las cinéticas de metabolización de las cepas y el consorcio microbiano en presencia de metales pesados .....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 39. Reducción de sulfato por metal pesado. ....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 40. Reducción de sulfatos por días de evaluación.....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 41. Reducción de sulfatos según metal pesado y días de evaluación.....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 42. Reducción de sulfatos en presencia de metales pesados.....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 43. Reducción de sulfatos por cepas en presencia de metales pesados ...</b>	<b>91</b>
<b>Figura 44. Reducción de sulfatos por días en presencia de metales pesados.....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 45. Reducción de sulfatos por cepas y metales pesados .....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 46. Reducción de sulfatos por cepas y días.....</b>	<b>93</b>
<b>Figura 47. Reducción de sulfatos por metales pesados y días .....</b>	<b>93</b>
<b>Figura 48. Cinética de metabolización de sulfatos en presencia de metales pesados y cada cepa .....</b>	<b>94</b>

<b>Figura 49. Comparación de las cinéticas de metabolización de sulfatos de las cepas y el consorcio bacteriano en presencia de metales pesados .....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 50. Concentración Final e Inicial en presencia de consorcio bacteriano</b>	<b>96</b>
<b>Figura 51. Concentración total de metales pesados .....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 52. Concentración de metales pesados en el tratamiento con consorcio bacteriano .....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 53. Concentración de metales pesados por cepas .....</b>	<b>98</b>
<b>Figura 54. Concentración total de metales pesados en ppm .....</b>	<b>99</b>
<b>Figura 55. Concentración final e inicial de metales pesados comparando ambas cepas.....</b>	<b>100</b>
<b>Figura 56. Concentración inicial y final de metales pesados comparando el consorcio bacteriano con las cepas por separado .....</b>	<b>101</b>
<b>Figura 57. Tratamiento del relave minero .....</b>	<b>102</b>
<b>Figura 58. Ácido láctico por días producido por el consorcio bacteriano en relave minero .....</b>	<b>104</b>
<b>Figura 59. Ácido láctico total por cepa en relave minero .....</b>	<b>105</b>
<b>Figura 60. Concentración de ácido láctico por días en relave minero .....</b>	<b>106</b>
<b>Figura 61. Ácido láctico por cepas y días en el tratamiento del relave minero</b>	<b>106</b>
<b>Figura 62. Concentración de ácido láctico para cada cepa y el consorcio bacteriano a través del tiempo en el tratamiento del relave minero.</b>	<b>107</b>
<b>Figura 63. Reducción de sulfato por días en relave minero .....</b>	<b>108</b>
<b>Figura 64. Concentración de sulfatos total por cepas en relave minero .....</b>	<b>109</b>
<b>Figura 65. Concentración de sulfatos total por días en relave minero.....</b>	<b>110</b>
<b>Figura 66. Reducción de sulfatos por cepas y tiempo de evaluación en el tratamiento de relave minero .....</b>	<b>111</b>
<b>Figura 67. Comparación de las cinéticas de reducción de sulfatos para cada cepa y el consorcio bacteriano en función del tiempo .....</b>	<b>111</b>
<b>Figura 68. Concentración total de cada metal pesado en biorreactor .....</b>	<b>113</b>
<b>Figura 69. Concentración de metales pesados al inicio y final de la experiencia en el biorreactor .....</b>	<b>114</b>
<b>Figura 70. Concentración total de metales pesados por cepas.....</b>	<b>115</b>
<b>Figura 71. Concentración total de metales pesados .....</b>	<b>116</b>

<b>Figura 72. Concentración total de metales pesados por medición.....</b>	<b>117</b>
<b>Figura 73. Concentración de cada metal pesado y cepa al inicio y final de la experiencia en bioreactor .....</b>	<b>118</b>
<b>Figura 74. Concentración inicial y final de metales pesados comparando el consorcio bacteriano con las cepas en bioreactor .....</b>	<b>118</b>



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Definición operacional y conceptual de las variables .....</b>	<b>5</b>
<b>Tabla 2. Estequiometria metabólica de oxidación de lactato de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (Okabe y Characklis, 1992) .....</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 3. Zona, ubicación y Provincia de cada muestra .....</b>	<b>31</b>
<b>Tabla 4. Medio de cultivo liquido Postgate B modificado (Postgate, 1984) .....</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 5. Medio de cultivo solido Postgate C modificado (Postgate, 1984).....</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 6. Solución de anaerobiosis.....</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 7. Medio de cultivo solido Postgate G modificado (Postgate, 1984).....</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 8. Solución de vitaminas .....</b>	<b>38</b>
<b>Tabla 9. Muestras colectadas en el campo .....</b>	<b>45</b>
<b>Tabla 10. Cepas aisladas a partir de las muestras colectadas.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabla 11. Descripción morfológica de las colonias.....</b>	<b>51</b>
<b>Tabla 12. Principales características microscópicas de las cepas.....</b>	<b>53</b>
<b>Tabla 13. Características fisiológicas de las bacterias reductoras de sulfato aisladas.....</b>	<b>64</b>
<b>Tabla 14. Cuadro comparativo de la cepa 2M con otras especies .....</b>	<b>65</b>
<b>Tabla 15. Cuadro comparativo de la cepa 806 con otras secuencias.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabla 16. Crecimiento de BRS a diferentes temperaturas.....</b>	<b>67</b>
<b>Tabla 17. Crecimiento de BRS a diferentes pH.....</b>	<b>67</b>
<b>Tabla 18. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Poblacion (Bacterias/mL) según tiempo de evaluación .....</b>	<b>68</b>
<b>Tabla 19. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para población (Bacterias/mL) por Cepas.....</b>	<b>69</b>
<b>Tabla 20. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Absorbancia según días de evaluación.....</b>	<b>71</b>
<b>Tabla 21. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Absorbancia por cada tipo de cepa .....</b>	<b>72</b>
<b>Tabla 22. Velocidades específicas de crecimiento máxima reportadas para BRS consumidoras de lactato.....</b>	<b>73</b>

<b>Tabla 23. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Concentración sulfatos g/L por tiempo de evaluación .....</b>	<b>75</b>
<b>Tabla 24. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Concentración sulfatos g/L por Cepas.....</b>	<b>76</b>
<b>Tabla 25. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido Láctico (g/L) por Metal pesado .....</b>	<b>78</b>
<b>Tabla 26. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido láctico (g/L) por Días .....</b>	<b>79</b>
<b>Tabla 27. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido láctico (g/L) por Cepa .....</b>	<b>81</b>
<b>Tabla 28. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido láctico (g/L) por Metal pesado .....</b>	<b>82</b>
<b>Tabla 29. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido láctico (g/L) por días .....</b>	<b>83</b>
<b>Tabla 30. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Reducción Sulfato (g/L) por Metal pesado .....</b>	<b>87</b>
<b>Tabla 31. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para reducción Sulfato (g/L) por días .....</b>	<b>88</b>
<b>Tabla 32. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para reducción Sulfatos (g/L) por Metales pesados .....</b>	<b>90</b>
<b>Tabla 33. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para reducción Sulfatos (g/L) por Cepa .....</b>	<b>90</b>
<b>Tabla 34. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para reducción Sulfatos (g/L) por días .....</b>	<b>91</b>
<b>Tabla 35. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Concentración de metales pesados (ppm) por Medición .....</b>	<b>96</b>
<b>Tabla 36. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración (ppm) por Metales Pesados .....</b>	<b>97</b>
<b>Tabla 37. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración (ppm) por Cepa .....</b>	<b>98</b>
<b>Tabla 38. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración (ppm) por Metales pesados .....</b>	<b>99</b>

<b>Tabla 39. Precipitación de metales pesados .....</b>	<b>102</b>
<b>Tabla 40. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido láctico (g/L) por días en relave minero.....</b>	<b>103</b>
<b>Tabla 41. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido láctico (g/L) por Cepas.....</b>	<b>104</b>
<b>Tabla 42. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido láctico (g/L) por días en relave minero.....</b>	<b>105</b>
<b>Tabla 43. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Reducción Sulfato (g/L) por día en relave minero .....</b>	<b>108</b>
<b>Tabla 44. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para reducción sulfatos por Cepa en relave mineros .....</b>	<b>109</b>
<b>Tabla 45. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para reducción Sulfato por día en relave minero.....</b>	<b>110</b>
<b>Tabla 46. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración por medición de metales pesados en bioreactor.....</b>	<b>112</b>
<b>Tabla 47. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración de Metales Pesados en bioreactor .....</b>	<b>113</b>
<b>Tabla 48. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración (ppm) por Cepa en biorector .....</b>	<b>115</b>
<b>Tabla 49. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración (ppm) por Metales Pesados en bioreactor .....</b>	<b>116</b>
<b>Tabla 50. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración (ppm) por medición en bioreactor .....</b>	<b>117</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ARS	Actividad reductora de sulfato
BRS	Bacterias reductoras de sulfato
°C	Grados Centígrados
DAM	Drenaje ácido de mina
DQO	Demanda química de oxígeno
g	Gramo
h	hora
Kps	Constante de producto de solubilidad
L	Litro
mg	Miligramo
pH	Potencial de Hidrogeno
POR	Potencial óxido reducción
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
RCTA	Bioreactor continuo tipo tanque agitado
$r_{SO_4}$	Velocidad volumétrica de reducción de sulfatos
$\mu_{m\acute{a}xima}$	Velocidad específica de crecimiento máximo

## RESUMEN

La contaminación ambiental se va incrementando conforme pasan los años y por tal motivo constantemente se realizan investigaciones para reducir y prevenir problemas ambientales. Uno de los principales contaminantes de agua a nivel mundial son los metales pesados debido a su alto grado de toxicidad. En los últimos años gracias a la biotecnología ambiental se ha podido estudiar e implementar procesos de tratamiento usando microorganismos. En el presente trabajo de investigación se evaluó la precipitación de metales pesados en solución y el tratamiento de un relave minero en un biorreactor tipo tanque agitado. Se seleccionaron dos cepas: 804 y 2M a partir de las ocho muestras ambientales, se identificaron como bacterias reductoras de sulfato del género *Desulfovibrio*. Se trabajó en pH 7.0 – 7.5 y Temperatura óptima de 30 °C. La velocidad específica de crecimiento máximo ( $\mu_{max}$ ) fue 0.009 h<sup>-1</sup> y la velocidad volumétrica de reducción de sulfatos ( $r_{SO_4}$ ) fue 0.0048 g/l.h para ambas cepas estudiadas. Se estudió las cinéticas de metabolización de ácido láctico y la actividad sulfato reductora durante el proceso. Como fuente de carbono se empleó lactato de ringer que es un inyectable usado para tratar deshidrataciones extremas. Se evaluó la precipitación de los metales: Cr(III), Pb(II) y Cd(II) en presencia de cada cepa y el consorcio bacteriano (Ambas cepas), se oxido mayor concentración de ácido láctico en la evaluación de cromo con la cepa 2M (1.48 g/l), en cuanto a sulfatos el consorcio bacteriano redujo hasta una concentración de 1.67 g/l en Cr; la cepa 2M presento

mayor porcentaje de reducción en todos los metales estudiados Cd 83%, Pb 58% y Cr 45% (0.67, 4.87 y 0.05 ppm, respectivamente para cada metal). Se utilizó un biorreactor tipo tanque agitado de capacidad de un litro con piedra pómez como soporte de inmovilización para tratar un relave minero, se evaluó la oxidación de ácido láctico y la reducción de sulfatos donde el consorcio bacteriano obtuvo los mejores resultados con una concentración final de 1.67 g/l de ácido láctico y 0.84 g/l de sulfatos; en cuanto al porcentaje de precipitación de metales de igual modo la cepa 2M obtuvo mejores resultados Cu 94%, Cd 83%, Pb 65% y Cr 44% (Concentraciones finales: 0.0008, 0.0004, 0.002 y 0.011 ppm, respectivamente). El cromo tanto en el biorreactor como en solución no se obtuvo un alto porcentaje de reducción debido a que su  $K_{ps}$  es de  $6 \times 10^{-37}$  mucho menor a los otros metales estudiados. En el estudio se demostró que la cepa 2M tuvo mejores resultados en la precipitación de metales pesados, el proceso por el cual los metales precipitan se debe a que las BRS reducen el sulfato para producir sulfuros, los cuales al estar en contacto con un metal pesado forman los sulfuros metálicos los cuales son insolubles.

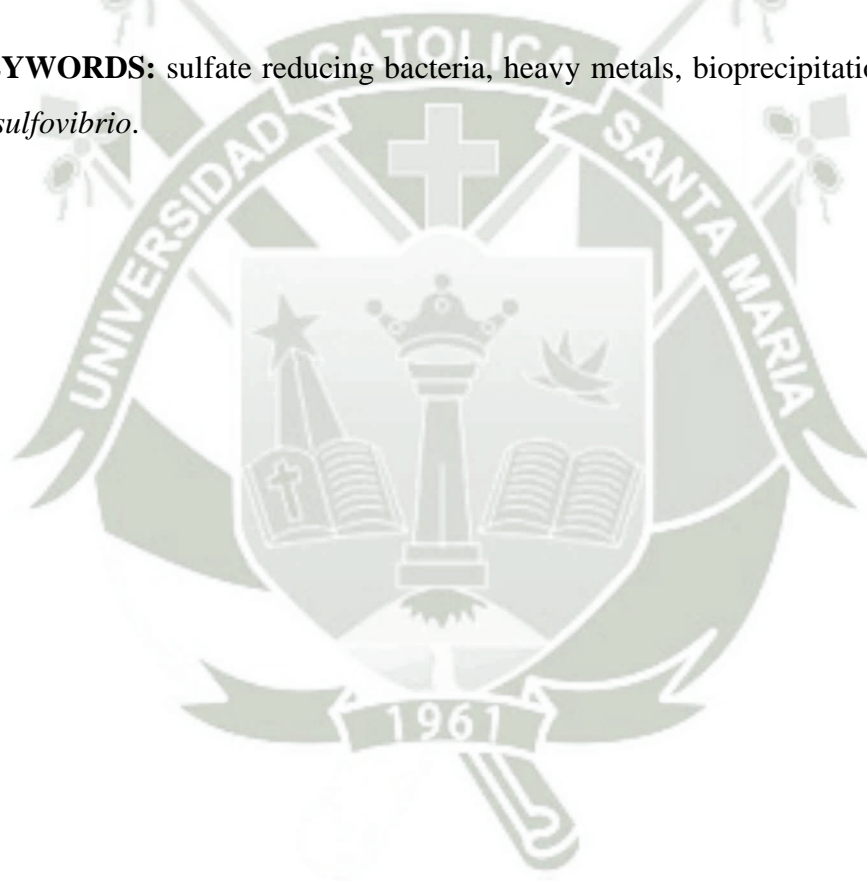
**PALABRAS CLAVES:** Bacterias reductoras de sulfato, Metales pesados, bioprecipitación, biorreactor, *Desulfovibrio*,

### ABSTRACT

Environmental pollution is increasing as the years pass and for this reason research is constantly being carried out to reduce and prevent environmental problems. One of the world's major water pollutants of heavy metals by a high degree of toxicity. In recent years thanks to environmental biotechnology has been able to study and execute treatment processes using microorganisms. In the present work, the heavy metal precipitation in the solution and the treatment of a mineral regrowth in a stirred tank bioreactor were evaluated. Two strains were selected: 804 and 2M from the environmental samples, they were identified as sulfate reducing bacteria from the *Desulfovibrio* generator. The maximum growth specific velocity ( $\mu_{max}$ ) was  $0.009\text{ h}^{-1}$  and the volume velocity of Sulfate Reduction ( $r_{SO_4}$ ) was  $0.0048\text{ g / l.h}$  for both strains studied. The metabolic kinetics of lactic acid and reducing sulphate activity were studied during the process. As the carbon source the roller roller is used which is an injectable used to treat extreme dehydrations. The precipitation of the metals: Cr (III), Pb (II) and Cd (II) in the presence of each strain and bacterial consortium (Both strains) was evaluated, the highest concentration of lactic acid was evaluated in the evaluation of chromium with the Strain 2M ( $1.48\text{ g / l}$ ); in sulfates the bacterial consortium reduced to a concentration of  $1.67\text{ g / l}$  in Cr; The strain 2M presented Cd 83%, Pb 58% and Cr 45% ( $0.67, 4.87$  and  $0.05\text{ ppm}$ , respectively for each metal). A stirred tank type bioreactor of one liter capacity with pumice stone was used as a support of the immobilization to treat a mining relay, it evaluated the oxidation of

lactic acid and the reduction of sulfates where the bacteriometer obtained the best results with a final concentration of 1, 67 g / l lactic acid and 0.84 g / l sulfates; In percentage of metal precipitation similarly in strain 2M it obtained better results Cu 94%, Cd 83%, Pb 65% and Cr 44% (Final concentrations: 0.0008, 0.0004, 0.002 and 0.011 ppm, respectively). The chromium in both the bioreactor and in the solution has not reached a high percentage of the reduction by one of its is  $6 \times 10^{-37}$  much less to the other metals studied. In the study that showed that strain 2M had better results in the precipitation of heavy metals, the process by which metals precipitate the BRS reduce the sulphate to produce the sulphides, which are in contact with a heavy metal form the metal sulphides which are insoluble.

**KEYWORDS:** sulfate reducing bacteria, heavy metals, bioprecipitation, bioreactor, *Desulfovibrio*.



## INTRODUCCIÓN

En la actualidad los procesos metalúrgicos, la minería, erupciones volcánicas y actividades relacionadas con la utilización de metales o sustancias que contienen metales pesados son la principal causa de contaminación agua, aire y suelos. Estos tipos de actividades generan emisiones, fugas, derrames accidentales, descargas de efluentes y residuos tóxicos. En estos procedimientos se involucran mezclas con agentes contaminantes, dentro de ellos los metales pesados, como Cu(II), Pb(II), Cr(III) y Cd(II). Los metales pesados son los metales más peligrosos debido a que no pueden separarse en componentes menos dañinos, ya que no son biodegradables, estos influyen negativamente en la salud de humanos, animales y de todo ser vivo.

Estos contaminantes tienen la facilidad de acuerdo a sus características fisicoquímicas de moverse por distintos sistemas ambientales y pueden bioacumularse en distintos organismos vivos. Está comprobado que algunos de los metales pesados son altamente tóxicos, clasificándolos como teratogénicos y carcinogénicos (Leonard y Gerber, 1996). Por ello se hace necesaria la búsqueda de procesos de remediación de aire, suelos y aguas contaminadas. En los últimos años se ha incrementado el estudio y la implementación de técnicas biotecnológicas para tratar los daños ambientales que han causado los metales pesados.

El uso de bacterias reductoras de sulfato (BRS) es una opción para disminuir la concentración de metales en solución. Las BRS utilizan sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) como aceptor de electrones durante su metabolismo de sustrato y lo transforman a sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) el cual con un adecuado pH y potencial óxido reducción (POR) se formará los sulfuros metálicos insolubles, y ocurriría el proceso de precipitación.

En distintos trabajos de investigación en los cuales se han utilizado las BRS para precipitar metales pesados en solución, han usado este tipo de bacterias por su capacidad de formar sulfuros, los cuales forman afinidad por los metales. En dichas

investigaciones se midió un metal por solución estudiada, se demostró la capacidad de la bacteria al remover altos porcentajes de metal pesado. El uso de bacterias para remediar sistemas contaminados no es una alternativa convencional por el hecho de que no se conoce mucho sobre el tema, sobre el mantenimiento de cultivo de bacterias, y el proceso de instalación y operación de las mismas.

Se conoce muy poco sobre cómo actúan las bacterias reductoras de sulfato frente a los metales pesados. En el presente trabajo se diseñó y construyó un sistema de tratamiento biológico anaerobio. Se aisló e identificó cepas de BRS a partir de muestras ambientales de sitios que contenían sulfatos, sitios contaminados con algún metal pesado, sitios cercanos a actividad minera. Se estudió dos cepas seleccionadas por su actividad reductora de sulfato (ARS) y un consorcio bacteriano el cual estaba conformado por ambas cepas; cada microorganismo se puso en contacto con soluciones de metales pesados (Cu, Cd, Pb y Cr) cada metal por separado y también se acondicionaron dentro de un biorreactor sulfidogénico tipo tanque con agitación.



## CAPITULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1 JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de investigación se enfocará en estudiar las bacterias reductoras de sulfato (BRS) en la precipitación de metales pesados de interés en solución y en el tratamiento de un relave minero en un biorreactor sulfidogenico a escala de laboratorio.

Lo anterior en cuanto al análisis de distintos metales pesados y el tratamiento de muestras contaminadas con metales pesados no se ha estudiado profundamente usando BRS y porque cuando se aplique esta remediación va a ser una forma de separar metales que se encuentran en pequeñas concentraciones. Este trabajo tiene el objetivo de usar las bacterias reductoras de sulfato que son microorganismos anaerobios las cuales utilizan el sulfato como aceptor final de electrones, lo que resulta en la producción de sulfuro para le eliminación de metales pesados mediante la precipitación como sulfuros metálicos.

Esta investigación va encaminada en estudiar las cinéticas de crecimiento de cada bacteria, la metabolización de ácido láctico, la reducción de sulfatos y la precipitación de cuatro metales pesados. Esta información puede ser útil para elaborar un proceso de tratamiento de zonas contaminadas in situ.

Definir la capacidad de las BRS al precipitar metales pesados al inicio y final de la experiencia. Se obtendrá la información en 2 meses, en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María y a escala de laboratorio. La información se piensa obtener mediante ensayos de medición de los distintos parámetros de interés, así como también las respectivas repeticiones para la elaboración de los datos estadísticos.

#### 1.2 HIPÓTESIS

Dado que las bacterias reductoras de sulfato (BRS) producen sulfuro en contacto con medios con sulfatos es posible que su empleo en la bioremediación de

muestras contaminadas con metales pesados pueda precipitar dichos metales, mediante la formación de sulfuros metálicos insolubles.

### 1.3 OBJETIVO GENERAL

Bioprecipitar metales pesados (Cd, Pb, Cr y Cu) utilizando bacterias reductoras de sulfato (BRS) para su aplicación en un bioreactor continuo tipo tanque agitado (RCTA).

#### 1.3.1 Objetivos Específicos

- ❖ Aislar, caracterizar e identificar bacterias reductoras de sulfato de diferentes muestras ambientales.
- ❖ Evaluar el efecto del pH y la temperatura en el crecimiento de las cepas seleccionadas.
- ❖ Determinar la velocidad específica de crecimiento máximo ( $\mu_{max}$ ) y velocidad volumétrica de reducción de sulfato ( $r_{SO_4}$ ) de las dos cepas seleccionadas.
- ❖ Determinar las cinéticas de oxidación de ácido láctico y la reducción de sulfatos de cada cepa y el consorcio bacteriano en presencia de metales pesados y en el proceso de tratamiento del relave minero.
- ❖ Evaluar la bioprecipitación de metales pesados (Cr, Cd y Pb) en solución.
- ❖ Biorremediar relave minero procedente de Espinar – Cusco utilizando las bacterias reductoras de sulfato aisladas, en un biorreactor sulfidogenico.

## 1.4 VARIABLES E INDICADORES

Tabla 1. Definición operacional y conceptual de las variables

	VARIABLE	INDICADOR	UNIDAD	TIPO DE VARIABLE
<b>INDEPENDIENTE</b>	<b>Especie bacteriana empleada</b>	- Consorcio microbiano de bacterias reductoras de sulfato. - Cepas puras de bacterias reductoras de sulfato		Cualitativa, cuantitativa
	<b>Crecimiento de bacterias reductoras de sulfato</b>	- Numero de bacterias reductoras de sulfato por unidad de tiempo - Turbidez del medio por unidad de tiempo	Bacterias/mL Abs	Cuantitativa, continua
<b>DEPENDIENTE</b>	<b>Reducción de sulfatos</b>	Precipitación de sulfuros metálicos	g/L	Cuantitativa, continua
	<b>Producción de ácido láctico</b>	Medición del ácido láctico por titulación.	g/L	Cuantitativa, continua
	<b>Bioprecipitación de metales pesados (Cu, Cr, Cd y Pb)</b>	Concentración de cada metal en solución y relave minero, al inicio y final de la experiencia	ppm	Cuantitativa, continua

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 METALES PESADOS

Los metales se definen en base a sus propiedades físicas en el estado sólido como son: alta reflectividad, alta conductividad eléctrica, alta conductividad térmica, propiedades mecánicas como fuerza y ductilidad. Otra definición más práctica, desde el punto de vista de la toxicidad, se basa en sus propiedades cuando están en solución: “metal es un elemento que bajo condiciones biológicas puede reaccionar perdiendo uno o más electrones para formar un catión” (Cornelis y Nordberg, 2007). Los metaloides poseen propiedades físicas semejantes a las de los metales y no metales, éstos son el arsénico, germanio, antimonio, selenio y telurio. Los compuestos metálicos y metaloides se presentan en diferente estado de oxidación en agua, aire y suelo y presentan diversos grados de reactividad, carga iónica y solubilidad en agua.

La definición rigurosa de metal pesado todavía no es establecida por los científicos y es tema de discusión y polémica. Una de sus definiciones se basa en la gravedad específica: “metal pesado es aquel metal con gravedad específica  $> 5\text{g/cm}^3$ ”, sin embargo, esta definición no es útil respecto al estudio de los efectos toxicológicos que algunos metales tienen sobre el ambiente y los seres vivos, así que otra definición de metal pesado que se ha adoptado es “grupo de metales o metaloides asociados con contaminación y toxicidad potencial” (Cornelis y Nordberg, 2007).

#### Cadmio

El cadmio (Cd) es una sustancia natural en la corteza terrestre. Generalmente se encuentra como mineral combinado con otras sustancias tales como oxígeno (óxido de cadmio), cloro (cloruro de cadmio), o azufre (sulfato de cadmio, sulfuro de cadmio).

Todo tipo de terrenos y rocas, incluso minerales de carbón y abonos minerales, contienen algo de cadmio. La mayor parte del cadmio que se usa en los Estados Unidos es extraída durante la producción de otros metales como zinc, plomo y cobre. El cadmio no se oxida fácilmente, y tiene muchos usos incluyendo baterías, pigmentos, revestimientos para metales, y plásticos. (ATSDR)

El cadmio entra al aire de fuentes como la minería, industria, y al quemar carbón y desechos domésticos. En el aire, partículas de cadmio pueden viajar largas distancias antes de depositarse en el suelo o en el agua. El cadmio entra al agua y al suelo de vertederos y de derrames o escapes en sitios de desechos peligrosos. Se adhiere fuertemente a partículas en la tierra. Parte del cadmio se disuelve en el agua. No se degrada en el medio ambiente, pero puede cambiar de forma. Las plantas, peces y otros animales incorporan cadmio del medio ambiente. (ATSDR)

El Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS) ha determinado que es razonable predecir que el cadmio y los compuestos de cadmio son carcinogénicos. Respirar altos niveles de cadmio produce graves lesiones en los pulmones y puede producir la muerte. Ingerir alimentos o tomar agua con niveles de cadmio muy elevados produce seria irritación al estómago e induce vómitos y diarrea. El cadmio puede acumularse en los riñones a raíz de exposición por largo tiempo a bajos niveles de cadmio en el aire, los alimentos o el agua; esta acumulación puede producir enfermedades renales.

Lesiones en los pulmones y fragilidad de los huesos son otros efectos posibles causados por exposición de larga duración. En animales a los que se les dio cadmio en la comida o en el agua se observaron aumento de la presión sanguínea, déficit de hierro en la sangre, enfermedades al hígado y lesiones en los nervios y el cerebro. No sabemos si estos efectos ocurren en seres humanos expuestos a cadmio a través de los alimentos o del agua. Contacto de la piel con cadmio no parece constituir un riesgo para la salud ya sea en animales o seres humanos. (ATSDR).

## Plomo

El plomo (Pb) es un metal gris, blando y maleable que se obtiene por fundición ó refinamiento de las minas ó secundariamente por el reciclamiento de los materiales de deshecho que contengan plomo, como por ejemplo de las baterías de los automóviles. La intoxicación por plomo ocurre luego de la exposición a este metal; este tiene muchos usos y fuentes como pueden ser baterías para autos ya mencionadas, aditivo en la gasolina, revestimiento de cables, producción de tuberías, cisternas, protección de materiales expuestos a la intemperie, fabricación de municiones, pigmentos para pinturas y barnices, fabricación de cristales, esmaltado de cerámica, litargirio, soldadura de latas, antisépticos (agua blanca de Codex). El tetraetilo y tetrametilo de plomo se utilizan como aditivos y antidetonantes de gasolinas, contribuyendo a la contaminación ambiental.

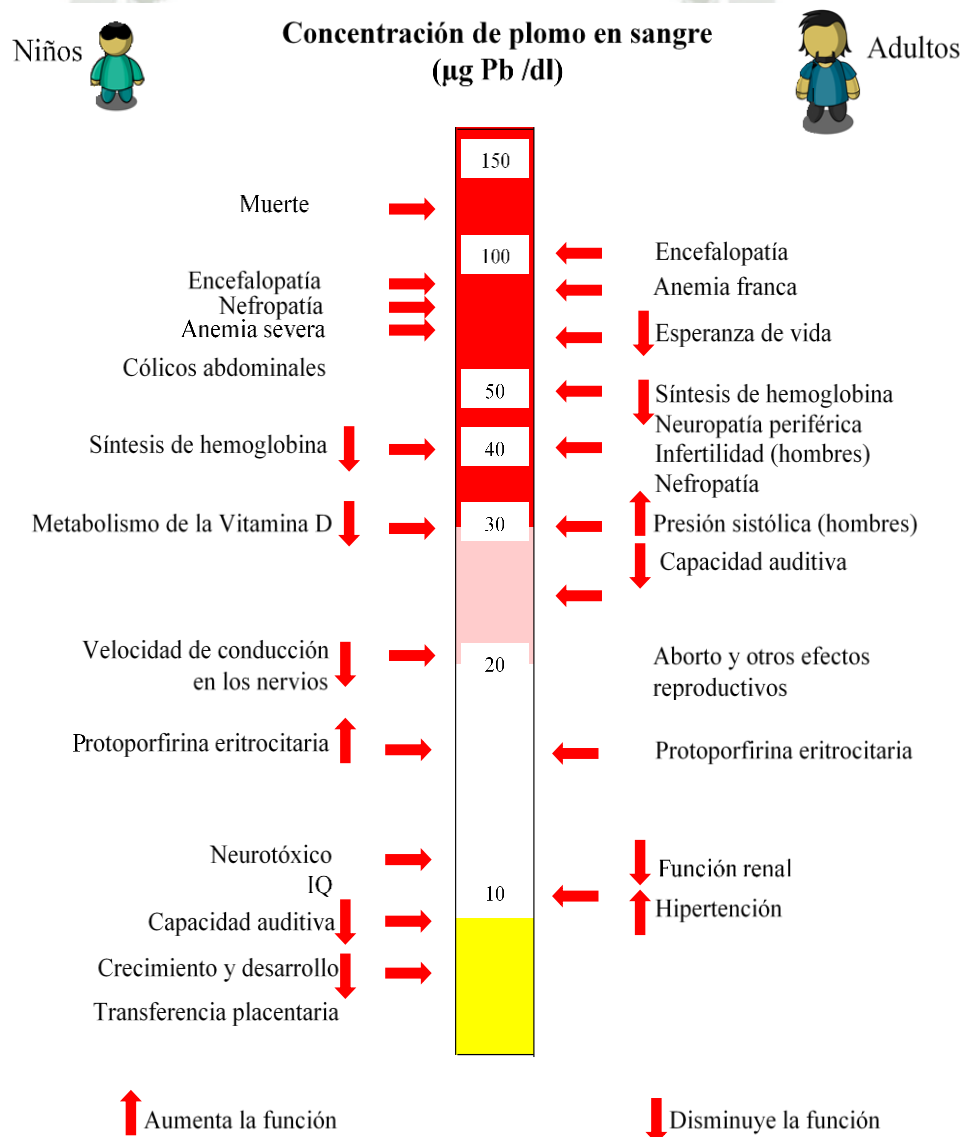
El plomo tiene gran afinidad por los grupos sulfhidrilo, en especial por las enzimas dependientes de zinc. El mecanismo de acción es complejo; en primer lugar, parece ser que el plomo interfiere con el metabolismo del calcio, sobre todo cuando el metal está en concentraciones bajas, el plomo altera el calcio de las siguientes formas (Shannon M, 1998):

- i. Reemplaza al calcio y se comporta como un segundo mensajero intracelular, alterando la distribución del calcio en los compartimentos dentro de la célula.
- ii. Activa la proteinquinasa C, una enzima que depende del calcio y que interviene en múltiples procesos intracelulares.
- iii. Se une a la calmodulina más ávidamente que el calcio, ésta es una proteína reguladora importante.
- iv. Inhibe la bomba de Na-K-ATPasa, lo que aumenta el calcio intracelular. Finalmente, esta alteración a nivel del calcio traería consecuencias en la neurotransmisión y en el tono vascular lo que explicaría en parte la hipertensión y la neurotoxicidad.

La toxicidad aguda se presenta luego de una exposición respiratoria a altas concentraciones, con encefalopatía, insuficiencia renal y síntomas gastrointestinales.

La toxicidad crónica es la más frecuente y se manifiesta con compromiso multisistémico: hematopoyético, del sistema nervioso, gastrointestinal, riñón y sistema reproductor.

El diagnóstico de la intoxicación por plomo suele ser difícil, ya que el cuadro clínico es sutil y los síntomas inespecíficos. Se ha descrito anomalía vertebral, atresia anal, defectos cardíacos, fístula esofágica, anomalías renales y anormalidades de las extremidades en un recién nacido de una madre con plumbemias altas durante el primer trimestre del embarazo (Figura 1).



**Figura 1. Plumbemia y manifestaciones clínicas.** (Tomado de Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Case Studies in Environmental Medicine: Lead Toxicity. US Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2006).

El Plomo puede terminar en el agua y suelos a través de la corrosión de las tuberías de Plomo en los sistemas de transportes y a través de la corrosión de pinturas que contienen Plomo. No puede ser roto, pero puede convertirse en otros compuestos.

El Plomo se acumula en los cuerpos de los organismos acuáticos y organismos del suelo. Estos experimentarán efectos en su salud por envenenamiento por Plomo. Los efectos sobre la salud de los crustáceos pueden tener lugar incluso cuando sólo hay pequeñas concentraciones de Plomo presente.

### **Cromo**

El cromo (Cr) es un elemento que se encuentra naturalmente en rocas, animales, plantas y en el suelo, en donde existe en combinación con otros elementos para formar varios compuestos.

Las tres formas principales del cromo son: cromo (0), cromo (III) y cromo (VI). Pequeñas cantidades de cromo (III) son necesarias para mantener buena salud. Se puede encontrar cromo en numerosos productos de consumo tales como: madera tratada con dicromato de cobre, cuero curtido con sulfato crómico, artículos de cocina de acero inoxidable, reemplazo de cadera metal-en-metal.

Se puede encontrar cromo en el aire, el suelo y el agua después de ser liberado por industrias que usan cromo, tales como industrias involucradas en galvanoplastia, curtido de cuero, producción de textiles, y en la manufactura de productos en base a cromo. El cromo también puede ser liberado al ambiente al quemar gas natural, petróleo o carbón.

El problema de salud más común que ocurre en trabajadores expuestos al cromo involucra a las vías respiratorias. Estos efectos incluyen irritación del revestimiento del interior de la nariz, secreción nasal, y problemas para respirar (asma, tos, falta de aliento, respiración jadeante). Los trabajadores también han desarrollado alergias a compuestos de cromo, lo que puede producir dificultad para respirar y salpullido en la piel.

Las concentraciones de cromo en el aire que pueden producir estos efectos pueden ser diferentes para los diferentes tipos de compuestos de cromo. Así, estos efectos ocurren con concentraciones de cromo (VI) mucho más bajas que de cromo (III). Sin embargo, las concentraciones que causan problemas respiratorios en trabajadores son por lo menos 60 veces más altas que los niveles que se encuentran normalmente en el ambiente. (ATSDR, 2012).

## **Cobre**

El cobre (Cu) es un mineral indispensable por las funciones que cumple en nuestro organismo. Al igual que los demás minerales, el cobre no puede ser fabricado por los organismos vivos. Como es necesario para mantener las funciones que significan estar vivos, se le denomina “esencial”. Por lo tanto, el hombre debe incorporarlo a su cuerpo desde el medio ambiente, principalmente desde los alimentos y el agua.

Es esencial porque forma parte de algunas proteínas que se necesitan para llevar a cabo procesos indispensables para mantener vivo al organismo, desde la concepción misma y durante toda la vida. (Copper)

El Cobre puede ser liberado en el medioambiente tanto por actividades humanas como por procesos naturales. Ejemplo de fuentes naturales son las tormentas de polvo, descomposición de la vegetación, incendios forestales y aerosoles marinos. Unos pocos de ejemplos de actividades humanas que contribuyen a la liberación del Cobre han sido ya nombrado. Otros ejemplos son la minería, la producción de metal, la producción de madera y la producción de fertilizantes fosfatados.

Cuando el Cobre termina en el suelo este es fuertemente atado a la materia orgánica y minerales. Como resultado este no viaja muy lejos antes de ser liberado y es difícil que entre en el agua subterránea. El Cobre no se rompe en el ambiente y por eso se puede acumular en plantas y animales cuando este es encontrado en suelos. En suelos ricos en Cobre sólo un número pequeño de plantas pueden vivir. Cuando los suelos de las granjas están contaminados con Cobre, los animales pueden absorber

concentraciones de Cobre que dañan su salud. Principalmente las ovejas sufren un gran efecto por envenenamiento con Cobre, debido a que los efectos del Cobre se manifiestan a bajas concentraciones. (Lennetch)

Cuando el agua contiene 4 miligramos de cobre por litro de agua aparecen los primeros individuos que sienten sensación de asco o náusea; cuando el contenido de cobre aumenta a 10 miligramos por litro en el agua que se bebe, el 30% de las personas sienten náusea.

## 2.2 BIOPRECIPITACIÓN

Dependiendo de la fase en la que se encuentra el metal, de su estado de oxidación y de la especie que es té conformando, la acción de un microorganismo puede responder a una de las siguientes alternativas. La movilización del metal, denominada lixiviación, 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 (Krebs y col., 1997), entre los cuales se destacan:

- i. Producción de ácidos orgánicos (cítrico, oxálico) o inorgánicos (sulfúrico).
- ii. Óxido-reducción de los metales.
- iii. Metilación de metales para dar compuestos más volátiles.
- iv. Producción de agentes complejantes y sideróforos.

La inmovilización con bacterias, pasaje de un estado soluble inicial, a uno insoluble, es una alternativa a los métodos fisicoquímicos tradicionales (Moosa y col., 2002). 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 coloidal es, 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 (Jong, y Parry, 2003).

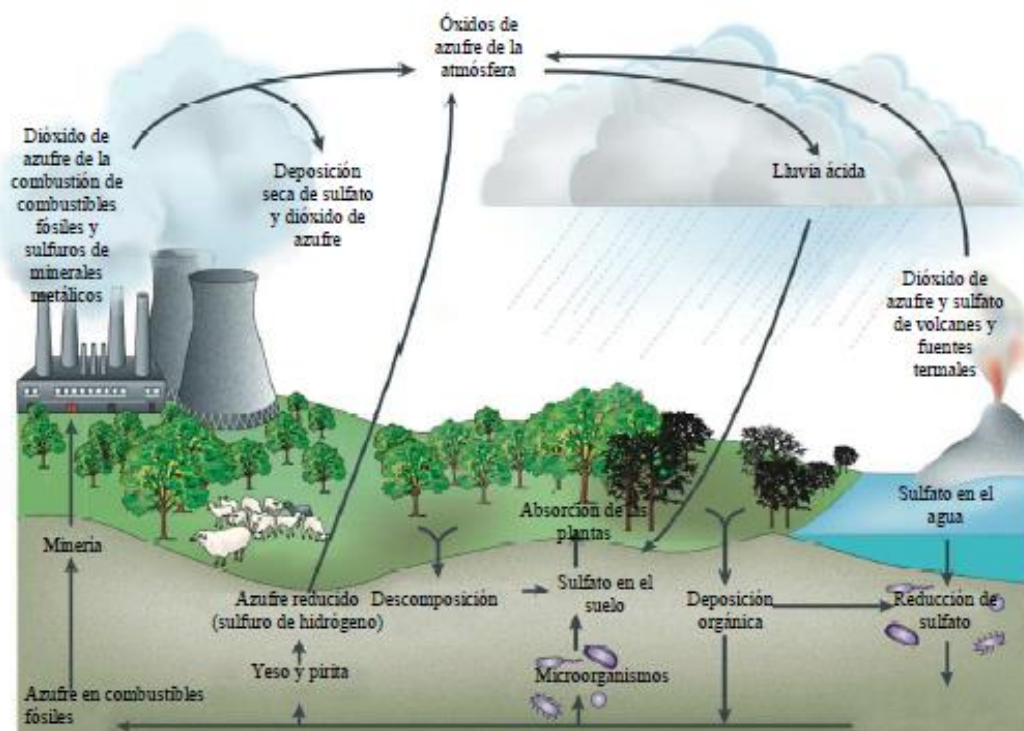
Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y tolerantes a metales. La habilidad de los microorganismos para sobrevivir a un ambiente con metales pesados implica mecanismos que potencialmente podrían ser utilizados para el tratamiento de las contaminaciones con esos metales a través de procesos de inmovilización (Vullo, 2003). Probablemente los dos procesos biológicos más relevantes en la inmovilización de metales son la biosorción y la bioprecipitación (Veglio y Beolchini, 1997). 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 (Nagpal y col., 2000).

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 (Davis y col, 2003; Veglio y Beolchini, 1997; Vullo, 2003; Whiteley y Lee, 2006). La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el cadmio, cromo, plomo, níquel, cinc y cobre.

En la bioprecipitación se utilizan microorganismos capaces de generar metabolitos que precipitan con muchos de los metales pesados (Malik, 2004). Un grupo importante de estos microorganismos son las bacterias denominadas sulfato-reductoras (BSR) (White y Gadd, 1996; Moosa y col., 2005; Jong, y Parry, 2003). 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.

### 2.3 BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO (BRS)

El azufre, uno de los elementos más abundantes en la Tierra, puede ser transformado química y biológicamente. El sulfato es tomado como nutriente, reducido a sulfato e incorporado luego en aminoácidos azufrados y enzimas, en un proceso que se conoce como reducción asimilatoria de sulfato. La reducción asimilatoria de sulfato no libera sulfuro al ambiente, a excepción de la putrefacción de los organismos muertos (Rabus *et al*, 2006). Las reacciones de oxidación y la reducción para la generación de energía metabólica son también importantes, como la reducción no asimilatoria de sulfato realizado por las bacterias reductoras de sulfato (BRS), microorganismos anaerobios que utilizan este compuesto como aceptor final de electrones, lo que resulta en la producción de sulfuro (Figura 2).



**Figura 2. Ciclo del azufre (Muyzer y Stams, 2008).** Los mayores depósitos de azufre son los sulfuros de hierro (pirita:  $\text{FeS}_2$ ) y el yeso ( $\text{CaSO}_4$ ) en sedimentos y rocas y el sulfato disuelto en el agua marina. El azufre es tomado como sulfato por los microorganismos y las plantas, y subsecuentemente por los animales, en un proceso de reducción asimilatoria. Las BRS son responsables de la reducción no asimilatoria del sulfato, que libera sulfuro al medio. La descomposición de la materia orgánica en anaerobiosis genera sulfuro de hidrógeno. La combustión de compuestos fósiles y las emisiones volcánicas desechan dióxido de azufre en la atmósfera, que interacciona con el agua formando ácido sulfúrico y resultando en la lluvia ácida.

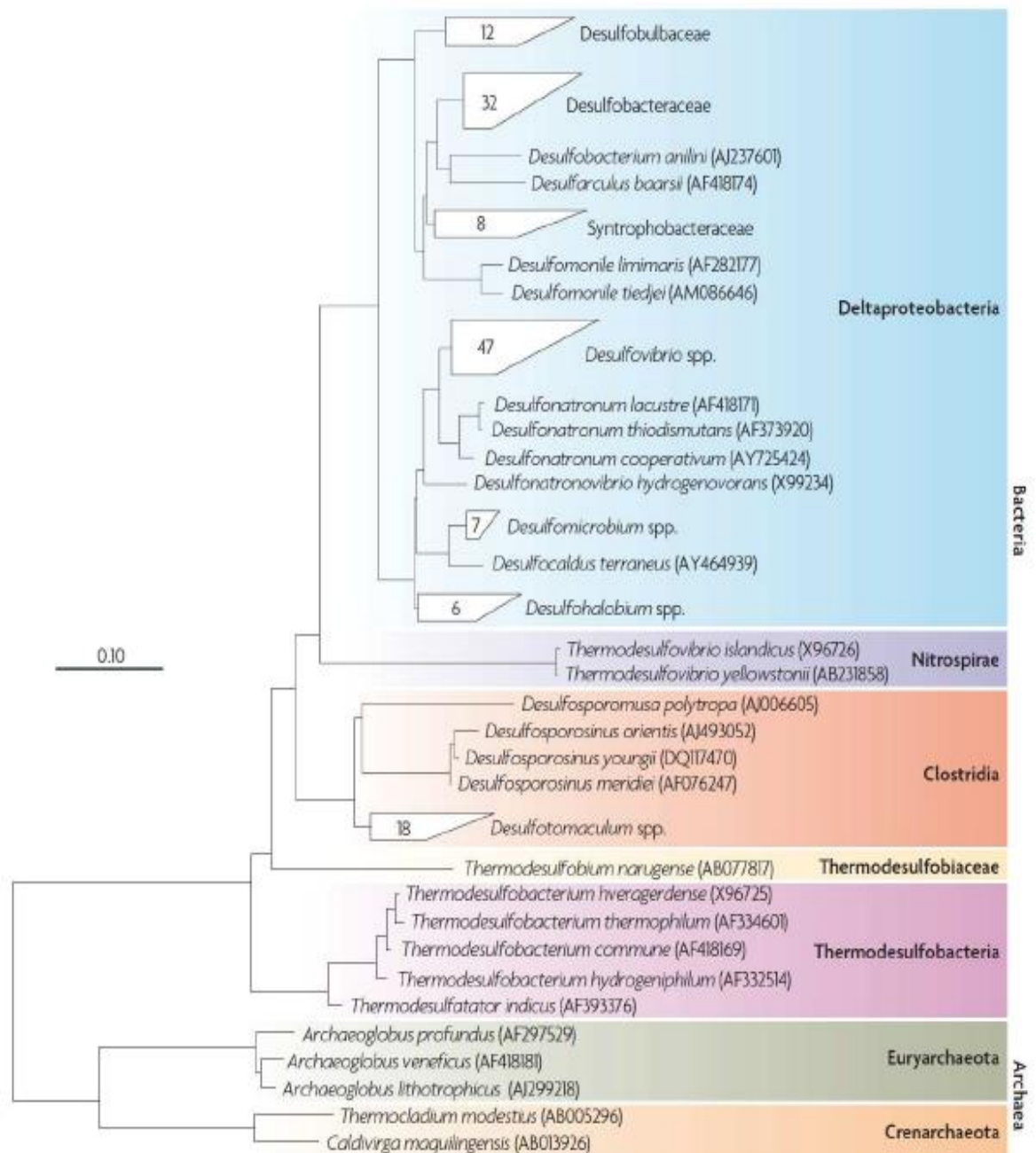
Dado que miembros de los dominios de las Bacterias y las Arqueas puede llevar a cabo este proceso, algunos investigadores usan el término procariotas reductoras de sulfato o microorganismos reductores de sulfato. Sin embargo, se utiliza usualmente el término BRS para referirse a ambos dominios (Muyzer y Stams, 2008).

El principal interés sobre las BRS se centra en su utilización en la remediación de efluentes con altos contenidos de sulfato y en el uso del sulfuro biológicamente producido para precipitar metales pesados en solución mediante la formación de sulfuros metálicos insolubles. Uno de los efluentes de interés es el drenaje ácido de mina (DAM). Los DAM son biolixiviados producidos en sitios mineros donde los sulfuros metálicos del suelo son expuestos al aire y el agua. Los DAM poseen pH ácido (entre 3 y 6), altas concentraciones de sulfato y de metales. La aplicación de biorremediación mediante BRS no sólo elimina los metales pesados y el sulfato del DAM, sino que además la actividad metabólica de estos microorganismos alcaliniza el pH ácido.

### **Clasificación de las BRS**

Hasta mediados de la década de 1980, la clasificación se había realizado mediante la observación de la nutrición microbiana, la morfología y de algunos marcadores bioquímicos como la proteína desulfovirdina (una enzima sulfito reductasa participante de la reducción no asimilatoria de sulfato), ácidos grasos específicos o menaquinonas (Rabus *et al.*, 2006). Los recientes avances en el análisis de la secuencia de ARNr 16S ha permitido una clasificación más exhaustiva y sistemática de la BRS. Basado en el análisis comparativo de secuencia del gen ARNr 16S, las BRS conocidas se pueden agrupar en siete linajes filogenéticos, cinco en Bactariae y dos en Archaea (Figura 3). La mayoría de los microorganismos reductores de sulfato corresponden a los 23 géneros pertenecientes al grupo de las Deltaproteobacterias, seguido por las BRS Gram-positivas dentro de las Clostridias (*Desulfotomaculum*, *desulfosporinus* y *Desulfosporomusa*). Existen tres linajes que contienen BRS termófilas, Nitrospirae (*Thermodesulfovibrio*), Thermodesulfobacteria (*Thermodesulfobacterium*) y Thermodesulfobiaceae (*Thermodesulfobium*). Dentro de

las Arqueas, existen BRS del género *Archaeoglobus* dentro del grupo Euryarchaeota, y el género *Thermocladium* y *Caldvirga* en Crenarchaeota.



**Figura 3. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial del gen ARNr 16S de especies descritas de BRS (Muyzer y Stams, 2008).** Siete linajes filogenéticos de organismos reductores de sulfato, dos en el dominio Archaea y cinco en Bactereae. El número de las ramas colapsadas indica la cantidad de especies dentro de un grupo. La barra de escala indica un 10 % de diferencia en las secuencias.

## Características de las BRS

Fisiológicamente se pueden dividir en tres grupos celulares básicos:

- i. Eubacterias gram negativas
- ii. Eubacterias gram positivas
- iii. Archeobacterias

Estas bacterias llevan a cabo el proceso de reducción desasimilatoria de sulfato (es decir, cuando el sulfuro producido en la reducción del sulfato no es incorporado a la biomasa); este ion es utilizado como un oxidante para la degradación de la fuente orgánica de carbono (Postgate, 1954). En forma general, este proceso puede representarse mediante la siguiente ecuación química:



Las características morfológicas de estas células varían considerablemente. Se han descrito distintos tipos celulares, entre los que se encuentran: bacilos, vibrios, cocos, espirilos, etc. (Widdel y Bak, 1992).

Las capacidades oxidativas y metabólicas de las BSR varían de acuerdo al género. Entre los compuestos orgánicos más utilizados se encuentran: lactato, acetato, piruvato, etanol, propanol y glucosa (Gibson, 1990). Los medios más utilizados para el crecimiento de BSR son los diseñados por J.R. Postgate (denominados medios B y C de Postgate) que poseen lactato como fuente de carbono. Además, el medio B contiene ácido ascórbico y tioglicólico como agentes reductores. Las composiciones detalladas de estos medios de cultivo serán descriptas en el siguiente capítulo.

Las bacterias sulfato-reductoras son estrictamente anaerobias y por lo general, son muy sensibles a los medios óxicos, muriendo de forma más o menos rápida cuando son expuestas a ese tipo de medios (Barton y Tomei, 1995).

Las BSR requieren ausencia de oxígeno para su crecimiento y también un potencial redox bajo (de aproximadamente 0 a -100 mV) (Gibson, 1990).

Los metales son importantes como cofactores para varias enzimas de las BSR y así son necesarios para el crecimiento. El níquel y el selenio son requeridos por la enzima hidrogenasa, el calcio es importante para incrementar la eficiencia del crecimiento en placa, por otra parte, el hierro es un elemento esencial para la producción de la hidrogenasa y de los citocromos (Barton y Tomei, 1995).

Las BSR crecen mejor bajo condiciones levemente alcalinas, en un relativamente estrecho rango de pH (entre 7,0 y 7,8). Sin embargo, se han encontrado BSR con capacidad de tolerar ambientes levemente ácidos (pH 4,0) así como también especies con capacidad de desarrollarse en ambientes alcalinos (pH 9,5) (Barton y Tome, 1995).

Un factor muy importante en la actividad de las bacterias sulfato reductoras es la temperatura del sistema. La mayoría de las BSR son mesófilas, es decir, con un crecimiento óptimo en el rango de temperatura de 25 a 40 °C (Okabe y Characklis, 1992).

Se ha comprobado que la actividad metabólica de las BSR es máxima cuando se encuentran formando biopelículas (biofilms) (Beyenal y Lewandowski, 2004).

### **Metabolismo de compuestos orgánicos**

En la reducción no asimilatoria de sulfato los sustratos orgánicos se oxidan y el sulfato se reduce produciendo  $\text{HS}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  que aumenta el pH de la solución. En estos casos, el donante de electrones y la fuente de carbono son el mismo compuesto. En casos minoritarios, se utiliza el hidrógeno como donante de electrones y el  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono. Debido a que gran parte del sustrato orgánico consumido por las BRS es oxidado para la conservación energética y sólo una pequeña fracción es asimilada en la biomasa, estos organismos poseen bajos rendimientos celulares. La estequiometría anabólica, catabólica y del metabolismo global para la oxidación incompleta de lactato se enumera en la Tabla 2. Se ha demostrado que los rendimientos catabólicos de crecimiento (de generación de acetato y reducción de sulfato) para *Desulfovibrio*

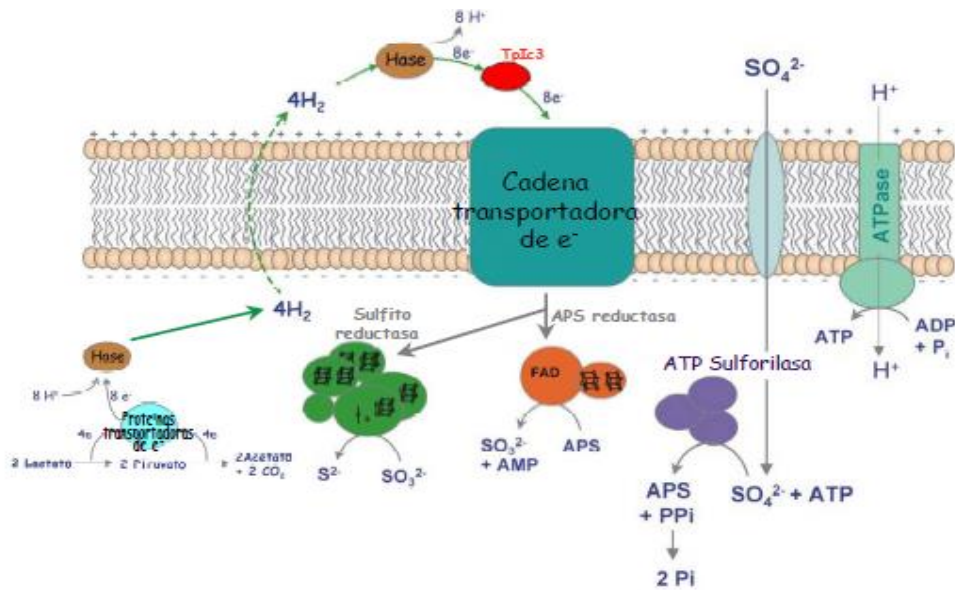
*desulfuricans* son independientes de las condiciones de cultivo (Okabe *et al.*, 1992, 1995; Okabe y Characklis, 1992); mientras que los rendimientos anabólicos de crecimiento (de producción de biomasa) y la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máxima}}$ ) son funciones de las necesidades energéticas de mantenimiento debido a las condiciones inhibitorias (Rabus *et al.*, 2006)

**Tabla 2. Estequiometria metabólica de oxidación de lactato de *Desulfovibrio desulfuricans* (Okabe y Characklis, 1992)**

Reacción	Estequiometria
Catabolismo	$\text{CH}_3\text{CHOHCOOH} + 0,5 \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{CO}_2 + 0,5 \text{H}_2\text{S} + \text{H}_2\text{O}$
Anabolismo	$\text{CH}_3\text{CHOHCOOH} + 0,6 \text{NH}_3 \rightarrow 3 \text{CH}_{1,4}\text{N}_{0,2}\text{O}_{0,4} + 1,8 \text{H}_2\text{O}$
Metabolismo global	$\text{CH}_3\text{CHOHCOOH} + 0,47 \text{H}_2\text{SO}_4 + 0,036 \text{NH}_3 \rightarrow 0,18 \text{CH}_{1,4}\text{N}_{0,2}\text{O}_{0,4} + 0,47 \text{H}_2\text{S} + 0,94 \text{CO}_2 + 0,94 \text{CH}_3\text{COOH} + 1,05 \text{H}_2\text{O}$

Diferentes mecanismos metabólicos se han usado para explicar la conservación energética de la reducción de sulfato acoplada a la utilización de sustratos orgánicos, como la oxidación del lactato acoplada a la reducción de sulfato por el mecanismo del hidrógeno (Figura 4) o el mecanismo del ácido fórmico.

Algunas BRS pueden crecer utilizando sulfito o tiosulfato como aceptores de electrones alternativos al sulfato, los cuales son reducidos a sulfuro. Solo algunas especies utilizan azufre elemental o nitrato como aceptor de electrones, los cuales son reducidos a sulfuro o amonio, respectivamente (Moura *et al.*, 1997). Por otro lado, las BRS utilizan una gran variedad de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, incluyendo ácidos mono- y di-carboxílicos alifáticos, alcoholes, compuestos aromáticos polares e incluso hidrocarburos (Rabus *et al.*, 2006). Sin embargo, el lactato es la fuente de carbono utilizada por la mayoría de las especies de BRS (Posgate, 1984). La desventaja de la utilización de lactato es que la mayoría de las especies lo oxidan parcialmente a acetato y  $\text{CO}_2$ , requiriendo una gran cantidad de sustrato para reducir el sulfato y generando efluentes de alta demanda química de oxígeno (DQO).



**Figura 4. Representación esquemática de la reducción de sulfato acoplada a la utilización de lactato en *Desulfovibrio* por el mecanismo del ciclo del hidrogeno (Matias *et al.*, 2005).** El mecanismo del ciclo del hidrogeno propuesto para explicar la conservación energética en *Desulfovibrio* creciendo con lactato y sulfato (Odom y Peck, 1981), describe que el poder reductor generado por la oxidación del lactato es transferido a una hidrogenasa citoplasmática para generar H<sub>2</sub>, el cual difunde al periplasma, donde es reoxidado. El aceptor de electrones para las hidrogenasas periplásmicas es el citocromo TpI-c3, el cual transfiere electrones a citocromos de complejos redox asociados a membrana. Los electrones generados que son transportados a través de la membrana se utilizan en la reducción citoplasmática del sulfato, dejando protones en el periplasma para activar la ATP sintasa. El sulfato reacciona con ATP para formar adenosina fosfosulfato (APS), catalizado por la ATP sulforilasa. El APS es reducido a sulfuro por la APS reductasa (afr), el cual es consecuentemente reducido por el sulfuro reductasa disimilatoria (srd) a sulfuro.

Las BRS se pueden clasificar en dos grupos en función de su capacidad funcional para oxidar los compuestos orgánicos completamente a CO<sub>2</sub> (incluido el acetato) o incompletamente a acetato y CO<sub>2</sub> (Iddel, 1998). La oxidación incompleta de los sustratos orgánicos se debe a la falta de un mecanismo para la oxidación terminal del acetyl-CoA. Las especies que pertenecen a las BRS de oxidación incompleta incluyen *Desulfomonas pigra*, *Thermodesulfobacterium commune* y la mayoría de las especies de los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonas* y *Desulfobulbus* (Colleran *et al.*, 1995). Algunas especies de los géneros *Desulfobacter*, *Desulfosarcina*, *Desulfococcus*

## Las biopelículas y sus características

El término biopelícula (biofilm) hace referencia a una serie de microorganismos que se encuentran agregados generalmente dentro de una estructura de exopolímeros y que se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas. Los exopolímeros, que son producidos por los mismos microorganismos, forman una matriz adherente en donde éstos quedan atrapados y comienzan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos. Estas conformaciones microbianas presentan características como: adherencia, heterogeneidad, diversidad de microambientes (pH, presión parcial de O<sub>2</sub>, concentración de iones y de otros sustratos), resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular (Betancourt y col., 2004).

La capacidad de formación de biofilm no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biofilms aunque su composición y estructura depende del microorganismo y de las condiciones en las que se forma.

Algunos estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz de un biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro del biofilm podamos encontrarnos con ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente (Branda y col, 2005).

La etapa inicial del proceso de formación del biofilm es la adherencia sobre la superficie. Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia. En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm y forma unas estructuras similares a setas (mushrooms) entre las cuales se observa la presencia de canales. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria. Finalmente, algunas

bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de desarrollo de formación del biofilm (Lasa y col., 2005).

Para adaptarse a la vida en el biofilm un microorganismo sufre, en general, cambios radicales. El campo del medio donde se encuentra, activa diferentes genes que codifican nuevas proteínas estructurales y enzimas. Estos genes y proteínas son los que explican la fijación y la resistencia de los microorganismos incluidos en las biopelículas ante los antibióticos o los desinfectantes.

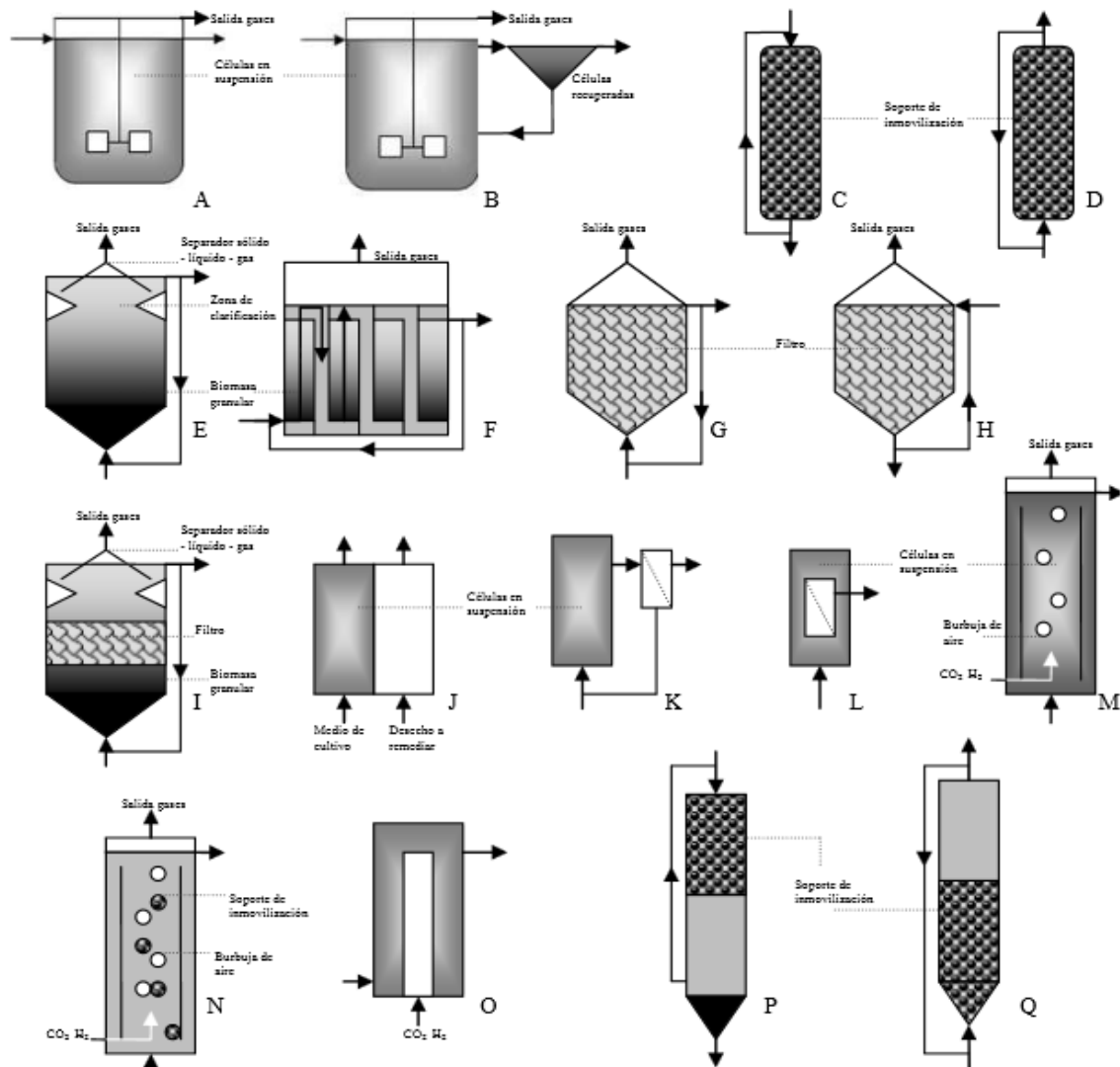
Los biofilms constituyen serios problemas en diferentes ámbitos como los de la salud u otros dentro del campo industrial debido no sólo a los problemas que acarrea la actividad microbiana y la del propio biofilm sino también a que su eliminación suele ser muy difícil (Betancourth y col., 2004). Un ejemplo muy importante dentro del ámbito industrial es el biofouling que consiste en la contaminación producida por actividad microbiana sobre diferentes superficies, generando corrosión de equipos, cascos de barcos, tuberías y de campos petroleros.

Por otro lado, existen procesos en los cuales la presencia de los biofilms garantiza la actividad microbiana deseada. Dentro de estos procesos se encuentran muchos de los procesos de biorremediación y, en particular, los de bioprecipitación de iones metálicos (Betancourt y col., 2000).

Precisamente, y como se ha adelantado, se ha comprobado que las bacterias sulfato-reductoras desarrollan los máximos niveles de actividad metabólica dentro de los biofilms (Beyenal y Lewandowski, 2004). En los sistemas naturales, la reducción de sulfato desasimilatoria tiene lugar en aquellas zonas de las biopelículas donde, por su profundidad respecto de la parte exterior, están garantizadas las condiciones anaerobias y en cambio no existen limitaciones severas a la difusión de sustratos.

## **2.4 REACTORES SULFIDOGENICOS**

El uso de BRS a través de tratamientos ex situ mediante sistemas activos en biorreactores (Figura 5) se ha centrado en maximizar la producción de sulfuro para optimizar la eliminación de metales pesados y de sulfato (Hao et al., 1996; Hulshoff Pol et al., 1998).



**Figura 5. Algunos biorreactores sulfidogénicos.** A. Reactor continuo tipo tanque agitado (RCTA); B. Reactor tipo tanque agitado con recuperación de células; C. Reactor de lecho empacitado de flujo descendente (RLEFD); D. Reactor de lecho empacitado de flujo ascendente (RLEFA); E. Reactor de lodo de flujo ascendente (UASB); F. Reactor de lodo con deflectores (RD); G. Filtro anaeróbico de flujo ascendente (FAFA); H. Filtro anaeróbico de flujo descendente (FAFD); I. Reactor híbrido de lodo y filtro anaeróbico (RH); J. Reactor de membrana extractiva (RME); K. Reactor de membrana localizada en serie (RMS); L. Reactor de membrana inmersa en el compartimento biológico (RMI); M. Reactor tipo gas-lift con células libres (GLL); N. Reactor tipo gas-lift con células inmovilizadas (GLI); O.

Reactor de membrana de fibra hueca (RMFH); P. Reactor de lecho fluidizado de flujo descendente (RLFFD); Q. Reactor de lecho fluidizado de flujo ascendente (RLFFA).

La reducción biológica de sulfato se puede lograr con células suspendidas o células inmovilizadas. La aplicación de células libres en biorreactores de cultivo continuo, tales como los reactores tipo tanque agitado (Moosa et al., 2002 y 2005; Herrera et al., 1997) (Figura 5.A) o gas-lift (Van Houten et al., 1994, 1995a, 1995b) (Figura 5.M) implica tiempos de residencia hidráulicos ( $t_R$ ) altos para evitar el lavado del reactor por arrastre de las células, o bien la aplicación de un sistema de recuperación y reincorporación de la biomasa lavada del biorreactor (por sedimentación, floculación, centrifugación o separación magnética) (Figura 5.B). En un biorreactor de células inmovilizadas, el tiempo de residencia de la biomasa se desacopla del  $t_R$ , por lo que es posible operar el reactor a flujos altos. La formación de biopelículas en los biorreactores de células inmovilizadas ofrece además resistencia a condiciones extremas tales como pH bajo, altas concentraciones de oxígeno (Kolmert et al., 1997) o altas concentraciones inhibidores, tales como los metales pesados y el sulfuro (Colleran et al., 1995; Lyew y Sheppard, 1997), generando velocidades de reacción óptimas en comparación con las bacterias en suspensión (Glombitza, 2001), proporcionando un aumento de la estabilidad del proceso (Alvarez et al., 2006) y mejorando el crecimiento microbiano (Chen et al., 1994; Costerton y Wilson, 2004).

Los biorreactores de flujo vertical se han utilizado en numerosos estudios (Dvorak et al., 1992; Cheong et al., 1998; Elliott et al., 1998; Drury, 1999; Tsukamoto y Miller, 1999; Chang et al., 2000; Willow y Cohen, 2003; Tsukamoto et al., 2004; Johnson y Hallberg, 2005b; Jong y Parry, 2003). En los biorreactores de lecho empacado (RLE) las células son inmovilizadas sobre un soporte. En los RLE de flujo descendente (Figura 5.C) el afluente se alimenta a través de la parte superior, mientras que en el modo de flujo ascendente (Figura 5.D) se alimenta a través de la parte inferior del reactor. Los biorreactores con flujo vertical pueden generar canales preferenciales por donde percola el líquido afluente. Los biorreactores de flujo ascendente tienden a evitar la compactación y la formación de canales (Neculita et al., 2007).

Los biorreactores de lodos granulares de flujo ascendente (up-flow anaerobic sludge bed reactors – UASB) (Figura 5.E) han sido aplicados para la reducción de sulfato (Colleran et al., 1994; Sánchez et al., 1997), pero el desarrollo de gránulos apropiados requiere varios meses y resulta más adecuado para aplicaciones metanogénicas (Omil et al., 1997). Debido a la granulación de la biomasa, no se requiere un soporte de inmovilización, lo que reduce los costos iniciales en comparación con otros sistemas de células inmovilizadas. Una variante del UASB es el reactor de lodo granular de lecho expandido (EGSB), donde la velocidad del flujo que atraviesa el lecho es suficiente para expandirlo y fluidizarlo. Los sistemas de reactores de lodo con deflectores (RD) son una variante de UASB con deflectores internos que fuerzan al líquido a fluir de modo sinuoso permitiendo aumentar el tiempo de contacto con la biomasa (Figura 5.F).

En los reactores de filtros anaeróbicos (Figura 5.G y 5.H) la biomasa es retenida en los intersticios del material de empaque del reactor sin adherirse al mismo y también como una biopelícula inmovilizada sobre el soporte. Existe una configuración híbrida entre los biorreactores de filtro anaeróbico y los de lodos granulares (Figura 5.I). El material soporte incluye materiales inorgánicos (polipropileno, perlas de vidrio y minerales alcalinos) (Kaksonen y Puhakka, 2007).

Los problemas asociados con el tratamiento anaerobio de aguas residuales mediante BRS están vinculados principalmente a los efectos tóxicos del H<sub>2</sub>S y los metales pesados. Una disposición útil para evitar este tipo de inconvenientes son los biorreactores de membrana extractiva (Figura 5.J) (Chuichulcherm et al., 2001), donde es posible separar los inhibidores del seno del reactor contenedor de las células libres. En este tipo de reactores, el residuo conteniendo los metales es pasado a través de la superficie de una membrana selectivamente permeable, mientras que el cultivo microbiano es mantenido del otro lado de la misma. El H<sub>2</sub>S permea del compartimento biológico al de los desechos y precipita los metales. Además, la membrana es impermeable a compuestos cargados, impidiendo el contacto con los metales, pH extremos y altas salinidades. Otro tipo de reactores de membrana son los de separación

de biomasa, que están conformados por un reactor de células libres y una unidad de filtración, lo que permite mayor retención de la biomasa en comparación con otros reactores de células libres. Existen diferentes configuraciones de acuerdo a la localización de la unidad de filtración, como los localizados en serie con el biorreactor (Figura 5.K) o inmersa en el biorreactor (Figura 5.L) (Mack et al., 2004).

Los reactores tipo gas-lift se aplican en sistemas que utilizan hidrógeno y dióxido de carbono para la reducción de sulfato (Figura 5.M y 5.N). La mezcla gaseosa se hace pasar por el líquido del reactor, se disuelve y difunde a las células, que pueden encontrarse libres o inmovilizadas sobre un soporte, lo que resulta en la formación de sulfuros. Dado que el hidrógeno es bastante insoluble en agua, los gases que no han reaccionado al salir del reactor se represurizan y reciclan. El  $H_2S(g)$  formado y eliminado del líquido debe ser separado de la corriente de gas de reciclaje para evitar su acumulación. Las principales desventajas del sistema son la baja solubilidad acuosa del hidrógeno, su pobre transferencia de masa, los problemas de seguridad derivados de su uso, y el empleo de células libres sujetas a un posible lavado por arrastre. El uso de un sistema de reactor de membrana de fibra hueca (Figura 5.O) supera los problemas de la utilización de reactores gas-lift. Las principales ventajas del sistema de reactor de membrana son la gran área expuesta a la fase líquida que presenta la membrana microporosa que resulta en flujos de masa altos, que el  $H_2S$  se forma fuera de la membrana y por lo tanto no se mezcla con el gas a presión en el interior de las fibras huecas, que no se requiere de un compresor de gas de reciclaje y que la membrana proporciona una superficie adecuada para la inmovilización de BRS. Debido a las limitaciones de transferencia de masa, los reactores gas-lift deben tener un volumen significativamente mayor que los reactores de membrana y los costos de operación son mayores debido principalmente a la recompresión y el reciclaje del gas (Tabak y Govind, 2003).

Los sistemas de lecho fluidizado (RLF) (Figura 5.P y 5.Q) impiden el taponamiento y la formación de canales en el lecho debido a la fluidización del soporte de inmovilización mediante la corriente del líquido (Cattony et al., 2005; Kaksonen et al., 2006a; Silva et al., 2006; Alvarez et al., 2006). El reactor anaeróbico de lecho

fluidizado de flujo descendente (RLFFD) es un sistema realmente útil en la eliminación de sulfato y metales pesados y la alcalinización de efluentes ácidos (Celis et al., 2009).

En otros sistemas de cultivo, el reactor sulfidogénico suele estar acoplado a una unidad de precipitación donde toma contacto el sulfuro con el metal, realizando la remediación del efluente en dos pasos al menos. El RLFFD utiliza pequeñas partículas que operan de soporte para la inmovilización celular, con una densidad específica más baja que la del líquido circundante, por lo que las partículas flotan en el reactor y son fluidizadas hacia abajo por acción del caudal descendente de alimentación y la recirculación del efluente (García-Calderón et al., 1998). En estos sistemas de cultivo, el proceso se produce en un solo paso, ya que es posible precipitar los metales en el mismo reactor en el que se desarrollan los microorganismos. El sulfuro metálico producido es arrastrado por el flujo hacia la base del reactor, donde precipita y permite ser separado de las partículas de soporte con la biopelícula en su superficie; impidiendo la oclusión del lecho (Jong y Parry, 2003) o la formación de canales (Kaksonen et al., 2006a), la inhibición causada por la presencia de sulfuro de metal (Utgikar et al., 2002) y permitiendo su recuperación. Además, la recirculación permite la neutralización del pH ácido y la precipitación de metales inmediatamente el agua residual ingresa al reactor, además de la dilución de sustancia inhibitorias del líquido ingresante (Sahinkaya y Gungor, 2010).

## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El trabajo se realizó en el laboratorio H - 301 “Laboratorio de Biología Molecular” de la Universidad Católica de Santa María y se mandó muestras a los Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L. para la medición de metales pesados.

#### 3.2 MATERIAL DE LABORATORIO Y REACTIVOS

##### EQUIPOS

- ❖ Autoclave
- ❖ Balanza analítica Marca Pioneer
- ❖ Estufa
- ❖ Centrifuga
- ❖ Centrifuga para Eppendorf
- ❖ Termostato
- ❖ Bombas peristálticas
- ❖ Vortex
- ❖ Espectrofotómetro
- ❖ Potenciómetro

##### MATERIAL DE VIDRIO

- ❖ Frascos de vidrio de 100 ml
- ❖ Frascos de vidrio de 1 Lt
- ❖ Tubos de ensayo con tapa
- ❖ Matraz Erlenmeyer
- ❖ Placas Petri
- ❖ Cámara de Neubauer

- ❖ Pipetas
- ❖ Vasos precipitados
- ❖ Celdas para espectrofotómetro

### **MATERIAL ACCESORIO**

- ❖ Agua destilada
- ❖ Agua desionizada estéril
- ❖ Agar
- ❖ Medio de cultivo SIM
- ❖ Complejo B
- ❖ Envases plásticos de 200 ml
- ❖ Tapones de goma
- ❖ Jeringas de tuberculina
- ❖ Jeringas (10 ml, 5ml)
- ❖ Tubos Eppendorf
- ❖ Tubos Falcon
- ❖ Micropipetas
- ❖ Puntas estériles (1000  $\mu$ l, 100  $\mu$ l)
- ❖ Papel filtro
- ❖ Asas de kohle (punta, aro)
- ❖ Filtro de aire (0.22  $\mu$ m)
- ❖ Bolsas plásticas
- ❖ Piedra pómez

### **REACTIVOS**

- ❖ Etanol
- ❖ Fenol
- ❖ Fenolftaleína
- ❖ Cloroformo
- ❖ Isoamilalcohol
- ❖ Ácido nítrico

- ❖ Acetato sódico
- ❖ Cloruro de bario
- ❖ Ácido ascórbico
- ❖ Ácido tioglicólico
- ❖ Citrato de sodio.7H<sub>2</sub>O
- ❖ Glicerina
- ❖ Cristal violeta
- ❖ Safranina
- ❖ Alcohol acetona
- ❖ Peróxido de hidrogeno
- ❖ Reactivo oxidasa
- ❖ Reactivo de kovac
- ❖ TE
- ❖ SDS 10%
- ❖ Proteinasa K
- ❖ CTAB
- ❖ RNAsa
- ❖ HCl(c)
- ❖ NaOH
- ❖ KCl
- ❖ HCl
- ❖ NaCl
- ❖ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- ❖ NH<sub>4</sub>Cl
- ❖ MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O
- ❖ MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O
- ❖ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- ❖ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- ❖ CaSO<sub>4</sub>
- ❖ FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O
- ❖ FeSO<sub>4</sub>
- ❖ CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O

- ❖  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- ❖  $\text{CdCl}_2$
- ❖  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
- ❖  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$

### 3.3 METODOLOGIA

#### CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS

##### Recolección de muestras y aislamiento de cepas

Las muestras ambientales fueron colectadas a partir de 8 diferentes zonas como se muestra en la Tabla 3, se tomaron los sedimentos del efluente y muestras de agua. Las muestras se recolectaron asépticamente en envases plásticos de 200 mL, fueron llenados por completo para mantener bajos niveles de oxígeno y rotuladas con el punto de muestreo, fecha, hora, temperatura, pH y observaciones particulares, tales como presencia de sólidos, coloración entre otras.

**Tabla 3. Zona, ubicación y Provincia de cada muestra.**

<b>Ubicación</b>	<b>Provincia</b>
<b>Curtiembre en Rio seco</b>	Arequipa
<b>Agua sulfurosa alcalina en Yura</b>	Arequipa
<b>Agua de Rivero descubierta en 1989 Yura</b>	Arequipa
<b>Relavera Antapaccay Espinar</b>	Cusco
<b>Tubo 1: Agua termal tajo Antapaccay Espinar</b>	Cusco
<b>Piscina 1: Agua de pozos de rebombeo Espinar</b>	Cusco
<b>Tubo 2: Agua termal tajo Antapaccay Espinar</b>	Cusco
<b>Piscina 2: Proviene del Tubo 1 y 2 Espinar</b>	Cusco

Los microorganismos fueron mantenidos y enriquecidos en el medio líquido Postgate B (Tabla 4), este medio permite la reducción de sulfato a sulfuro que se evidencia por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro ( $\text{FeS}$ ). Se distribuyó alícuotas de 90 mL de medio de cultivo en frascos con tapa rosca y se esterilizaron con calor húmedo a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 min.

**Tabla 4. Medio de cultivo líquido Postgate B modificado (Postgate, 1984).**

Sustancia	Cantidad (por litro)
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
CaSO <sub>4</sub>	1,0 g
Lactato de Ringer	49,84 ml
Extracto de levadura	1,0 g
Ácido ascórbico	0,1 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Ácido tioglicólico	0,1 ml
pH	7,0 – 7,5

Para el procedimiento de siembra cada frasco fue inoculado con 10 mL de la muestra, siendo cada muestra procesada por duplicado (Figura 6). Posteriormente, se llevó a 32 °C durante 8 días para permitir el crecimiento de bacterias reductoras de sulfato.



**Figura 6. Siembra de bacterias reductoras de sulfato en medio líquido Postgate B. A.** Muestras ambientales procedentes de Espinar – Cusco; **B.** Muestras ambientales procedentes de Arequipa.

Al observar el crecimiento bacteriano, se procedió a realizar la siembra en medio sólido Postgate C (Tabla 5), a partir de cada cultivo líquido, se tomó una alícuota de 0,1 ml con una jeringa estéril y se inoculó sobre el medio sólido. Usando un asa estéril, el inoculo fue distribuido sobre la superficie del medio empleando la técnica de siembra por agotamiento. Posteriormente, las placas petri se incubaron a 32 °C durante 5 días en una jarra de anaerobiosis.

**Tabla 5. Medio de cultivo solido Postgate C modificado (Postgate, 1984)**

Sustancia	Cantidad (por litro)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,0 g
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	4,5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,06 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,06 g
Lactato de Ringer	85,44 ml
Extracto de levadura	1,0 g
$\text{FeSO}_4$	0,004 g
Citrato de sodio. $7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g
Solución de anaerobiosis <sup>A, B</sup>	5 mL
pH	7,0 – 7,5

<sup>A</sup> Esterilizado por separado, mediante filtración; <sup>B</sup> (Tabla 6)

**Tabla 6. Solución de anaerobiosis**

Sustancia	Cantidad (por litro)
Ácido ascórbico	20,0 g
Ácido tioglicólico	20,0 ml
pH	7,0

Al observar la morfología de las colonias sobre el medio sólido, se procedió a realizar repetidos pases con el fin de garantizar su aislamiento y la obtención de cultivos axénicos. Seguidamente, se realizaron repiques en medio líquido Postgate B, y la caracterización macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana.

### **Caracterización morfológica y Bioquímica**

#### *Caracterización Macroscópica*

Se describió de forma detallada las colonias formadas sobre la superficie del medio sólido, se realizó mediante la inspección visual, se tuvo en cuenta parámetros como forma, color, borde y tamaño de las colonias.

### *Caracterización Microscópica*

Se realizó empleando la tinción de Gram, la cual permitió observar su morfología y el grupo al cual pertenecen. Se observará a 10X, 40X y 100X.

### *Identificación Bioquímica*

Las colonias aisladas fueron identificadas empleando pruebas bioquímicas convencionales. A continuación, se citan las pruebas realizadas:

- ❖ Siembra en medio SIM: Cada colonia aislada se sembró por picadura en medio SIM y llevando a incubar a 32 °C durante 4 días. Mediante esta prueba se determinó la motilidad, la capacidad de cada colonia para producir sulfuro de hidrogeno y la presencia de indol, para lo cual a cada tubo se le adicionaron 10 gotas de reactivo de Kovacs dejándolas resbalar por la pared interna del tubo.
- ❖ Determinación de Oxidasa: Se colocó un trozo de papel filtro sobre una tapa de una placa petri y se añadió 1 gota del reactivo oxidasa, sobre el reactivo se depositó una colonia y se observó si cambia de color en 10 segundos.
- ❖ Determinación de Catalasa: A partir de un medio sólido y empleando un asa en punta o de aro se tomó una colonia que fue depositada en una lámina portaobjeto y se adicionó una gota 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se observó la formación de burbujas.
- ❖ Determinación de Desulfovirdina: Cada cepa fue inoculada en 9 ml de medio Postgate B y se llevó a incubar a 32 °C x 8 días. Luego las muestras se centrifugaron por 15 min a 4500 rpm a 24 °C. Se re suspendieron las células en agua desionizada estéril. Luego a cada tubo se le adicionó 1 gota de 2N NaOH y se observó inmediatamente bajo luz UV. La presencia de una luz roja fluorescente indica la presencia de la enzima. Mediante esta prueba se determinaron las cepas que se utilizarían para las posteriores pruebas.

## Caracterización molecular

### *Extracción de RNAr*

El RNA genómico de las 2 cepas presuntamente caracterizadas como bacterias reductoras de sulfato por pruebas morfológicas y bioquímicas fue aislado a partir de 1,5 ml de cultivo joven en medio líquido Posgate B, mediante lisis mecánica con perlas de vidrio y siguiendo el método de descrito por Cullen y Hirsch (1998) (Figura 7).

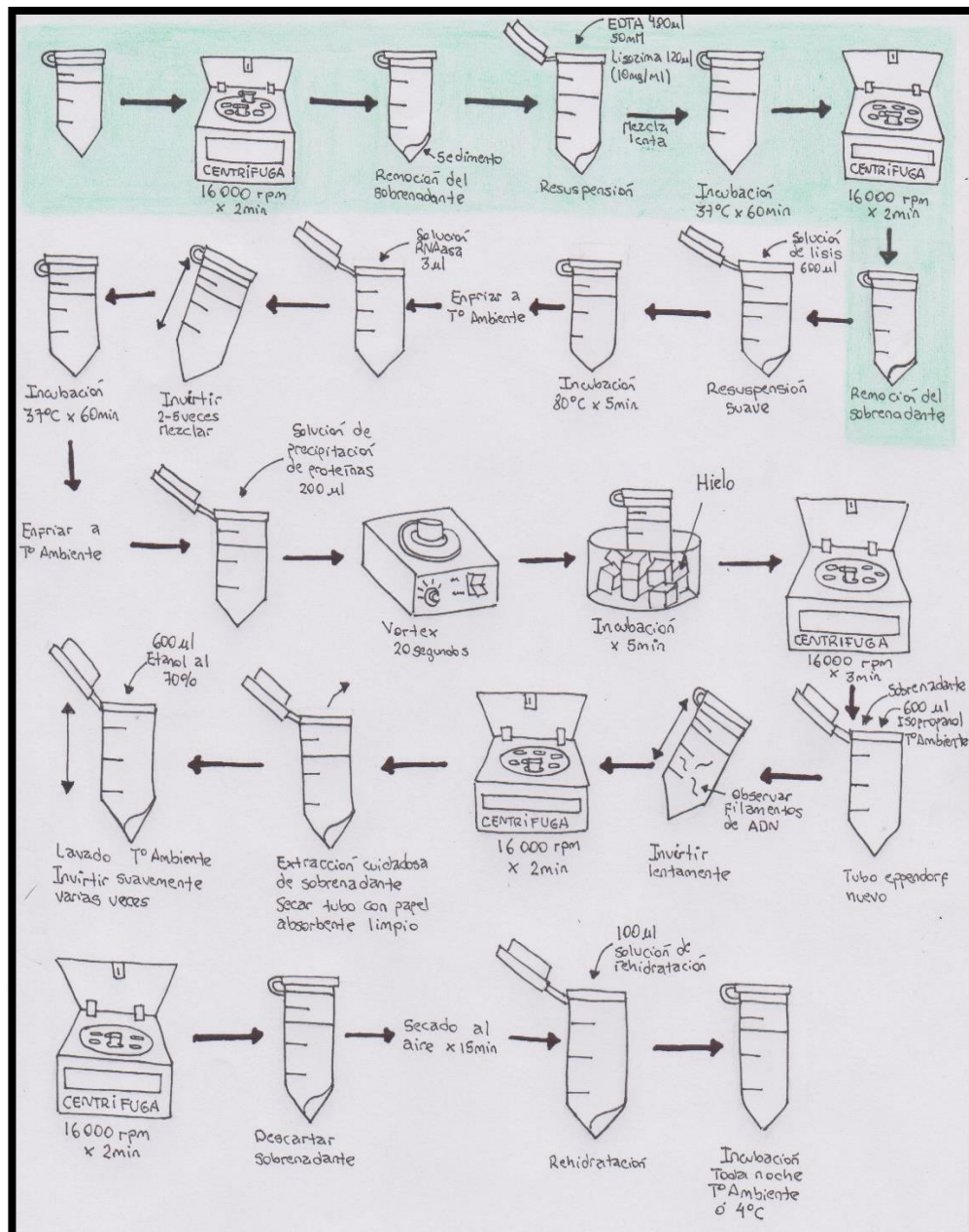
### *Amplificación usando PCR*

Se realizó una RT-PCR , usando primeramente una transcriptasa reversa, iniciadores universales para eubacterias y después iniciadores específicos para BSR. El DNA fue amplificado con 35 ciclos usando las condiciones de amplificación: desnaturalización a 94 °C, 1 min; alineamiento a 54 °C, 1 min; polimerización a 72 °C, 1 min. La desnaturalización inicial fue ejecutada a 94 °C por 5 min y un paso de extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR (10 ml de cada mezcla de reacción) fueron analizados en un gel de agarosa al 1 % (p/v) con regulador TAE 1X (Trisacetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) y teñido con Bromuro de etidio. Un marcador de talla molecular de DNA de 100 pb fue usado como estándar. Los geles fueron corridos durante dos horas.

La purificación de los productos de PCR a partir de agarosa se llevó a cabo con el kit QIAquick Gel Extraction aproximadamente a 100 V y el DNA fue visualizado con un transiluminador UV.

### *Secuenciación RNAr 16S de cada cepa*

Las secuencias de nucleotides que codifican los genes del 16S RNAr de bacterias reductoras de sulfato fueron depositadas en la base de datos de la NCBII (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); posteriormente se compararon con las secuencias disponibles en el GenBank Database: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>



**Figura 7. Método de extracción directa de ADN genómico.** Diagrama esquemático del método experimental usado para la extracción de ADN de cada cepa estudiada.

### Determinación de pH y temperatura óptimas

- ❖ Rango de crecimiento a diferentes temperaturas: Se tomaron tubos de ensayo con tapa rosca cada uno contuvo 9 ml de medio líquido Postgate B. Se rotularon con la cepa y temperatura a evaluar. Cada cepa fue procesada por triplicado en cada uno de las temperaturas (30°C, 45°C y 60°C). A cada tubo se le inoculó 1 ml de

cultivo bacteriano y se incubó hasta que el medio se volvió negro lo que indicó un resultado positivo.

- ❖ Rango de crecimiento a diferentes valores de pH: Se emplearon tubos de ensayo de tapa rosca cada uno contendrá 9 ml de medio líquido Postgate B y se inoculó 1 ml de la cepa. El pH del medio fue ajustado con soluciones 1M HCl y 1M NaOH a los diferentes valores a evaluar (4.5, 5, 8, 8.5) cada cepa por triplicado. Se incubaron a 32 °C hasta que el medio cambió a color negro que indicó resultado positivo.

#### DETERMINACIÓN DE LA $\mu_{m\acute{a}xima}$ Y $r_{so4}$

Se realizaron cultivos por duplicado de las cepas seleccionadas y obtenidas a partir de los consorcios (804, 2M) en medio Postgate G modificado (Tabla 7) el cual no contuvo la solución de microelementos y la solución de selenito, que interferirían en las determinaciones analíticas a realizar, se incubó a 32 °C en botellas herméticas de 50 ml sin cámara de aire.

**Tabla 7. Medio de cultivo sólido Postgate G modificado (Postgate, 1984)**

Sustancia	Cantidad (por litro)
NaCl	1,2 g
KCl	0,3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,31 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,3 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,2 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,15 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,4 g
Lactato de Ringer	79,75 ml
Solución de anaerobiosis <sup>A, B</sup>	5 ml
Solución de vitaminas <sup>A, B</sup>	1 ml
pH	7,0 – 7,5

<sup>A</sup> Esterilizado por separado, mediante filtración; <sup>B</sup> Tablas 6, 8

**Tabla 8. Solución de vitaminas**

Sustancia	Cantidad (por litro)
Complejo B	0,2 mg
pH	7,0 – 7,5

Se contaron en forma directa la cantidad de células y la concentración de ácido láctico al final del ensayo. Se determinó la concentración de sulfato en el tiempo para cada inóculo y se calcularon las velocidades volumétricas de reducción de sulfato ( $r_{SO_4}$ ) mediante la Ecuación:

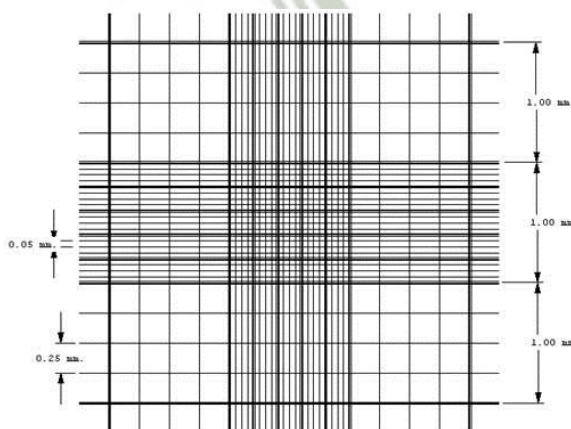
$$r_{SO_4} = \frac{([SO_4^{2-}]_f - [SO_4^{2-}]_i)}{\Delta t} \quad (3)$$

Donde,  $[SO_4^{2-}]_f$  y  $[SO_4^{2-}]_i$  son las concentraciones inicial y final de sulfato, y  $\Delta t$  es el tiempo de cultivo en el cuál se produjo la reducción de sulfato.

Se determinó la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\text{máxima}}$ ) de los aislados mediante estimación de la biomasa por la medición de la densidad óptica (DO) a 600 nm. Las mediciones se realizaron cada 5 días por 20 días.

### Conteo directo de células

Para contar de modo directo la cantidad de células se utilizó una cámara de Petroff-Hausser o cámara de Neubauer. Se utilizó un microscopio óptico.



$$\frac{\text{N}^\circ \text{ total de microorganismo}}{\text{ml}} = \frac{\text{Bacterias contadas} \cdot \frac{1}{\text{dilución}}}{\text{Número de cuadrados contados} \cdot 5 \times 10^{-8}} \quad (2)$$

## BIOPRECIPITACIÓN DE LOS METALES PESADOS

Se utilizaron 4 metales pesados Cr(III), Cu(II), Cd(II) y Pb. Se hicieron tres repeticiones, adicionalmente se realizaron controles abióticos para cada uno de los factores (donde el inóculo fue suprimido), y un control de cada cepa sin contenido de metales (pH neutro).

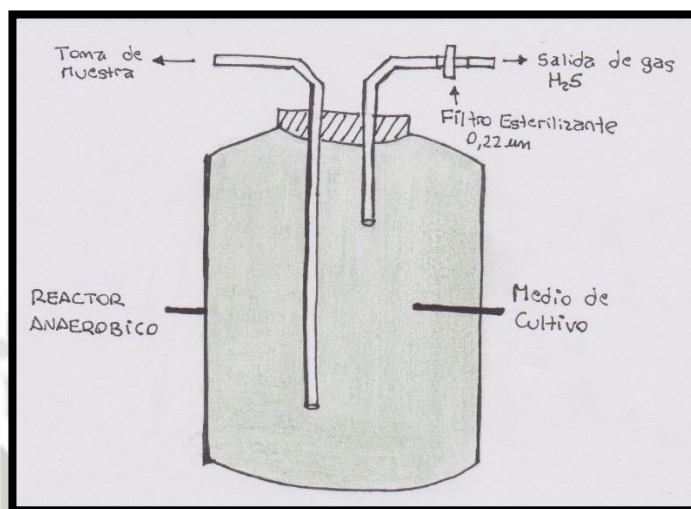
Todos los ensayos se llevaron a cabo en botellas de suero de 50 ml cerradas herméticamente con tapones de goma y llenas completamente con medio de cultivo Postgate G, se ajustó el pH con soluciones de NaOH o HCl. Bajo condiciones anaeróbicas se añadió 5 ml de inóculo y se complementó con soluciones estériles de los metales correspondientes. Se incubó a 30 °C hasta que no se detectó consumo de sulfato. Se determinó las concentraciones de sulfato, metales pesados, de ácido láctico al inicio y final de la experiencia.

Se tomó muestras a tiempo 0, 5, 10, 15 y 20 días, se determinó las concentraciones de sulfato y de ácido láctico de cada uno de los tiempos con el objetivo de obtener las cinéticas de metabolización de estos compuestos en presencia simultánea de los metales ensayados.

## ARMADO DE BIOREACTOR TIPO TANQUE

El experimento fue realizado usando un biorreactor de 1000 ml de capacidad, al cual se le añadió medio Postgate G sin el agregado de FeSO<sub>4</sub>. Se utilizó un biorreactor para cada cepa y para el consorcio con ambas cepas, en cada biorreactor se colocó piedra pómez que sirvió como soporte para las bacterias. El reactor fue cerrado herméticamente y se le adicionó solución para anaerobiosis antes de la inoculación. Luego se adicionó 130 ml de relave esterilizado a cada biorreactor. La agitación del cultivo se mantuvo periódicamente. La temperatura se mantuvo a 30 °C, el pH fue mantenido en el valor prefijado de  $7,5 \pm 0,2$  mediante la medición constante con tiras

de pH. Se realizó un control (relave + medio de cultivo) en paralelo a los biorreactores para evidenciar el cambio de color en los reactores.



**Figura 8. Diagrama esquemático del dispositivo utilizado para el cultivo batch**

La Figura 8 muestra un diagrama esquemático del dispositivo experimental usado para los estudios de tratamiento de relave. La primera muestra fue tomada inmediatamente después de inocular para registrar la condición inicial del cultivo. Posteriormente, se tomaron muestras en intervalos de 5, 10, 15 y 20 días. En la muestra inicial y final se hizo la medición de metales pesados, también se mandó a analizar el relave para saber los tipos de metales pesados existentes en la muestra.

## METODOS ANALITICOS

### Determinación de sulfato

La concentración de sulfato se determinó por el método turbidimétrico se utilizó un espectrofotómetro a 450 nm. Cuando se adiciona bario a una solución conteniendo sulfato, el sulfato de bario precipita según la Ecuación:



Antes de la determinación del sulfato remanente en el medio de cultivo, los elementos suspendidos (bacterias y sólidos inorgánicos) se separaron de la muestra por

centrifugación, ya que la presencia de éstos interfería en la medida de turbidez. A 500 µl de muestra, estándar o blanco (agua) se le agregaron 12,5 ml de agua y 500 µl de solución reguladora (7,5 ml de glicerina, 4,5 ml HCl(c), 11,25 g NaCl, 15 ml etanol y 45 ml de agua destilada). Se agregó cloruro de bario en polvo en exceso, se mezcló en un vortex vigorosamente, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia. La curva de calibración se realizó utilizando una solución de sulfato de sodio.

### **Determinación de metales pesados en solución**

La concentración de metales pesados en solución se midió por el método de espectroscopia de plasma ICP - OES. Previamente las muestras se filtraron con una membrana de tamaño de poro de 0,22 µm para remover biomasa y sólidos en suspensión.

### **Determinación de ácido láctico**

Se midió 20 ml de muestra en un matraz Erlenmeyer y se diluyó agregando dos veces su volumen con agua destilada. Se añadió un ml de solución de fenolftaleína y se tituló con hidróxido de sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosado que persista de 15 a 30 segundos.

$$\text{Acidez } \frac{\text{g}}{\text{Lt}} (\text{ácido láctico}) = \frac{V \times N \times 90}{M} \quad (5)$$

V = Volumen de solución de hidróxido de sodio 0.1 N gastado en la titulación de la muestra, en ml.

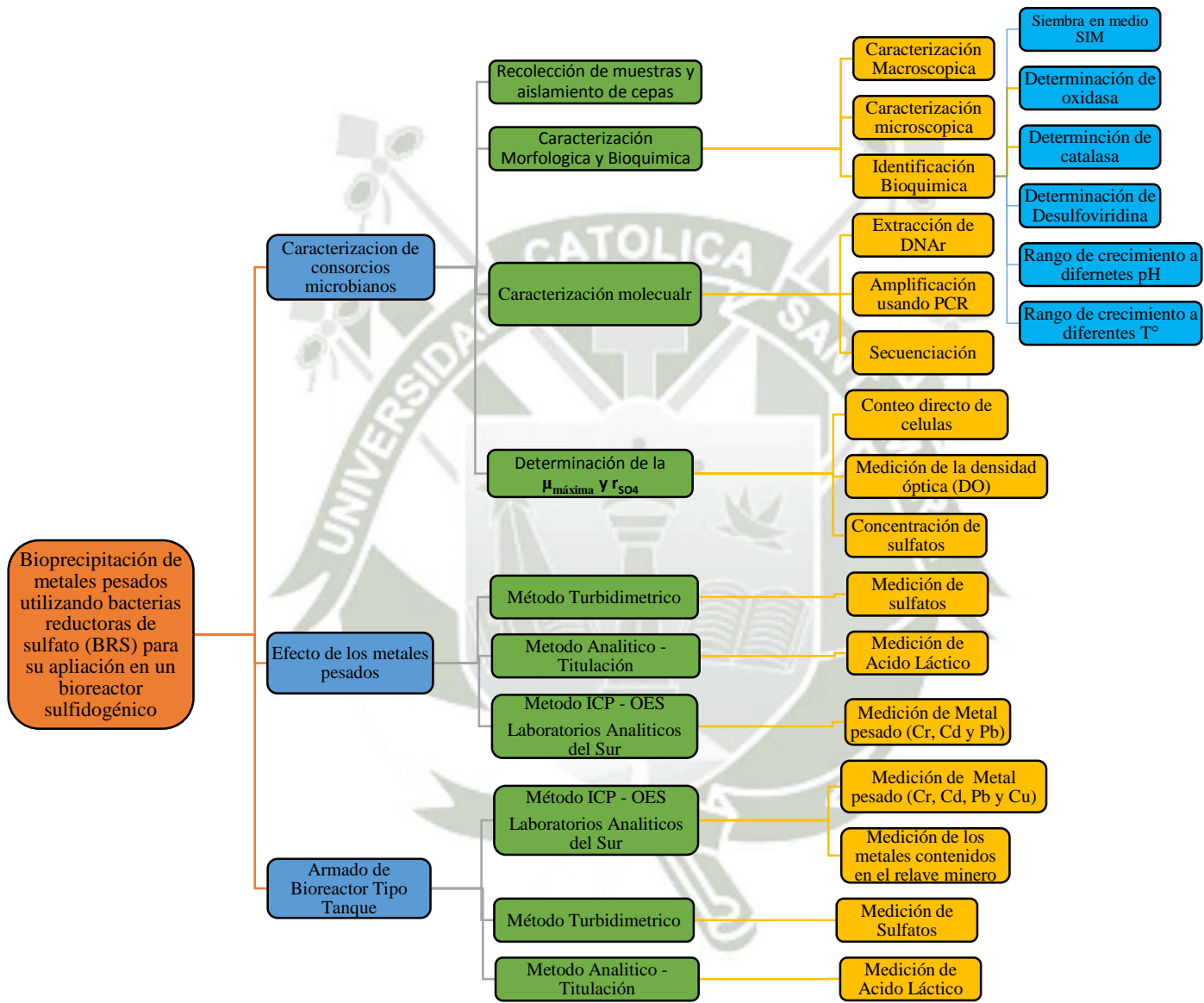
N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

M = Volumen de la muestra, en ml

90 Equivalente del ácido láctico.

### **Determinación de densidad óptica**

Para estimar la biomasa se determinó la DO a 600 nm mediante un espectrofotómetro, se utilizó el agua destilada como blanco.



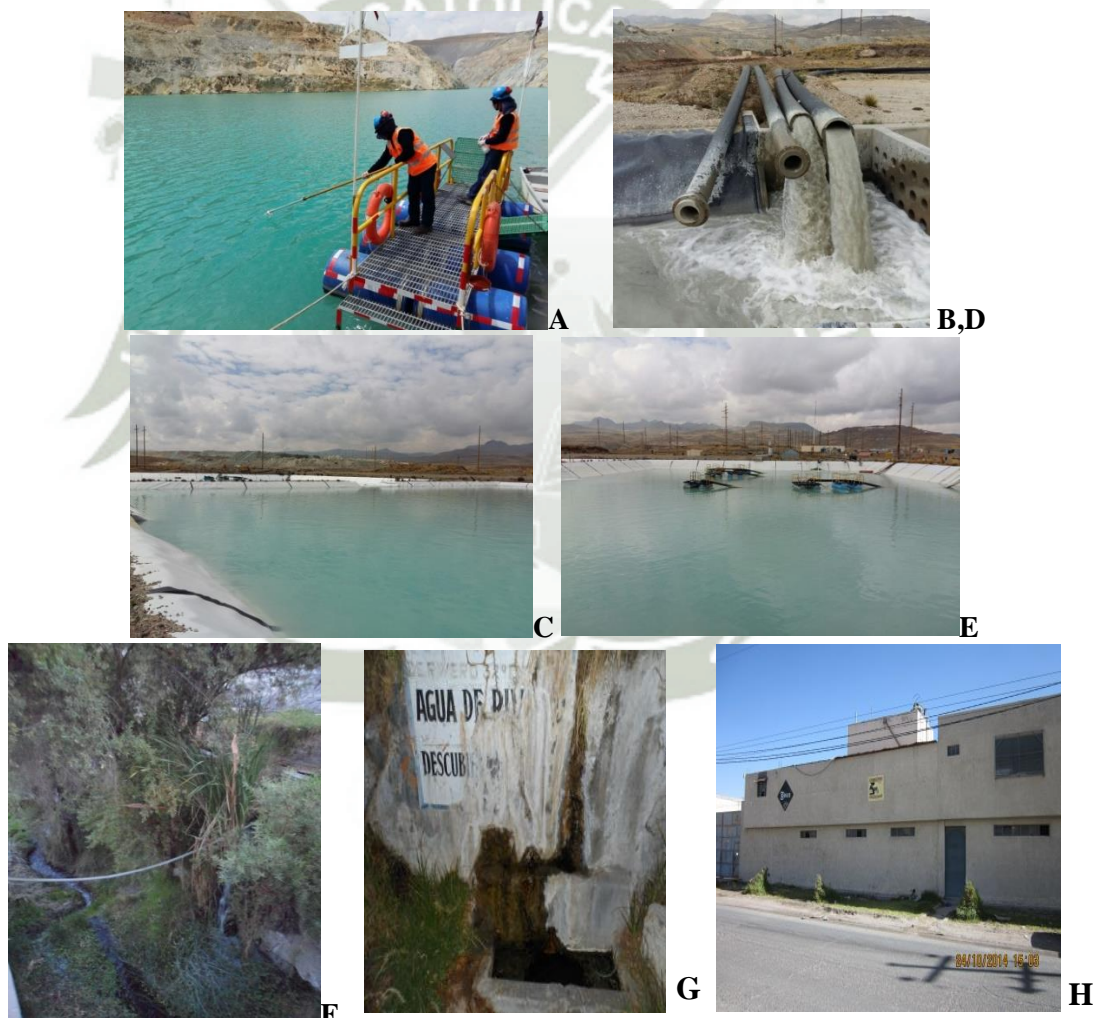
## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS REDUCTORES DE SULFATO

##### Comunidades microbianas reductoras de sulfato

Se obtuvieron muestras ambientales denominadas 001, 002, 003, 004, 005, 006, 007 y 008 las cuales fueron inoculadas en medio Postgate B.



**Figura 9.** Sitios de origen de las muestras. **A.** Relavera Antapaccay- Espinar, Cusco (001); **B.** Tubo 1: Agua termal bajo Antapaccay – Espinar, Cusco (002); **C.** Piscina 1: Agua proviene de pozos de rebombeo – Espinar, Cusco (003); **D.** Tubo 2: Agua Termal bajo Antapaccay – Espinar, Cusco (004); **E.** Piscina 2: Agua proviene de pozos de rebombeo – Espinar, Cusco (005); **F.** Muestra de agua en un riachuelo; **G.** Muestra de agua en un manantial; **H.** Edificio de la Universidad Católica de Santa María.

**E.** Piscina 2: Proviene de Tubo 1 y Tubo 2 – Espinar, Cusco (005); **F.** Agua sulfurosa alcalina – Yura, Arequipa (006); **G.** Agua de rivero descubierta en 1989 – Yura, Arequipa (007); **H.** Curtiembre – Río seco, Arequipa (008).

Las muestras 001, 002, 003, 004 y 005 fueron obtenidos de la Compañía Minera Antapaccay ubicada en el sureste de la Provincia de Espinar, Cuzco. La mina Antapaccay ( $14^{\circ}53'S$ ,  $71^{\circ}18'W$ ), posee una relavera de donde se aisló la muestra 001 (Figura 9.A), pozos de rebombeo de relave de donde se aisló la muestra 003 (Figura 9.C), Tubos de transporte de agua termal de donde se aisló la muestra 004 (Figura 9.D), Piscina que contiene la mezcla del agua termal con el relave, permitió aislar la muestra 005 (Figura 9.E). Luego cercana a la mina existe una fuente de aguas termales de la cual se aisló la muestra 002 (Figura 9.B). Numerosos estudios han caracterizado los microorganismos acidófilos de zonas parecidas a las muestras tomadas como es el caso de la investigación realizada por Nina Chambe. M (2008) que determino la presencia de BRS en la Mina Cerro de Pasco desarrolladas a pH ácido.

Las muestras 006 y 007 fueron obtenidos de salida de un riachuelo y de un pozo situados en el Distrito de Yura, Arequipa. Yura es conocida por sus aguas termales las cuales están divididas en dos grupos: Aguas sulfurosas y aguas ferruginosas. Cerca del pozo de agua sulfurosa llamado “Tigre” se encuentra un riachuelo del cual se aisló la muestra 006 (Figura 9.F). Luego cercano al mismo pozo caminando unos cuantos metros en dirección al pozo zamacola se encuentra un pequeño pozo, del cual se aisló de la salida de agua la muestra 007 (Figura 9.G), ambas muestras tomadas presentaron un olor como huevo podrido característico de la presencia de BRS. En este tipo de ecosistema ya se ha demostrado la viabilidad de BRS (J.F. Albert *et al.*, 1978).

La muestra 008 provino de los sedimentos del efluente de una curtiembre en Río Seco, Arequipa (Figura 9.H) que presentaban las características típicas de presencia de BRS (olor a sulfuro de hidrogeno y ennegrecimiento). En este tipo de ecosistema se ha demostrado la viabilidad de bacterias reductoras de sulfato (Boshoff *et al.*, 2004).

Las muestras aisladas presentaron dos fases: una líquida acuosa y otra líquida orgánica (crudo), a excepción de las muestras de agua que fueron fases líquidas. En la

Tabla 9 se observan los puntos y fechas de muestreo, lugar de muestreo, codificación de las muestras en el laboratorio, pH y temperatura de las mismas.

**Tabla 9. Muestras colectadas en el campo**

Código de la muestra	Tipo de muestra	Lugar de Muestreo	Punto de muestreo	Hora/Fecha de muestreo	pH	T °C	Descripción
001	Líquido acuoso/ orgánico	Relavera Antapaccay-Espinar, Cusco	proviene de agua de proceso y agua de las piscinas	15/11/15 11:00 am	8.47	17.4	Las muestras 001, 002, 003, 004 y 005 fueron obtenidas de la Compañía minera Antapaccay (14°53'S, 71°18'W) ubicada en el sureste de la Provincia de Espinar. Cerca de la mina existe una fuente de aguas termales.
002	Líquido acuoso/ orgánico	Agua termal tajo Antapaccay – Espinar, Cusco	Tubo 1	15/11/15 8:10 am	7.52	20.2	
003	Líquido acuoso/ orgánico	Agua proviene de pozos de rebombeo – Espinar, Cusco	Piscina 1	15/11/15 9:00 am	7.68	18.9	
004	Líquido acuoso/ orgánico	Agua termal tajo Antapaccay – Espinar, Cusco	Tubo 2	15/11/15 8:00 am	7.55	20.0	
005	Líquido acuoso/ orgánico	Proviene de tubo 1 y tubo 2 – Espinar, Cusco	Piscina 2	15/11/15 9:20 am	7.70	20.0	
006	Líquido acuoso	Agua sulfurosa alcalina – Yura, Arequipa	Chorro entre las rocas	04/12/15 5:00 am	6.5	20.8	Muestra tomada de la salida de un riachuelo
007	Líquido acuoso	Agua de rivero descubierta en 1989 – Yura, Arequipa	Pozo	04/12/15 5:10 am	7.0	28.2	Muestra tomada de un pozo pequeño
008	Líquido acuoso/ orgánico	Curtiembre – Rio seco, Arequipa	Contenedor de salida de agua de lavado d cuero	04/12/15 5:45 am	6.5	18.6	Se tomó los sedimentos del efluente

### Aislamiento de cepas de BRS y caracterización

Transcurrido el tiempo de crecimiento, se observó el ennegrecimiento del medio de cultivo en algunas de las muestras indicando crecimiento de bacterias reductoras de sulfato (Figura 10a). Las bacterias, llevan a cabo la reducción del sulfato presente en el medio, a sulfuro (característico por su olor azufrado) y posteriormente se da lugar a la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro, FeS (Figura 10b). El medio de Postgate B usualmente contiene altas concentraciones de hierro ferroso, formando un precipitado blancuzco. Este reacciona con el sulfuro para producir sulfuro ferroso de color negro, actuando, así como indicador de actividad metabólica y crecimiento (Garrity, 2005).



**Figura 10. a) Crecimiento de bacterias reductoras de sulfato en medio líquido. b) Precipitado de Sulfuro de Hierro.**

Al observar el ennegrecimiento del medio, se procedió a realizar un pase en medio sólido Postgate C, empleando la técnica de siembra por agotamiento. Después de incubar en jarra de anaerobiosis durante seis días (Figura 11), se observó el crecimiento de las colonias bacterianas. Estas fueron evaluadas mediante inspección visual y según sus características fueron clasificadas como colonias diferentes, las cuales fueron descritas y sembradas en nuevas placas Petri con medio sólido Postgate B, por la técnica de siembra por agotamiento.

A partir de cada placa Petri se tomó una colonia que se inoculó en un tubo de ensayo con medio Postgate B, llevando a incubación durante 8 días a 32 °C, con el fin de mantener los aislados en medio líquido.



Figura 11. Crecimiento de BRS en anaerobiosis.

En total se lograron obtener veintidós cepas de las muestras colectadas inicialmente como se observa en la Tabla 10, cada cepa fue rotulada con números para facilitar el trabajo en los posteriores análisis.

Tabla 10. Cepas aisladas a partir de las muestras colectadas

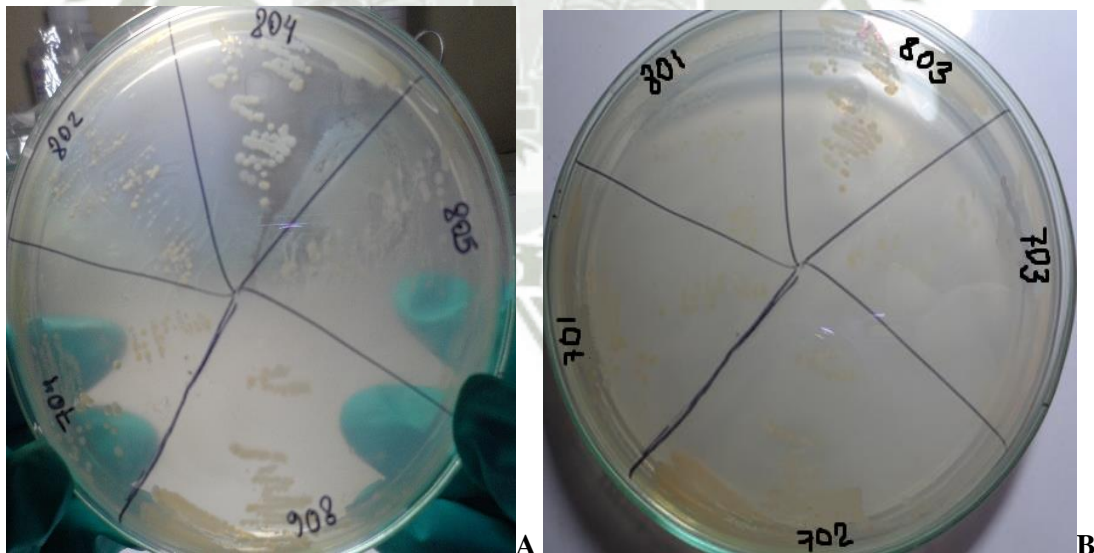
MUESTRA	CEPAS AISLADAS	PROCEDENCIA
002	2M	Agua termal tajo Antapaccay - Espinar, Cusco (Tubo 1)
	2CH	
003	301	Agua de pozos de rebombeo – Espinar, Cusco
	302	
	303	
004	401	Agua termal tajo Antapaccay - Espinar, Cusco (Tubo 2)
	402	
	403	
	404	
	405	
006	601	Agua sulfurosa alcalina - Yura
	701	Agua de rivero descubierta en 1989 – Yura, Arequipa
	702	
007	703	
	704	
	705	
	706	
008	801	Curtiembre – Rio seco, Arequipa
	802	
	803	
	804	
	805	
	806	

### *Caracterización macroscópica*

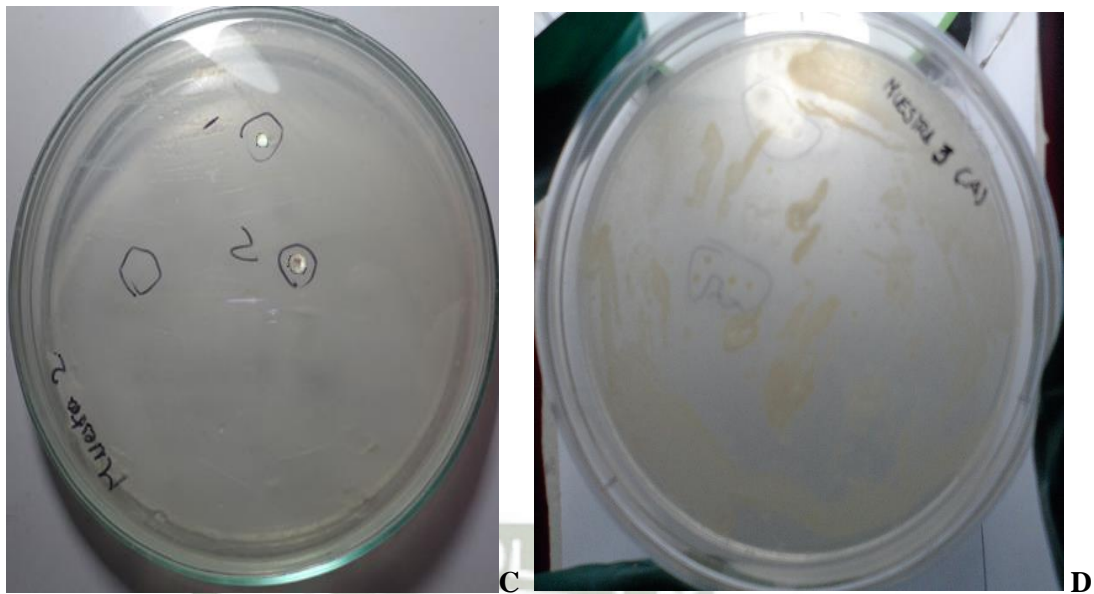
Después de incubar las bacterias en medio sólido y observar su crecimiento, se realizó la descripción morfológica de sus colonias teniendo en cuenta los siguientes parámetros: forma, superficie, elevación, borde, tamaño, color, lustre, consistencia, entre otros (Tabla 11). Parra Chavez. D.C (2008) realizó el aislamiento de BRS las cuales tenían las mismas características morfológicas descritas en este trabajo.

Como se observa en la Figura 12, 13 y 14, la mayoría de los aislados presentaron una morfología común con respecto a su elevación de tipo convexo, con una depresión en el centro, se observó la variedad en los tamaños de las colonias, pueden ser desde pequeñas casi punteadas hasta grandes, siendo las primeras las más jóvenes y las últimas las maduras.

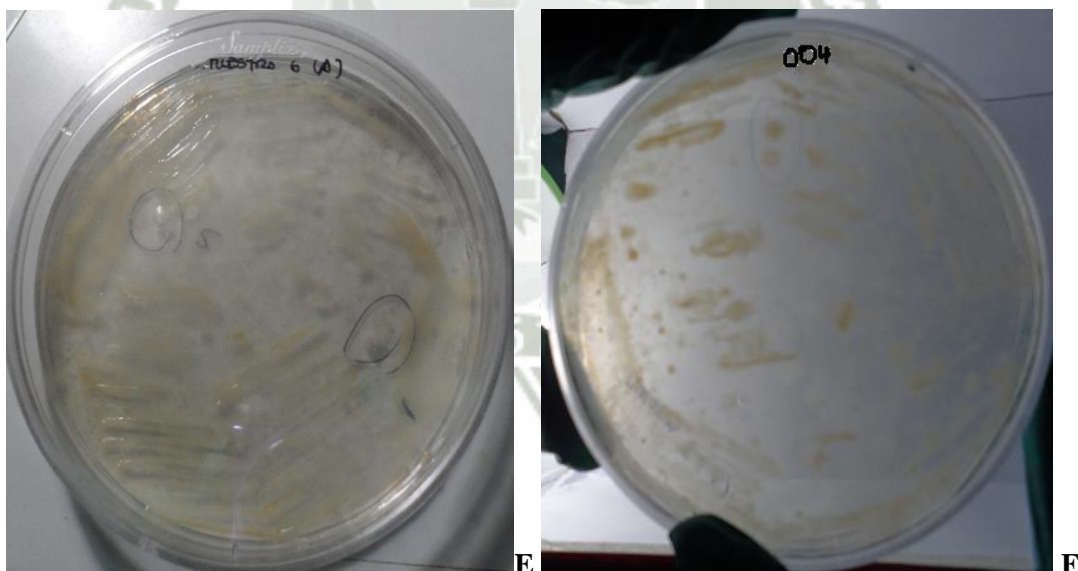
En cuanto a la coloración las colonias eran grises blancuzcos, con respecto a la forma de las colonias, la mayoría de ellas fueron redondeadas, superficie lisa y borde entero.



**Figura 12. Crecimiento macroscópico de las colonias de las muestras 007 y 008 en medios Postgate C sólido. A. Colonias 704, 802, 804, 805, 806; B. Colonias 701, 702, 703, 801, 803; Se observan en ambas figuras colonias grises blancuzcas, redondas puntiformes.**



**Figura 13. Crecimiento macroscópico de las colonias de las muestras 002 y 003 en medios Postgate C sólido. C. Colonias 2M, 2CH; D. Colonias 301, 302, 303. Se observan colonias cremas con punto negro en el centro, la mayoría de colonias son lisas del mismo modo son puntiformes y pequeñas.**



**Figura 14. Crecimiento macroscópico de las colonias de las muestras 004 y 006 en medios Postgate C sólido. E. Colonia 601; F. Colonias 401, 402, 403, 404, 405. Se observa que la mayoría de colonias son cremas, pequeñas y redondas**

Por otra parte, los aislados que mostraron variación en su morfología, fueron las cepas 303, 402, 405, 704 y 805. Sus colonias exhibieron una pigmentación blanca, forma irregular, bordes irregulares, sin brillo y de tamaño mediano.

De acuerdo a lo anterior, se infiere que las colonias de las bacterias sulfato reductoras aisladas, presentan variación morfológica según su estado de madurez. Inicialmente, su elevación y tamaño son mínimos y al entrar en etapas maduras su elevación y tamaño son mayores; cambiando de colonias convexas y pequeñas, a umbilicadas y grandes.

En la mayoría de colonias de observo una zona más oscura o un punto negro en la parte central de la colonia formando una depresión. Esta depresión, se presume podría permitir la expulsión del sulfuro de hidrógeno producto del metabolismo bacteriano, el cual se acumula en la colonia.

La mayoría de las colonias de los aislados presentaron una coloración gris blanquizca o blanquecina y forma redondeada, características observadas por Ollivier *et al.*, (1988) al describir una bacteria reductora de sulfato del género *Desulfovibrio*, aislada a partir de sedimentos estuarinos.

**Tabla 11. Descripción morfológica de las colonias**

<b>Parámetros Cepas</b>	<b>Forma</b>	<b>Borde</b>	<b>Elevación</b>	<b>Color</b>	<b>Superficie</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Lustre</b>	<b>Consistencia</b>
<b>301</b>	Redonda	Entera	Convexa	Blanquecina	No lisa	Pequeña	Brillante	Mucoide
<b>302</b>	Redonda	Entera	Convexa	Crema con punto oscuro en el centro	Lisa	Pequeña	Brillante	Mucoide
<b>303</b>	Irregular	Irregular	Convexa	Blanca	Lisa	Mediana	No brillante	No mucoide
<b>401</b>	Redonda	Entera	Convexa	Crema oscura con punto en el centro	Lisa	Pequeña	No brillante	Mucoide
<b>402</b>	Irregular	Irregular	Convexa	Crema con punto negro	Lisa	Mediana	No brillante	No mucoide
<b>403</b>	Redonda	Entera	Convexa	Blanco con punto negro en el centro	No lisa	Grande	Brillante	Mucoide
<b>404</b>	Redonda	Entera	Convexa	Blanca con punto negro en el centro	Lisa	Pequeña	No brillante	Mucoide
<b>405</b>	Irregular	Irregular	Convexa	Blanca	Lisa	Grande	No brillante	Mucoide
<b>601</b>	Redonda	Entera	Convexa	Blanca con centro oscuro	Lisa	Pequeña	Brillante	No mucoide
<b>701</b>	Redonda	Entera	Convexa	Blanquecina con punto negro	Lisa	Pequeña	Brillante	Mucoide
<b>702</b>	Redonda	Entera	Convexa	Blanquecina con punto negro	Lisa	Pequeña	No brillante	Mucoide
<b>703</b>	Redonda	Entera	Umbilicada	Blanca con punto negro	Lisa	Grande	Brillante	Mucoide

Sigue a la pág. 52 ...

... viene de la pág. 51

<b>Parámetros Cepas</b>	<b>Forma</b>	<b>Borde</b>	<b>Elevación</b>	<b>Color</b>	<b>Superficie</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Lustre</b>	<b>Consistencia</b>
<b>704</b>	Irregular	Irregular	Convexa	Blanquecina con punto negro	No Lisa	Mediana	No brillante	Mucoide
<b>705</b>	Redonda	Entera	Convexa	Blanca	Lisa	Pequeña	Brillante	Mucoide
<b>801</b>	Redonda	Entera	Convexa	Blanquecina	No lisa	Mediana	No brillante	Mucoide
<b>802</b>	Redonda	Entera	Convexa	Blanquecina oscura	Lisa	Grande	Brillante	Mucoide
<b>803</b>	Redonda	Entera	Convexa	Blanquecina oscura	Lisa	Grande	Brillante	Mucoide
<b>804</b>	Redonda	Entera	Convexa	Blanco oscuro	Lisa	Mediana	Brillante	No mucoide
<b>805</b>	Irregular	Irregular	Convexa	Blanquecina con punto negro en el centro	Lisa	Pequeña	No brillante	No mucoide
<b>806</b>	Redonda	Entera	Convexa	Blanca con punto oscuro en el centro	No lisa	Pequeña	No brillante	No mucoide
<b>2M</b>	Redonda	Entera	Convexa	Blanca con punto negro	Lisa	Mediana	Brillante	Mucoide
<b>2CH</b>	Redonda	Entera	Convexa	Blanquecina	Lisa	Pequeña	Brillante	Mucoide

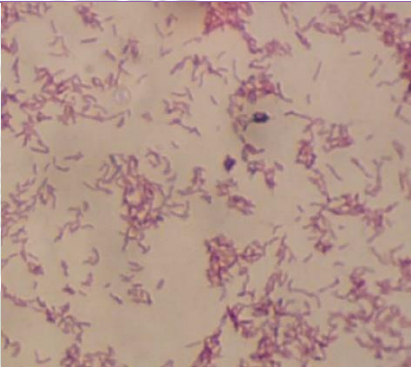
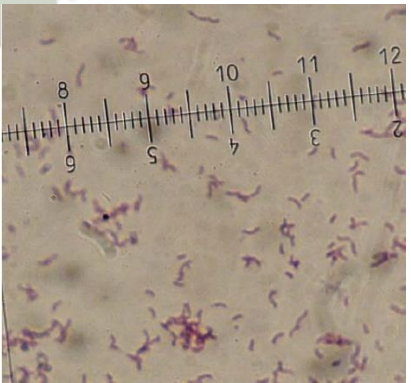
*Caracterización microscópica*

Al realizar la tinción de Gram y observar con el menor aumento, fue evidente la formación de agregados celulares rodeados por partículas de Sulfuro de Hierro presentes en el medio de cultivo.

Los veintidós aislados presentaron una tinción característica de las bacterias Gram negativas. Las células exhibieron morfología de bacilos rectos, curvos sigmoides y vibrios. No se observaron esporas. En la tabla 12 se resume las características generales de cada cepa y su correspondiente observación en el microscopio a 100X.

Fue notoria una distribución particular, pues la mayoría de las células se disponían en cadenas de hasta tres dando una apariencia filamentososa; en pares en los cuales las células se presentaron paralelas entre sí o en cadena e individuales.

**Tabla 12. Principales características microscópicas de las cepas**

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	OBSERVACIÓN MICROSCOPICA A 100X
2M	Bacterias Gram negativas Bacilos grandes. Rectos, curvos y sigmoides Algunos distribuidos en cadenas de 2 a 4 células.	
2CH	Bacterias Gram negativas Bacilos rectos, curvos, sigmoides y vibrios	

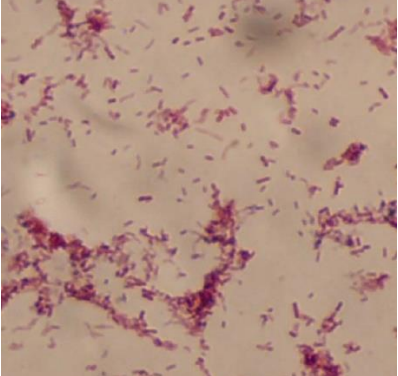
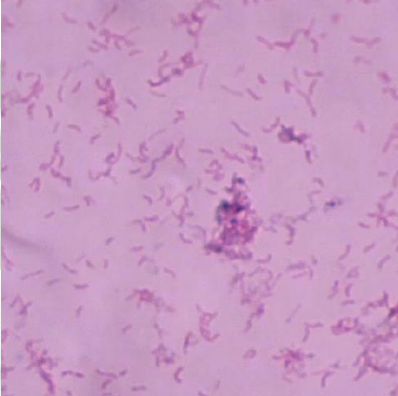
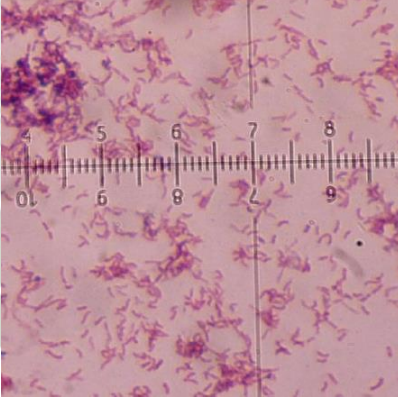

Sigue a la pág. 54 ...

... viene de la pág. 53

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	OBSERVACIÓN MICROSCOPICA A 100X
301	<p>Bacterias Gram negativos</p> <p>Bacilos grandes y largos</p> <p>La mayoría son bacilos rectos</p> <p>Algunos se disponen en cadenas de hasta 3 células, en pares y otros individuales.</p>	
302	<p>Bacterias Gram negativas</p> <p>Bacilos grandes y largos</p> <p>Ligeramente curvos y algunos rectos</p> <p>La mayoría se disponen en pares, en cadena y otros individuales</p>	
303	<p>Bacterias Gram negativas</p> <p>Bacilos grandes, largos y delgados</p> <p>La mayoría son rectos y otros ligeramente curvos</p> <p>Algunos se disponen en cadenas y otros individuales</p>	
401	<p>Bacterias Gram negativas</p> <p>Bacilos cortos y delgados</p>	

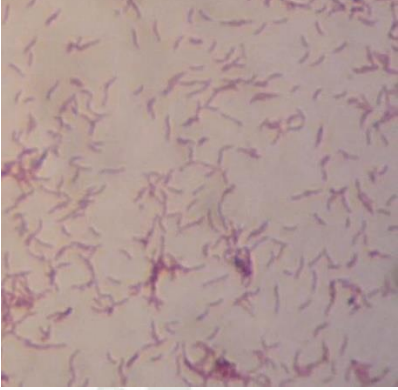
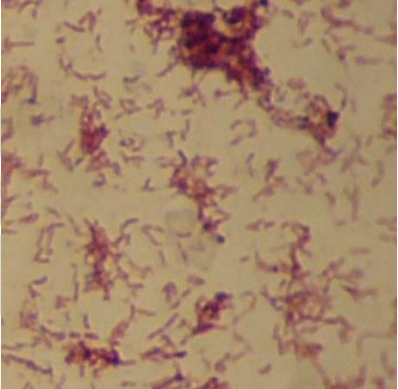
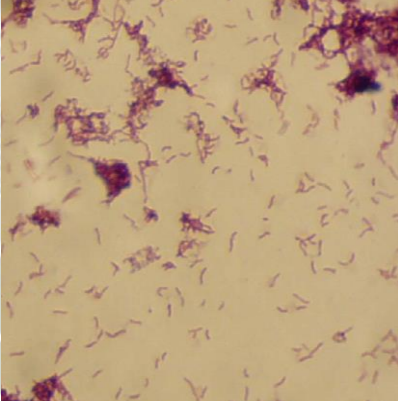

Sigue a la pág. 55 ...

... viene de la pág. 54

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	OBSERVACIÓN MICROSCOPICA A 100X
402	Bacterias Gram negativas Bacilos largos y delgados Algunos dispuestos en cadena	
403	Bacterias Gram negativas Bacilos rectos, curvos y sigmoides	
404	Bacterias Gram negativas Bacilos grandes y largos Rectos y curvos Algunos dispuesto en cadena	
405	Bacterias Gram negativas Bacilos cortos y rectos Algunos de disponen en cadenas, otros en pares	


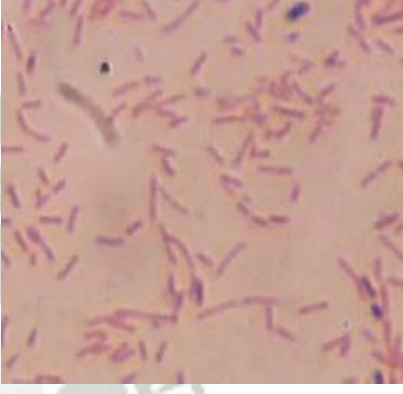
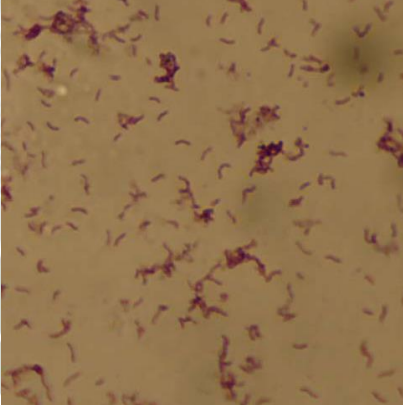
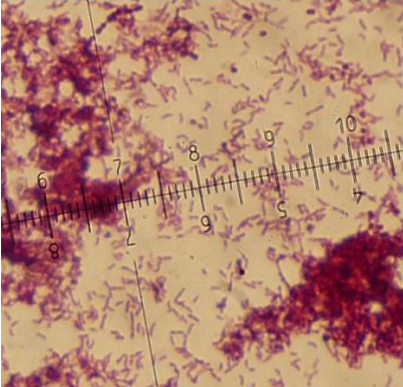
Sigue a la pág. 56 ...

... viene de la pág. 55

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA A 100X
601	Bacterias Gram negativas Bacilos grandes y largos Ligeramente curvos y algunos rectos	
701	Bacterias Gram negativas Bacilos cortos y delgados Algunos se disponen en pares	
702	Bacterias Gram negativas Bacilos delgados y rectos Distribuidos individualmente	
703	Bacterias Gram negativas Bacilos grandes y largos Algunos se disponen en cadenas de 3	

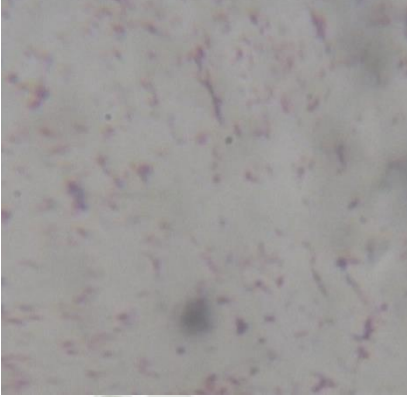
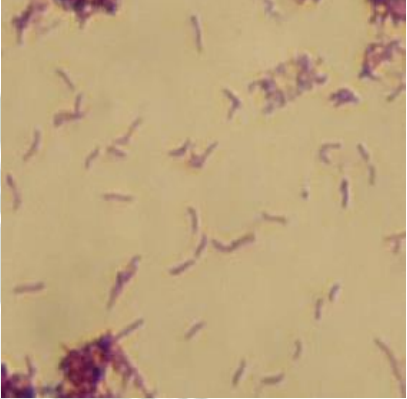
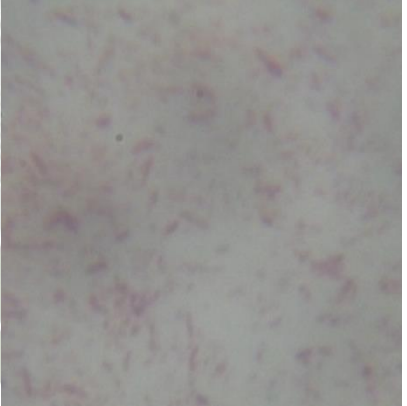

Sigue a la pág. 57 ...

... viene de la pág. 56

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	OBSERVACIÓN MICROSCOPICA A 100X
704	Bacterias Gram negativas Bacilos delgados y ligeramente curvos	
705	Bacterias Gram negativas Bacilos curvos, sigmoides y vibrios	
801	Bacterias Gram negativas Bacilos grandes, largo y delgados La mayoría son rectos y otros ligeramente curvos.	
802	Bacterias Gram negativas Bacilos grandes Curvos, sigmoides y vibrios Algunos dispuestos en cadenas de hasta 3 células.	

Sigue a la pág. 58 ...

... viene de la pág. 57

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA A 100X
803	Bacterias Gram negativas Bacilos cortos y delgados	
804	Bacterias Gram negativas Bacilos grandes y largos Rectos y curvos Algunos dispuestos en cadena	
805	Bacterias Gram negativas Bacilos cortos y pequeños La mayoría son rectos. Algunos curvos	
806	Bacilos Gram negativos Bacilos largos Curvos, sigmoides y vibrios Dispuestos en cadenas de hasta 3 células, en pares e individuales	

## Identificación Bioquímica

### *Determinación de la motilidad*

El objetivo de esta prueba es determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil. Para tal fin, se empleó un medio semisólido sobre el cual la cepa fue sembrada por picadura, llevando a incubar durante 8 días a 32 °C. En la tabla 13 se muestran los resultados de cada cepa a esta prueba.

Transcurrido el tiempo de incubación, ocho de las cepas aisladas (2M, 2CH, 704, 802, 803, 804, 805 y 806) presentaron motilidad positiva evidenciado por el crecimiento dentro y fuera de la línea de siembra causando turbidez en el medio SIM.

Este movimiento se debe a la presencia de flagelos, los cuales predominan en las reductoras de sulfato (Odom & Singleton, 1993).

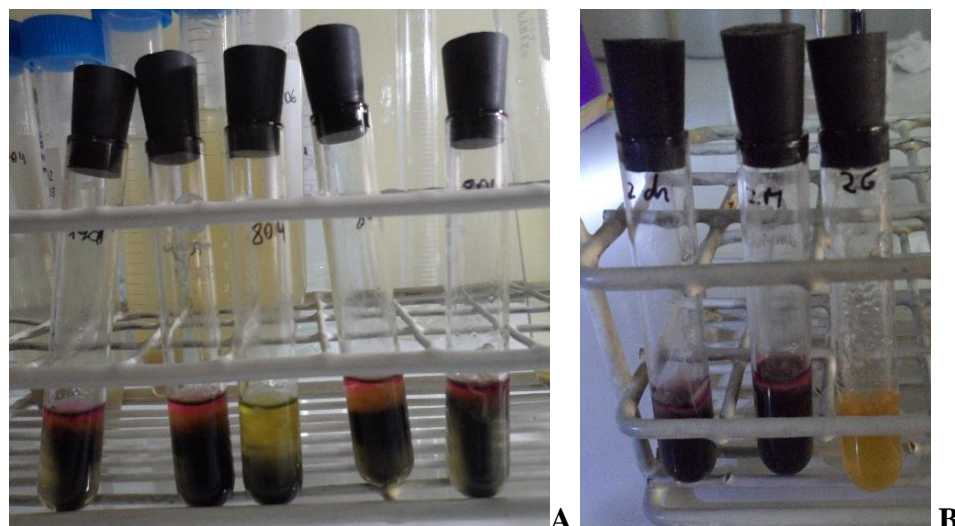
### *Determinación de Indol*

La prueba se basa en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído de p-dimetilaminobenzaldehído, componente principal del reactivo de Kovac (Koneman *et al.*, 1988).

Siete cepas fueron indol positivo (Tabla 13) evidenciado por la formación de un anillo rojo a fucsia en la zona superior. Las cepas 805 y 2CH, mostraron un anillo ligeramente rojo debido a la mínima producción de indol (Figura 15: A y B respectivamente). Por el contrario, las cepas 2M, 704, 802, 803, 805 y 806, presentaron un anillo fucsia debido a una mayor producción de este compuesto.

El indol es uno de los productos de la degradación metabólica del aminoácido triptófano. La triptofanasa cataliza la reacción removiendo el grupo amino (NH<sub>2</sub>) de la molécula de triptófano con la producción de indol, ácido pirúvico y amoniaco.

La variación de coloración del complejo formado al finalizar la prueba, permite distinguir el tipo de actividad que presenta la enzima triptofanasa. Así una tonalidad ligeramente roja indica actividad débil y roja a fucsia una actividad intensa.



**Figura 15. Determinación de indol en aislados. A.** Cepas 704, 803, 804, 805, 806; **B.** Cepas 2CH y 2M, en ambas imágenes se puede observar el cambio de color al agregar el reactivo de Kovac en los tubos de cada cepa.

#### *Producción de sulfuro de hidrogeno*

Ocho cepas: 2M, 2CH, 704, 802, 803, 805 y 806 formaron sulfuro de hidrógeno en el medio SIM (Tabla 13) a excepción de la cepa 804 que presentó ligera formación de Sulfuro de hidrogeno al no estar completamente todo el medio de color negro. La formación fue evidente por el ennegrecimiento del medio ya que el  $H_2S$  al reaccionar con el hierro disuelto forma Sulfuro de hierro responsable del cambio de coloración. Además, la formación de éste ácido fue comprobado al percibir su olor característico a huevo podrido.

En la prueba se empleó el medio SIM debido a que la fuente de azufre es el Tiosulfato. Según los datos obtenidos las bacterias reductoras de sulfato aisladas son capaces de generar sulfuro a partir de fuentes de azufre diferentes.

Las BRS reducen el sulfato por desasimilación a sulfuro de hidrógeno o ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ). El sulfuro de hidrógeno es el principal gas volátil de azufre, es muy tóxico y se reconoce por su característico olor fétido. Este ácido se combina con las sales ferrosas para formar un sulfuro de hierro ( $FeS$ ) negro, importante producto de corrosión (Madigan *et al.*, 1999).

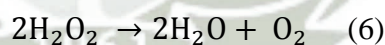
### *Determinación de catalasa*

Todas las cepas fueron catalasa positiva debido a la formación de burbujas al adicionar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabla 13). Los veintidós aislados contienen la enzima catalasa, la cual funciona como un mecanismo de defensa para las bacterias reductoras de sulfato frente a los radicales libre de oxígeno.

Debido al efecto toxico del oxígeno, las bacterias reductoras de sulfato han desarrollado estrategias de adaptación para protegerse del mismo. Estas estrategias pueden ser clasificadas en dos grupos: estrategias de comportamiento y estrategias moleculares (Cypionka, 2000). Las primeras incluyen aerotaxis y formación de agregados, mientras que las últimas permiten a las BRS remover el oxígeno y protegerse de sus efectos nocivos.

Al Igual que para organismo aerobios, las especies de oxígeno altamente tóxicas (como el superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno) son generadas cuando las BRS están en contacto con el oxígeno. La enzima catalasa es la responsable de eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalizando su conversión en agua y oxígeno molecular sin la producción de radicales libres que serían perjudiciales para bacterias anaerobias como las BRS. La actividad catalasa fue detectada por primera vez en *Desulfovibrio* por Hatchikian *et al.*, 1977 (Dolla, *et al.*, 2006).

La reacción es la siguiente:



El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una especie reactiva de oxígeno responsable de la toxicidad por O<sub>2</sub> debido a su alta reactividad la cual genera diferentes tipos de daños dentro de las células. Entre los principales daños se citan oxidaciones de proteínas y aminoácidos, inactivación de enzimas, entre otros. Además, la auto-oxidación química del sulfuro de hidrogeno, normalmente producido por sulfato reductoras, puede resultar en la formación de éstas especies, las cuales aumentan la sensibilidad de las BRS al oxígeno (Cypionka *et al.*, 1985). El estrés oxidativo es también una consecuencia de la inactivación directa por oxígeno molecular de algunas enzimas importantes como la

hidrogenasa (Cammack et al., 1994) o lactato deshidrogenasa (Stams & Hansen, 1982) y la modificación de parámetros físico-químicos del ambiente como el potencial redox y pH (Dolla *et al.*, 2006).

#### *Determinación de oxidasa*

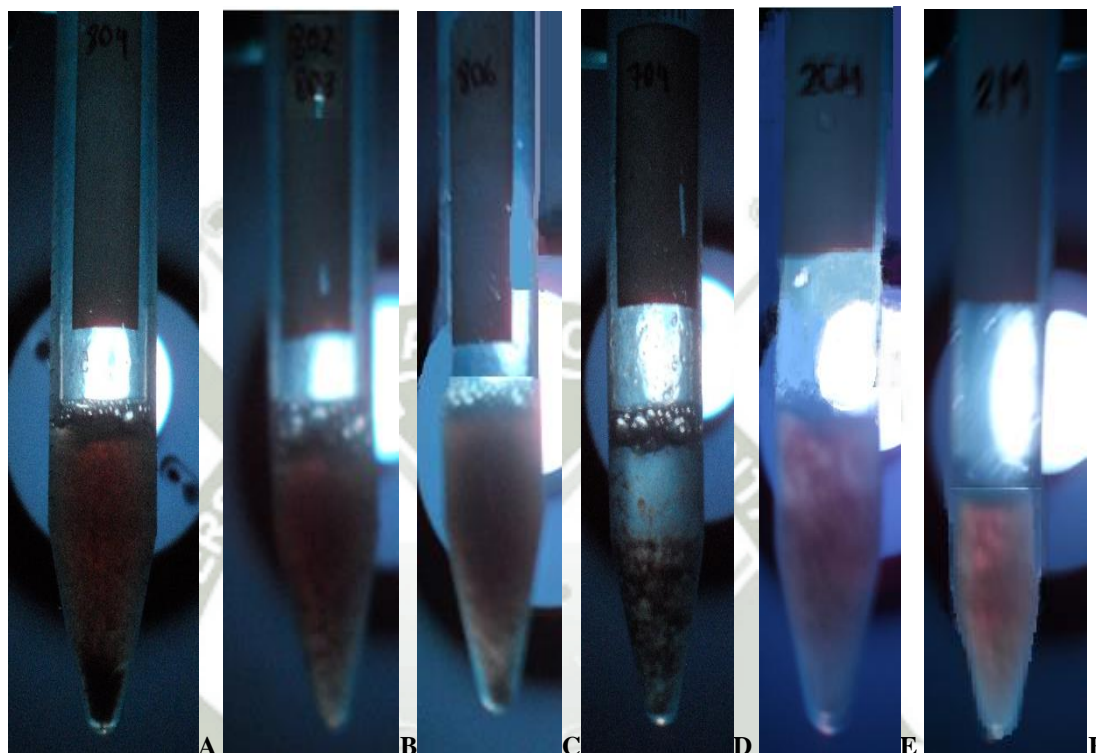
Todas las cepas fueron oxidas negativa (Tabla 13), pues no se observó la coloración púrpura sobre las tirillas de papel filtro, luego de inocular la cepa. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con investigaciones preliminares en las cuales las bacterias reductoras de sulfato aisladas resultan negativas para ésta prueba (Sass & Cypionka, 2004; Suzuki *et al.*, 2007).

Esta prueba permite determinar si una bacteria presenta citocromoxidasa, enzima encontrada en algunas bacterias que transfieren electrones al oxígeno que actúa como aceptor final en algunas cadenas transportadoras. La enzima oxida el citocromo c, para realizar la transferencia de energía. La presencia de la citocromo oxidasa puede ser detectada a través del uso de una tirilla o un disco que contiene tetra metil-p-fenilendiamina (TMPD) o dimetil-p-fenilendiamina, los cuales actúan como donadores de electrones para la enzima. Si la bacteria oxida el reactivo que se encuentra en la tirilla o en el disco, es decir, si remueve los electrones, se tornará púrpura indicando una prueba positiva. Por el contrario, si no se presenta cambio en la coloración, la prueba se considera negativa, como en este caso (Koneman *et al.*, 1988).

#### *Determinación de Desulfoviridina*

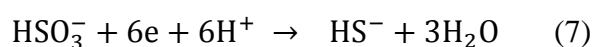
Como se observa en la Tabla 13, siete de las cepas aisladas, fueron positivas para la prueba. Todos los miembros del género *Desulfovibrio* dan una reacción positiva a la prueba de desulfoviridina, manifestándose como una fluorescencia roja (Figura 20) debido al cromóforo de sirohidroclorin del pigmento (Garrity. 2005). A partir de esta prueba se seleccionó las cepas 804 y 2M porque se observó mayor fluorescencia roja en la luz UV, estas cepas serán utilizadas en las siguientes pruebas.

Diversos estudios realizados con bacterias sulfato-reductoras han demostrado que especies del género *Desulfovibrio* son positivas para la presencia de ésta enzima (Oliver *et al.*, 1988; Mogensen *et al.*, 2005).



**Figura 16. Determinación de Desulfoviridina en BRS aisladas. A. Cepa 804; B. Cepa 802-803; C. Cepa 806; D. Cepa 704; E. Cepa 2CH; F. Cepa 2M.**

La desulfovirina conocida también como pigmento verde, de significado taxonómico para el género *Desulfovibrio*, presenta actividad bisulfito reductasa y puede catalizar la conversión de  $\text{HSO}_3^-$  a  $\text{S}^{2-}$  en un solo paso (LeFall *et al.*, 1979). Las sulfito reductasas son importantes constituyentes de la cadena transportadora de electrones en bacterias de sulfato y cataliza la reducción de seis electrones de sulfito a sulfuro. La reacción es la siguiente (Steuber & Kroeck, 1998):



**Tabla 13. Características fisiológicas de las bacterias reductoras de sulfato aisladas.**

<i>Característica</i> Cepa	Motilidad	Indol	H <sub>2</sub> S	Catalasa	Oxidasa	Desulfoviridina
2M	+	+	+	+	-	+
2CH	+	+	+	+	-	(+)
301	-	-	-	+	-	-
302	-	-	-	+	-	-
303	-	-	-	+	-	-
401	-	-	-	+	-	-
402	-	-	-	+	-	-
403	-	-	-	+	-	-
404	-	-	-	+	-	-
405	-	-	-	+	-	-
601	-	-	-	+	-	-
701	-	-	-	+	-	-
702	-	-	-	+	-	-
703	-	-	-	+	-	-
704	+	+	+	+	-	(+)
705	-	-	-	+	-	-
801	-	-	-	+	-	-
802	+	+	+	+	-	+
803	+	+	+	+	-	+
804	(+)	-	(+)	(+)	-	+
805	+	+	+	+	-	-
806	+	+	+	+	-	(+)

+: presente, crecimiento; -: ausente, no crecimiento; (+): crecimiento débil

### Caracterización molecular de las cepas aisladas

Cada secuencia de nucleótidos (Anexo 63 y 65) correspondiente a cada cepa fue comparada en la base de datos del NCBI, en la cual se realizó un blast del cual se obtuvo los porcentajes de identidad el cual permitió saber de qué género de las bacterias reductoras de sulfato se trataba.

Como se observa en la Tabla 14 la cepa 2M pertenece al género *Desulfovibrio*, por su porcentaje de parentesco que fue de 98 %, pero no se identificó el tipo de especie por lo tanto es un *Desulfovibrio* sp. El árbol filogenético se encuentra en Anexo 64, Pág. 169

**Tabla 14. Cuadro comparativo de la cepa 2M con otras especies**

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	% de Identidad
Desulfovibrio sp. enrichment culture clone 06-1235251-87 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1613	1613	77%	0.0	98%
Desulfovibrio aerotolerans strain DvO5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1600	1600	77%	0.0	98%
Desulfovibrio magneticus strain RS-1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1594	1594	77%	0.0	98%
Desulfovibrio carbinolicus strain DSM 3852 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1594	1594	77%	0.0	98%
Desulfovibrio marrakechensis strain EMSSDQ4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1585	1585	77%	0.0	98%
Desulfovibrio sp. G2 gene for 16S rRNA, partial sequence	1580	1580	77%	0.0	97%
Desulfovibrio fructosivorans partial 16S rRNA gene, type strain DSM 3604T	1574	1574	77%	0.0	97%

Como se observa en la Tabla 15 la cepa 806 también pertenece al género *Desulfovibrio*, por su porcentaje de parentesco que fue de 96 %, pero no se identificó el tipo de especie por lo tanto es un *Desulfovibrio* sp. . El árbol filogenético se encuentra en Anexo 66, Pág. 170.

De acuerdo a las características morfológicas y fisiológicas de las bacterias aisladas, estas corresponden a sulfato-reductoras que pertenecen al género *Desulfovibrio*.

Este género se caracteriza por presentar morfología variable, desde bacilos rectos, curvos y sigmoides hasta vibrios. Son Gram negativas, móviles, anaerobios estrictos y mesófilos. La mayoría de las especies oxidan compuestos orgánicos como el lactato incompletamente hasta acetato. Todos sus miembros contienen desulfovirdina e hidrogenasa, y están presentes en diversos hábitats como lodos

anóxicos, agua dulce, ambientes marinos, incluso intestinos de animales (Garrity, 2005).

**Tabla 15. Cuadro comparativo de la cepa 806 con otras secuencias**

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	% de Identidad
Uncultured Desulfovibrio sp. gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: sus-5	1537	1537	77%	0.0	96%
Desulfovibrio sp. S14 PV-2008 partial 16S rRNA gene, strain S14	1528	1528	77%	0.0	96%
Desulfovibrio sp. enrichment culture clone 06-1235251-126 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1522	1522	77%	0.0	96%
Desulfovibrio sp. b16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1522	1522	77%	0.0	96%
Desulfovibrio sp. 6-71 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1520	1520	77%	0.0	96%
Desulfovibrio sp. zt10e 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1517	1517	77%	0.0	96%

### Determinación del pH y Temperatura óptima

#### *Rango de crecimiento a diferentes temperaturas*

Esta prueba permite evaluar el rango de temperatura en el cual crecen las bacterias reductoras de sulfato aisladas. Ambas cepas la 804 y 2M crecieron (+) a una temperatura de 30 °C. Sin embargo, presentaron ligero crecimiento a 45 °C solo en una de las repeticiones (Tabla 16). El crecimiento óptimo se logró a 32 °C. Según los datos obtenidos, las bacterias reductoras de sulfato aisladas son mesófilas, pues su rango de crecimiento se encuentra entre los 30 °C y 45 °C, es decir, requieren temperaturas medias para llevar a cabo sus reacciones metabólicas. Según estudios realizados sobre BRS en sistemas de inyección de agua (Chalela, 1991), la temperatura óptima para estas oscila entre 20 y 40 °C, lo cual coincide con los resultados de este trabajo. Ninguna cepa presento crecimiento a 60 °C.

**Tabla 16. Crecimiento de BRS a diferentes temperaturas**

CEPA	TEMPERATURA								
	30 °C			45 °C			60°C		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<b>2M</b>	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-
<b>804</b>	+	+	+	-	(+)	-	-	-	-

+: crecimiento; -: no crecimiento; (+): crecimiento débil

A: primera repetición; B: segunda repetición; C: tercera repetición

*Rango de crecimiento a diferentes pH*

Las cepas 2M y 806 reportaron crecimiento a partir de pH 5.0. el medio de cultivo con pH 8.0 ofreció las mejores condiciones pues la mayoría de los aislados presentaron crecimiento, al igual que en el medio con pH 8.5 (Tabla 17).

Según los resultados obtenidos, las bacterias reductoras de sulfato prefieren un pH cercano al neutro para llevar a cabo su crecimiento, es decir valores como 8.0 y 8.5. Sin embargo, una de las cepas la 2M tolera valores ligeramente ácidos como el pH 5.0. El crecimiento óptimo fue obtenido en pH 7.0 – 7.5.

En general, los aislados mostraron crecimiento en un amplio espectro de pH en un rango entre 5.0 y 8.5. Resultados similares fueron reportados al evaluar reductoras de sulfato aisladas a partir de aguas subterráneas, las cuales crecieron a valores de pH entre 5.5 y 8.5 (Sass & Cypionka, 2004).

**Tabla 17. Crecimiento de BRS a diferentes pH**

CEPA	TEMPERATURA											
	4.5			5.0			8.0			8.5		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<b>2M</b>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>804</b>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+: crecimiento; -: no crecimiento; (+): crecimiento débil

A: primera repetición; B: segunda repetición; C: tercera repetición

## 4.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO

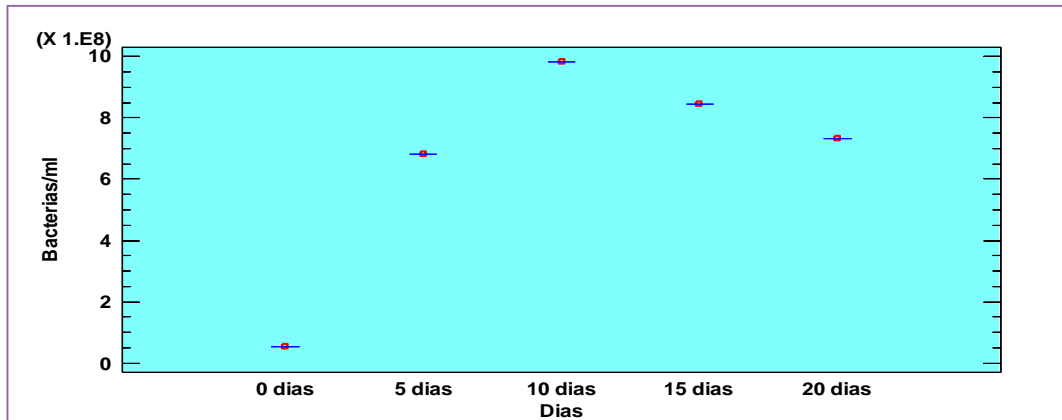
En los ensayos realizados, se siguió el crecimiento de las cepas 804 y 2M en un sistema sin alimentación. Las muestras fueron analizadas como se explica en el capítulo 3, los datos obtenidos luego de esas mediciones se les realizó un análisis estadístico para su posterior análisis.

Los resultados correspondientes a la evaluación de la población bacteriana en suspensión en los diferentes tiempos de evaluación en ambas cepas se muestran en el ANOVA (Anexo 13, pág. 139) en el cual la población de bacterias en suspensión no muestra diferencias significativas entre las cepas en estudio ( $p > 0.05$ ), en cambio las diferencias entre los diferentes tiempos de evaluación son altamente significativas ( $p < 0.01$ ). el efecto de interacción es no significativo ( $p > 0.05$ ). El ANOVA se realizó a partir de los datos obtenidos de las mediciones (Anexo 11 y 12, pág. 139).

En la Figura 17 y Tabla 18, se puede observar la cantidad de bacterias en suspensión en función del tiempo, se observa un incremento constante de tipo exponencial hasta los 10 días a partir de los cuales se alcanza una fase estacionaria y un posterior decrecimiento a los 15 días que puede atribuirse a la lisis bacteriana.

**Tabla 18. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Población (Bacterias/ml) según tiempo de evaluación**

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0 días	6	$5.32 \cdot 10^7$	$3.21 \cdot 10^5$	X
5 días	6	$6.81 \cdot 10^8$	$3.21 \cdot 10^5$	X
20 días	6	$7.33 \cdot 10^8$	$3.21 \cdot 10^5$	X
15 días	6	$8.44 \cdot 10^8$	$3.21 \cdot 10^5$	X
10 días	6	$9.83 \cdot 10^8$	$3.21 \cdot 10^5$	X

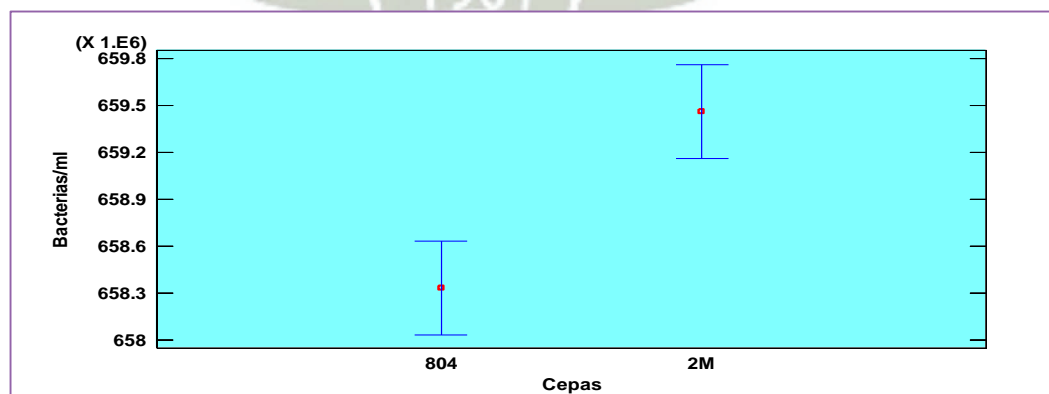


**Figura 17. Población Bacteriana según tiempo de evaluación (Días).** Se aprecia los resultados para el Test de Tukey aplicado para los diferentes tiempos de evaluación, se aprecia que existe un incremento significativo de la población de bacterias hasta los 10 días, para luego a los 15 días y 20 días iniciar su descenso.

Como se observa en la Figura 18 y en la Tabla 19 ambas bacterias no muestran diferencias significativas en su tipo de crecimiento y en la cantidad de bacterias presentes por día esto se puede deber a que ambas bacterias pertenecen al género *Desulfovibrio*.

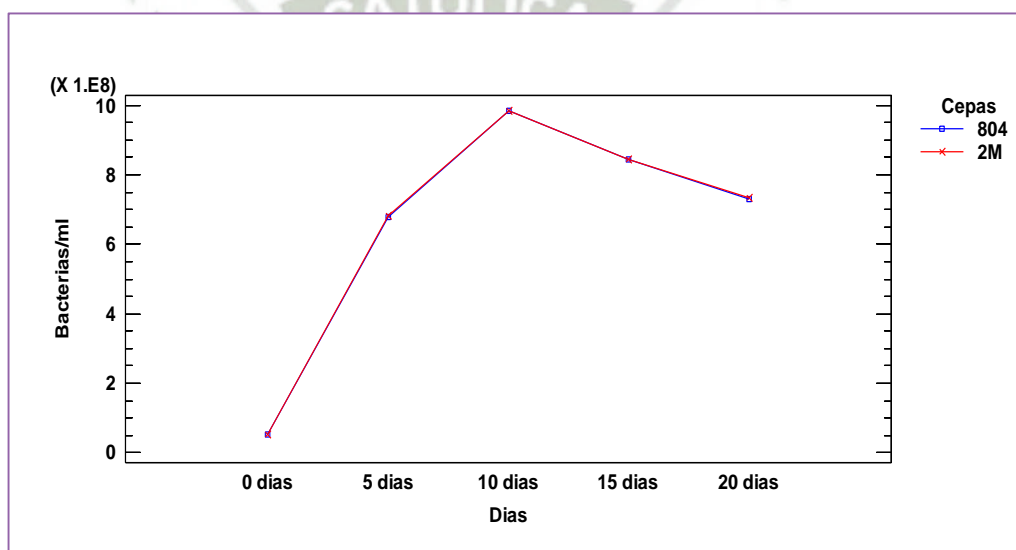
**Tabla 19. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para población (Bacterias/ml) por Cepas**

Cepas	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
804	15	$6.58 \cdot 10^8$	$2.03 \cdot 10^5$	X
2M	15	$6.59 \cdot 10^8$	$2.03 \cdot 10^5$	X



**Figura 18. Población bacteriana según tipo de cepas.** La población de bacterias entre la cepa 804 y 2M muestra diferencias no significativas según el test de Tukey.

Para poder comparar más claramente el comportamiento de las bacterias seleccionadas, se graficaron ambas cepas en forma conjunta tal como se muestra en la Figura 19. El comportamiento de la población bacteriana en las cepas 804 y 2M es similar en los diferentes tiempos de evaluación, produciéndose un incremento en la población bacteriana desde el inicial hasta los 10 días, para luego iniciar un decrecimiento en la población a partir del día 15 y 20, tal como se muestra en el Anexo 14. Este tipo de comportamiento y crecimiento se demostró también en el trabajo realizado por Mariana Soledad Vicente (2006) donde evaluó la concentración de bacterias en un cultivo batch con *Desulfovibrio*.



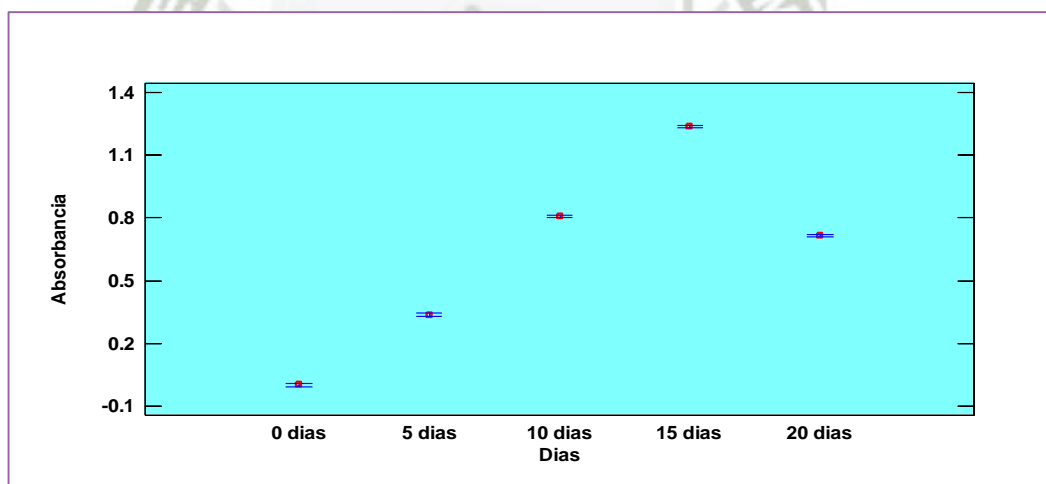
**Figura 19. Crecimiento poblacional de bacteria según cepas y tiempo de evaluación.** Comparación de las curvas de crecimiento de las cepas 804 y 2M. (Anexo 14, pág. 140).

Como se ha fundamentado anteriormente (capítulo 3), la determinación de la densidad óptica es otra medida que permite evaluar el crecimiento microbiano. Por lo cual también se evaluó la absorbancia en las dos cepas y los diferentes tiempos de evaluación (Anexo 15, pág. 140 y Anexo16 pág. 141), encontrándose que las diferencias de las absorbancias son altamente significativas en los diferentes tiempos ( $p < 0.01$ ), en cambio para las cepas las diferencias no son significativas ( $p > 0.05$ ). La interacción entre cepas y tiempos de evaluación resultó no significativa ( $p > 0.05$ ) (Anexo 17, pág. 141).

En la Figura 20 y Tabla 20 se ha representado la absorbancia a 600 nm en función del tiempo. El comportamiento de esta magnitud se incrementa conforme avanza el tiempo del mismo modo como ocurría en la medición de la población bacteriana.

**Tabla 20. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Absorbancia según días de evaluación**

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0 días	6	0	0.00435693	X
5 días	6	0.336083	0.00435693	X
20 días	6	0.715517	0.00435693	X
10 días	6	0.807283	0.00435693	X
15 días	6	1.23882	0.00435693	X

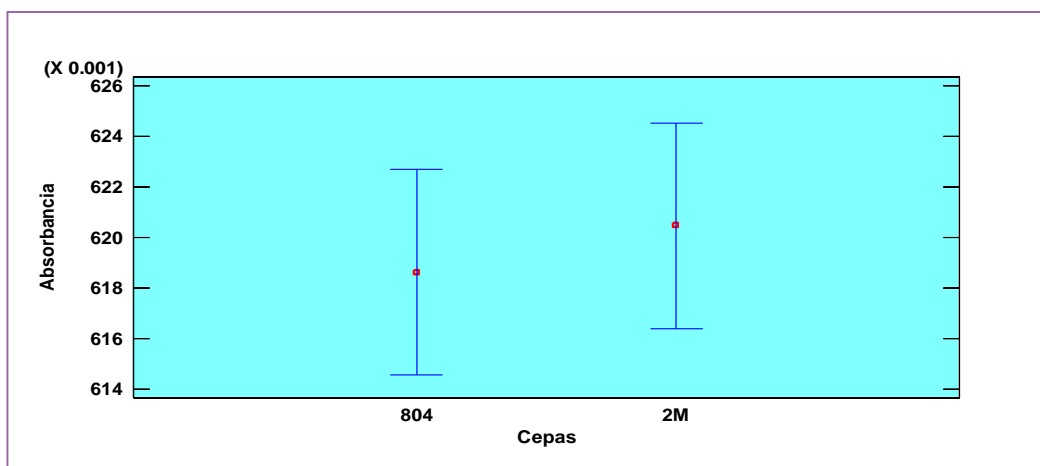


**Figura 20. Absorbancia según tiempo de evaluación (Días).** La aplicación del Test de Tukey indica que a medida que aumenta el tiempo de evaluación la absorbancia se incrementa, hasta el día 15, para luego proceder a disminuir en el día 20.

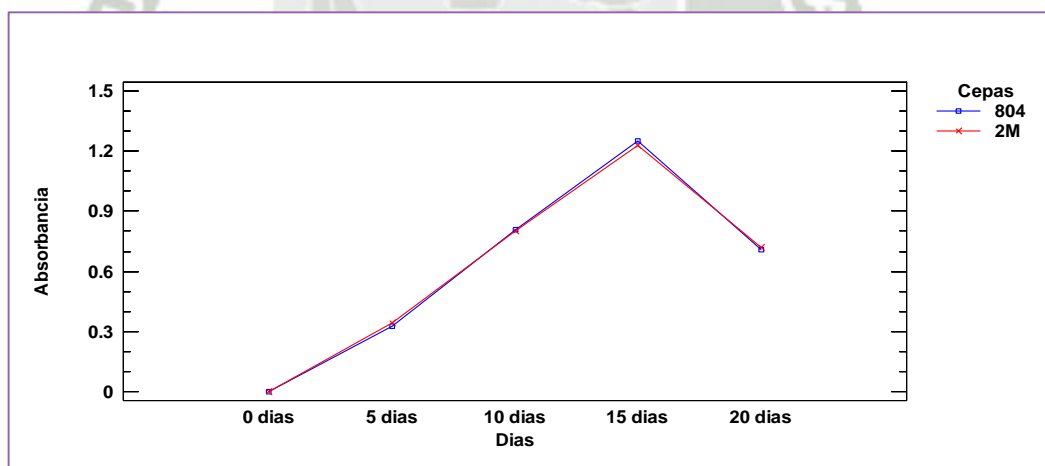
Del mismo modo en la Tabla 21 y Figura 21 ambas bacterias no muestran diferencias significativas en sus absorbancias medidas. Para mejor análisis de las cepas se compararon en un mismo grafico para evaluar su comportamiento. El aumento de la absorbancia en la cepa 804 y 2M es similar, aumentando su absorbancia hasta el día 15 para luego disminuir en el día 20, tal como se muestra en la Figura 22 y Anexo 18.

**Tabla 21. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Absorbancia por cada tipo de cepa**

Cepas	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
804	15	0.61862	0.00275556	X
2M	15	0.62046	0.00275556	X



**Figura 21. Absorbancia según Tipos de cepas.** Las absorbancias entre las cepas 804 y 2M no muestran diferencias significativas según el Test de Tukey.



**Figura 22. Absorbancia según cepas y tiempo de evaluación.** Comparación de absorbancias a 600 nm de la cepa 804 y la cepa 2M. (Anexo 18, Pág. 141).

Los distintos métodos utilizados para seguir la evaluación de este cultivo tienen ventajas y desventajas; la determinación a través de la densidad óptica o del conteo de bacterias en el microscopio permite obtener el dato de manera inmediata. Sin embargo, el conteo de bacterias no puede realizarse en aquellos cultivos en los que se produzca

biomasa. Por otro lado, la medida de absorbancias o densidad óptica no debe realizarse en cultivos en los cuales haya presencia de precipitados, ya que ellos interfieren en la turbidez del medio. Para evitar este problema se procedió a centrifugar para evitar las interferencias de los precipitados en la muestra.

### Determinación de la $\mu_{m\acute{a}xima}$ y $r_{SO4}$

#### Velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{m\acute{a}xima}$ )

La  $\mu_{m\acute{a}xima}$  obtenida para la cepa 804 y 2M fueron  $0.0089\text{ h}^{-1}$  y  $0.0088\text{ h}^{-1}$ , respectivamente (Figura 23). Estos valores fueron del orden de los obtenidos por algunos autores para aislados del género *Desulfovibrio* (Tabla 22). Aunque varios trabajos reportan una  $\mu_{m\acute{a}xima}$  mayor, estas velocidades de crecimiento son pequeñas en comparación con otro tipo de microorganismos.

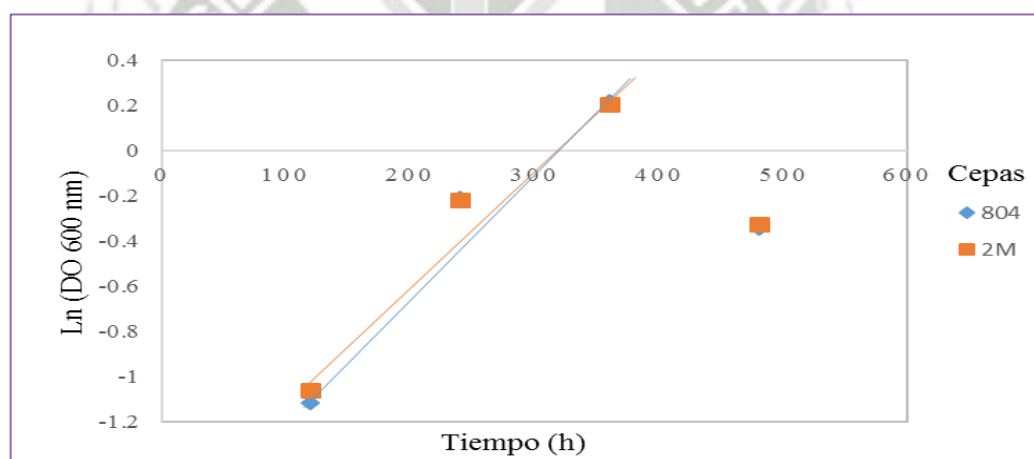


Figura 23. Determinación de  $\mu_{m\acute{a}xima}$ . cepas 804 (Rombos azules) y 2M (Cuadrados naranjas).

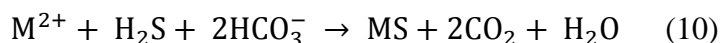
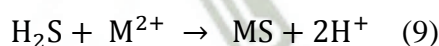
Tabla 22. Velocidades específicas de crecimiento máxima reportadas para BRS consumidoras de lactato.

Organismo	$\mu_{m\acute{a}xima}$ ( $h^{-1}$ )	Medio de cultivo	Temp. ( $^{\circ}C$ )	pH	Referencia
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	0.395	Postgate G	25	7.0	Okabe y Characklis, 1992
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	0.074	Postgate B	30	7.0	Petrova <i>et al.</i> , 2006
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	0.050	Postgate B	30	7.0	Petrova <i>et al.</i> , 2002

<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	0.052	Postgate C	37	7.8	Cooney <i>et al.</i> , 1996
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	0.056				
<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	0.058	Sintético	29	7.1 – 7.3	Widdel y Pfennig, 1981
<i>Desulfovibrio africanus</i>	0.060	Complejo	30	7.2	Traore <i>et al.</i> , 1982
<i>Desulfovibrio gigas</i>	0.092				
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	0.104				
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	0.222	Complejo	30	7.2	Traore <i>et al.</i> , 1982
<i>Hiidenborough</i>	0.011	Sintético	30	7.1	Ingvorsen y Jorgensen, 1984
<i>Desulfovibrio sapovorans</i>	0.007				
<i>Desulfovibrio salexigens</i>	0.021				
Cultivo mixto	0.002	Complejo	30	7.0	Visser, 1995

#### Reducción de sulfatos y determinación de la velocidad volumétrica de reducción de sulfato ( $r_{SO_4}$ )

Para la validación de datos, las mediciones obtenidas se muestran en los anexos 19 y 20. El proceso de reducción de sulfato por parte de las BRS, donde el lactato es el sustrato donador de electrones, puede describirse de acuerdo a las reacciones:



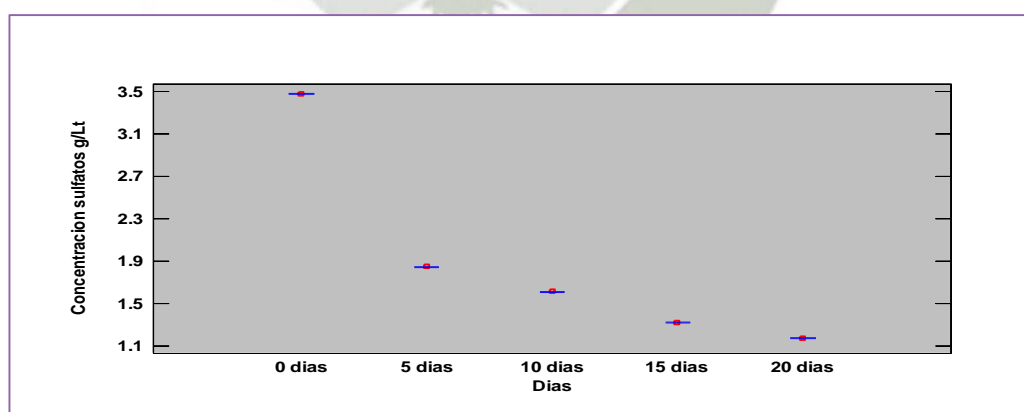
Se observa que las BRS generan iones biocarbonato, como resultado de la reducción de sulfato a sulfuro; la concentración de sulfito producida por los microorganismos fue difícilmente evaluada, ya que este ión es continuamente utilizado

en la remoción de los metales en disolución. La reducción de sulfato, por parte de las BRS, es un proceso irreversible que produce estequiometricamente sulfito a partir de iones sulfato, 1mmol de  $\text{SO}_4^{2-}$  puede generar 1 mmol de  $\text{H}_2\text{S}$  o  $\text{S}^{2-}$ .

La concentración de sulfato es un anión que es utilizado durante el crecimiento como aceptor electrónico por lo que es consumido como se observa en los siguientes datos. Desde un valor promedio inicial de 3.4718 g/l, desciende hasta alcanzar un valor de 1.1692 g/l para ambas cepas 804 y 2M, tal como se aprecia en la Tabla 23 y Figura 24. La concentración de sulfato comienza a decrecer con una pendiente mucho menor sugiriendo alguna inhibición por producto (Postgate, 1954).

**Tabla 23. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Concentración sulfatos g/L por tiempo de evaluación**

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
20 días	6	1.16918	0.00217363	X
15 días	6	1.31828	0.00217363	X
10 días	6	1.60927	0.00217363	X
5 días	6	1.84318	0.00217363	X
0 días	6	3.47818	0.00217363	X

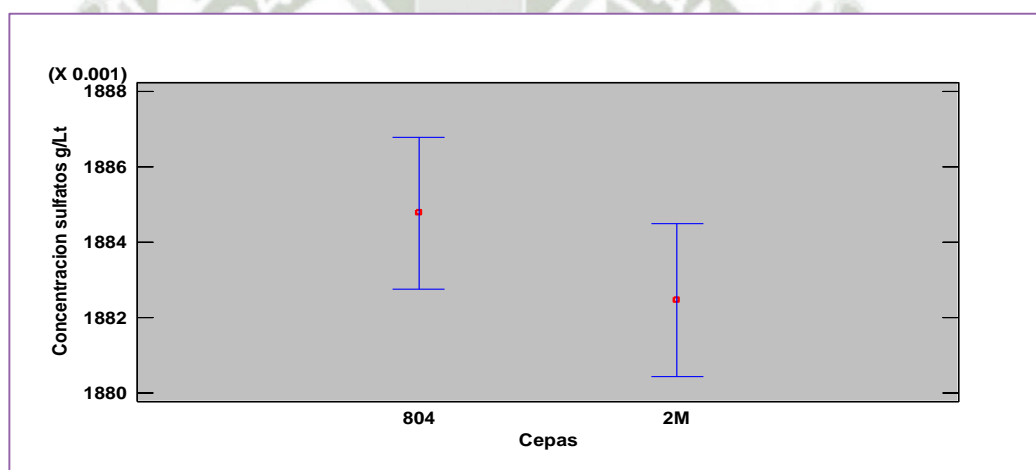


**Figura 24. Reducción de Sulfatos según tiempo de evaluación (Días).** El test de Tukey aplicado para establecer diferencias entre los tiempos de evaluación muestra que a medida que transcurre el tiempo se presenta una reducción de sulfatos.

En la Tabla 24 y Figura 25 se observa que no hay diferencias significativas entre cada cepa la 804 y 2M, esto se debe a que ambas cepas obtuvieron datos similares en su concentración de sulfatos. En la Figura 30 y Anexo 22 se muestra el comportamiento de las cepas 804 y 2M para la reducción de sulfatos a los diferentes tiempos de evaluación, notándose una disminución de los sulfatos desde la evaluación inicial hasta el día 20.

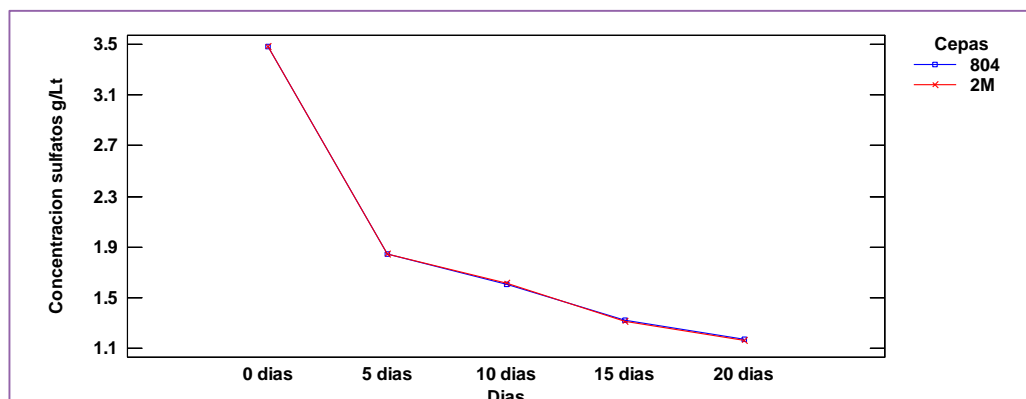
**Tabla 24. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Concentración sulfatos g/L por Cepas**

Cepas	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2M	15	1.88247	0.00137472	X
804	15	1.88477	0.00137472	X



**Figura 25. Reducción de Sulfatos según cepas.** Entre la cepa 804 y la cepa 2M no hay diferencias significativas.

Los resultados del ANOVA para reducción de sulfatos indican que esta muestra diferencias altamente significativas en los días de evaluación ( $p < 0.01$ ), en cambio la reducción de sulfatos no muestra significación estadística entre las cepas 804 y 2M ( $p > 0.05$ ) (Anexo 21, pág. 143).



**Figura 26. Reducción de Sulfatos según cepas y tiempo de evaluación.** Comparación de reducción de sulfatos para cada cepa la 804 y 2M.

En la Figura 26 la cepa 804 y 2M consumieron cantidades similares de sulfato como se observó anteriormente, su valor  $r_{SO_4}$  es similar en ambas cepas 0.0048 y 0.0048 g/l.h para la cepa 804 y la cepa 2M respectivamente. La cantidad total de sulfato reducido de la 804 fue 2.3082 g/l en comparación de la 2M que fue 2.3098 g/l, observándose los datos la cepa 2M reduce un poco más los sulfatos diferenciándose por decimales.

#### 4.3 BIOPRECIPITACIÓN DE METALES PESADOS

Se realizó experimentos colocando el consorcio bacteriano y cada cepa (804 y 2M) en presencia de metales pesados, se midió su producción de ácido láctico, reducción de sulfatos y la formación de sulfuros metálicos que son los precipitados formados en los frascos como se observa en la Figura 27.



**Figura 27. Bioprecipitación de plomo, cromo y cadmio.** A. Medios de cultivo al inicio de la experiencia; B. Medios de cultivo al final de la experiencia, presencia de precipitados en la base del frasco.

## Metabolización de ácido láctico en presencia de metales pesados

La oxidación de ácido láctico a partir del lactato presente en el medio como sustrato se realizó de acuerdo a la ecuación (8) en la cual se muestra la reacción que ocurre por parte de las BRS al estar en contacto con el lactato. Se realiza la medición de ácido láctico presente en el medio para evidenciar el consumo de sustrato (Lactato).

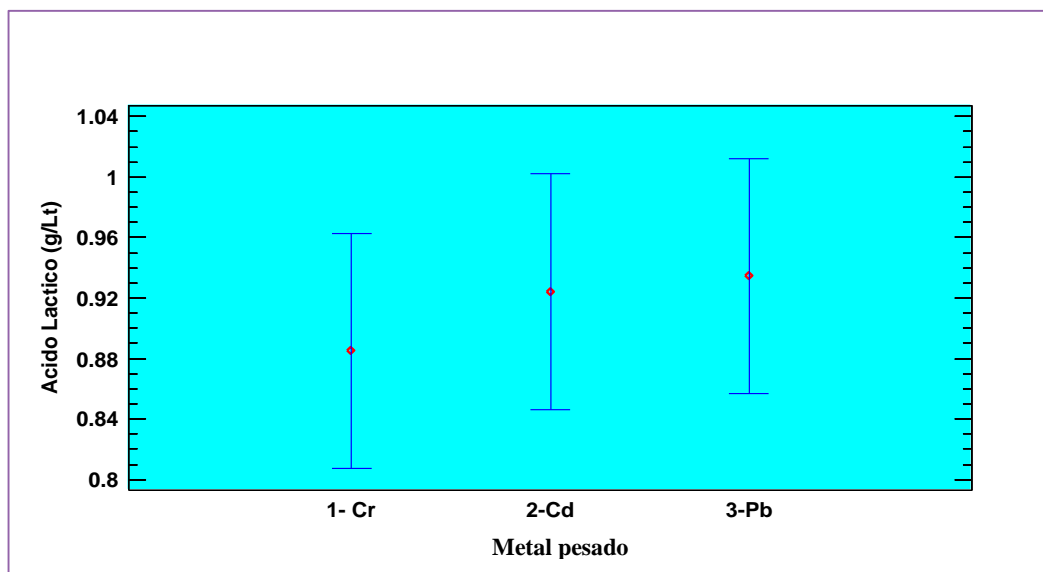
### *Producción de ácido láctico utilizando consorcio bacteriano*

La evaluación de ácido láctico se realizó para el consorcio bacteriano y los días de evaluación (Anexo 23, pág. 144)., al respecto se muestra en el ANOVA (Anexo 24, pág. 144) que en el consorcio no existen diferencias significativas para la producción de ácido láctico en presencia de metales pesados ( $p > 0.05$ ), en cambio para los días de evaluación las diferencias en los niveles de ácido láctico son altamente significativas ( $p < 0.01$ ). La interacción entre ambas variables de metal pesado y tiempo no son significativas ( $p > 0.05$ ).

La aplicación del Test de Tukey indica que los consorcios de Cr, Cd y Pb tienen similares niveles de ácido láctico con promedios de 0.885, 0.924 y 0.9445 g/l respectivamente, tal como se muestra en la Tabla 25 y Figura 28.

**Tabla 25. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido Láctico (g/Lt) por Metal pesado**

Metal pesado	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1- Cr	15	0.885	0.0539305	X
2-Cd	15	0.924	0.0539305	X
3-Pb	15	0.9345	0.0539305	X

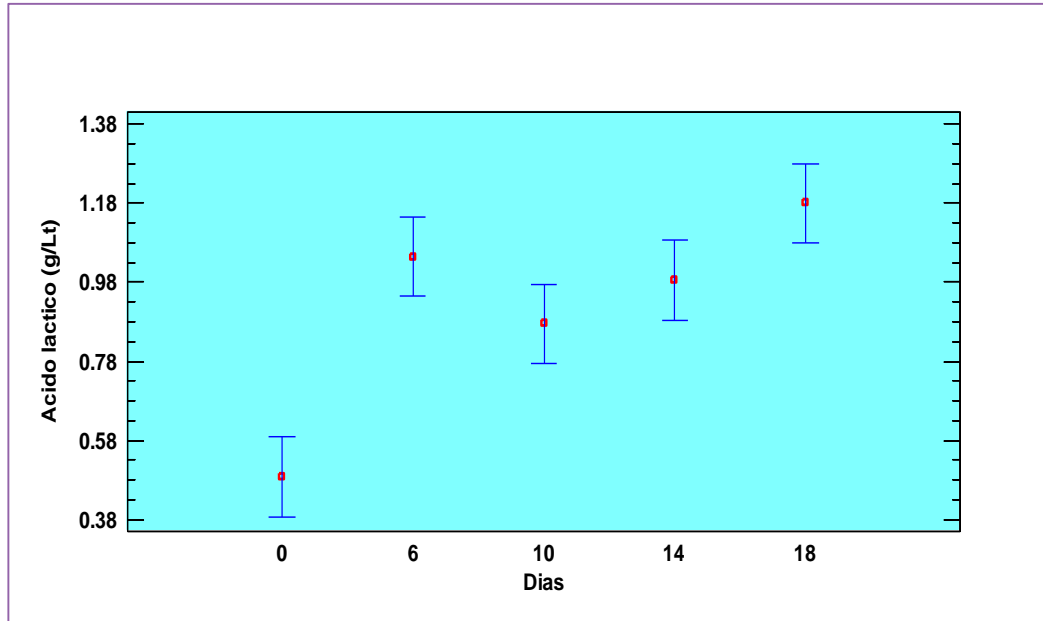


**Figura 28. Ácido Láctico según consorcio bacteriano.** La aplicación del Test de Tukey indica que las muestras de Cr, Cd y Pb tienen similares niveles de ácido láctico.

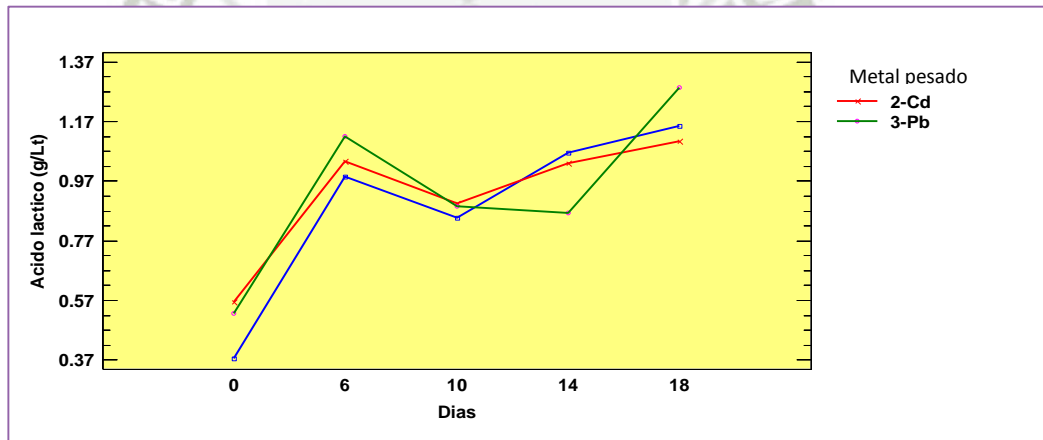
En lo referente al análisis de los resultados por días de evaluación el test de Tukey muestra que al día 6 los niveles de ácido láctico aumentan alcanzando un promedio de 1.045 g/l, sucediendo lo mismo al día 18 donde los niveles de ácido láctico aumentan aún más con un promedio de 1.18 g/l, para disminuir en los días 10 y 14, tal como se aprecia en la Tabla 26 y Figura 29.

**Tabla 26. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido láctico (g/Lt) por Días**

Días	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	9	0.4875	0.069624	X
10	9	0.875	0.069624	X
14	9	0.985	0.069624	XX
6	9	1.045	0.069624	XX
18	9	1.18	0.069624	X



**Figura 29. Ácido láctico según días de evaluación.** Test de Tukey para los días de evaluación, cinética de metabolización.



**Figura 30. Ácido láctico según metal pesado y días de evaluación.** Comparación de las cinéticas de metabolización de cada metal analizado. (Anexo 25, pág. 144).

En la Figura 30 y Anexo 25 se aprecia la variación de los niveles de ácido láctico de cada uno de los metales pesados analizados a través del tiempo, en todos los metales los niveles de ácido láctico aumentan del inicio al día 6, para luego mostrar disminución al día 10 y volver a incrementarse al día 14 y 18. Se observa mayor oxidación de ácido láctico en las muestras con Plomo (Pb) a los días 18 con un promedio de 1.2825 g/l.

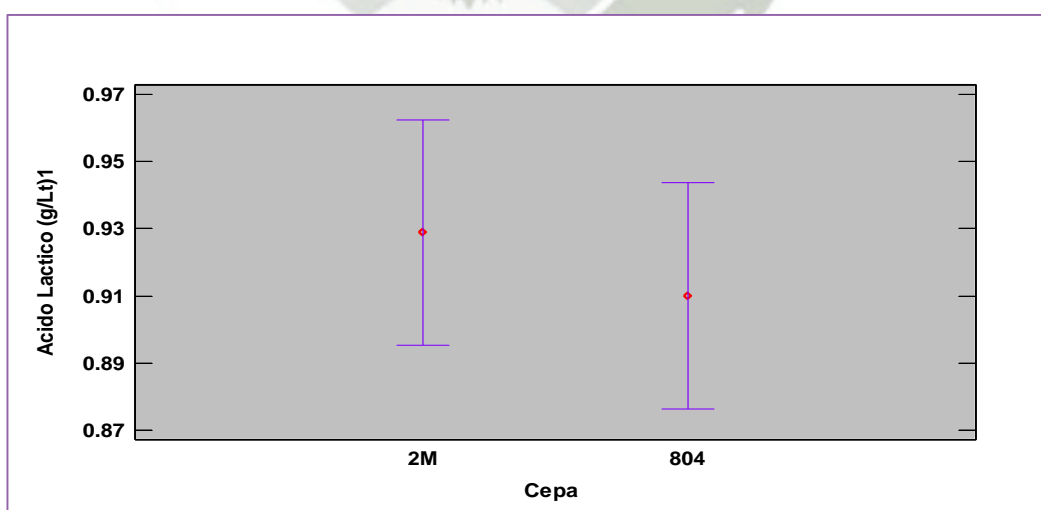
*Producción de ácido láctico por cepa 804 y cepa 2M*

También se realizó la evaluación de ácido láctico para cada cepa en presencia de metales pesados (Cr, Cd y Pb) (Anexo 26, pág. 145 y Anexo 27, Pág. 146), en el Anexo 28 se muestra el ANOVA para la reducción de ácido láctico por tipos de cepas, por metal pesado utilizado y tiempo de evaluación, de todas estas variables solo el tiempo de evaluación mostro significación altamente significativa ( $p < 0.01$ ), de igual manera la interacción cepa y metal pesado mostró significación altamente significativa ( $p < 0.01$ ).

El test de Tukey para la comparación de cepas muestra que no existen diferencias significativas entre la cepa 804 y 2M para los niveles de ácido láctico como se muestra en la Tabla 27 y Figura 31.

**Tabla 27. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido láctico (g/Lt)1 por Cepa**

Cepa	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
804	45	0.91	0.0261917	X
2M	45	0.929	0.0261917	X

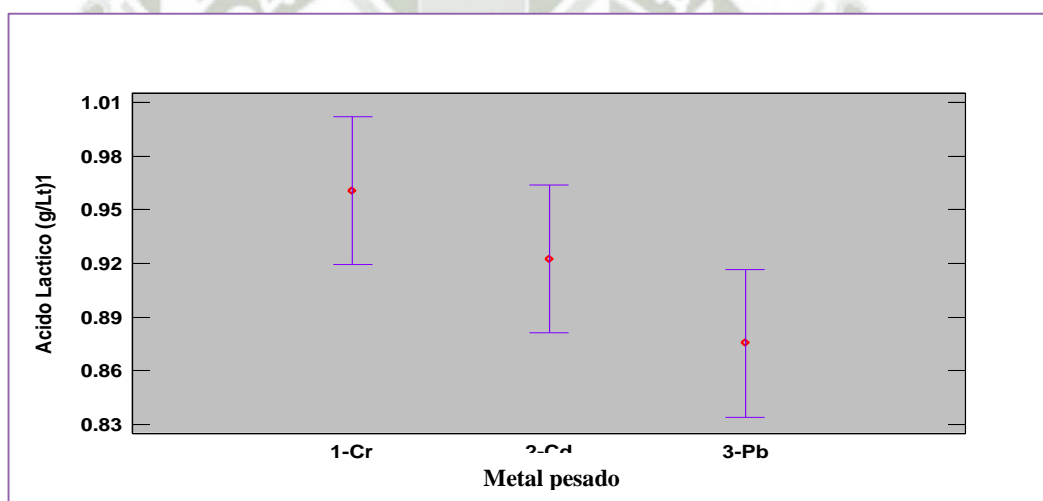


**Figura 31. Niveles de ácido láctico por cepas.** Nivel promedio de ácido láctico para cada cepa

De igual forma se encontró que entre los metales pesados las diferencias entre los niveles de ácido láctico no son significativas, tal como lo demuestra el test de Tukey. Los promedios de ácido láctico están entre 0.8752 g/l en Pb, 0.9608 g/l para Cr y 0.9225 g/l para Cd como se muestra en la Tabla 28 y Figura 32.

**Tabla 28. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido láctico (g/Lt) por Metal pesado**

Metal pesado	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3-Pb	42	0.87525	0.029338	X
2-Cd	42	0.9225	0.029338	X
1-Cr	42	0.96075	0.029338	X

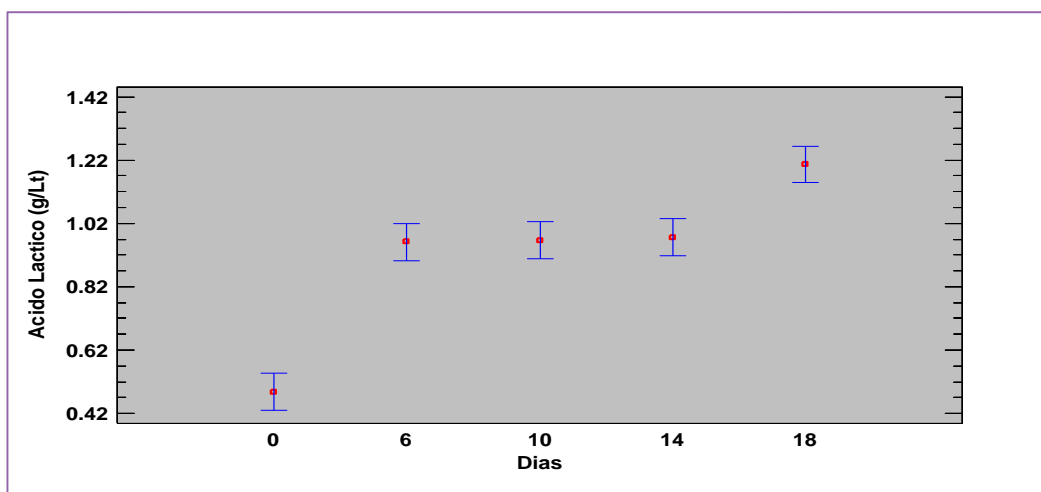


**Figura 32. Niveles de ácido láctico por metal pesado. Diferencias no significativas entre cada metal.**

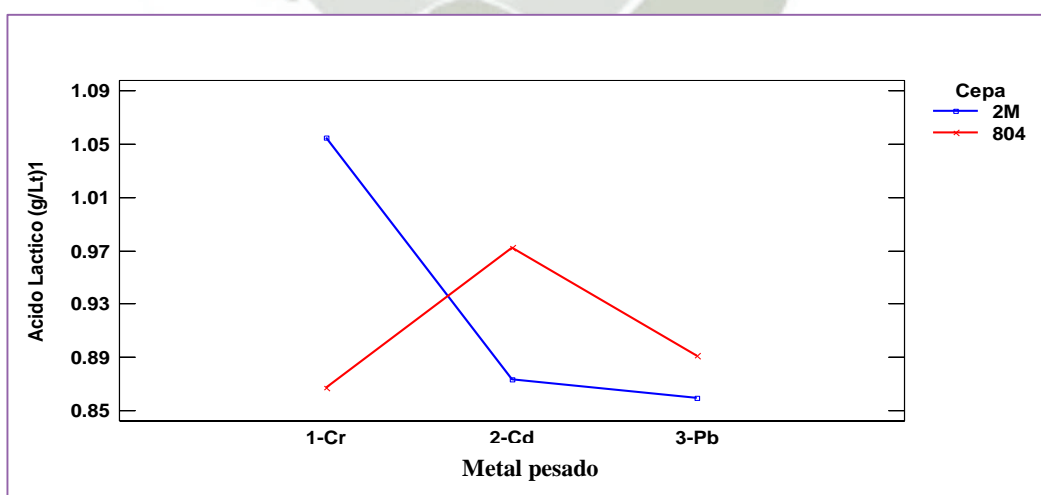
Según el test de Tukey en el tiempo de evaluación si muestran diferencias significativas los niveles de ácido láctico, siendo en el tiempo 0 el nivel más bajo con un promedio de 0.4875 g/l para luego incrementarse en el día 6, 10 y 14 a promedio de 0.9612, 0.9662 y 0.9762 g/l e incrementarse aún más en el día 18 a un promedio de 1.2062 tal como se muestra en la Tabla 29 y Figura 33.

**Tabla 29. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido láctico (g/Lt)1 por días**

Días	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	18	0.4875	0.0414128	X
6	18	0.96125	0.0414128	X
10	18	0.96625	0.0414128	X
14	18	0.97625	0.0414128	X
18	18	1.20625	0.0414128	X

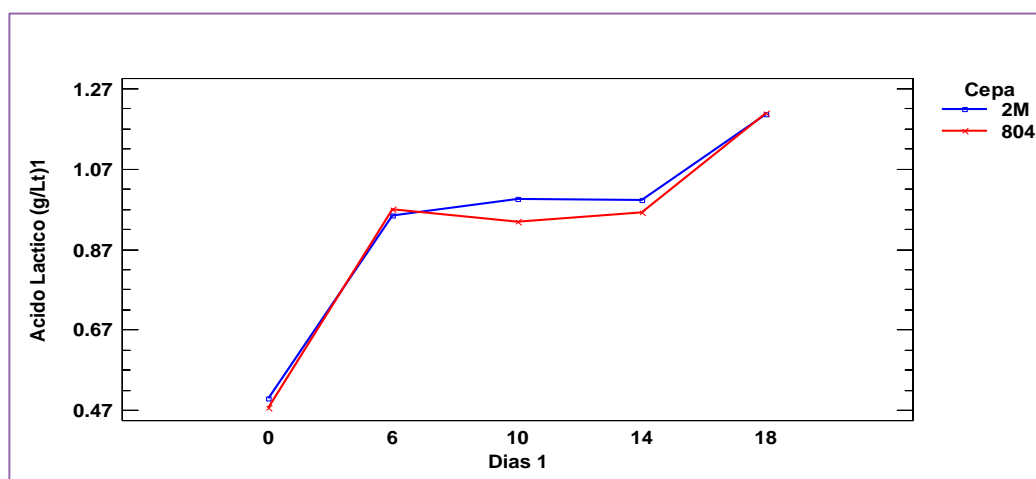


**Figura 33. Niveles de ácido láctico por días. Test de Tukey para los niveles de ácido láctico por días muestras diferencias significativas.**



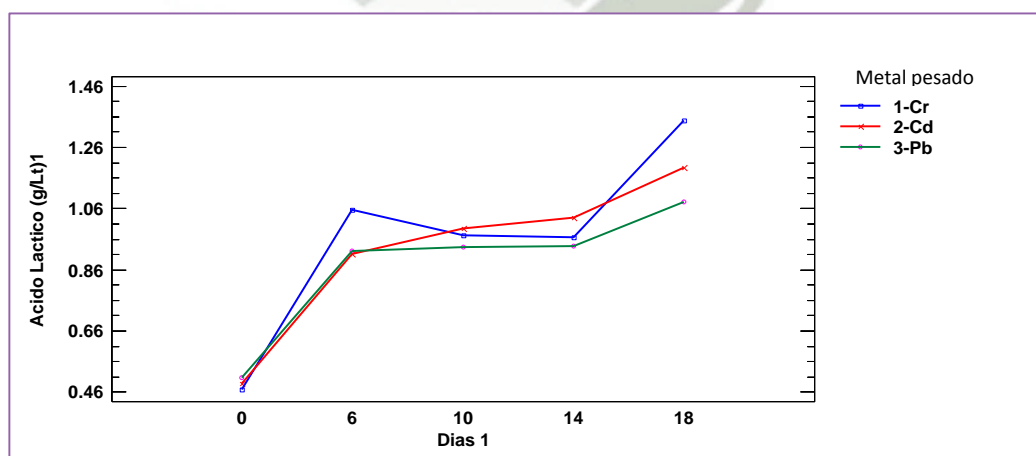
**Figura 34. Niveles de ácido láctico según cepa y metal pesado. Interacción negativa entre las cepas y el metal pesado.**

Entre la cepa y el metal pesado se muestra una interacción negativa es decir que mientras que con la cepa 2M el nivel de ácido láctico aumenta en Cr, disminuye con la cepa 804, en Cd es todo lo contrario con la cepa 804 aumenta los niveles de ácido láctico disminuyendo con la cepa 2M y el Pb en ambas cepas los niveles de ácido láctico son similares (Figura 34).



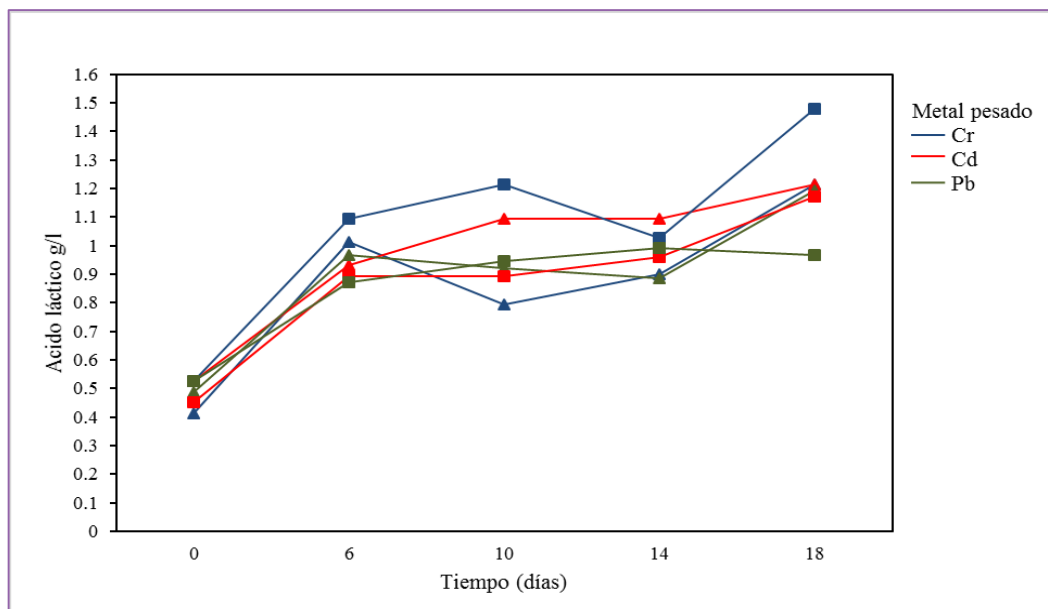
**Figura 35. Niveles de ácido láctico según cepa y días.** Comportamiento de cada cepa en presencia de metales pesados. (Anexo 29, Pág. 147).

El comportamiento de las cepas a través del tiempo se manifiesta similar para los niveles de ácido láctico como se muestra en la Figura 35.



**Figura 36. Niveles de ácido láctico según metal pesado y días.** Sin diferencias significativas en la producción de ácido láctico en presencia de cada metal.

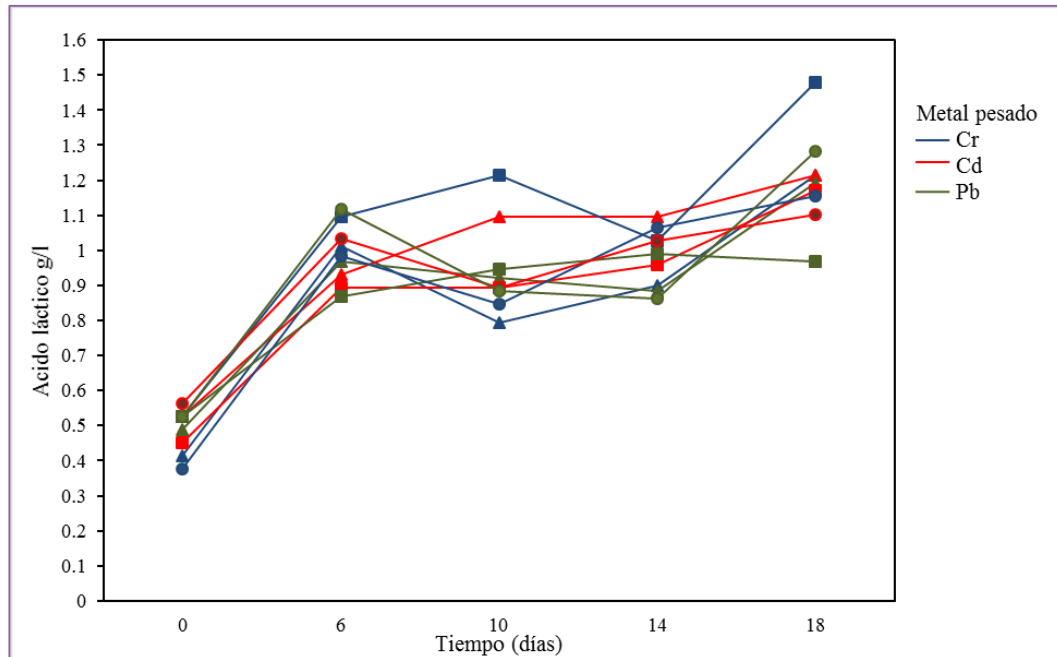
Los niveles de ácido láctico para cada metal pesado (Cr, Cd, y Pb) a través del tiempo no muestran significación estadística como se muestra en la Figura 36 que muestra de manera similar la oxidación de ácido láctico presente en el medio para cada metal analizado.



**Figura 37. Cinética de metabolización del ácido láctico en presencia de metales pesados y por cada cepa. Cepa 804 (Triángulos); Cepa 2M (cuadrados).**

En la Figura 37 se muestra las cinéticas de oxidación de ácido láctico por cepa y metal pesado utilizado, la cepa 2M en presencia de cromo (Cr) tiene mayor producción de ácido láctico al tener un promedio de 1.4775 g/l en comparación de la cepa 804 al tener 1.215 g/l. En el caso de cadmio (Cd) ambas cepas producen la misma cantidad de ácido láctico (1.215 y 1.17 g/l; cepa 804 y 2M respectivamente), En presencia de plomo (Pb) la cepa 804 oxida mayor cantidad de ácido láctico (1.1925 g/l) en comparación con la cepa 2M (0.9675 g/l).

En la Figura 38 se muestra la comparación del consorcio bacteriano con las cepas utilizadas en presencia de metales pesados, se oxidó mayor cantidad de ácido láctico en presencia de Cr para la cepa 2M, en cuanto en presencia de Cd del mismo modo la cepa 2M oxidó mayor cantidad de ácido láctico y por último en cuanto a la presencia de Pb en el medio el consorcio bacteriano oxidó más.



**Figura 38. Comparación de las cinéticas de metabolización de las cepas y el consorcio microbiano en presencia de metales pesados.** Ceba 804 (Triángulos); Ceba 2M (Cuadrados); Consorcio bacteriano (Círculos).

### Concentración de sulfatos en presencia de metales pesados

Como se mencionó anteriormente la medición de sulfatos presente en el medio se realizó para medir la cantidad de sulfuros formados necesarios para que reaccionen con el metal pesado y así formar los sulfuros metálicos correspondientes.

#### *Reducción de sulfatos utilizando consorcio bacteriano*

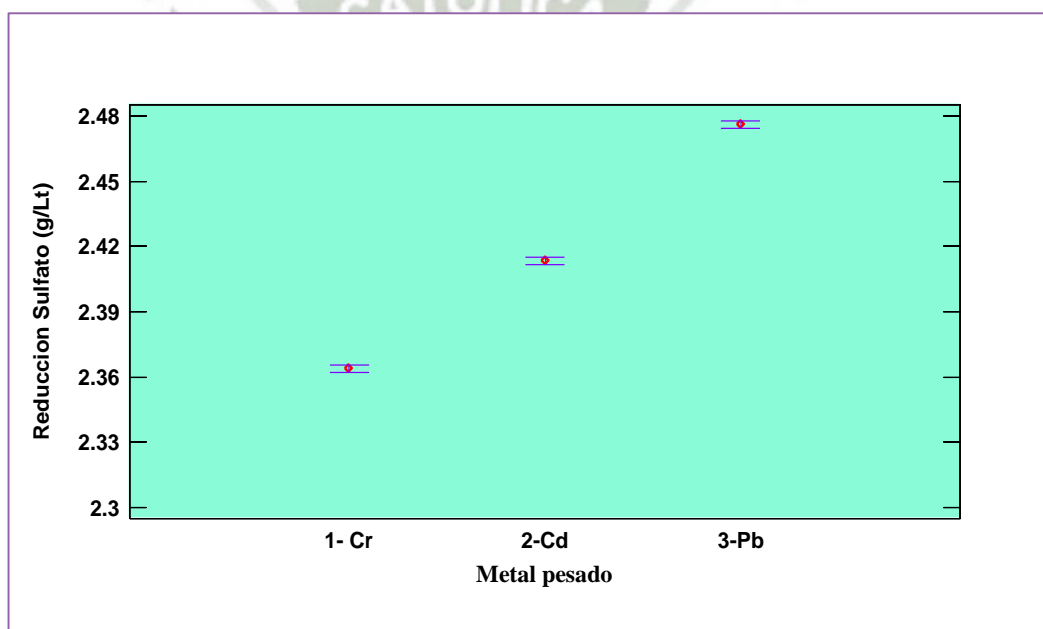
En lo referente a la reducción de sulfatos usando el consorcio se muestran las mediciones en el Anexo 30, se encontró a través del ANOVA que el metal pesado, los días de evaluación y la interacción entre cada variable mostraron diferencias altamente significativas en la reducción de sulfatos ( $p < 0.01$ ) (Anexo 31, pág. 148).

En lo concerniente al metal pesado (Cr, Cd y Pb) utilizado se encontró a través del Test de Tukey que los niveles más altos de reducción de sulfatos se encuentran con el Pb con un promedio de 2.4762 g/l y el más bajo con el Cr que alcanza un promedio

de 2.3637 g/l y el Cd tiene promedios intermedios con 2.4134 g/l en los niveles de sulfato como se muestra en la Tabla 30 y Figura 39.

**Tabla 30. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Reducción Sulfato (g/Lt) por Metal pesado**

Metal pesado	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1- Cr	15	2.3637	0.00120493	X
2-Cd	15	2.41339	0.00120493	X
3-Pb	15	2.47623	0.00120493	X

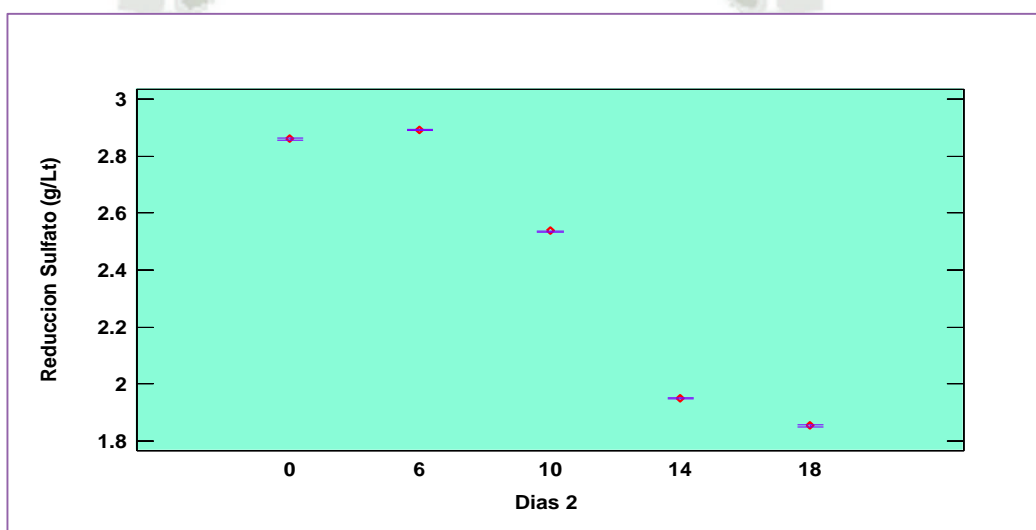


**Figura 39. Reducción de sulfato por metal pesado. Test de Tukey, diferencias altamente significativas**

En cuanto a la evaluación de la reducción de sulfatos según el tiempo de evaluación se encontró a través del Test de Tukey que se muestra una reducción de los niveles de sulfato a través del tiempo iniciándose con un promedio de 2.8605 g/l y llegando al día 18 a un promedio de 1.85274 g/l en la concentración de sulfatos como se muestra en la Tabla 31 y Figura 40.

**Tabla 31. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para reducción Sulfato (g/Lt) por días**

Días	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
18	9	1.85274	0.00155556	X
14	9	1.94865	0.00155556	X
10	9	2.53561	0.00155556	X
0	9	2.86048	0.00155556	X
6	9	2.89141	0.00155556	X

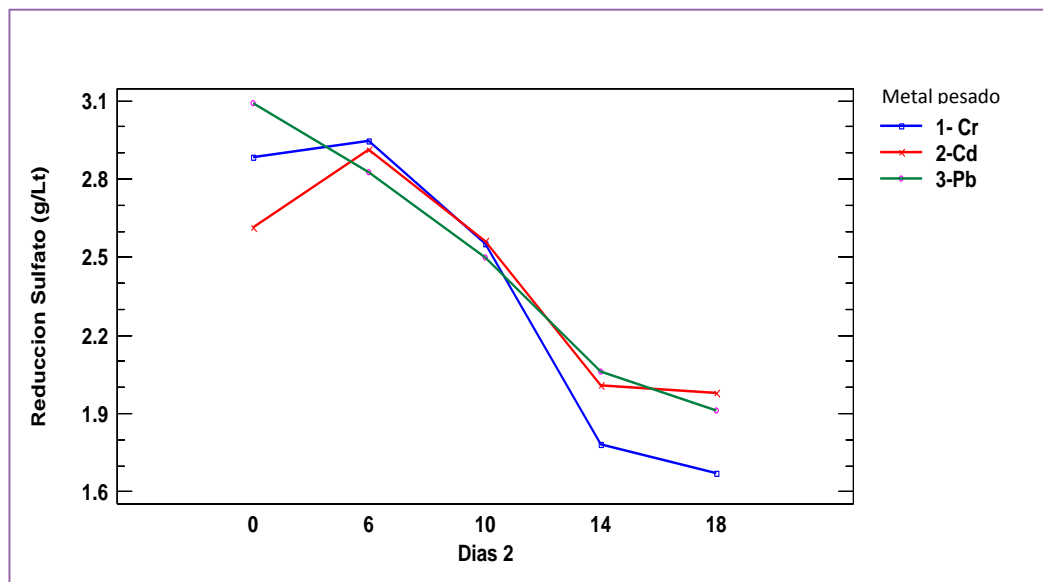


**Figura 40. Reducción de sulfatos por días de evaluación.** Evolución de la concentración de sulfato en el cultivo.

En la Figura 41 se presenta la evolución característica de la concentración de sulfato en un cultivo de *Desulfovibrio sp.* conteniendo metales pesados se detecta una disminución en la concentración de sulfato semejante a los sistemas analizados independientemente del metal presente.

En cuanto a la reducción de sulfatos por metal pesado y días de evaluación se tiene que con el Cr se logra la mayor disminución en los niveles de sulfatos, en Cd y Pb las variaciones de los niveles de sulfatos a través del tiempo son similares (Anexo 32, pág. 149). En el Figura 41 puede verse que todos los ensayos realizados tienen un comportamiento muy similar. En todos los casos se detectó una disminución de la concentración de sulfato hasta el día 14 aproximadamente, y a partir de ese día dicha

magnitud se mantiene aproximadamente constante. El valor obtenido es de 1.8 g/l sugiriendo alguna inhibición por producto (Cooney y col., 1996).



**Figura 41. Reducción de sulfatos según metal pesado y días de evaluación.** Variación de la concentración de sulfatos similar para cada metal

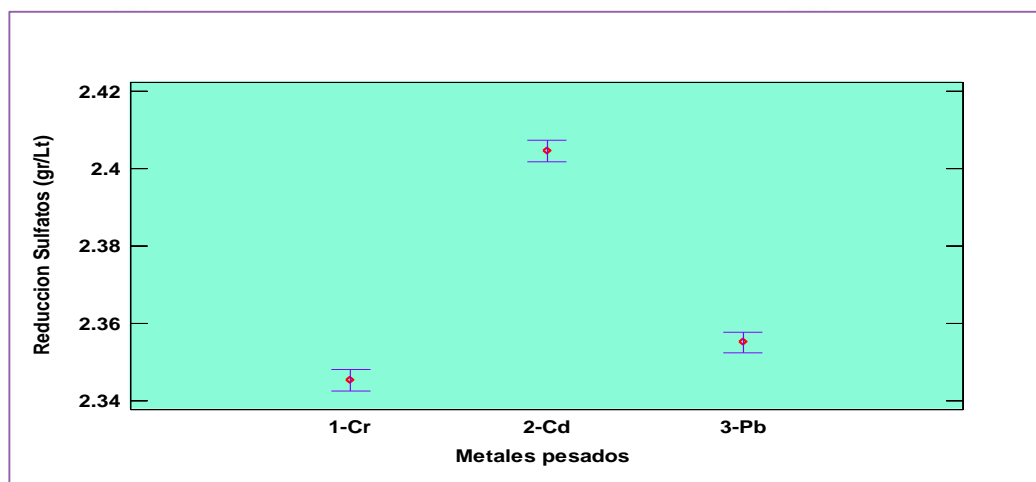
#### *Reducción de sulfatos por cepa 804 y cepa 2M*

Se realizó la evaluación de concentración de sulfatos en presencia de metales pesados (Anexo 33 y 34 pág. 150), las tres variables estudiadas cepas, metales pesados y días de evaluación mostraron diferencias altamente significativas sobre la reducción de sulfatos ( $p < 0.01$ ) tal como lo muestra el ANOVA, lo mismo se encontró para las interacciones (Anexo 35, pág. 151).

El Test de Tukey aplicado para los metales pesados muestra que con el Cd se alcanza el promedio más alto de reducción de sulfatos 2.4046 g/l y con el Cr se logra la menor reducción de sulfato con un promedio de 2.3453 g/l, el Pb se considera con una reducción intermedia con un promedio de 2.3551 g/l como se muestra en la Tabla 32 y Figura 42.

**Tabla 32. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para reducción Sulfatos (gr/Lt) por Metales pesados.**

Metales pesados	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<b>1-Cr</b>	30	2.34528	0.00192027	X
<b>3-Pb</b>	30	2.35508	0.00192027	X
<b>2-Cd</b>	30	2.40462	0.00192027	X

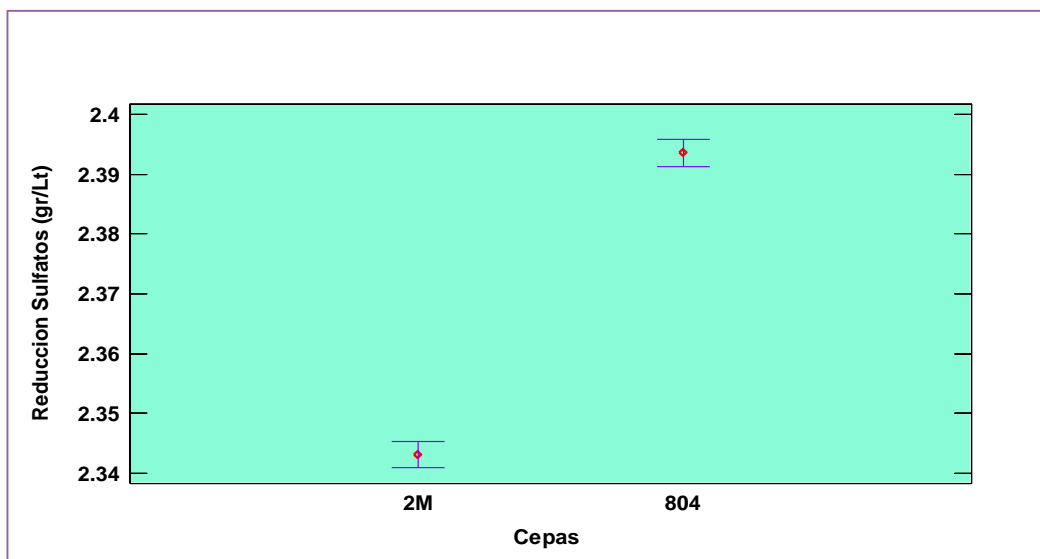


**Figura 42. Reducción de sulfatos en presencia de metales pesados.** Aplicación del Test de Tukey, diferencias significativas.

En la Tabla 33 y Figura 43 se muestra que la cepa 804 logra el promedio más alto en la reducción de sulfato con un valor de 2.3936 g/l y con la cepa 2M alcanza el menor promedio con 2.3431 g/l en los niveles de concentración de sulfato. Mediante esta Figura se puede observar que la cepa 804 no se inhibe por estar en presencia de metales pesados.

**Tabla 33. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para reducción Sulfatos (gr/Lt) por Cepa.**

Cepa	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<b>2M</b>	45	2.34306	0.0015679	X
<b>804</b>	45	2.39359	0.0015679	X

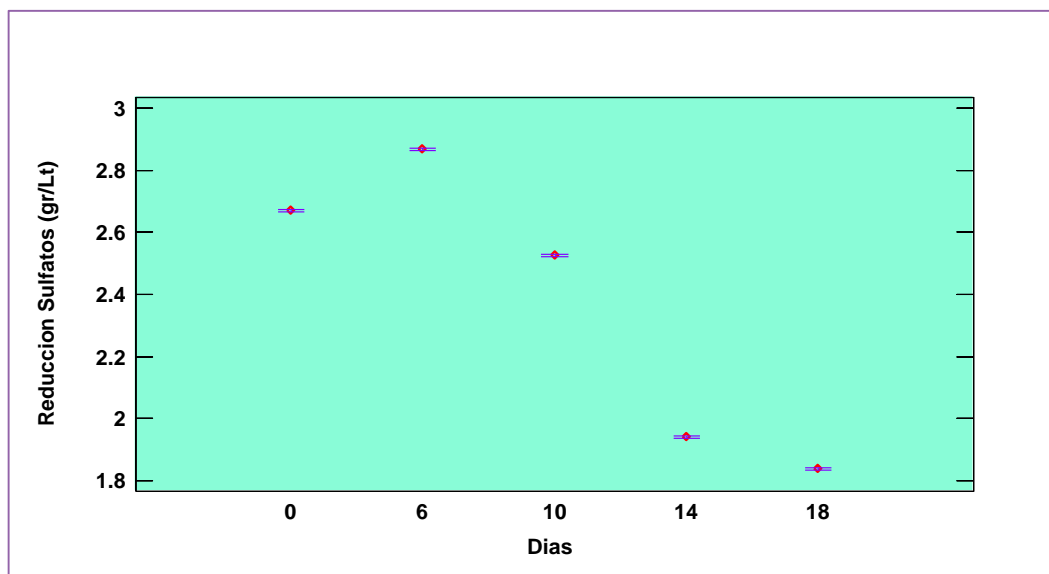


**Figura 43. Reducción de sulfatos por cepas en presencia de metales pesados.** Cepa 804 mayor reducción de sulfatos en presencia de metales.

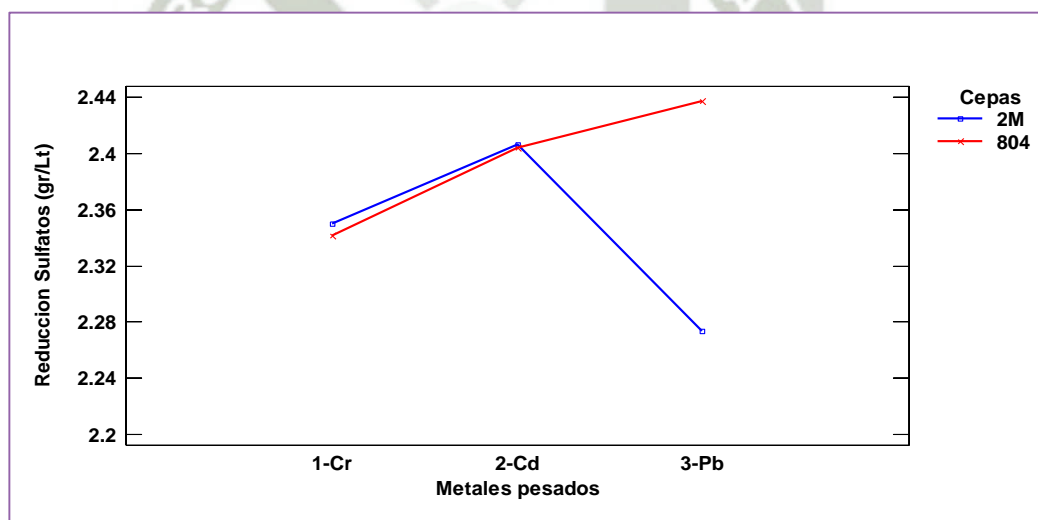
En cuanto a los niveles de reducción de sulfatos por tiempo de evaluación se nota que al comienzo del cultivo se aumenta la concentración de sulfatos esto se puede deber a que las bacterias se van acostumbrando a la presencia de metales, existe una disminución en el sulfato respecto al tiempo de evaluación iniciándose un promedio de 2.6714 g/l hasta llegar un promedio de 1.8377 g/l a los 18 días como se observa en la Tabla 34 y Figura 44.

**Tabla 34. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para reducción Sulfatos (gr/Lt) por días.**

Días	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
18	18	1.83764	0.00247906	X
14	18	1.93882	0.00247906	X
10	18	2.52546	0.00247906	X
0	18	2.67136	0.00247906	X
6	18	2.86834	0.00247906	X

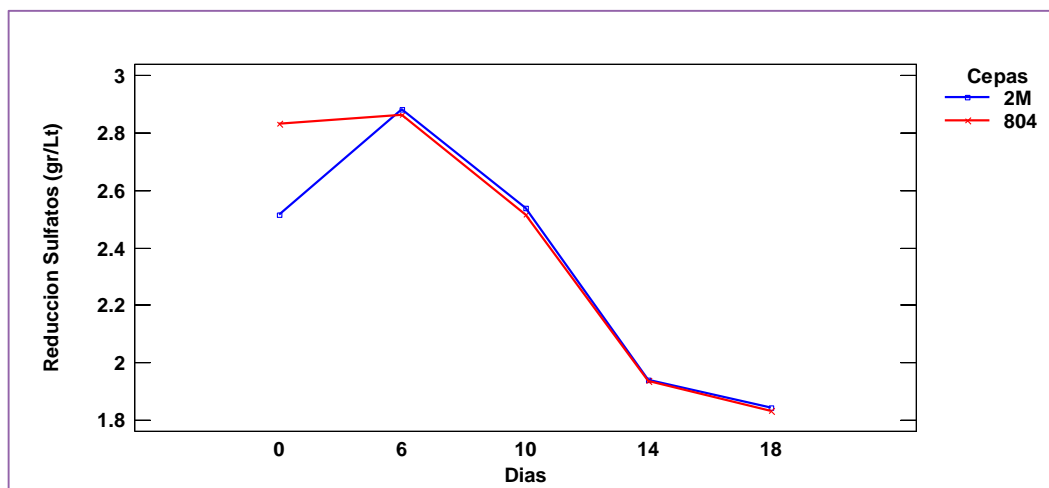


**Figura 44. Reducción de sulfatos por días en presencia de metales pesados.** Curva característica en la reducción de sulfatos.



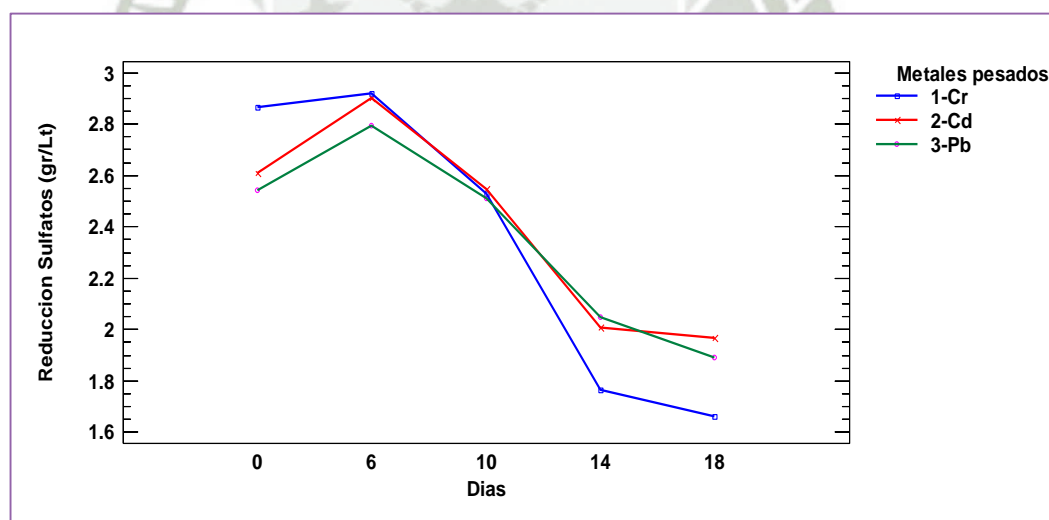
**Figura 45. Reducción de sulfatos por cepas y metales pesados.** Variación de concentración de sulfatos en presencia de cada metal pesado.

Para la interacción cepa – metales pesados se encontró que con la cepa 804 los niveles de sulfato aumentan con Cr, Cd y Pb, en cambio con la cepa 2M los niveles de sulfato aumentan con Cr y Cd, pero disminuyen con el Pb (Figura 45, Anexo 36).



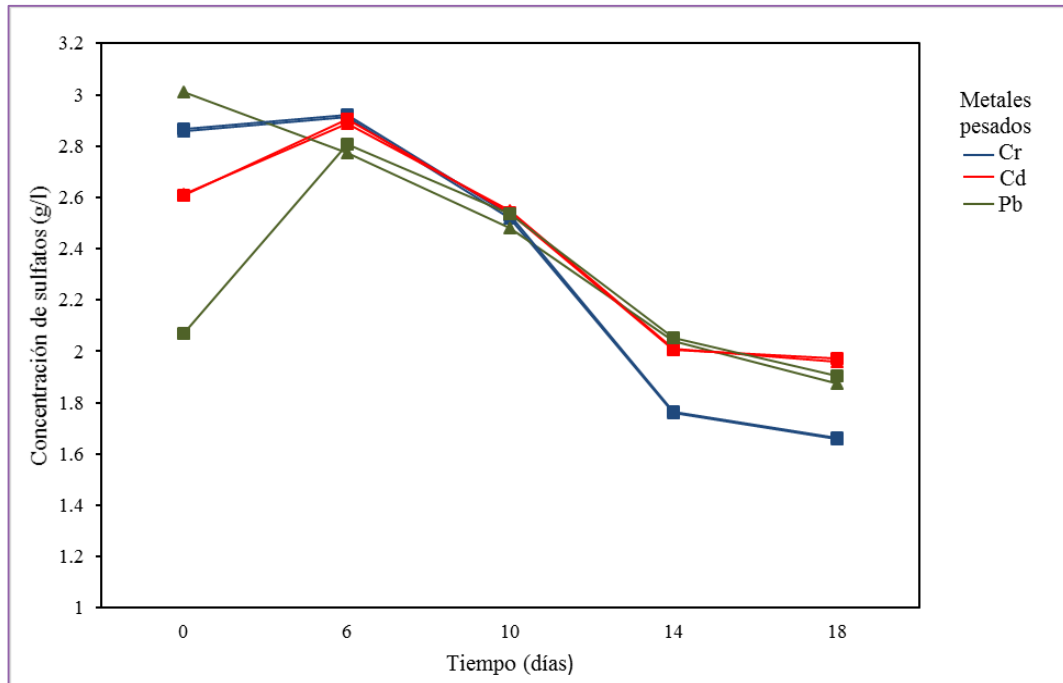
**Figura 46. Reducción de sulfatos por cepas y días.** Ambas curvas de reducción de sulfatos para cada cepa tienen mismo comportamiento. (Anexo 36, pág. 151).

Al comparar el comportamiento de las cepas en los diferentes tiempos analizados la concentración de sulfato para cada tiempo es similares, muestra una curva que disminuye a través del tiempo como se observa en la Figura 46.



**Figura 47. Reducción de sulfatos por metales pesados y días.** Curva de metabolización de sulfatos en presencia de metales pesados a través del tiempo.

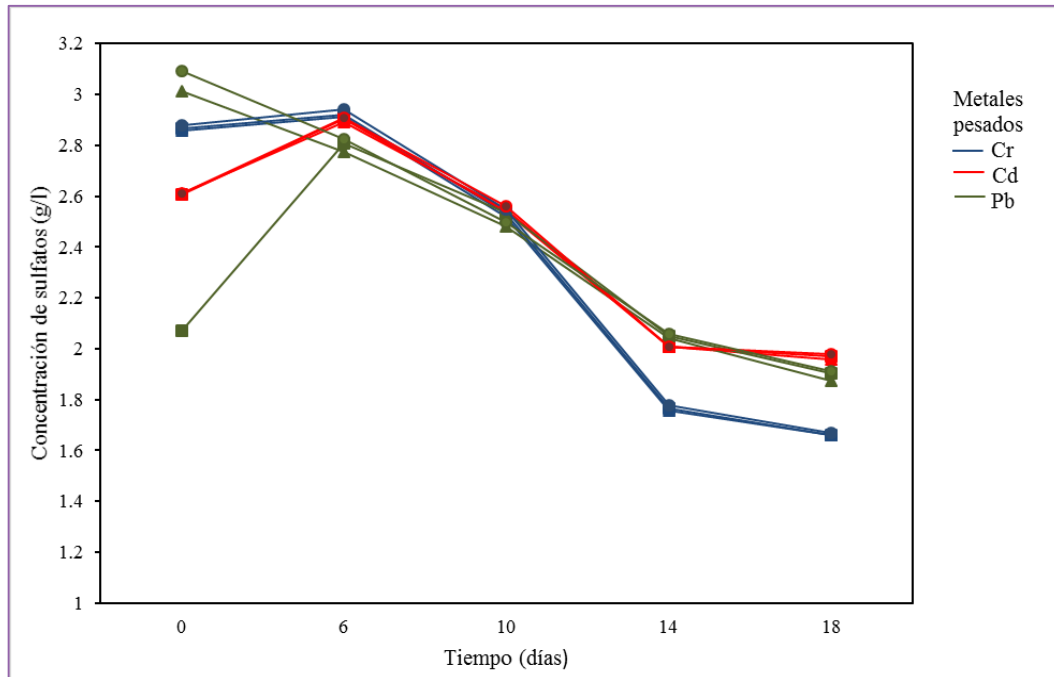
Los niveles de concentración de sulfatos en la interacción de cada metal pesado con los días analizados se muestran que con el Cr a los 14 y 18 días se produce menor promedio en la reducción como se muestra en la Figura 47.



**Figura 48. Cinética de metabolización de sulfatos en presencia de metales pesados y cada cepa. Cepa 804 (Triangulo); Cepa 2M (Cuadrado).**

En la Figura 48 se muestra las cinéticas de reducción de sulfatos por cepa y metal pesado utilizado, Ambas cepas (804 y 2M) en presencia de cromo (Cr) tiene mayor reducción de la concentración de sulfatos final al tener un promedio en ambos casos de 1.66 g/l. En el caso de cadmio (Cd) ambas cepas reducen de forma similar la concentración de sulfatos (1.9586 y 1.9707 g/l; cepa 804 y 2M respectivamente), en presencia de plomo (Pb) la cepa 804 al comienzo del tratamiento tuvo una mayor concentración de sulfatos, pero tuvo una concentración final de 1.8736 g/l parecida a la cepa 2M que tuvo una concentración de 1.9037 g/l.

En cuanto a la comparación del consorcio con las cepas utilizadas en presencia de metales pesados, disminuyó mayor cantidad de la concentración de sulfatos en presencia de Cr para el consorcio microbiano, en cuanto en presencia de Cd la cepa 804 redujo mayor cantidad de sulfatos y por último en cuanto a la presencia de Pb en el medio el consorcio bacteriano disminuyó mayor cantidad de sulfatos (Figura 49).



**Figura 49.** Comparación de las cinéticas de metabolización de sulfatos de las cepas y el consorcio bacteriano en presencia de metales pesados. Cepa 804 (Triangulo); Cepa 2M (Cuadrado); Consorcio bacteriano (Circulo).

### Precipitación de Cromo (Cr), Cadmio (Cd) y Plomo (Pb)

La precipitación de metales pesados realizada por las BRS se realiza de acuerdo a la ecuación (10) señalada anteriormente, en la cual explica la reacción que sucede al estar en contacto las bacterias reductoras de sulfato con los metales, el sulfato reducido en sulfuro se une al metal formando un sulfuro metálico el cual precipita lo cual conlleva a un aumento de la concentración de  $H^+$ , ocasionando la disminución del pH de la disolución.

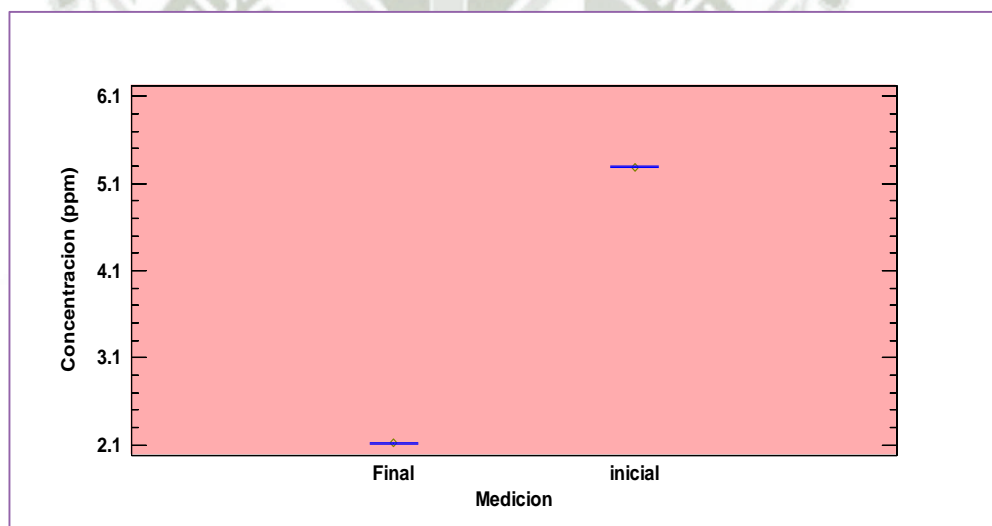
Para evaluar la eficacia de la precipitación de metales por la cepa 804, 2M y el consorcio bacteriano, la concentración de metales pesados se midió al principio y final del experimento en las tres réplicas, los resultados brindados por los laboratorios Analíticos del Sur se muestran en los Anexos 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En estos experimentos las concentraciones iniciales de los metales fueron: Cr(III) 1.0 ppm; Cd(II) 4.0 ppm y Pb 11.0 ppm.

*Precipitación de metales pesados utilizando consorcio bacteriano*

En el ANOVA se realizó a partir de los datos señalados en el Anexo 49. Se encontró diferencias significativas en la concentración de metales pesados según la medición y en los diferentes metales ( $p < 0.01$ ) (Anexo 55, pág. 161). La medición de metales pesados inicial arroja un promedio de 5.2916 ppm, para al final disminuir a un promedio de 2.1189 ppm como se observa en la Tabla 35 y Figura 50.

**Tabla 35. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Concentración de metales pesados (ppm) por Medición**

Medición	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<b>Final</b>	9	2.1189	0.00178339	X
<b>inicial</b>	9	5.2916	0.00178339	X

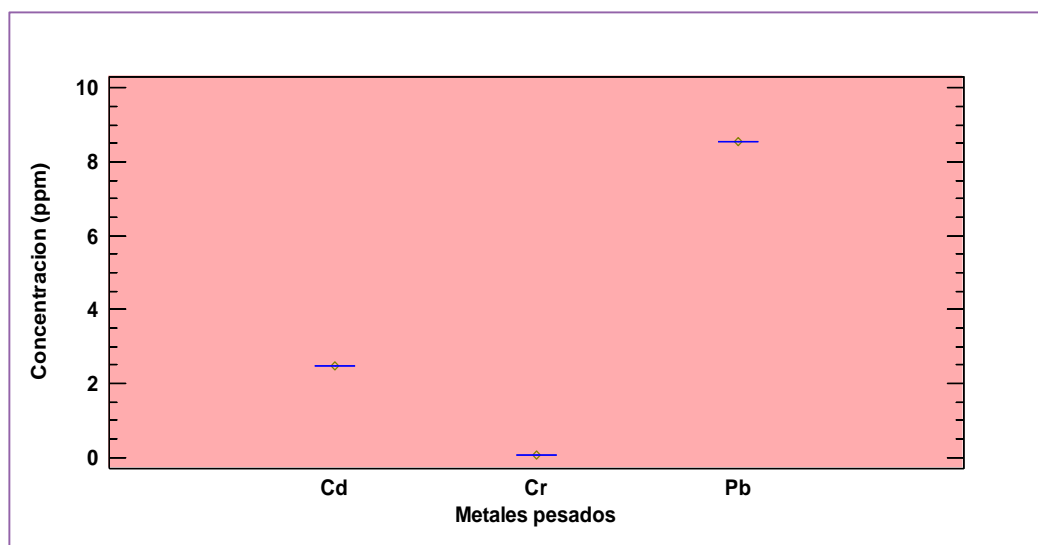


**Figura 50. Concentracion Final e Inicial en presencia de consorcio bacteriano.** Test de Tukey, se observa la diferencia de concentraciones.

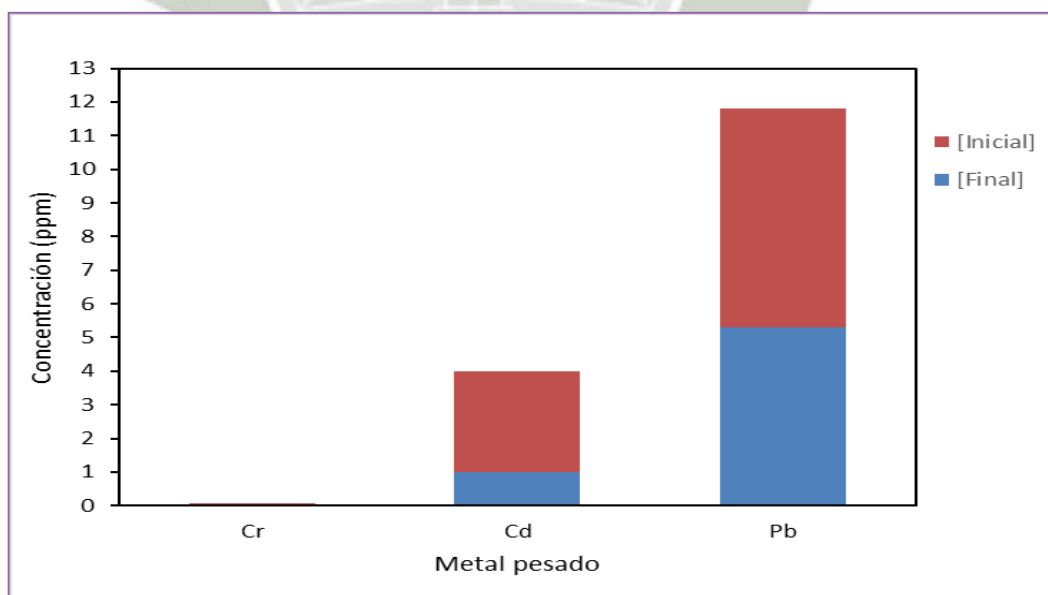
Según el Test de Tukey la mayor concentración de metal presente en el medio es el de Pb con un promedio de 8.5561 ppm seguido de Cd con un promedio de 2.4894 ppm y en el Cr se encontró la menor concentración con un promedio de 0.0702 ppm como se muestra en la Tabla 36 y Figura 51.

**Tabla 36. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración (ppm) por Metales Pesados**

Metales Pesados	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<b>Cr</b>	6	0.0702	0.0021842	X
<b>Cd</b>	6	2.4894	0.0021842	X
<b>Pb</b>	6	8.5561	0.0021842	X



**Figura 51. Concentración total de metales pesados.** Test de Tukey realizado, mayor concentración de Plomo



**Figura 52. Concentración de metales pesados en el tratamiento con consorcio bacteriano.** Concentración de cada metal al inicio y final de la experiencia. (Anexo 56, pág. 161).

En la Figura 52 se muestra las concentraciones iniciales y finales de cada metal analizado se puede observar que en el caso del Cr se obtuvo una precipitación del 37% del total al obtener una concentración final de 0.0542 ppm, en el caso de Cd se obtuvo una precipitación del 75% al obtener una concentración final de 0.9926 ppm y por último en Pb precipito el 55% del total con una concentración final de 5.3099 ppm. Como puede verse, la eficacia de precipitación de metales pesados fue alta para el Cd, sin embargo, la eliminación del Cr y Pb fue baja.

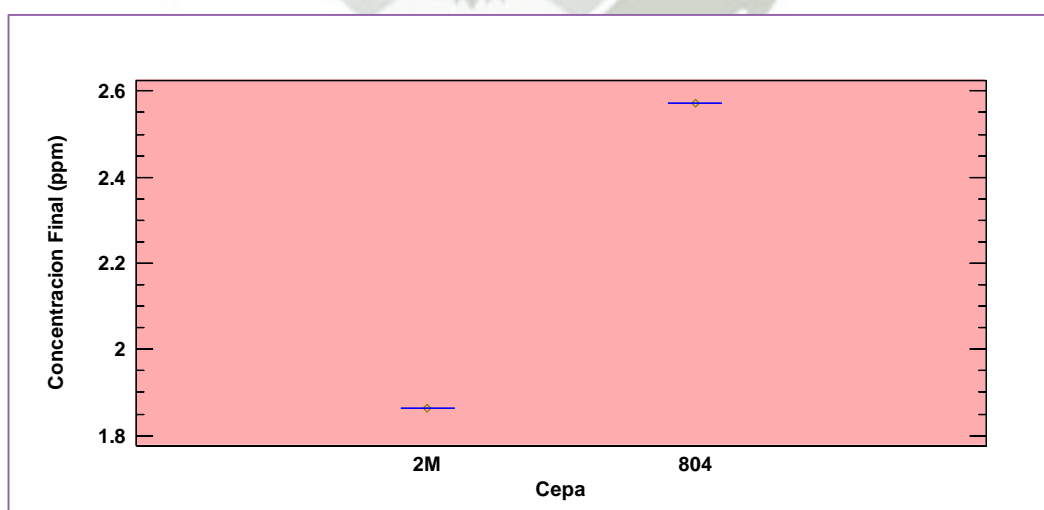
*Precipitación de metales pesados por cepa 804 y cepa 2M*

Los análisis estadísticos se realizaron a partir de los datos mostrados en los Anexos 50 y 51 (Pág. 158 y 159, respectivamente).

Los resultados del ANOVA muestran diferencias altamente significativas entre las cepas, los metales pesados y en la interacción ( $p < 0.01$ ) (Anexo 57, pág. 162).

**Tabla 37. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración (ppm) por Cepa**

Cepa	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2M	9	1.8629	0.000330987	X
804	9	2.5726	0.000330987	X

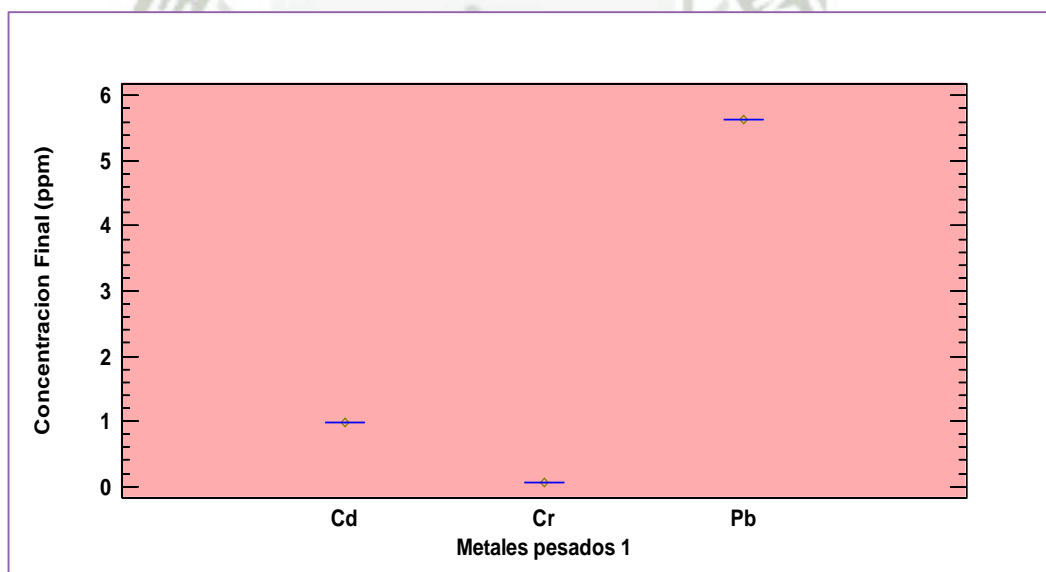


**Figura 53. Concentración de metales pesados por cepas.** Diferencias altamente significativas entre la concentración de metales de cada cepa.

La concentración de metales pesados según los tipos de cepas muestra que con la cepa 804 se alcanza el promedio más alto de metales pesados con un valor de 2.5726 ppm en contraste con la cepa 2M cuyo promedio en los metales pesados es de 1.8629 ppm como se observa en la Tabla 37 y Figura 53.

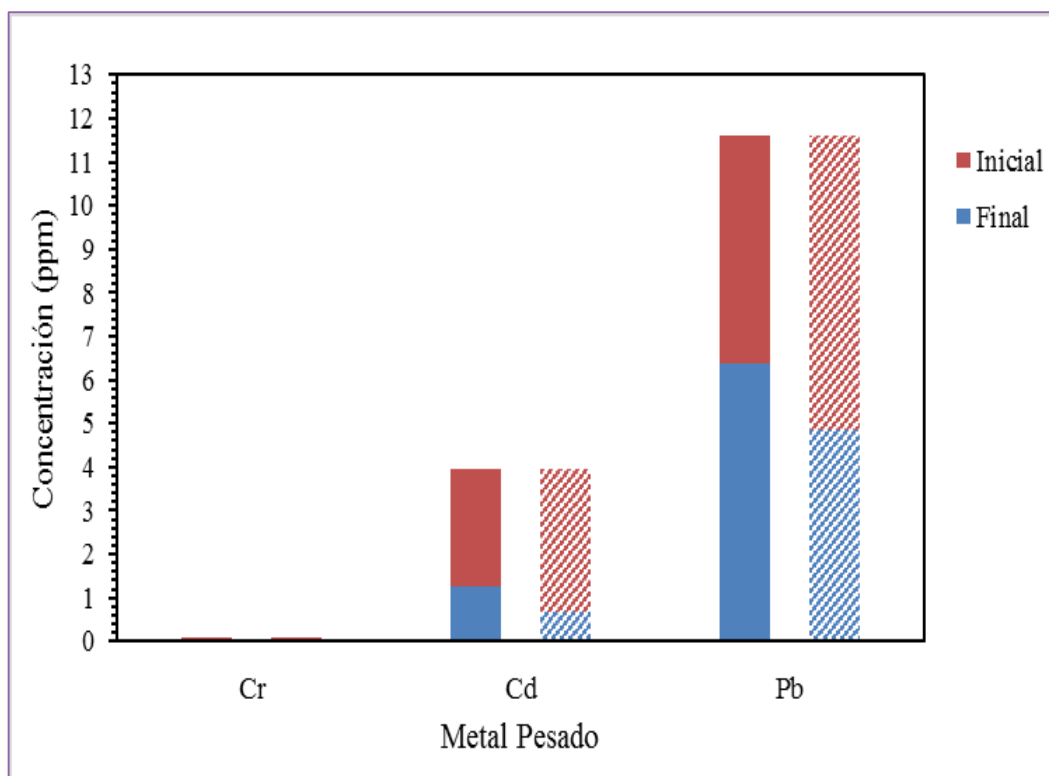
**Tabla 38. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración (ppm) por Metales pesados**

Metales pesados	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<b>Cr</b>	6	0.0531	0.000405375	X
<b>Cd</b>	6	0.9724	0.000405375	X
<b>Pb</b>	6	5.6278	0.000405375	X



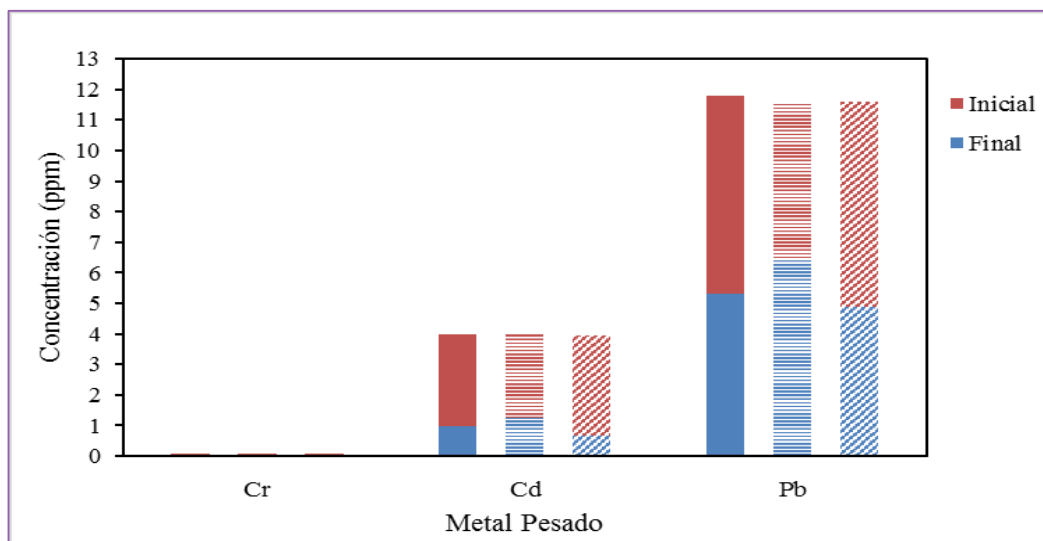
**Figura 54. Concentración total de metales pesados en ppm.** Diferencias significativas entre cada metal analizado.

La concentración total de metales pesados muestra que en Pb se alcanza el promedio más alto con un valor de 5.6278 ppm, seguido por el Cd cuyo promedio es de 0.9724 ppm y el Cr es el que alcanza la concentración más baja con un promedio de 0.0531 ppm como se observa en la Tabla 38 y Figura 54.



**Figura 55. Concentración final e inicial de metales pesados comparando ambas cepas.** Cepa 804 (Barras solidas); Cepa 2M (Barras con líneas en diagonal). (Anexo 58, pág. 162).

En la Figura 55 se muestra las concentraciones iniciales y finales de cada metal analizado comparando ambas cepas, como se puede observar para el caso del Cr usando la cepa 804 se obtuvo una concentración final de 0.0594 ppm en comparación de la cepa 2M que fue 0.0468 ppm (porcentaje de reducción de 30% y 45% respectivamente), en el Cd se obtuvo una concentración final de 1.2708 ppm para la cepa 804 y 0.6727 ppm para la cepa 2M (porcentaje de reducción de 68% y 83% respectivamente para cada cepa) y por ultimo para el Pb la concentración final obtenida por la cepa 804 fue 6.3876 ppm y en cuanto a la cepa 2M fue 4.8680 ppm (porcentaje de reducción de 45 % y 58% respectivamente).



**Figura 56. Concentración inicial y final de metales pesados comparando el consorcio bacteriano con las cepas por separado.** Consorcio bacteriano (Barras solidas); Cepa 804 (Barras con líneas horizontales); Cepa 2M (Barras con líneas en diagonal).

En cuanto a la comparación del consorcio microbiano con las cepas por separado (Figura 56), la cepa 2M precipito mayor cantidad de cada metal pesado en comparación con la cepa 804 y el consorcio bacteriano, esto se puede deber a que al estar ambas cepas juntas puede que una inhiba en su proceso de metabolización a la otra, en cuanto al porcentaje de reducción en todos los casos analizados el metal que más precipito fue el Cd, seguido por el Pb y por último el Cr. Este resultado contrasta con el hecho de que el sulfuro de cromo tiene un  $K_{ps}$  de magnitud menor que los sulfuros del resto de los metales ensayados  $CdS, 8 \times 10^{-27} > PbS, 8 \times 10^{-28} > CrS, 6 \times 10^{-37}$ . Este resultado coincide con el reportado por Cabrera et al. (2006), quienes encontraron la efectividad de la precipitación de cromo por *Desulfovibrio vulgaris* fue la más baja entre los otros metales ensayados, observándose un aumento del porcentaje de metal precipitado con el aumento de la concentración inicial de metal, precipitando alrededor de 7, 10, 20, 23 y 25% con 1, 4, 5, 9, 12 y 15 ppm de cromo, respectivamente.

Varios autores (Tabla 39) realizaron experiencias de precipitación, la mayoría de las cuales se han realizado con soluciones individuales de los cationes metálicos. Se puede cotejar que la precipitación de cadmio y plomo suele ser alta en todos los estudios, independientemente de la concentración inicial y de la precipitación simultánea con otros metales. Existe poca literatura sobre la precipitación de Cr(III).

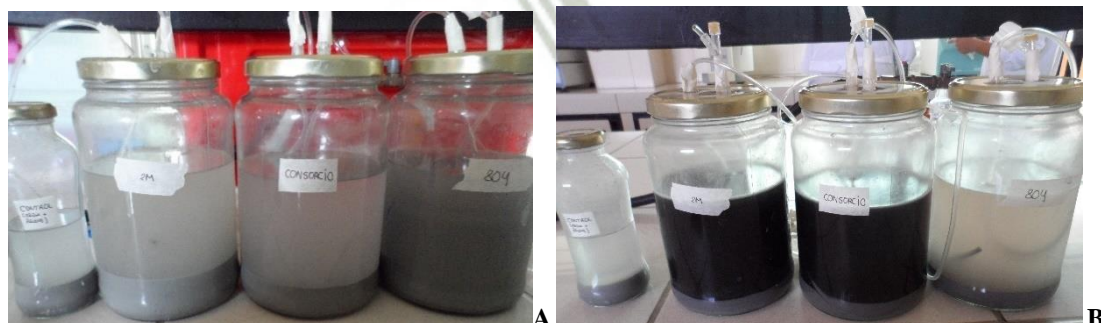
**Tabla 39. Precipitación de metales pesados reportados.**

Cr(III)		Cd(II)		Pb(II)		Cultivo celular	Simultaneo	Referencia
Inicial (ppm)	% remoción	Inicial (ppm)	% remoción	Inicial (ppm)	% remoción			
0.08	37	3.99	75	11.80	55	L	S	Este trabajo (consorcio)
0.08	30	3.97	68	11.61	45	L	S	Este trabajo (804)
0.08	45	3.96	83	11.59	58	L	S	Este trabajo (2M)
1.9	46	2.8	100	-	-	L	S	Kikot, 2012
4.5	10	-	-	-	-	L	N	Cabrera <i>et al</i> , 2006
-	-	20	85	-	-	L	N	Medircio <i>et al</i> , 2007
-	-	50	98	-	-	I	S	Jong y Parry, 2003
-	-	-	-	5	90	L	S	Márquez, 2013

L: células libres; I: células inmovilizadas; S: cultivo con los metales en forma simultanea; N: cultivo con cada metal por separado.

#### 4.4 TRATAMIENTO DE RELAVE MINERO EN UN BIOREACTOR SULFIDOGENICO

En los ensayos realizados anteriormente se demostró la eficiencia de las cepas y el consorcio bacteriano en la reducción de sulfato, para estudiar en detalle sus cinéticas se realizó un cultivo en un reactor tipo tanque agitado para cada cepa y consorcio en donde se trató un relave minero (Figura 57), el reactor tenía como soporte de inmovilización piedra pómez la cual se usó por su porosidad, y para que las bacterias formaran biopelículas y actúen en mejor eficiencia. Se determinó las concentraciones de sulfato, ácido láctico y metales pesados analizados a intervalos de tiempo adecuados.



**Figura 57. Tratamiento del relave minero. A.** Se muestra los reactores al inicio de la experiencia, así como también el control (Relave minero y medio de cultivo); **B.** Reactores al final de la experiencia, cambio de color para la cepa 2M y el consorcio, el reactor de la cepa 804 muestra solo turbidez.

## Metabolización de ácido láctico en el tratamiento del relave minero

Como anteriormente se realizaron las mediciones de ácido láctico en presencia de metales pesados por separados en donde se explicó el proceso de oxidación de ácido láctico, en esta etapa también se realizaron las mediciones de ácido láctico de cada cepa y el consorcio, pero presencia del relave minero, el cual contiene diferentes metales pesados como se explicará más adelante.

### *Producción de ácido láctico utilizando consorcio bacteriano presente en el biorreactor*

Las mediciones obtenidas en el experimento se muestran en el Anexo 37, en el cual muestran las repeticiones correspondientes. El ANOVA aplicado para los niveles de ácido láctico según días de evaluación mostro diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) (Anexo 38). El Test de Tukey muestra que los niveles de ácido láctico a través del tiempo se incrementan al tratar el relave minero. Al inicio los niveles promedios de ácido láctico es 0.6433 g/l y hasta el día 18 se viene incrementando hasta llegar a un promedio de 1.6606 g/l como se muestra en la Tabla 40 y Figura 58.

**Tabla 40. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido láctico (g/l) por días en relave minero**

Días	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	0.6433	X
5	3	1.326	X
10	3	1.3705	X
15	3	1.4409	X
20	3	1.66063	X

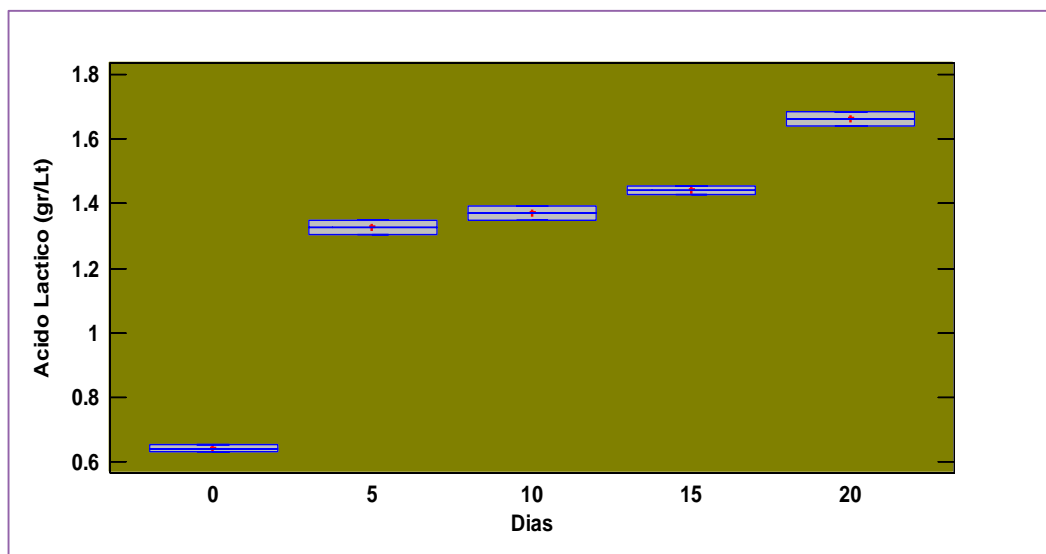


Figura 58. Ácido láctico por días producido por el consorcio bacteriano en relave minero. Cinética de oxidación del ácido láctico.

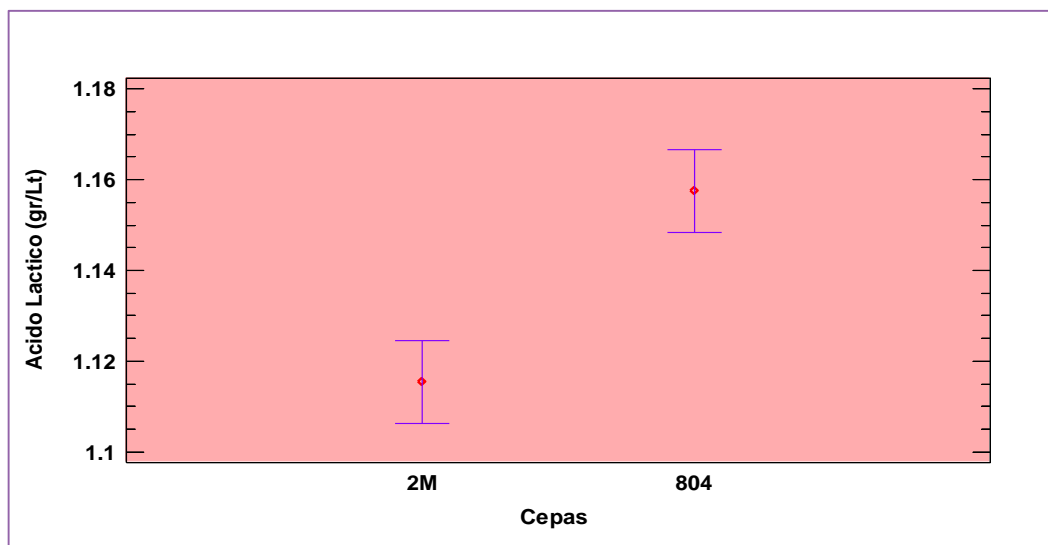
*Producción de ácido láctico por cepa 804 y cepa 2M en el biorreactor*

De igual modo al caso anterior se hizo la medición de la concentración de ácido láctico en el medio comparando ambas cepas (Anexo 39 y 40). Tanto las cepas analizadas (804 y 2M) como el tiempo de evaluación mostraron diferencias altamente significativas sobre los niveles de ácido láctico, tal como lo evidencia el ANOVA (Anexo 41). La interacción entre cepas y días resultó también altamente significativa ( $p < 0.01$ ).

El Test de Tukey muestra que con la cepa 804 se obtiene el promedio más alto de ácido total 1.1575 g/l y con la cepa 2M el promedio total es más bajo con 1.1154 g/l como se muestra en la Tabla 41 y Figura 59.

**Tabla 41. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido láctico (g/l) por Cepas**

Cepas	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<b>2M</b>	15	1.11535	0.00620111	X
<b>804</b>	15	1.1575	0.00620111	X



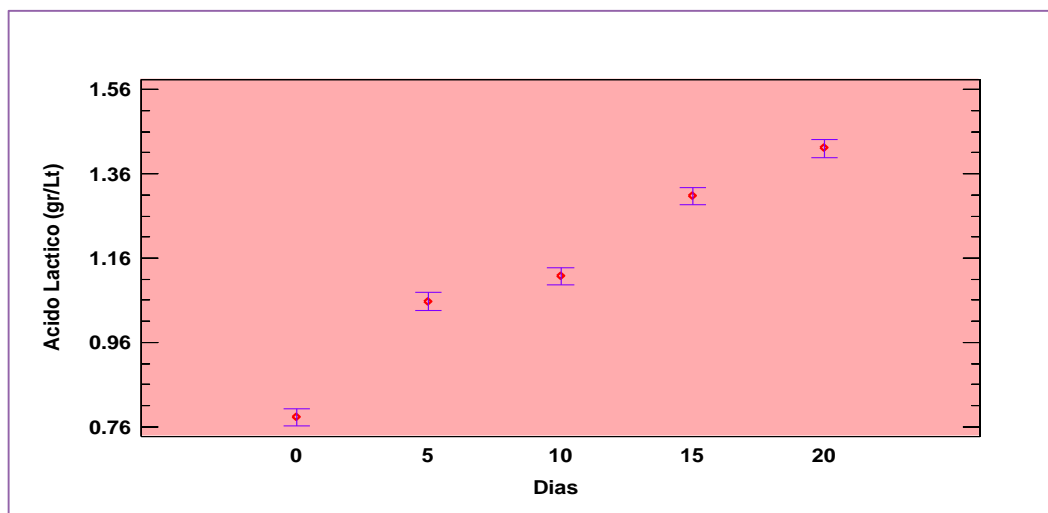
**Figura 59. Ácido láctico total por cepa en relave minero.** Promedio de concentración de ácido láctico total para cada cepa.

Para la evaluación de las concentraciones total de ácido láctico en el tratamiento del relave minero según el tiempo de evaluación se encontró a través del Test de Tukey que a medida que transcurre el tiempo los niveles de ácido láctico aumentan iniciándose con un promedio de 0.7825 g/l hasta llegar a un promedio de 1.42 g/l en el día 20 como se observa en la Tabla 42 y Figura 60.

**Tabla 42. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Ácido láctico (g/l) por días en relave minero**

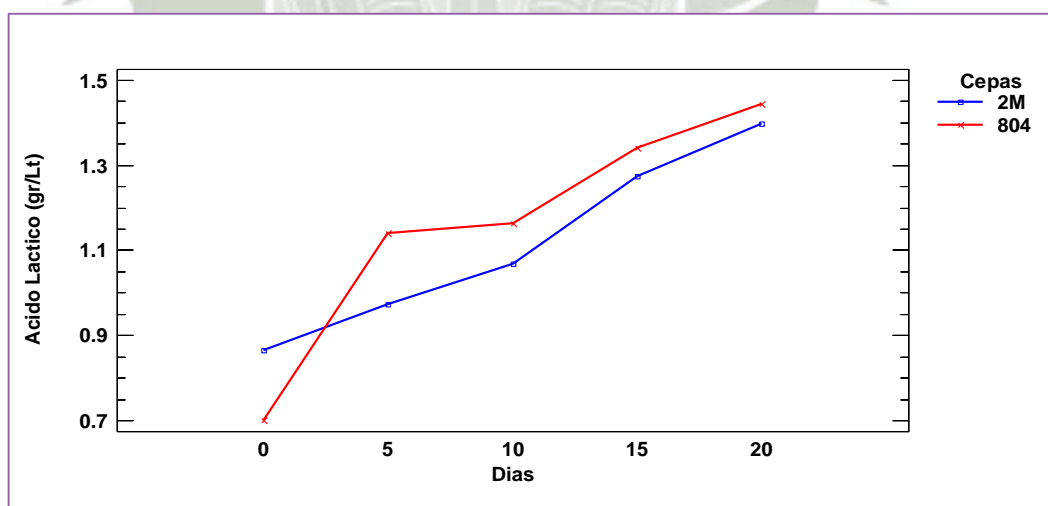
Días	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	6	0.7825	0.00980481	X
5	6	1.05725	0.00980481	X
10	6	1.11612	0.00980481	X
15	6	1.30625	0.00980481	X
20	6	1.42	0.00980481	X

La cinética de metabolización de ácido láctico sigue siendo en forma ascendente (Figura 60) como en casos anteriores se explicó, la concentración de ácido láctico aumentara hasta que el sustrato (Lactato) sea totalmente consumido.

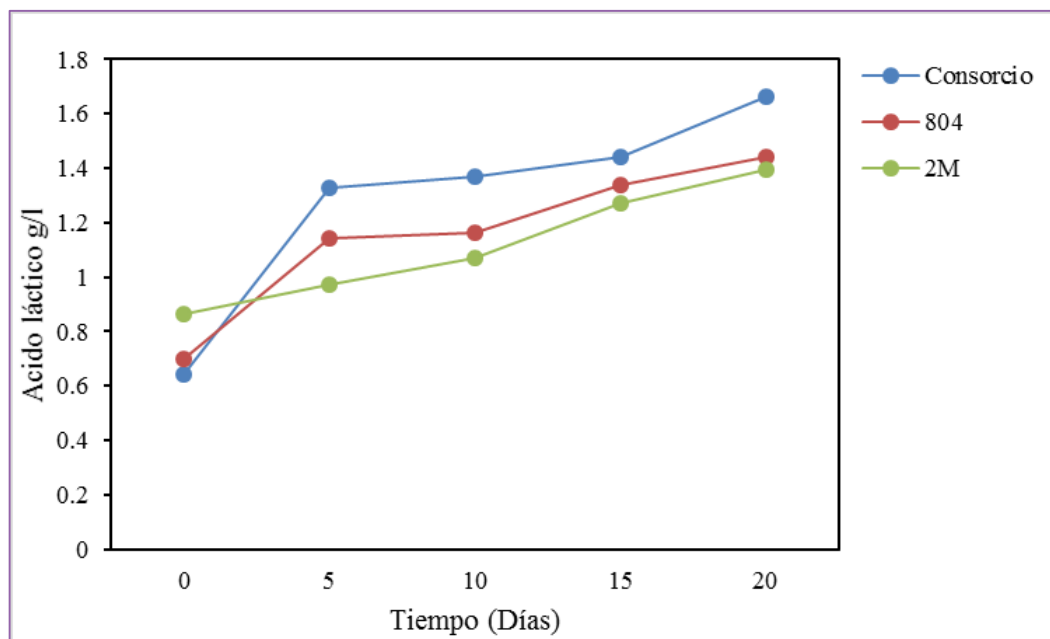


**Figura 60. Concentración de ácido láctico por días en relave minero.** Cinética de metabolización de ácido láctico para ambas cepas.

En la Figura 61 se muestra la cinética de metabolización de ácido láctico para cada cepa, la 804 logra obtener mayor cantidad de concentración de ácido láctico con una concentración final de 1.4435 g/l en comparación con la cepa 2M la cual obtuvo una concentración final de 1.3965 g/l.



**Figura 61. Ácido láctico por cepas y días en el tratamiento del relave minero.** Mayor producción de ácido láctico para la cepa 2M. (Anexo 42, pág. 154).



**Figura 62. Concentración de ácido láctico para cada cepa y el consorcio bacteriano a través del tiempo en el tratamiento del relave minero.** El consorcio bacteriano mostro mayores niveles de ácido láctico al final de la experiencia.

En la Figura 62 se muestra la comparación del consorcio bacteriano con las cepas utilizadas en el tratamiento de relave minero, puede verse que todos los sistemas analizados tienen un comportamiento muy similar. En todos los casos se detectó un aumento de la concentración de ácido láctico hasta el día 20. Se oxido mayor cantidad de ácido láctico para el consorcio microbiano seguido de la cepa 804 y por último la cepa 2M (1.6606, 1.4435 y 1.3965 g/l, respectivamente).

### **Concentración de sulfatos en el tratamiento del relave minero**

El proceso de medición de sulfatos es idéntico a los casos anteriores, lo que diferencia estos ensayos es que los biorreactores contienen un soporte de inmovilización que es la piedra pómez. Las BRS son capaces de formar biopelículas sobre diferentes soportes, como: carbón vegetal, poliestireno, cerámico, entre otros. La adherencia y efectividad en la reducción de sulfato, varían entre los mismos según lo expuesto por Silvia y col (2006).

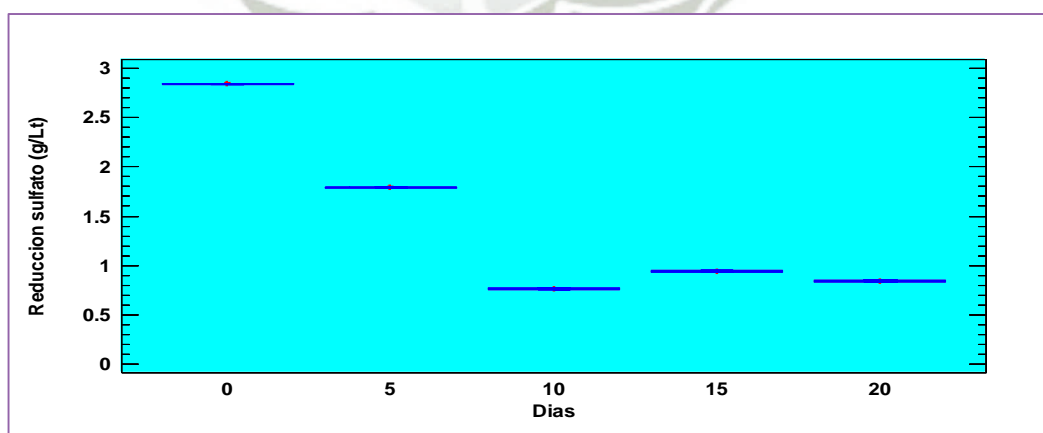
*Reducción de sulfatos utilizando consorcio bacteriano en el biorreactor*

La reducción de sulfatos o producción de sulfuros por tiempo de evaluación en el tratamiento de relave minero en el biorreactor muestra diferencias altamente significativas ( $p > 0.01$ ) en el ANOVA (Anexo 44) basado en los datos obtenidos mostrados en el Anexo 43.

Con el Test de Tukey se encontró que existe una disminución en los sulfatos a través del tiempo ya que el promedio de sulfatos en el tratamiento del relave minero al inicio de la experiencia es de 2.8394 g/l, para luego ir disminuyendo hasta alcanzar un promedio de 0.8426 g/l al día 20 en la reducción de sulfatos como se observa en la Tabla 43 y Figura 63.

**Tabla 43. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Reducción Sulfato (g/l) por día en relave minero**

Día	Casos	Media	Grupos Homogéneos
10	3	0.7637	X
20	3	0.84265	X
15	3	0.94365	X
5	3	1.7901	X
0	3	2.8394	X



**Figura 63. Reducción de sulfato por días en relave minero.** Concentración final de sulfatos en presencia del relave minero fue 0.8426 g/l.

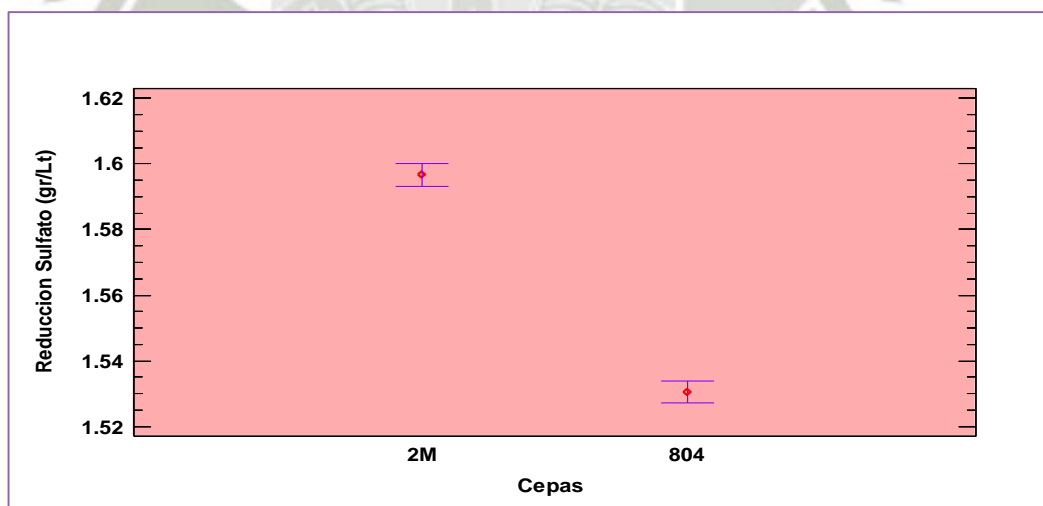
*Reducción de sulfatos por cepa 804 y cepa 2M en el bioreactor*

Los resultados obtenidos se muestran en el Anexo 45 y 46 de los cuales se basó para realizar el ANOVA (Anexo 47) para tipo de cepas, días de evaluación e interacción encontrándose en las tres variables diferencias altamente significativas en la reducción de sulfatos de relave minero.

Según el Test de Tukey la cepa 2M es la que da lugar a la mayor concentración total de sulfatos con un promedio de 1.5967 g/l seguida por la cepa 804 que produce un promedio de 1.5305 g/l en la reducción de sulfatos (Tabla 44 y Figura 64).

**Tabla 44. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para reducción sulfatos por Cepa en relave mineros.**

Cepa6	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
804	15	1.53047	0.00228448	X
2M	15	1.59666	0.00228448	X



**Figura 64. Concentración de sulfatos total por cepas en relave minero.** Cepa 2M reduce mayor concentración de sulfatos en comparación con la cepa 804.

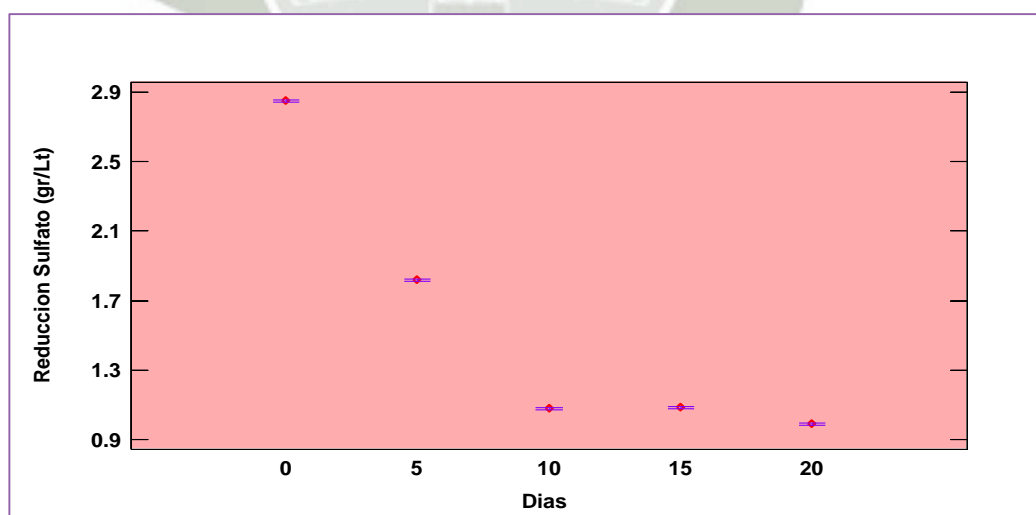
Esta Figura también muestra que hay diferencias altamente significativas en la concentración total de sulfatos entre las cepas analizadas, indicando que la cepa 2M

no redujo en gran cantidad la concentración de sulfatos en comparación con la cepa 804 lo que indica que puede haber una ligera inhibición de la oxidación de sulfuros.

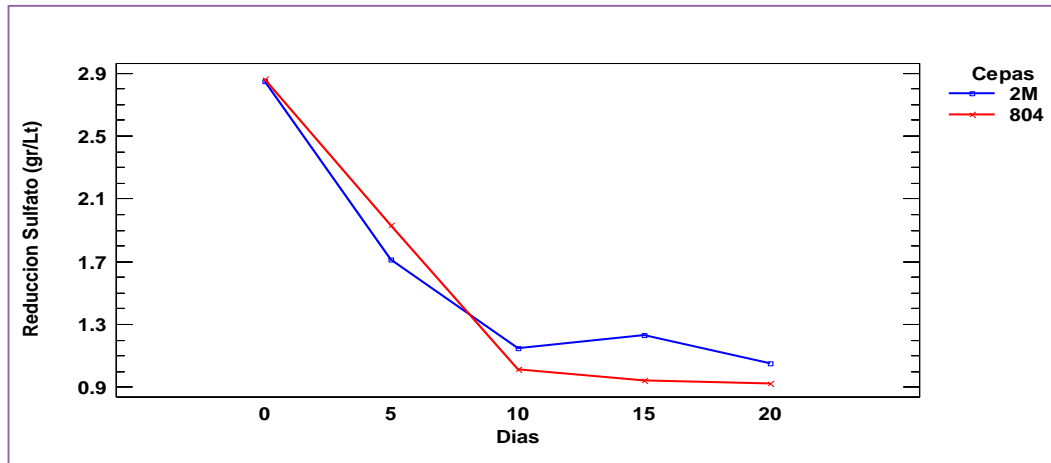
Como se observa en la Tabla 45 y Figura 65 se muestra la cinética de metabolización de sulfatos característico de las bacterias reductoras de sulfato, con respecto a la reducción de sulfatos según el tiempo de evaluación se encontró a través del Test de Tukey que los sulfatos en el tratamiento del relave minero a través del tiempo, alcanzando en el tiempo inicial un promedio de 2.8522 g/l en los sulfatos para ir disminuyendo hasta alcanzar en el día 20 un promedio en la concentración de sulfatos de 0.9859 g/l.

**Tabla 45. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para reducción Sulfato por día en relave minero**

Día	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
20	6	0.985925	0.00361208	X
10	6	1.07692	0.00361208	X
15	6	1.08385	0.00361208	X
5	6	1.81893	0.00361208	X
0	6	2.8522	0.00361208	X

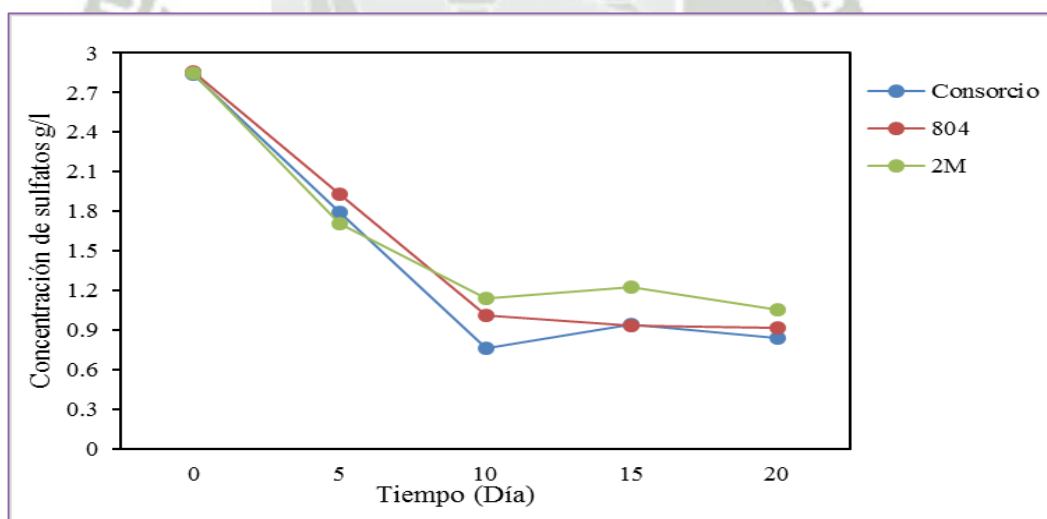


**Figura 65. Concentración de sulfatos total por días en relave minero. Cinética de metabolización de sulfatos comportamiento característico de las BRS.**



**Figura 66. Reducción de sulfatos por cepas y tiempo de evaluación en el tratamiento de relave minero.** Mayor reducción de sulfatos para la cepa 804 pero diferencias no tan significativas. (Anexo 48, pág. 157).

En la Figura 66 se muestra la interacción de las cepas con el tiempo de evaluación en la reducción de sulfatos en el tratamiento del relave minero, se encontró que con la cepa 804 se reducen más los sulfatos a partir del tiempo de 10 días de evaluación, todo lo contrario, sucede con la cepa 2M.



**Figura 67. Comparación de las cinéticas de reducción de sulfatos para cada cepa y el consorcio bacteriano en función del tiempo.** Concentración final de sulfato parecida para los tres casos.

En la Figura 67 se muestra las cinéticas de reducción de sulfato comparando el consorcio bacteriano con las cepas estudiadas, como se observa el proceso comienza con una concentración inicial de 2.8 g/l para los tres casos, el consorcio reduce mayor

cantidad de sulfatos con una concentración final de 0.8426 g/l, seguido por la cepa 804 que se mostró más estable con una concentración final de 0.9196 y por último la cepa 2M con una concentración final de sulfatos de 1.0522 g/l.

En el trabajo realizado por Mariana Vicente (2006) reporto resultados similares a los obtenidos en este trabajo, la cinética de metabolización mostro comportamiento similar, pero en mayor tiempo de evaluación se detectó la disminución de la concentración de sulfato al día 34, la concentración final obtenida en dicho trabajo fue de 1 g/l.

### **Precipitación de Cobre (Cu), Cromo (Cr), Cadmio (Cd) y Plomo (Pb) en el tratamiento del relave minero**

Se realizó la medición de metales presentes en la muestra de relave para tener una referencia (Anexo 1 y 2), solo se tomó en cuenta la medición de los metales pesados de interés a analizar (Cu, Cr, Cd y Pb) de igual modo como en el caso anterior se hicieron mediciones al inicio y final de la experiencia para cada cepa y el consorcio (Anexo 9 y 10).

#### *Precipitación de metales pesados utilizando consorcio bacteriano en el biorreactor*

Los resultados de obtenidos de forma ordenada se muestran en el Anexo 52, el ANOVA (Anexo 59, pág. 163) para precipitación de metales pesados presentes en el relave minero y las mediciones (Inicial y final) en el biorreactor. La concentración de metales, la medición y la interacción de ambas variables mostraron diferencias altamente significativas en la concentración de metales pesados ( $p < 0.01$ ).

**Tabla 46. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración por medición de metales pesados en bioreactor**

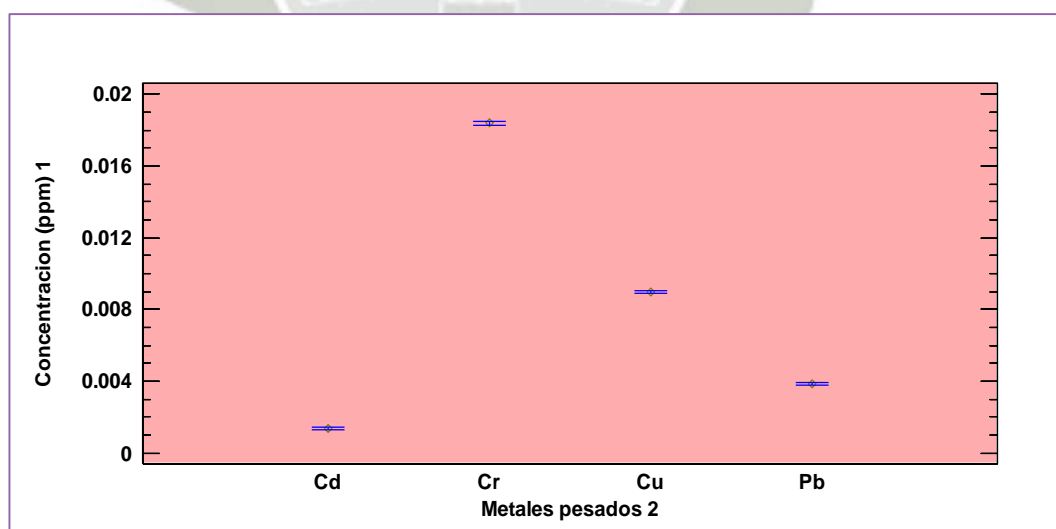
Medición	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<b>Final</b>	12	0.00464917	$3.6233 \cdot 10^{-5}$	X
<b>Inicial</b>	12	0.01165	$3.6233 \cdot 10^{-5}$	X

La medición de metales pesados al inicio de la experiencia muestra un promedio de 0.0116 ppm y al final la medición de los metales pesados disminuye a un promedio de 0.0047 ppm (Tabla 46).

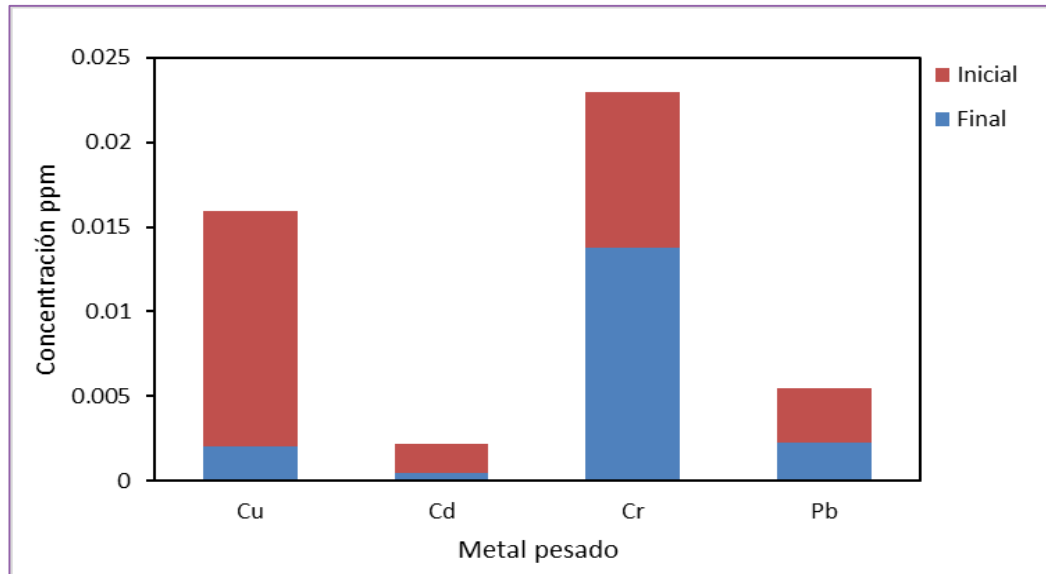
Tal como se muestra en la Tabla 47 y Figura 68, en cada uno de los metales la concentración es diferente, alcanzando el mayor promedio en Cr con un valor de 0.0184 ppm, seguido de Cu con un promedio de 0.0090 ppm, luego el Pb con un promedio de 0.0039 ppm y el Cd cuyo promedio es de 0.0013 ppm. La variación de concentraciones de los metales pesados analizados sugiere que las bacterias reductoras de sulfato precipitan primero otros metales debido a su  $K_{ps}$  como se explicó anteriormente, el orden relativo de precipitación es  $Cu > Cd >> Pb >>> Cr$ .

**Tabla 47. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración de Metales Pesados en bioreactor**

Metales Pesados	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<b>Cd</b>	6	0.001345	$5.12415 \cdot 10^{-5}$	X
<b>Pb</b>	6	0.00386667	$5.12415 \cdot 10^{-5}$	X
<b>Cu</b>	6	0.00900833	$5.12415 \cdot 10^{-5}$	X
<b>Cr</b>	6	0.0183783	$5.12415 \cdot 10^{-5}$	X



**Figura 68. Concentración total de cada metal pesado en biorreactor.** Concentración de cada metal es diferente.



**Figura 69. Concentración de metales pesados al inicio y final de la experiencia en el biorreactor.** Concentración de cada metal de interés en el tratamiento del relave minero usando el consorcio bacteriano. (Anexo 60, pág. 163).

En la Figura 69 se muestra las concentraciones iniciales y finales de cada metal analizado presente en el relave minero, se puede observar que en el caso de Cu se obtuvo una precipitación del 87% del total obteniéndose una concentración final de 0.0021 ppm, en el caso del Cd se obtuvo una precipitación del 78% del total al obtener una concentración final de 0.0005 ppm, en el caso de Cr se obtuvo una precipitación del 40% al obtener una concentración final de 0.0138 ppm y por último en Pb precipito el 59% del total con una concentración final de 0.0022 ppm. Como puede verse, la eficacia de precipitación de metales pesados fue alta para el Cd y Cu, de forma intermedia para el Pb y la eliminación de Cr fue baja, también se puede observar que el relave tenía mayor cantidad de concentración de Cr en comparación con los otros metales.

#### *Precipitación de metales pesados por cepa 804 y cepa 2M en el biorreactor*

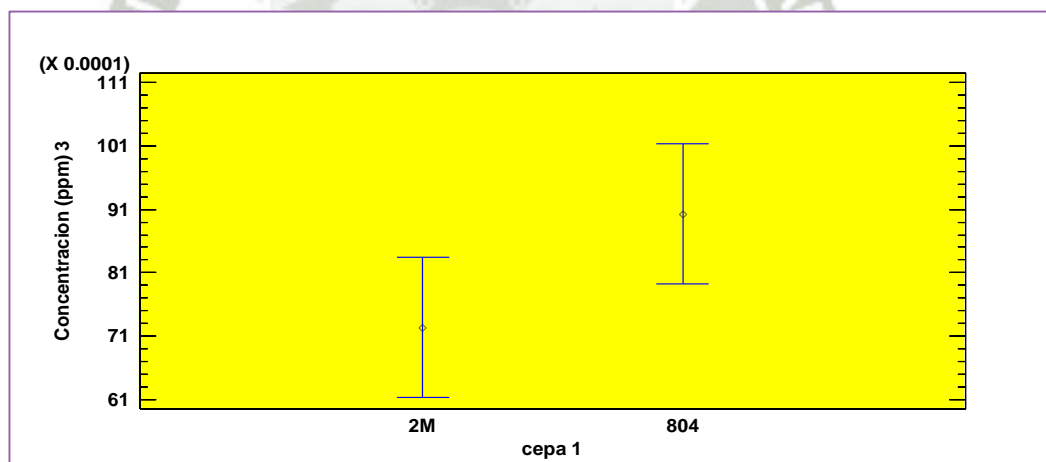
Los resultados obtenidos se muestran en los Anexos 53 y 54 de los cuales se realizó el ANOVA (Anexo 61, pág. 164) el cual muestra la comparación de los metales pesados por cada cepa analizada, y la medición tomada, todas las interacciones

muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Solo la interacción de la cepa con los metales pesados no mostro significación estadística.

Las concentraciones de metales pesados en el biorreactor mostraron diferencias la cepa 2M obtuvo una concentración de metal 0.0072 ppm y 804 la concentración promedio de metal es 0.009 ppm como se muestra en la Tabla 48 y Figura 70.

**Tabla 48. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración (ppm) por Cepa en bioreactor.**

Cepa	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2M	24	0.00723708	0.000766829	X
804	24	0.009025	0.000766829	X

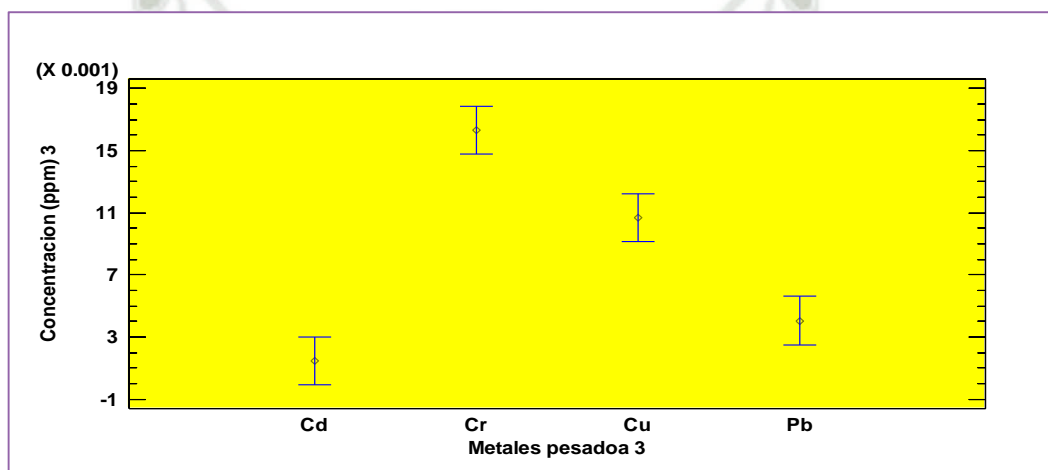


**Figura 70. Concentración total de metales pesados por cepas. No hay diferencias significativas.**

En la Tabla 49 y Figura 71 muestra el Test de Tukey realizado el que indica que en los diferentes metales estudiados su concentración total es diferente así se tienen que en Cr se alcanza la mayor concentración con 0.0163 ppm, seguido por el Cu el cual alcanza un promedio de 0.0107 ppm, sigue el Pb cuyo promedio es 0.00404 ppm y el Cd que alcanza la menor concentración con un promedio de 0.0015 ppm.

**Tabla 49. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración (ppm) por Metales Pesados en bioreactor**

Metales Pesados	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<b>Cd</b>	12	0.00146417	0.00108446	X
<b>Pb</b>	12	0.00404167	0.00108446	X
<b>Cu</b>	12	0.0106933	0.00108446	X
<b>Cr</b>	12	0.016325	0.00108446	X



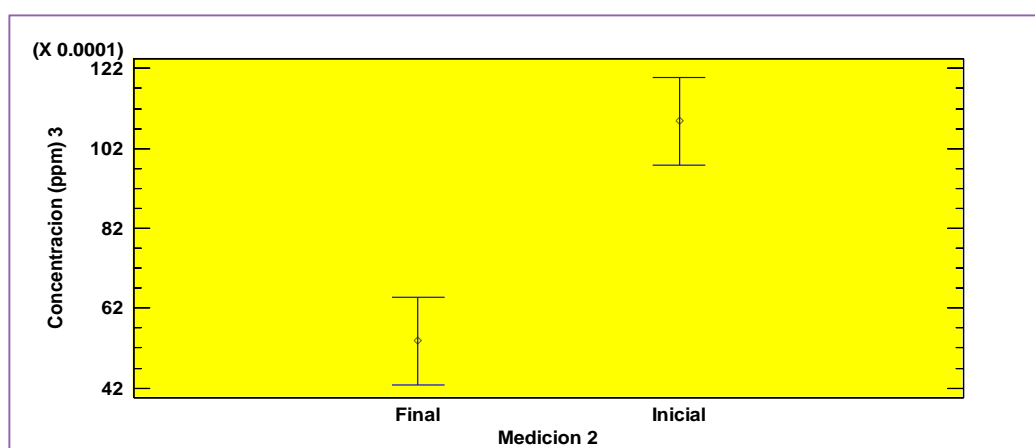
**Figura 71. Concentración total de metales pesados.** Diferentes concentraciones de cada metal presente en el tratamiento del relave minero.

Anteriormente en la medición de la concentración de metales con el consorcio bacteriano se explicó que el relave minero contiene mayor concentración de Cr, seguido de Cu, lo cual del mismo modo las mediciones en este caso evidencian lo mismo.

En la Tabla 50 muestra las concentraciones promedio de metal pesado al inicio y final de la experiencia, muestran diferencias significativas al mostrar que la concentración total final es menor a la inicial.

**Tabla 50. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para concentración (ppm) por medición en bioreactor**

Medición	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<b>Final</b>	24	0.00537792	0.000766829	X
<b>Inicial</b>	24	0.0108842	0.000766829	X

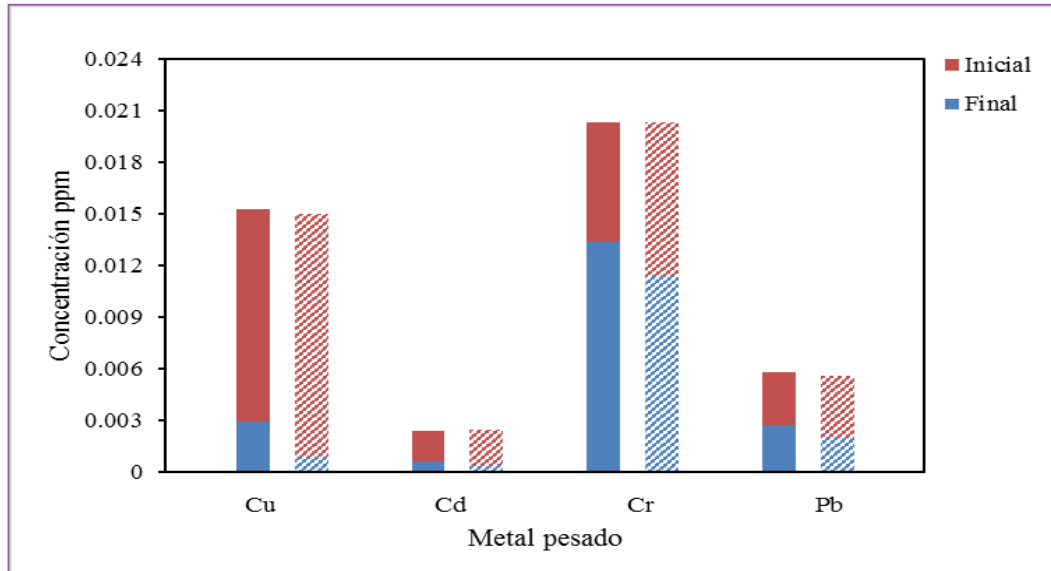


**Figura 72. Concentración total de metales pesados por medición.** Diferencias significativas entre ambas mediciones.

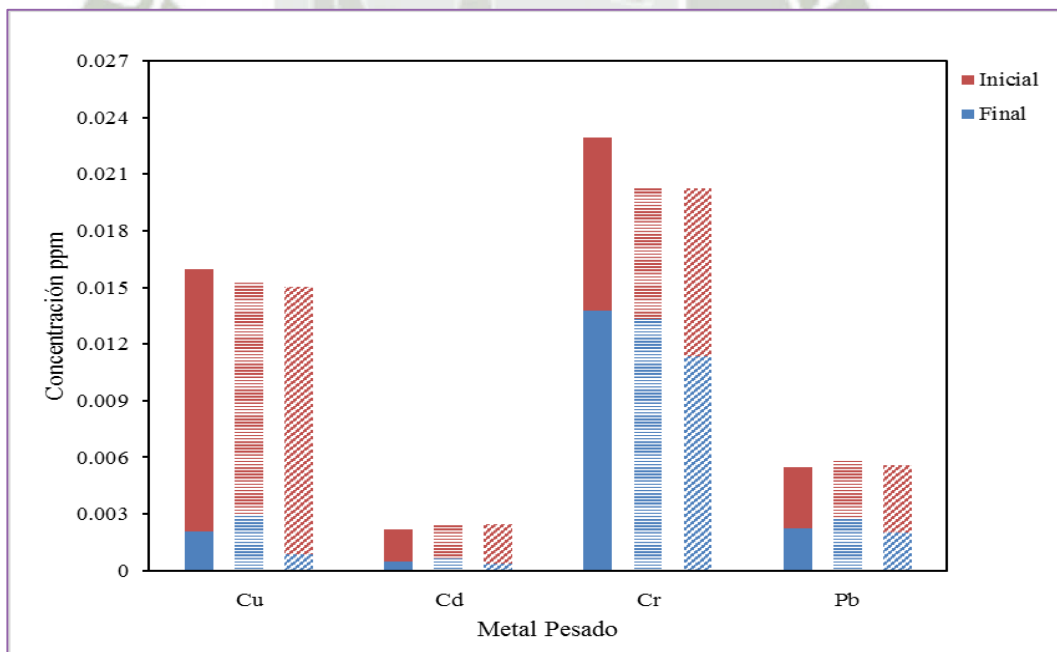
En la Figura 72 se muestra la concentración de los metales pesados inicial promedio para ambas cepas indicando la diferencia de concentración al final de la experiencia mostrando que las cepas realizaron una buena precipitación de los metales, esta Figura también indica la concentración de los metales en conjunto.

En la Figura 73 se muestra las concentraciones iniciales y finales de cada metal analizado a partir del tratamiento del relave minero comparando ambas cepas en un biorreactor por separada para cada una, como se puede observar para el caso del Cu usando la cepa 804 se obtuvo una concentración final de 0.003 ppm en comparación de la cepa 2M que fue 0.0009 ppm (porcentaje de reducción de 81% y 94% respectivamente), en el Cd se obtuvo una concentración final de 0.0006 ppm para la cepa 804 y 0.0004 ppm para la cepa 2M (porcentaje de reducción de 72% y 83% respectivamente para cada cepa), en Cr usando la cepa 804 se obtuvo una concentración final de 0.0134 ppm y para la cepa 2M fue 0.0114 ppm (porcentaje de

reducción de 34% y 44% respectivamente) y por ultimo para el Pb la concentración final obtenida por la cepa 804 fue 0.0028 ppm y en cuanto a la cepa 2M fue 0.002 ppm (porcentaje de reducción de 53 % y 65% respectivamente).



**Figura 73. Concentración de cada metal pesado y cepa al inicio y final de la experiencia en bioreactor. Cepa 804 (Barras sólidas); Cepa 2M (Barras con líneas en diagonal).** (Anexo 62, pág. 164).



**Figura 74. Concentración inicial y final de metales pesados comparando el consorcio bacteriano con las cepas en bioreactor. Consorcio bacteriano (Barras solidas); Cepa 804 (Barras con líneas horizontales); Cepa 2M (Barras con líneas en diagonal).**

En cuanto a la comparación del consorcio microbiano con las cepas por separado en el tratamiento del relave minero en los biorreactores (Figura 74), la cepa 2M precipitó mayor cantidad de cada metal pesado en comparación con la cepa 804 y el consorcio bacteriano, esto se puede deber a que al estar ambas cepas juntas puede que una inhiba en su proceso de metabolización a la otra, en cuanto al porcentaje de reducción en todos los casos analizados el metal que más precipitó fue el Cu, seguido por el Cd, luego el Pb y por último el Cr.

El proceso de bioprecipitación usando bacterias reductoras de sulfato permite recuperar metales que se encuentran en concentraciones pequeñas y que por otro método sería difícil de separar más aún porque los metales se encuentran solubles en el medio, lo cual el uso de las bacterias permite aislar los sulfuros metálicos los cuales son insolubles por eso el motivo de su precipitación.

En los trabajos realizados por Julia Mariana Marquez Reyes (2013), Maria Soledad Vicente (2006) y Pamela Alejandra Kikot (2012) realizaron investigaciones referentes al uso de bacterias reductoras de sulfato para precipitar metales pesados en solución por separado, en todos los trabajos obtuvieron resultados similares a este trabajo realizado, pero solo se investigaron la eficiencia de la bacteria en un metal por solución, mientras que en este trabajo se realizó el tratamiento de un relave minero evaluando el desempeño de la bacteria en presencia de varios metales pesados a la vez.

## CONCLUSIONES

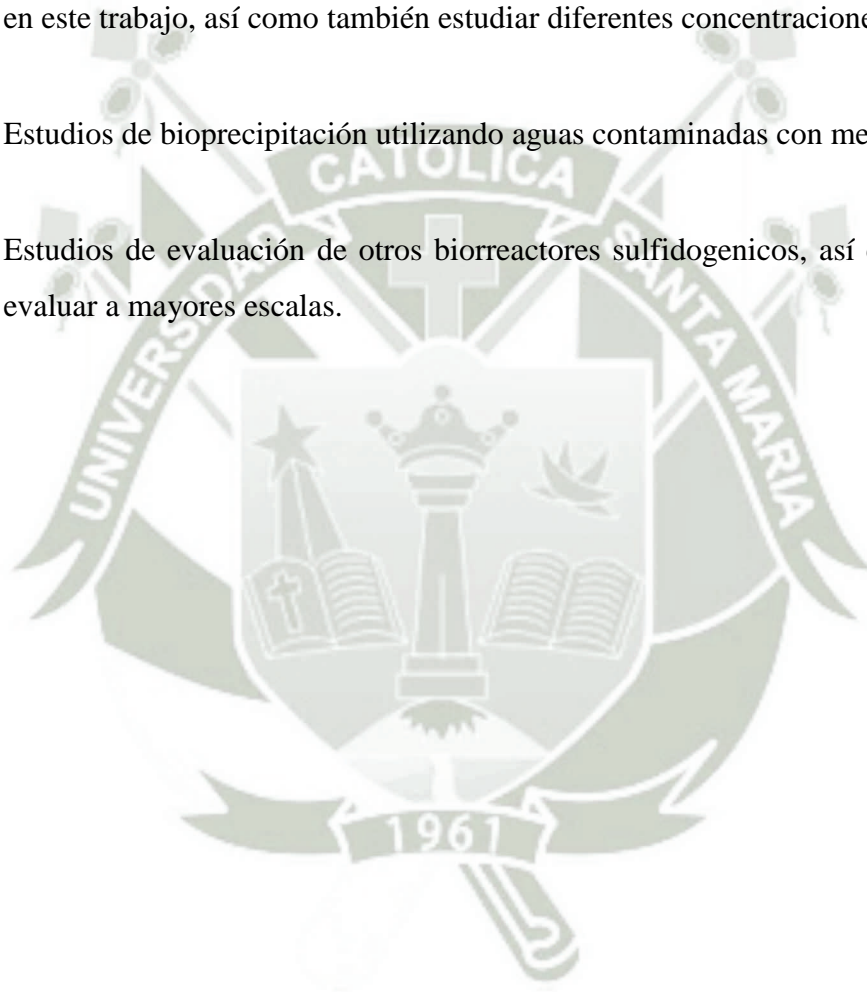
1. Las bacterias reductoras de sulfato aisladas e identificadas bioprecipitaron los metales pesados estudiados (Cu, Cr, Cd y Pb) en solución, así como también en el tratamiento del relave minero en el biorreactor tipo tanque agitado.
2. Se aislaron, caracterizaron e identificaron dos cepas de BRS de muestras ambientales siendo ellas la cepa 804 y la 2M en base a que presentan la enzima Desulfoviridina. Las cepas seleccionadas son del genero *Desulfovibrio*.
3. Se evaluó el efecto del pH y temperatura, el crecimiento a 30 °C y pH entre 7.0 – 7.5 fue el más óptimo dentro del rango estudiado observándose mayor turbidez de color negro en el medio. Se observó ligero crecimiento entre los rangos menores y mayores tanto para la temperatura y pH.
4. Evaluando la cinética de crecimiento, se determinó la velocidad específica de crecimiento máximo ( $\mu_{\max}$ ) para la cepa 804 y 2M fue 0.0089 h<sup>-1</sup> y 0.0088 h<sup>-1</sup>, respectivamente; la velocidad volumétrica de reducción de sulfatos ( $r_{SO_4}$ ) fue 0.0048 g/l.h para ambas cepas estudiadas.
5. En lo referente a la determinación de la producción de ácido láctico en presencia de metales pesados, el cromo (Cr) con la cepa 2M oxido mayor concentración de ácido láctico obteniendo 1.48 g/l, el cadmio (Cd) con la cepa 804 obtuvo una concentración de 1.22 g/l superior a los otros casos estudiados y por ultimo para el plomo (Pb) el consorcio microbiano oxido mayor concentración, obteniendo 1.28 g/l. En el caso de la reducción de sulfatos del mismo modo en presencia de un metal por solución, el consorcio bacteriano redujo mayor concentración de sulfatos obteniendo una concentración final para el Cr de 1.67 g/l, el Cd 1.98 g/l y el Pb 1.91 g/l. En cuanto a la evaluación de la producción de ácido láctico en el tratamiento del relave minero usando un biorreactor sulfidogenico, el consorcio microbiano obtuvo una concentración final de 1.67 g/l indicando una mayor

producción de ácido láctico en comparación con las cepas analizadas. Para la reducción de sulfatos del mismo modo el consorcio bacteriano redujo mayor concentración en comparación con las cepas obteniendo una concentración final de 0.84 g/l.

6. Se evaluó la bioprecipitación de metales pesados obteniéndose resultados positivos, el mayor porcentaje de precipitación fue usando la cepa 2M, el Cd obtuvo un 83% con una concentración final de 0.67 ppm, seguido por el Pb con 58% con una concentración final de 4.87 ppm y por último el Cr con 45% con concentración final de 0.05 ppm, el porcentaje de reducción de cromo fue baja debido a que el Kps de este metal es más bajo que los otros metales estudiados.
7. Se precipitaron porcentajes altos de metales pesados en la bioremediación del relave minero usando la cepa 2M para el Cobre 94% y Cadmio 83% con concentraciones finales 0.0008 ppm y 0.0004 ppm respectivamente, para el Plomo se obtuvo un 65 % con concentración final de 0.002 ppm y por último el Cromo con un porcentaje de precipitación de 44% con concentración final de 0.011 ppm.

## SUGERENCIAS

1. Estudios con otras fuentes de carbono más económicas que el lactato (subproductos o deshechos de otros procesos) para obtener un crecimiento más adecuado de *Desulfovibrio*.
2. Estudios de bioprecipitación de otros metales pesados diferentes a los estudiados en este trabajo, así como también estudiar diferentes concentraciones de metal.
3. Estudios de bioprecipitación utilizando aguas contaminadas con metales pesados.
4. Estudios de evaluación de otros biorreactores sulfidogénicos, así como también evaluar a mayores escalas.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Alvarez M.T., Pozzo T., Mattiasson B. (2006).** Enhancement of sulphide production in anaerobic packed bed benchscale biofilm reactors by sulphate reducing bacteria. *Biotechnology Letters* 28 (3), 175-181.
2. **Andrade, Virginia (2010).** Evaluación del Potencial de Generación de Sulfuro por la Acción de las Bacterias Sulfato Reductoras y sus Posibles Aplicaciones en el Tratamiento de los Drenajes Ácidos de Mina.
3. **Agencia para Sustancias tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2012)** Resumen de Salud Pública: Cadmio. URL [http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs5.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs5.pdf)
4. **Agencia para Sustancias tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2012)** Resumen de Salud Pública: Cromo. URL [http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs7.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs7.pdf)
5. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2006).** Case Studies in Environmental Medicine: Lead Toxicity. US Department of Health and Human Services, Public Health Service.
6. **Barton LL (1995).** Sulfate-Reducing Bacteria. En: *Biotechnology Handbooks* (Atkinson T, Sherwood RF. eds.) Plenum Press. New York- London. 8.
7. **Betancur, M. et al. (2000).** Gestión de los Residuos Producidos en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Pontificia Bolivariana.
8. **Beyenal H, Donovan C, Lewandowski Z, Harkin G. (2004).** Three-dimensional biofilm structure quantification
9. **Boshoff G., Duncan J., Rose P.D. (2004).** Tannery effluent as a carbon source for biological sulphate reduction. *Water Research*. 38 (11), 2651-2658.
10. **Cabrera G., Pérez R., Gómez J.M., Ábalo A., Cantero D. (2006).** Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio sp.* strains. *Journal of Hazardous Materials A135*, 40-46.
11. **Cammack R., Fernandez V.M., Hatchikian E.C. (1994).** Nickel-iron hydrogenase. *Methods Enzymol.* 243, 43-68.
12. **Cattony E.B.M., Chinalia F.A., Ribeiro R., Zaiat M., Foresti E., Varesche M.B.A. (2005).** Ethanol and toluene removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor in the presence of sulfate. *Biotechnology and Bioengineering* 91(2), 244-253.

13. **Celis L.B., Villa-Gómez D., Alpuche-Solís A.G., Ortega-Morales B.O., Razo-Flores E. (2009).** Characterization of sulfate-reducing bacteria dominated surface communities during start-up of a down-flow fluidized bed reactor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 111-121.
14. **Chalela, G. (1991).** Informe Final II: Estudio fisiológico, caracterización y actividad metabólica de las BSR encontradas en los sistemas de inyección de agua. Universidad Industrial de Santander.
15. **Chen C.I., Mueller R.F., Griebe T. (1994).** Kinetic analysis of microbial sulphate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in an anaerobic upflow porous media biofilm reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 43, 267-274.
16. **Cheong Y.W., Min J.S., Kwon K.S. (1998).** Metal removal efficiencies of substrates for treating acid mine drainage of a Dalsung mine, South Korea. *Journal of Geochemical Exploration* 64, 147-152.
17. **Chuichulcherm S., Nagpal S., Peeva L., Livingston A. (2001).** Treatment of metalcontaining wastewaters with a novel extractive membrane reactor using sulfate-reducing bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76, 61-68.
18. **Colleran E., Finnegan S., Lens P. (1995).** Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek* 67 (1), 29-46.
19. **Cooney M.J., Roschi E., Marison I.W., Comninellis Ch., von Stockar U. (1996).** Physiologic studies with the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*: Evaluation for use in a biofuel cell. *Enzyme and Microbial Technology* 18, 358-365.
20. **Copius Peereboom y Reijnders. (1989).** ¿Cómo de peligrosas son las sustancias perjudiciales para el medio ambiente?
21. **Copper Connects life (2012).** Cobre: Salud, Medio ambiente y Nuevas tecnologías. 7 – 61.
22. **Cornelis, R & Nordberg, M. (2007).** General chemistry, sampling, analytical methods, and speciation. En G. Nordberg, B. Fowler, M. Nordberg & L. Friberg (Eds), *Handbook on the Toxicology of Metals* (3a Ed.). (pp 11 – 38). Elsevier
23. **Costerton W.J., Wilson M. (2004).** Introducing biofilms. *Biofilms* 1(1), 1-4.
24. **Cullen. D.W. & Hirsch. P.R. (1998).** Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR.
25. **Cypionka H. (2000).** Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Ann. Rev. Microbiol.* 54, 827-848.

26. **Cypionka H., Widdel F., Pfennig N. (1985).** Survival of sulfatereducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate free oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 39-45.
27. **Dolla, A., Fournier, M., Dermoun, Z. (2006).** Oxigen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology.* 126: 87-100.
28. **Drury W.J. (1999).** Treatment of acid mine drainage with anaerobic solid substrate reactors. *Water Environment Research* 71, 1244-1250.
29. **Dvorak D.H., Hedin R.S., Edenborn H.M., McIntire P.E. (1992).** Treatment of metalcontaminated water using bacterial sulphate reduction: results from pilot-scale reactors. *Biotechnology and Bioengineering* 40, 609.
30. **D.W. Cullen & Hirsch, Penny R. (1998)** Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR, *Soil Biology and Biochemistry* 30(8-9):983-993
31. **Elliott P., Ragusa S., Catcheside D. (1998).** Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. *Water Research.* 32 (12), 3724-3730.
32. **Emsley John. (2001).** Las piezas de construcción de la naturaleza (Nature's Building Blocks)
33. **Galan Huertos, Emilio & Romero Baena, Antonio (2008).** Contaminación de suelos por metals pesados.
34. **Garcia-Calderon D., Buffiere P., Moletta R., Elmaleh S. (1998).** Anaerobic digestion of wine distillery wastewater in down-flow fluidized bed. *Wat. Res.* 32 (12), 3593-3600.
35. **Garrity, G.M., J.A. Bell and T. Lilburn. (2005) v.:** Family II. *Thermithiobacillaceae* fam. Nov. In Brenner, Krieg, Staley and Garrity eds, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Editio, Volume 2 (The *Proteobacteria*), Part B (The *Gammaproteobacteria*), Springer, New York, p. 62.
36. **Gibson G.R. (1990).** Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 769-797.
37. **Glombitza F. (2001).** Treatment of acid lignite mine flooding water by means of microbial sulfate reduction. *Waste Management.* 21, 197-203.
38. **Greenwood y Earnshaw. (1997).** Química de los elementos (Chemistry of the Elements).

39. **Hao J.H., Chen J.M., Huang L., Buglass R.L. (1996).** Sulfate-reducing bacteria. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 26 (1), 155-87.
40. **Hatchikian, E., Bell, G. and LeGall, J. (1977).** Significance of superoxide dismutase and catalase activities in the strict anaerobes, sulfate-reducing bacteria, in : Michelson, A., McCord, J., Fridovich, I. Eds, *Superoxide dismutase*. Academic Press, London, United Kingdom. 159-172.
41. **Herrera L., Hernandez J., Bravo L., Romo L., Vera L. (1997).** Biological process for sulfate and metals abatement from mine effluents. *Environmental Toxicology and Water Quality* 12, 101-107.
42. **Hulshoff Pol L.W., Lens P.N.L., Stams A.J.M., Lettinga G. (1998).** Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation* 9, 213-224.
43. **Ingvorsen K., Jorgensen B.B. (1984).** Kinetics of sulfate uptake by freshwater and marine species of *Desulfovibrio*. *Arch. Microbiol.* 139, 61-66.
44. **Johnson D.B., Hallberg K.B. (2005) b.** Biogeochemistry of the compost bioreactor components of a composite acid mine drainage passive remediation system. *Science of Total Environment* 338, 81-93.
45. **Jong T, Perry DL (2003).** Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Res.* 37:3379-3389.
46. **Kaksonen A.H., Plumb J.J., Robertson W.J., Riekkola-Vanhanen M., Franzmann P.D., Puhakka J.A. (2006) a.** The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed treatment of acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *Hydrometallurgy* 83, 204-213.
47. **Kaksonen A.H., Puhakka J.A. (2007).** Sulfate Reduction Based Bioprocesses for the Treatment of Acid Mine Drainage and the Recovery of Metals. *Eng. Life Sci.* 2007, 7, No. 6, 541-564
48. **Kido T, Tsuritani I, Honda R. (1988).** Selenium, zinc, copper and cadmium concentration in livers and kidneys of people exposed to environmental cadmium. *J Trace Elem Electroly.* 2:101-104.
49. **Kikot, Pamela (2012).** Bioprecipitación de metales pesados por bacterias reductoras de sulfato aisladas de muestras ambientales.
50. **Kolmert A., Henrysson T., Hallberg R., Mattiasson B. (1997).** Optimization of sulphide production in an anaerobic continuous biofilm process with sulphate reducing bacteria. *Biotechnology Letters* 19 (10), 971-975.
51. **Koneman, A., Dowell, J., Sommers, W. (1988).** Diagnostico microbiológico. 190-260.

52. **Krebs W, Brombacher C, Bosshard PP, Bachofen R, Brandl H (1997).** Microbial recovery of metals from solids. *FEMS Microbiol. Rev.*20:605-617
53. **Lenntech.** Water Treatment Solutions. URL <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/te.htm>
54. **LeGall, J., DerVartanian, D. and Peck, H. (1979).** Flavoproteins, iro proteins and hemoproteins as electron-transfer components of the sulfate-reducing bacteria. *Current Topics in Bioenergetics.* 9: 237-265.
55. **Leonard A & Gerber GB (1996).** Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of antimony compounds.
56. **Levy B S, Wegman D H, eds (1988).** Occupational Health. Boston: Little, Brown and Co.
57. **Lyew D., Sheppard J.D. (1997).** Effects of physical parameters of a gravel bed on the activity of sulphate-reducing bacteria in the presence of acid mine drainage. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 70, 223–230.
58. **Mack C., Burgess J.E., Duncan J.R. (2004).** Membrane bioreactors for metal recovery from wastewater: A review. *Water SA* 30, 521-532.
59. **Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (1999).** Brock Biología de los microorganismos. Octava edición. Prentice may. Madrid. 505-510.
60. **Malik A. (2004).** Metal bioremediation through growing cells. *Environment International* 30, 261 - 278.
61. **Marquez Reyes, Julia Mariana (2013).** Desarrollo, optimización e integración de tecnologías Sustentables a base de un biorreactor empacado de flujo Ascendente y un humedal artificial de flujo horizontal sub-Superficial para el tratamiento de agua contaminada Con Cromo y plomo.
62. **Matías P.M., Pereira I.A.C., Soares C.M., Carrondo M.A., (2005).** Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 89, 292-329.
63. **Merck (1980).** Manual de diagnóstico y terapéutica. Ed. Merck Sharp & Dohme. Research Labor.
64. **Mogensen, G., Kjeldsen, K., Ingvorsen, K. (2005).** *Desufovibrio aerotolerans* sp. Nov., an oxygen tolerant sulphate-reducing bacterium isolated from acxtived sludge. *Anerobe.* 11: 339-349.

65. **Moosa S, Nemati M, Harrison STL (2002).** A kinetic study on anaerobic reduction of sulphate, Part I: Effect of sulphate concentration. *Chemical Eng. Sci.* 57:2773-2780.
66. **Moosa, S., Nemati, M., Harrison, S.T.L. (2005).** A kinetic study on anaerobic reduction of sulphate. Part II. Incorporation of temperatura effects in the kinetic model. *Chemical Engineering Science* 60:3517-3524.
67. **Moura I., Bursakov S., Costa C., Moura J.J.G. (1997).** Nitrate and nitrite utilization in sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe* 3, 279-290.
68. **Moyad MA (2004).** Zinc for prostate disease and other conditions: a little evidence, a lot of hype, and a significant potential problem. *Urol Nurs.* 24(1):49-52.
69. **Muyzer G., Stams A.J.M. (2008).** The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6, 441-454.
70. **Nagpal P, Walker LM, Young JC, Sonawala A, Timpte C, Estelle M, Reed JW. (2000).** *AXR2* encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiol.* 123:563-574.
71. **National Research Council (2001).** Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodone, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Institute of Medicine/Food and Nutrition Board. National Academy Press. Washington DC.
72. **Neculita C.M., Zagury G. J., Bussière B. (2007).** Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria: Critical review and research needs. *J. Environ. Qual.* 36, 1-16.
73. **Nina Chambe, Meyla (2008).** Evaluación de los métodos químicos y biogénico para el tratamiento de drenaje ácido de mina a escala de laboratorio.
74. **Okabe S., Characklis W.G. (1992).** Effects of temperature and phosphorous concentration on microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotechnology and Bioengineering* 39 (10), 1031-1042.
75. **Okabe S., Nielsen P.H., Jones W.L., Characklis W.G. (1992).** Factors affecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* continuous culture: Limiting nutrients and sulfide concentration. *Biotechnology and Bioengineering* 40, 725-734.
76. **Odom, J., Singleton, R. (1993).** The sulfate-reducing bacteria: COntemporary Perspectives. Springer-Verlag. New York.

77. **Oliver, B., Cord – Ruwisch, R., Hatchikian, E., García, J. (1988).** Characterization of *Desulfovibrio Fructosovorans* sp. Nov. Arch. Microbiol. 149: 447-450.
78. **Omil F., Lens P., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G. (1997).** Characterization of biomass from a sulfidogenic, volatile fatty acid-degrading granular sludge reactor. Enzyme and Microbial Technology 20 (3), 229-236.
79. **Parra Chavez, Diana Carolina (2008).** Aislamiento y Caracterización Bioquímica y Morfológica de bacterias reductoras de sulfato (BRS) Provenientes de agua de producción de un campo petrolero. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.
80. **Petrova O.E., Tarasova N.B., Davydova M.N. (2002).** Biotechnological potential of sulfate-reducing bacteria for transformation of nitrocellulose. Anaerobe 8, 315-317.
81. **Petrova O.E., Tarasova N.B., Alyabyev A.Ju., Davydova M.N., Loseva N.L. (2006).** Calorimetric studies of the growth of *Desulfovibrio desulfuricans* in the presence of nitrocellulose. Thermochemica Acta 445, 67-69.
82. **Postgate J.R. (1984).** The sulphate-reducing bacteria. Cambridge University Press. United Kingdom.
83. **Rabus R., Hansen T.A., Widdel F. (2006).** Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. Prokaryotes 2, 659-768.
84. **Ramírez, Augusto V, (2008).** Intoxicación ocupacional por mercurio.
85. **Rubio. C, González Weller. D, Martín-Izquierdo. R. E, Revert. C, Rodríguez. I y Hardisson. A (2006).** Alimentos esenciales. El Zinc: Oligoelemento esencial. Nutrición hospitalaria. 22(1):101-107
86. **Sahinkaya E., Gungor M. (2010).** Comparison of sulfidogenic up-flow and down-flow fluidized-bed reactors for the biotreatment of acidic metal-containing wastewater. Bioresource Technology 101, 9508-9514.
87. **Sanchez R.F., Cordoba P., Sineriz F. (1997).** Use of the USAB for the anaerobic treatment of stillage from sugarcane molasses. Biotechnology and Bioengineering 27 (12), 1710-1716.
88. **Sass, H., Cypionka, H. (2004).** Isolation of sulfate-reducing bacteria from the terrestrial deep subsurface and description at *Desulfovibrio cavernae* sp. Nov. System Appl Microbiol. 27: 541-548.
89. **Shannon Michael (1998).** «Lead» in Haddad, Shanon y Winchester editors: Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose. WB Saunders, 3ra edition.

90. **Silva A.J., Hirasawa J.S., Varesche M.B., Foresti E., Zaiat M. (2006).** Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Anaerobe* 12, 93-98.
91. **Stams A.J.M., Hansen T.A. (1982).** Oxygen-labile l(+) lactate dehydrogenase activity in *Desulfovibrio desulfuricans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 13, 389-394.
92. **Stubner S., Meuser K. (2000).** Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 34, 73-80.
93. **Suzuki, D., Ueki, A., Amishi, A., Ueki, K. (2007).** Diversity of substrate utilization and growth characteristics of sulphate-reducing bacteria isolated from estuarine sediment in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53: 119-132.
94. **Tabak H.H., Govind R. (2003).** Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 2. Membrane bioreactor system for sulfate reduction. *Biodegradation* 14, 437-452.
95. **Traore A.S., Hatchikian C.E., Belaich J.P., Le Gall J. (1982).** Microcalorimetric studies of the growth of sulfatereducing bacteria: Comparison of the growth parameters of some *Desulfovibrio* species. *Journal of Bacteriology* 149 (2), 606-611.
96. **Tsukamoto T.K., Miller G.C. (1999).** Methanol as a carbon source for microbiological treatment of acid mine drainage. *Water Research* 33 (6), 1365-1370.
97. **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* 38 (6), 1405-1418.
98. **Utgikar V.P., Harmon S.M., Chaudhary N., Tabak H.H., Govind R., Haines J.R. (2002).** Inhibition of sulfatereducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage. *Environmental Toxicology* 17, 40-48.
99. **Valdivia Infantas, Melinda M. (2005).** *Intoxicación por plomo.* *Rev. Soc. Per. Med. Inter.* 18(1)
100. **Van Houten R.T., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G. (1994).** Biological sulphate reduction using gas-lift reactors fed with hydrogen and carbon dioxide as energy and carbon source. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 586-594.
101. **Van Houten R.T., Oude Elferink S.J.W.H., van Hamel S.E., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G. (1995) a.** Sulfate reduction by aggregates of sulfate reducing bacteria and homo-acetogenic bacteria in a lab-scale gas-lift reactor. *Bioresource Technology* 54, 73-79.

- 102. Van Houten R.T., van Aelst A.C., Lettinga G. (1995) b.** Aggregation of sulphatereducing bacteria in a homoacetogenic bacteria in a lab-scale gaslift reactor. *Water Sci. Technol.* 32 (8), 85-90.
- 103. Veglio, F. & Beolchini, F. (1997).** *Hydrometallurgy. Removal of metals by biosorption, Volumen 44 (pp.301 -316).*
- 104. Vicente, M.S. (2006).** Uso de Bacterias sulfato-reductoras inmovilizadas para la precipitación de metales pesados (Trabajo final de Laboratorio de Procesos Biotecnológicos). Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- 105. Visser, A. (1995).** The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Tesis doctoral. Wageningen University. Wageningen, The Netherlands.
- 106. Vullo Diana L. (2003).** Microorganismos y metales pesados: interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva* 2, 93-104.
- 107. Whiteley, C. G., Lee, D. J. (2006).** Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 291-316.
- 108. White C, Gadd GM (1996)** A comparison of carbon/energy and complex nitrogen sources for bacterial sulphate-reduction: potential applications to bioprecipitation of toxic metal as sulphides. *J. Ind. Microbiol* 17:116-123.
- 109. Widdel F. (1992).** The genus *Desulfotomaculum*. *The Prokaryotes* (segunda edición). Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W. y Schleifer K.H. (Ed). Springer Verlag, New York, USA. 1793-1799.
- 110. Widdel F., Pfennig N. (1981).** Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. *Archives of Microbiology* 129, 395-400.
- 111. Willow M.A., Cohen R.R.H. (2003).** pH, dissolved oxygen and adsorption effects on metal removal in anaerobic bioreactors. *Journal of Environmental Quality* 32, 1212-1221.
- 112. Wright John. (2003).** Química medioambiental (Environmental Chemistry).
- 113. Yagnentkovsky, Nadia (2011).** Aplicación de técnicas de biorremediación para el tratamiento de residuos industriales con alto contenido de metales pesados.
- 114. Zenz C, ed. (1988).** Occupational medicine: principles and practical applications. 2nd Ed. Chicago: Mosby.

# ANEXOS



# Anexo 1

## Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado  
Arequipa Perú / Apartado 2102

Teléfono (054) 443294 Fax: (054) 444582  
www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

### INFORME DE ENSAYO LAS-16-00453

Fecha de emisión: 26/01/2016  
Pág.: 1/2

Señores: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Dirección: AV RAMON CASTILLA LT 2A Mz 26 SEMIRURAL PACHACUTEC AREQUIPA  
Atención: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Recepción: 20/01/2016  
Realización: 20/01/2016

**Método de ensayo aplicado**

903 Método de ensayo para Cobre por Absorción Atómica en solución Ácida  
\*952 Método de Ensayo para metales traza por ICP-OES

Muestra #	Nombre de muestra	Descrip. de muestra	Procedencia de la muestra	952 Ag mg/L	952 Al mg/L	952 As mg/L	952 B mg/L	952 Ba mg/L	952 Be mg/L	952 Ca mg/L	952 Cd mg/L	952 Co mg/L	952 Cr mg/L	952 Cu mg/L	952 Fe mg/L	952 Hg mg/L	952 K mg/L	952 Li mg/L	952 Mg mg/L
SS16000149	MUESTRA 1	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0,0113	0,08	0,0514	0,1477	0,02446	a<0,000079	>250	0,00245	a<0,000094	0,02045	0,0158	6,47	a<0,00041	>250	0,0124	33,65
SS16000150	MUESTRA 2	Post gate G	No proporcionado por el cliente	a<0,0024	1,33	0,0529	0,0595	0,04224	a<0,000079	>250	0,00261	0,000479	0,00663	0,0124	0,475	a<0,00041	111	0,0071	30,86
SS16000151	RELAVE MUESTRA 3	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0,012	0,099	0,0127	0,1452	0,04548	a<0,000079	>250	a<0,00011	a<0,000094	0,01095	a<0,002	a<0,016	0,00979	74,6	0,004	7,06

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de productos o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados solo están relacionados a la muestra ensayada.

# Anexo 2

## Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado  
Arequipa Perú / Apartado 2102

Teléfono (054) 443294 Fax: (054) 444582  
www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

### INFORME DE ENSAYO LAS-16-00453

Fecha de emisión: 26/01/2016  
Pág.: 2/2

Señores: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Dirección: AV RAMON CASTILLA LT 2A Mz 26 SEMIRURAL PACHACUTEC AREQUIPA  
Atención: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Recepción: 20/01/2016  
Realización: 20/01/2016

**Método de ensayo aplicado**

903 Método de ensayo para Cobre por Absorción Atómica en solución Ácida  
\*952 Método de Ensayo para metales traza por ICP-OES

Muestra #	Nombre de muestra	Descrip. de muestra	Procedencia de muestra	952 Mn mg/L	952 Mo mg/L	952 Na mg/L	952 Ni mg/L	952 P mg/L	952 Pb mg/L	952 Sb mg/L	952 Se mg/L	952 SiO2 mg/L	952 Sn mg/L	952 Sr mg/L	952 Ti mg/L	952 Tl mg/L	952 V mg/L	952 Zn mg/L
SS16000149	MUESTRA 1	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0,38417	0,02959	>250	<sup>a</sup> <0,00051	28,37	0,0059	0,00179	<sup>a</sup> <0,002	14,47	0,00891	2,453	0,01814	<sup>a</sup> <0,0013	0,00607	0,1052
SS16000150	MUESTRA 2	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0,41818	0,22458	>250	<sup>a</sup> <0,00051	4,982	0,0321	0,01768	<sup>a</sup> <0,002	17,47	<sup>a</sup> <0,00085	4,562	0,03524	0,0053	0,00146	0,1147
SS16000151	RELAVE MUESTRA 3	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0,15283	0,83792	135	<sup>a</sup> <0,00051	1,175	0,0082	0,00729	<sup>a</sup> <0,002	3,174	<sup>a</sup> <0,00085	10,9	0,00286	0,0074	<sup>a</sup> <0,00014	0,1068

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de productos o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Anexo 3

**Laboratorios Analíticos del Sur**

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado  
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

**INFORME DE ENSAYO LAS-16-00567**

Fecha de emisión: 12 / 01 / 2016

Pág.: 1 / 3

Señores: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Dirección: AV RAMON CASTILLA LT 2A Mz 26 SEMIRURAL PACHACUTEC AREQUI  
Atención: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Recepción: 11/01/2016  
Realización: 11/01/2016

Método de ensayo aplicado

952 Método de Ensayo para Metales traza por ICP-OES

Muestra #	Nombre de muestra	Descrip. de muestra	Procedencia de la muestra	906 Cd mg/L	910 Cr mg/L	937 Pb mg/L
SS16000182	804 - 1 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0853	-
SS16000183	804 - 4 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0848	-
SS16000184	804 - 8 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0851	-
SS16000185	804 - 2 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	3.9754	-	-
SS16000186	804 - 5 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	3.9686	-	-
SS16000187	804 - 9 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	3.972	-	-
SS16000188	804 - 3 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	11.635
SS16000189	804 - 6 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	11.593
SS16000190	804 - 7 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	11.614
SS16000191	2M - 1 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0855	-
SS16000192	2M - 4 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0859	-



Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.  
Omar A. Juárez Soto  
Gerente de Operaciones  
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114426

<sup>a</sup><Valor numérico> = Límite de detección del método, <sup>b</sup><Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.

## Anexo 4

# Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado  
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

### INFORME DE ENSAYO LAS-16-00567

Fecha de emisión: 12 / 01 / 2016

Señores: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Dirección: AV RAMON CASTILLA LT 2A Mz 26 SEMIRURAL PACHACUTEC AREQUI  
Atención: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Recepción: 11/01/2016  
Realización: 11/01/2016

Pág.: 2 / 3

#### Método de ensayo aplicado

952 Método de Ensayo para Metales traza por ICP-OES

Muestra #	Nombre de muestra	Descrip. de muestra	Procedencia de la muestra	906 Cd mg/L	910 Cr mg/L	937 Pb mg/L
SS16000193	2M - 8 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0855	-
SS16000194	2M - 2 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	3.9646	-	-
SS16000195	2M - 5 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	3.9531	-	-
SS16000196	2M - 9 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	3.9587	-	-
SS16000197	2M - 3 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	11.583
SS16000198	2M - 6 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	11.601
SS16000199	2M - 7 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	11.592
SS16000200	Consorcio - 1 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0863	-
SS16000201	Consorcio - 4 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0859	-
SS16000202	Consorcio - 8 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0861	-
SS16000203	Consorcio - 2 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	3.9968	-	-



Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.  
Omar A. Juárez Soto  
Gerente de Operaciones  
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114426

<sup>a</sup><Valor numérico> = Límite de detección del método, <sup>b</sup><Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.

Anexo 5



# Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado  
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

## INFORME DE ENSAYO LAS-16-00567

Fecha de emisión: 12 / 01 / 2016

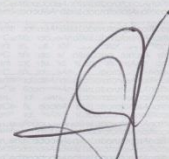
Pág.: 3 / 3

Señores: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Dirección: AV RAMON CASTILLA LT 2A Mz 26 SEMIRURAL PACHACUTEC AREQUI  
Atención: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Recepción: 11/01/2016  
Realización: 11/01/2016

**Método de ensayo aplicado**

952 Método de Ensayo para Metales traza por ICP-OES

Muestra #	Nombre de muestra	Descrip. de muestra	Procedencia de la muestra	906 Cd mg/L	910 Cr mg/L	937 Pb mg/L
SS16000204	Consorcio - 5 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	3.9756	-	-
SS16000205	Consorcio - 9 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	3.9862	-	-
SS16000206	Consorcio - 3 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	11.809
SS16000207	Consorcio - 6 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	11.796
SS16000208	Consorcio - 7 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	11.8025



Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.  
Omar A. Juárez Soto  
Gerente de Operaciones  
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114426

<sup>a</sup><Valor numérico> = Límite de detección del método, <sup>b</sup><Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.

## Anexo 6

# Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado  
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

### INFORME DE ENSAYO LAS-16-00788

Fecha de emisión: 30 / 01 / 2016

Señores: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Dirección: AV RAMON CASTILLA LT 2A Mz 26 SEMIRURAL PACHACUTEC AREQUI  
Atención: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Recepción: 29/01/2016  
Realización: 29/01/2016

Pág.: 1 / 3

**Método de ensayo aplicado**

952 Método de Ensayo para Metales traza por ICP-OES

Muestra #	Nombre de muestra	Descrip. de muestra	Procedencia de la muestra	906 Cd mg/L	910 Cr mg/L	937 Pb mg/L
SS16000507	804 - 1 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0595	-
SS16000508	804 - 4 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0593	-
SS16000509	804 - 8 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0594	-
SS16000510	804 - 2 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	1.271	-	-
SS16000511	804 - 5 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	1.2707	-	-
SS16000512	804 - 9 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	1.2708	-	-
SS16000513	804 - 3 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	6.3877
SS16000514	804 - 6 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	6.3874
SS16000515	804 - 7 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	6.3876
SS16000516	2M - 1 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0471	-
SS16000517	2M - 4 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0466	-



Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.  
Omar A. Juárez Soto  
Gerente de Operaciones  
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114426

<sup>a</sup><Valor numérico> = Límite de detección del método, <sup>b</sup><Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.

Anexo 7

# Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado  
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

## INFORME DE ENSAYO LAS-16-00788

Fecha de emisión: 30 / 01 / 2016

Pág.: 2 / 3

Señores: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Dirección: AV RAMON CASTILLA LT 2A Mz 26 SEMIRURAL PACHACUTEC AREQUI  
Atención: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Recepción: 29/01/2016  
Realización: 29/01/2016

**Método de ensayo aplicado**

952 Método de Ensayo para Metales traza por ICP-OES

Muestra #	Nombre de muestra	Descrip. de muestra	Procedencia de la muestra	906 Cd mg/L	910 Cr mg/L	937 Pb mg/L
SS16000518	2M - 8 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.0468	-
SS16000519	2M - 2 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.6729	-	-
SS16000520	2M - 5 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.6725	-	-
SS16000521	2M - 9 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.6727	-	-
SS16000522	2M - 3 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	4.8686
SS16000523	2M - 6 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	4.8673
SS16000524	2M - 7 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	4.868
SS16000525	Consorcio - 1 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.05424	-
SS16000526	Consorcio - 4 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.05423	-
SS16000527	Consorcio - 8 - Cr	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	0.05424	-
SS16000528	Consorcio - 2 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.9886	-	-



Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.  
Omar A. Juárez Soto  
Gerente de Operaciones  
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114426

<sup>a</sup><Valor numérico> = Límite de detección del método, <sup>b</sup><Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.

## Anexo 8

# Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado  
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

### INFORME DE ENSAYO LAS-16-00788

Fecha de emisión: 30 / 01 / 2016

Pág.: 3 / 3

Señores: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Dirección: AV RAMON CASTILLA LT 2A Mz 26 SEMIRURAL PACHACUTEC AREQUI  
Atención: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Recepción: 29/01/2016  
Realización: 29/01/2016

**Método de ensayo aplicado**

952 Método de Ensayo para Metales traza por ICP-OES

Muestra #	Nombre de muestra	Descrip. de muestra	Procedencia de la muestra	906 Cd mg/L	910 Cr mg/L	937 Pb mg/L
SS16000529	Consorcio - 5 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.9886	-	-
SS16000530	Consorcio - 9 - Cd	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.9965	-	-
SS16000531	Consorcio - 3 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	5.3111
SS16000532	Consorcio - 6 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	5.3087
SS16000533	Consorcio - 7 - Pb	Post gate G	No proporcionado por el cliente	-	-	5.3099



Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.  
Omar A. Juárez Soto  
Gerente de Operaciones  
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114426

<sup>a</sup><Valor numérico> = Límite de detección del método, <sup>b</sup><Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.

## Anexo 9

# Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado  
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

### INFORME DE ENSAYO LAS-16-00603

Fecha de emisión: 12 / 01 / 2016

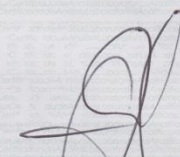
Señores: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Dirección: AV RAMON CASTILLA LT 2A Mz 26 SEMIRURAL PACHACUTEC AREQUI  
Atención: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Recepción: 11/01/2016  
Realización: 11/01/2016

Pág.: 1/1

**Método de ensayo aplicado**

952 Método de Ensayo para Metales traza por ICP-OES

Muestra #	Nombre de muestra	Descrip. de muestra	Procedencia de la muestra	903 Cu mg/L	906 Cd mg/L	910 Cr mg/L	937 Pb mg/L
SS16000209	CONSORCIO 1	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0161	0.0023	0.0232	0.0056
SS16000210	CONSORCIO 2	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0158	0.0021	0.0227	0.0053
SS16000211	CONSORCIO 3	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.016	0.0022	0.023	0.0055
SS16000212	804 - 1	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0158	0.0025	0.0205	0.0059
SS16000213	804 - 2	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0147	0.0023	0.0201	0.0057
SS16000214	804 - 3	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0153	0.0024	0.0203	0.0058
SS16000215	2M - 1	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0148	0.0024	0.0201	0.0057
SS16000216	2M - 2	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0152	0.0025	0.0204	0.0055
SS16000217	2M - 3	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.015	0.0024	0.0203	0.0056
SS16000218	RELAVE CONTROL	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0124	0.00261	0.00663	0.0321



Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.  
Omar A. Juárez Soto  
Gerente de Operaciones  
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114426

<sup>a</sup><Valor numérico> = Límite de detección del método, <sup>b</sup><Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.

## Anexo 10

# Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado  
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

### INFORME DE ENSAYO LAS-16-00710

Fecha de emisión: 02/02/2016

Señores: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Dirección: AV RAMON CASTILLA LT 2A Mz 26 SEMIRURAL PACHACUTEC AREQUI  
Atención: FRANCINE VALDIVIA TEJADA  
Recepción: 01/02/2016  
Realización: 01/02/2016

Pág.: 1/1

#### Método de ensayo aplicado

952 Método de Ensayo para Metales traza por ICP-OES

Muestra #	Nombre de muestra	Descrip. de muestra	Procedencia de la muestra	903 Cu mg/L	906 Cd mg/L	910 Cr mg/L	937 Pb mg/L
SS16000415	CONSORCIO 1	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.002	0.0005	0.0138	0.0022
SS16000416	CONSORCIO 2	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0021	0.00048	0.01378	0.0023
SS16000417	CONSORCIO 3	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0021	0.00049	0.0137	0.00225
SS16000418	804 - 1	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0029	0.0006	0.0133	0.0027
SS16000419	804 - 2	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.003	0.0007	0.0134	0.0028
SS16000420	804 - 3	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0029	0.00065	0.01335	0.00275
SS16000421	2M - 1	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0009	0.0004	0.0113	0.0019
SS16000422	2M - 2	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0008	0.00038	0.0114	0.0021
SS16000423	2M - 3	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0008	0.00039	0.01135	0.002
SS16000424	RELAVE CONTROL	Post gate G	No proporcionado por el cliente	0.0124	0.00261	0.00663	0.0321

Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.  
Omar A. Juárez Soto  
Gerente de Operaciones  
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114426

<sup>a</sup><Valor numérico> = Límite de detección del método, <sup>b</sup><Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.

**Anexo 11. Población bacteriana en suspensión de la cepa 804**

Tiempo (días)	0	5	10	15	20
Repetición	Bacterias/ml	Bacterias/ml	Bacterias/ml	Bacterias/ml	Bacterias/ml
1	5.34E+07	6.79E+08	9.82E+08	8.45E+08	7.31E+08
2	5.26E+07	6.81E+08	9.83E+08	8.44E+08	7.32E+08
3	5.30E+07	6.80E+08	9.83E+08	8.44E+08	7.32E+08

**Anexo 12. Población bacteriana en suspensión de la cepa 2M**

Tiempo (días)	0	5	10	15	20
Repetición	Bacterias/ml	Bacterias/ml	Bacterias/ml	Bacterias/ml	Bacterias/ml
1	5.32E+07	6.81E+08	9.85E+08	8.43E+08	7.34E+08
2	5.34E+07	6.82E+08	9.83E+08	8.46E+08	7.35E+08
3	5.33E+07	6.81E+08	9.84E+08	8.44E+08	7.34E+08

**Anexo 13. Análisis de Varianza para población bacteriana (Bacterias/ml) - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Tratamiento</b>	3.06E+18	4	7.66E+17	1675.95	0
<b>B: Cepas</b>	1.39E+14	1	1.39E+14	0.3	0.5876
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	1.11E+15	4	2.77E+14	0.61	0.6623
<b>RESIDUOS</b>	9.14E+15	20	4.57E+14		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	3.08E+18	29			

**Anexo 14. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Poblacion bacteriana (Bacterias/ml) con intervalos de confianza del 95.0%**

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Limite Superior
<b>MEDIA GLOBAL</b>	30	6.56E+08			
<b>Tratamiento</b>					
<b>0 días</b>	6	5.32E+07	8.73E+06	3.49E+07	7.14E+07
<b>10 días</b>	6	9.83E+08	8.73E+06	9.65E+08	1.00E+09
<b>15 días</b>	7	8.31E+08	8.16E+06	8.14E+08	8.48E+08
<b>20 días</b>	5	7.33E+08	9.76E+06	7.13E+08	7.53E+08
<b>5 días</b>	6	6.81E+08	8.73E+06	6.62E+08	6.99E+08
<b>Cepas</b>					
<b>2M</b>	15	6.54E+08	5.66E+06	6.42E+08	6.66E+08
<b>804</b>	15	6.58E+08	5.52E+06	6.47E+08	6.70E+08
<b>Tratamiento por Cepas</b>					
<b>0 días,2M</b>	3	5.33E+07	1.23E+07	2.76E+07	7.90E+07
<b>0 días,804</b>	3	5.30E+07	1.23E+07	2.73E+07	7.87E+07
<b>10 días,2M</b>	3	9.84E+08	1.23E+07	9.58E+08	1.01E+09
<b>10 días,804</b>	3	9.83E+08	1.23E+07	9.57E+08	1.01E+09
<b>15 días,2M</b>	4	8.17E+08	1.07E+07	7.94E+08	8.39E+08
<b>15 días,804</b>	3	8.44E+08	1.23E+07	8.19E+08	8.70E+08
<b>20 días,2M</b>	2	7.35E+08	1.51E+07	7.03E+08	7.66E+08
<b>20 días,804</b>	3	7.32E+08	1.23E+07	7.06E+08	7.57E+08
<b>5 días,2M</b>	3	6.81E+08	1.23E+07	6.56E+08	7.07E+08
<b>5 días,804</b>	3	6.80E+08	1.23E+07	6.54E+08	7.06E+08

**Anexo 15. Medición de absorbancias a 600 nm de la cepa 804**

Tiempo (días)	0	5	10	15	20
Repeticón	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
<b>1</b>	0.0000	0.3372	0.8134	1.2563	0.7013
<b>2</b>	0.0000	0.3165	0.8064	1.2386	0.7164
<b>3</b>	0.0000	0.3269	0.8099	1.2475	0.7089

**Anexo 16. Medición de absorbancias a 600 nm de la cepa 2M**

Tiempo (días)	0	5	10	15	20
Repetición	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
1	0.0000	0.3521	0.8250	1.2452	0.7362
2	0.0000	0.3385	0.7843	1.2151	0.7081
3	0.0000	0.3453	0.8047	1.2302	0.7222

**Anexo 17. Análisis de Varianza para Absorbancia - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Tratamiento</b>	5.35284	4	1.33821	11749.3	0
<b>B: Cepas</b>	2.54E-05	1	2.5392E-05	0.22	0.6419
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	0.00124	4	0.00030991	2.72	0.0587
<b>RESIDUOS</b>	0.002278	20	0.0001139		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	5.35638	29			

**Anexo 18. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Absorbancia con intervalos de confianza del 95.0%**

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
<b>MEDIA GLOBAL</b>	30	0.61954			
<b>Tratamiento</b>					
0 días	6	0	0.00435693	-0.00908841	0.00908841
10 días	6	0.807283	0.00435693	0.798195	0.816372
15 días	6	1.23882	0.00435693	1.22973	1.24791
20 días	6	0.715517	0.00435693	0.706428	0.724605
5 días	6	0.336083	0.00435693	0.326995	0.345172
<b>Cepas</b>					
2M	15	0.62046	0.00275556	0.614712	0.626208
804	15	0.61862	0.00275556	0.612872	0.624368

Tratamiento por Cepas					
<b>0 días,2M</b>	3	0	0.00616163	-0.012853	0.012853
<b>0 días,804</b>	3	0	0.00616163	-0.012853	0.012853
<b>10 días,2M</b>	3	0.804667	0.00616163	0.791814	0.81752
<b>10 días,804</b>	3	0.8099	0.00616163	0.797047	0.822753
<b>15 días,2M</b>	3	1.23017	0.00616163	1.21731	1.24302
<b>15 días,804</b>	3	1.24747	0.00616163	1.23461	1.26032
<b>20 días,2M</b>	3	0.722167	0.00616163	0.709314	0.73502
<b>20 días,804</b>	3	0.708867	0.00616163	0.696014	0.72172
<b>5 días,2M</b>	3	0.3453	0.00616163	0.332447	0.358153
<b>5 días,804</b>	3	0.326867	0.00616163	0.314014	0.33972

**Anexo 19. Reducción de sulfatos de la cepa 804 en medio Postgate G**

Tiempo (días)	0	5	10	15	20
Repetición	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt
<b>1</b>	3.4861	1.8511	1.6134	1.3261	1.1765
<b>2</b>	3.4721	1.8387	1.5987	1.3197	1.1653
<b>3</b>	3.4791	1.8449	1.6061	1.3229	1.1709

**Anexo 20. Reducción de sulfatos de la cepa 2M en medio Postgate G**

Tiempo (días)	0	5	10	15	20
Repetición	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt
<b>1</b>	3.4793	1.8497	1.6095	1.3098	1.1653
<b>2</b>	3.4752	1.8332	1.6154	1.3175	1.1696
<b>3</b>	3.4773	1.8415	1.6125	1.3137	1.1675

**Anexo 21. Análisis de Varianza para Concentración sulfatos g/Lt - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Tratamiento</b>	20.6974	4	5.17434	182529.41	0
<b>B: Cepas</b>	3.99E-05	1	3.9905E-05	1.41	0.2493
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	0.00019	4	4.7455E-05	1.67	0.1954
<b>RESIDUOS</b>	0.000567	20	2.8348E-05		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	20.6982	29			

**Anexo 22. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Concentración sulfatos g/Lt con intervalos de confianza del 95.0%**

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
<b>MEDIA GLOBAL</b>	30	1.88362			
<b>Tratamiento</b>					
<b>0 días</b>	6	3.47818	0.00217363	3.47365	3.48272
<b>10 días</b>	6	1.60927	0.00217363	1.60473	1.6138
<b>15 días</b>	6	1.31828	0.00217363	1.31375	1.32282
<b>20 días</b>	6	1.16918	0.00217363	1.16465	1.17372
<b>5 días</b>	6	1.84318	0.00217363	1.83865	1.84772
<b>Cepas</b>					
<b>2M</b>	15	1.88247	0.00137472	1.8796	1.88533
<b>804</b>	15	1.88477	0.00137472	1.88191	1.88764
<b>Tratamiento por Cepas</b>					
<b>0 días,2M</b>	3	3.47727	0.00307398	3.47085	3.48368
<b>0 días,804</b>	3	3.4791	0.00307398	3.47269	3.48551
<b>10 días,2M</b>	3	1.61247	0.00307398	1.60605	1.61888
<b>10 días,804</b>	3	1.60607	0.00307398	1.59965	1.61248
<b>15 días,2M</b>	3	1.31367	0.00307398	1.30725	1.32008
<b>15 días,804</b>	3	1.3229	0.00307398	1.31649	1.32931
<b>20 días,2M</b>	3	1.16747	0.00307398	1.16105	1.17388
<b>20 días,804</b>	3	1.1709	0.00307398	1.16449	1.17731
<b>5 días,2M</b>	3	1.84147	0.00307398	1.83505	1.84788
<b>5 días,804</b>	3	1.8449	0.00307398	1.83849	1.85131

**Anexo 23. Producción de ácido láctico por el consorcio bacteriano en presencia de distintos metales pesados**

Tiempo (días)		0	6	10	14	18
Repetición	Muestra	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido
		láctico	láctico	láctico	láctico	láctico
		(g/Lt)	(g/Lt)	(g/Lt)	(g/Lt)	(g/Lt)
1	Consortio -1-Cr	0.3375	0.81	0.9225	0.99	1.08
	Consortio - 2-Cd	0.5625	0.945	1.035	1.08	1.35
	Consortio - 3-Pb	0.675	1.17	0.9225	0.945	1.3725
2	Consortio - 4-Cr	0.3375	1.125	0.6975	1.26	1.08
	Consortio - 5-Cd	0.675	1.035	0.72	1.125	1.2375
	Consortio - 6-Pb	0.45	0.9225	0.675	1.1475	0.81
3	Consortio - 7-Pb	0.45	1.26	1.0575	0.495	1.665
	Consortio - 8-Cr	0.45	1.0125	0.9225	0.945	1.305
	Consortio - 9-Cd	0.45	1.125	0.9225	0.8775	0.72

**Anexo 24. Análisis de Varianza para Acido Láctico (g/Lt) - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Metal pesado</b>	0.020408	2	0.0102037	0.23	0.7929
<b>B: Días</b>	2.48742	4	0.621855	14.25	0
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	0.19098	8	0.0238725	0.55	0.8115
<b>RESIDUOS</b>	1.30883	30	0.0436275		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	4.00763	44			

**Anexo 25. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Acido Láctico (g/Lt) con intervalos de confianza del 95.0%**

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
<b>MEDIA GLOBAL</b>	45	0.9145			
<b>Metal pesado</b>					
1- Cr	15	0.885	0.0539305	0.774859	0.995141
2-Cd	15	0.924	0.0539305	0.813859	1.03414
3-Pb	15	0.9345	0.0539305	0.824359	1.04464

Días					
0	9	0.4875	0.069624	0.345309	0.629691
6	9	1.045	0.069624	0.902809	1.18719
10	9	0.875	0.069624	0.732809	1.01719
14	9	0.985	0.069624	0.842809	1.12719
18	9	1.18	0.069624	1.03781	1.32219
<b>Metal pesado por Días</b>					
1- Cr,0	3	0.375	0.120592	0.128717	0.621283
1- Cr,6	3	0.9825	0.120592	0.736217	1.22878
1- Cr,10	3	0.8475	0.120592	0.601217	1.09378
1- Cr,14	3	1.065	0.120592	0.818717	1.31128
1- Cr,18	3	1.155	0.120592	0.908717	1.40128
2-Cd,0	3	0.5625	0.120592	0.316217	0.808783
2-Cd,6	3	1.035	0.120592	0.788717	1.28128
2-Cd,10	3	0.8925	0.120592	0.646217	1.13878
2-Cd,14	3	1.0275	0.120592	0.781217	1.27378
2-Cd,18	3	1.1025	0.120592	0.856217	1.34878
3-Pb,0	3	0.525	0.120592	0.278717	0.771283
3-Pb,6	3	1.1175	0.120592	0.871217	1.36378
3-Pb,10	3	0.885	0.120592	0.638717	1.13128
3-Pb,14	3	0.8625	0.120592	0.616217	1.10878
3-Pb,18	3	1.2825	0.120592	1.03622	1.52878

**Anexo 26. Producción de ácido láctico por la cepa 804 en presencia de distintos metales pesados**

Repetición	Muestra	Tiempo (días)	0	6	10	14	18
			Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)
1	804 - 1-Cr		0.3375	1.035	0.9	0.855	1.1475
	804 - 2-Cd		0.45	0.855	1.0575	0.9675	1.08
	804 - 3-Pb		0.45	1.0125	1.125	0.9675	1.08
2	804 - 4-Cr		0.45	0.855	0.6975	0.945	1.0125
	804 - 5-Cd		0.3375	1.26	1.17	1.26	1.62
	804 - 6-Pb		0.45	0.9225	0.9	0.855	1.2375
3	804 - 7-Pb		0.5625	0.9675	0.7425	0.8325	1.26
	804 - 8-Cr		0.45	1.1475	0.7875	0.9	1.485
	804 - 9-Cd		0.7875	0.675	1.0575	1.0575	0.945

**Anexo 27. Producción de ácido láctico por la cepa 2M en presencia de distintos metales pesados**

Repetición	Tiempo (días)	0	6	10	14	18
	Muestra	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)
<b>1</b>	2M - 1-Cr	0.45	0.945	0.945	1.1025	1.2375
	2M - 2-Cd	0.45	0.8775	0.8775	0.9225	1.26
	2M - 3-Pb	0.675	0.9675	0.9675	1.2825	1.08
<b>2</b>	2M - 4-Cr	0.45	1.08	1.2375	0.7875	1.9125
	2M - 5-Cd	0.45	0.9675	0.9675	1.125	1.35
	2M - 6-Pb	0.3375	0.7875	1.0125	0.9675	1.035
<b>3</b>	2M - 7-Pb	0.5625	0.855	0.855	0.72	0.7875
	2M - 8-Cr	0.675	1.26	1.4625	1.1925	1.2825
	2M - 9-Cd	0.45	0.8325	0.8325	0.8325	0.9

**Anexo 28. Análisis de Varianza para Ácido láctico (g/Lt)1 - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Cepa</b>	0.008123	1	0.0081225	0.26	0.6096
<b>B: Metal pesado</b>	0.110059	2	0.0550294	1.78	0.176
<b>C: Días</b>	4.96798	4	1.24199	40.23	0
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	0.336499	2	0.168249	5.45	0.0064
<b>AC</b>	0.015728	4	0.00393188	0.13	0.972
<b>BC</b>	0.222435	8	0.0278044	0.9	0.5211
<b>RESIDUOS</b>	2.09918	68	0.0308703		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	7.76	89			

**Anexo 29. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Ácido láctico (g/l) con intervalos de confianza del 95.0%**

Nivel	Casos	Media	Erro Est.	Límite Inferior	Límite Superior
<b>MEDIA GLOBAL</b>	90	0.9195			
<b>Cepa</b>					
<b>2M</b>	45	0.929	0.0261917	0.876735	0.981265
<b>804</b>	45	0.91	0.0261917	0.857735	0.962265
<b>Metal pesado</b>					
<b>2-Cd</b>	30	0.9225	0.0320782	0.858489	0.986511
<b>1-Cr</b>	30	0.96075	0.0320782	0.896739	1.02476
<b>3-Pb</b>	30	0.87525	0.0320782	0.811239	0.939261
<b>Días</b>					
<b>0</b>	18	0.4875	0.0414128	0.404862	0.570138
<b>6</b>	18	0.96125	0.0414128	0.878612	1.04389
<b>10</b>	18	0.96625	0.0414128	0.883612	1.04889
<b>14</b>	18	0.97625	0.0414128	0.893612	1.05889
<b>18</b>	18	1.20625	0.0414128	1.12361	1.28889
<b>Cepa por metal pesado</b>					
<b>2M,2-Cd</b>	15	0.873	0.0453654	0.782475	0.963525
<b>2M,1-Cr</b>	15	1.0545	0.0453654	0.963975	1.14503
<b>2M,3-Pb</b>	15	0.8595	0.0453654	0.768975	0.950025
<b>804,2-Cd</b>	15	0.972	0.0453654	0.881475	1.06253
<b>804,1-Cr</b>	15	0.867	0.0453654	0.776475	0.957525
<b>804,3-Pb</b>	15	0.891	0.0453654	0.800475	0.981525
<b>Cepa por Días</b>					
<b>2M,0</b>	9	0.5	0.0585665	0.383132	0.616868
<b>2M,6</b>	9	0.9525	0.0585665	0.835632	1.06937
<b>2M,10</b>	9	0.995	0.0585665	0.878132	1.11187
<b>2M,14</b>	9	0.9925	0.0585665	0.875632	1.10937
<b>2M,18</b>	9	1.205	0.0585665	1.08813	1.32187
<b>804,0</b>	9	0.475	0.0585665	0.358132	0.591868
<b>804,6</b>	9	0.97	0.0585665	0.853132	1.08687
<b>804,10</b>	9	0.9375	0.0585665	0.820632	1.05437
<b>804,14</b>	9	0.96	0.0585665	0.843132	1.07687
<b>804,18</b>	9	1.2075	0.0585665	1.09063	1.32437
<b>Metal pesado por días</b>					
<b>2-Cd,0</b>	6	0.4875	0.071729	0.344367	0.630633
<b>2-Cd,6</b>	6	0.91125	0.071729	0.768117	1.05438
<b>2-Cd,10</b>	6	0.99375	0.071729	0.850617	1.13688
<b>2-Cd,14</b>	6	1.0275	0.071729	0.884367	1.17063
<b>2-Cd,18</b>	6	1.1925	0.071729	1.04937	1.33563

<b>1-Cr,0</b>	6	0.46875	0.071729	0.325617	0.611883
<b>1-Cr,6</b>	6	1.05375	0.071729	0.910617	1.19688
<b>1-Cr,10</b>	6	0.97125	0.071729	0.828117	1.11438
<b>1-Cr,14</b>	6	0.96375	0.071729	0.820617	1.10688
<b>1-Cr,18</b>	6	1.34625	0.071729	1.20312	1.48938
<b>3-Pb,0</b>	6	0.50625	0.071729	0.363117	0.649383
<b>3-Pb,6</b>	6	0.91875	0.071729	0.775617	1.06188
<b>3-Pb,10</b>	6	0.93375	0.071729	0.790617	1.07688
<b>3-Pb,14</b>	6	0.9375	0.071729	0.794367	1.08063
<b>3-Pb,18</b>	6	1.08	0.071729	0.936867	1.22313

**Anexo 30. Reducción de sulfato por el consorcio bacteriano en presencia de distintos metales pesados**

		0	6	10	14	18
Repetición	Tiempo (días)					
	Muestra	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt
<b>1</b>	Consorcio -1-Cr	2.8851	2.9513	2.5521	1.7842	1.6745
	Consorcio - 2-Cd	2.6132	2.9112	2.5598	2.0042	1.9831
	Consorcio - 3-Pb	3.0943	2.8312	2.5023	2.0621	1.9123
<b>2</b>	Consorcio - 4-Cr	2.8742	2.9342	2.5431	1.7741	1.6642
	Consorcio - 5-Cd	2.6086	2.9054	2.5631	2.0102	1.9751
	Consorcio - 6-Pb	3.0874	2.8151	2.4932	2.0571	1.9072
<b>3</b>	Consorcio - 7-Pb	3.0909	2.8232	2.4978	2.0596	1.9098
	Consorcio - 8-Cr	2.8797	2.94275	2.5476	1.77915	1.66935
	Consorcio - 9-Cd	2.6109	2.9083	2.56145	2.0072	1.9791

**Anexo 31. Análisis de Varianza para Reducción Sulfato (g/Lt) - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Metal pesado</b>	0.095405	2	0.0477026	2190.43	0
<b>B: Días</b>	8.76186	4	2.19046	100582.55	0
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	0.573226	8	0.0716533	3290.2	0
<b>RESIDUOS</b>	0.000653	30	2.1778E-05		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	9.43114	44			

**Anexo 32. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Reducción Sulfato (g/Lt) con intervalos de confianza del 95.0%**

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
<b>MEDIA GLOBAL</b>	45	2.41778			
<b>Consorcio Bacteriano</b>					
<b>1- Cr</b>	15	2.3637	0.00120493	2.36124	2.36616
<b>2-Cd</b>	15	2.41339	0.00120493	2.41093	2.41585
<b>3-Pb</b>	15	2.47623	0.00120493	2.47377	2.47869
<b>Días</b>					
<b>0</b>	9	2.86048	0.00155556	2.8573	2.86365
<b>6</b>	9	2.89141	0.00155556	2.88823	2.89458
<b>10</b>	9	2.53561	0.00155556	2.53243	2.53878
<b>14</b>	9	1.94865	0.00155556	1.94547	1.95183
<b>18</b>	9	1.85274	0.00155556	1.84956	1.85592
<b>Metal pesado por días</b>					
<b>1- Cr,0</b>	3	2.87967	0.0026943	2.87416	2.88517
<b>1- Cr,6</b>	3	2.94275	0.0026943	2.93725	2.94825
<b>1- Cr,10</b>	3	2.5476	0.0026943	2.5421	2.5531
<b>1- Cr,14</b>	3	1.77915	0.0026943	1.77365	1.78465
<b>1- Cr,18</b>	3	1.66935	0.0026943	1.66385	1.67485
<b>2-Cd,0</b>	3	2.6109	0.0026943	2.6054	2.6164
<b>2-Cd,6</b>	3	2.9083	0.0026943	2.9028	2.9138
<b>2-Cd,10</b>	3	2.56145	0.0026943	2.55595	2.56695
<b>2-Cd,14</b>	3	2.0072	0.0026943	2.0017	2.0127
<b>2-Cd,18</b>	3	1.9791	0.0026943	1.9736	1.9846
<b>3-Pb,0</b>	3	3.09087	0.0026943	3.08536	3.09637
<b>3-Pb,6</b>	3	2.82317	0.0026943	2.81766	2.82867
<b>3-Pb,10</b>	3	2.49777	0.0026943	2.49226	2.50327
<b>3-Pb,14</b>	3	2.0596	0.0026943	2.0541	2.0651
<b>3-Pb,18</b>	3	1.90977	0.0026943	1.90426	1.91527

**Anexo 33. Reducción de sulfato por la cepa 804 en presencia de distintos metales pesados**

Repetición	Tiempo (días)	0	6	10	14	18
	Muestra	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt
<b>1</b>	804 - 1-Cr	2.8651	2.9165	2.5241	1.7624	1.6642
	804 - 2-Cd	2.6134	2.8952	2.5542	2.0084	1.9641
	804 - 3-Pb	3.0123	2.7851	2.4851	2.0431	1.8741
<b>2</b>	804 - 4-Cr	2.8541	2.9065	2.5112	1.7541	1.6531
	804 - 5-Cd	2.6083	2.8841	2.5431	2.0083	1.9531
	804 - 6-Pb	3.0117	2.7643	2.4751	2.0401	1.8731
<b>3</b>	804 - 7-Pb	3.012	2.7747	2.4801	2.0416	1.8736
	804 - 8-Cr	2.8596	2.9115	2.5177	1.7583	1.6587
	804 - 9-Cd	2.6109	2.8897	2.5487	2.0084	1.9586

**Anexo 34. Reducción de sulfato por la cepa 2M en presencia de distintos metales pesados**

Repetición	Tiempo (días)	0	6	10	14	18
	Muestra	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt
<b>1</b>	2M - 1-Cr	2.8751	2.9321	2.5492	1.7792	1.6731
	2M - 2-Cd	2.6112	2.9102	2.5471	2.0031	1.9763
	2M - 3-Pb	2.0781	2.8101	2.4901	2.0531	1.9053
<b>2</b>	2M - 4-Cr	2.8568	2.9102	2.5172	1.7531	1.6481
	2M - 5-Cd	2.6051	2.9006	2.5306	2.0108	1.9651
	2M - 6-Pb	2.0651	2.8051	2.5785	2.0501	1.9021
<b>3</b>	2M - 7-Pb	2.0716	2.8076	2.5343	2.0516	1.9037
	2M - 8-Cr	2.86595	2.92115	2.5332	1.76615	1.6606
	2M - 9-Cd	2.60815	2.9054	2.53885	2.00695	1.9707

**Anexo 35. Análisis de Varianza para reducción Sulfatos (gr/Lt) - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Cepa</b>	0.057451	1	0.0574513	519.34	0
<b>B: Metales pesados</b>	0.060725	2	0.0303627	274.47	0
<b>C: Días</b>	14.9873	4	3.74683	33870.08	0
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	0.141508	2	0.0707538	639.59	0
<b>AC</b>	0.385917	4	0.0964794	872.14	0
<b>BC</b>	0.929271	8	0.116159	1050.04	0
<b>ABC</b>	0.750601	8	0.0938252	848.15	0
<b>RESIDUOS</b>	0.006637	60	0.00011062		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	17.3194	89			

**Anexo 36. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para reducción Sulfatos (gr/Lt) con intervalos de confianza del 95.0%**

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
<b>MEDIA GLOBAL</b>	90	2.36833			
<b>Cepa</b>					
<b>2M</b>	45	2.34306	0.0015679	2.33992	2.3462
<b>804</b>	45	2.39359	0.0015679	2.39045	2.39673
<b>Metales pesados</b>					
<b>1-Cr</b>	30	2.34528	0.00192027	2.34143	2.34912
<b>2-Cd</b>	30	2.40462	0.00192027	2.40078	2.40846
<b>3-Pb</b>	30	2.35508	0.00192027	2.35124	2.35892
<b>Días</b>					
<b>0</b>	18	2.67136	0.00247906	2.6664	2.67632
<b>6</b>	18	2.86834	0.00247906	2.86338	2.87329
<b>10</b>	18	2.52546	0.00247906	2.52051	2.53042
<b>14</b>	18	1.93882	0.00247906	1.93386	1.94378
<b>18</b>	18	1.83764	0.00247906	1.83269	1.8426
<b>Cepa por Metales pesados</b>					
<b>2M,1-Cr</b>	15	2.34941	0.00271568	2.34398	2.35484
<b>2M,2-Cd</b>	15	2.40601	0.00271568	2.40058	2.41144
<b>2M,3-Pb</b>	15	2.27376	0.00271568	2.26833	2.27919
<b>804,1-Cr</b>	15	2.34114	0.00271568	2.33571	2.34657
<b>804,2-Cd</b>	15	2.40323	0.00271568	2.3978	2.40867
<b>804,3-Pb</b>	15	2.4364	0.00271568	2.43097	2.44183

<b>Cepa por días</b>					
<b>2M,0</b>	9	2.51523	0.00350593	2.50822	2.52225
<b>2M,6</b>	9	2.87805	0.00350593	2.87104	2.88506
<b>2M,10</b>	9	2.53545	0.00350593	2.52844	2.54246
<b>2M,14</b>	9	1.94157	0.00350593	1.93455	1.94858
<b>2M,18</b>	9	1.845	0.00350593	1.83799	1.85201
<b>804,0</b>	9	2.82749	0.00350593	2.82048	2.8345
<b>804,6</b>	9	2.85862	0.00350593	2.85161	2.86564
<b>804,10</b>	9	2.51548	0.00350593	2.50846	2.52249
<b>804,14</b>	9	1.93608	0.00350593	1.92906	1.94309
<b>804,18</b>	9	1.83029	0.00350593	1.82328	1.8373
<b>Metales pesados por Días</b>					
<b>1-Cr,0</b>	6	2.86277	0.00429386	2.85419	2.87136
<b>1-Cr,6</b>	6	2.91633	0.00429386	2.90774	2.92491
<b>1-Cr,10</b>	6	2.52543	0.00429386	2.51684	2.53402
<b>1-Cr,14</b>	6	1.76221	0.00429386	1.75362	1.7708
<b>1-Cr,18</b>	6	1.65963	0.00429386	1.65104	1.66822
<b>2-Cd,0</b>	6	2.60951	0.00429386	2.60092	2.6181
<b>2-Cd,6</b>	6	2.89753	0.00429386	2.88894	2.90612
<b>2-Cd,10</b>	6	2.54376	0.00429386	2.53517	2.55235
<b>2-Cd,14</b>	6	2.00766	0.00429386	1.99907	2.01625
<b>2-Cd,18</b>	6	1.96465	0.00429386	1.95606	1.97324
<b>3-Pb,0</b>	6	2.5418	0.00429386	2.53321	2.55039
<b>3-Pb,6</b>	6	2.79115	0.00429386	2.78256	2.79974
<b>3-Pb,10</b>	6	2.5072	0.00429386	2.49861	2.51579
<b>3-Pb,14</b>	6	2.0466	0.00429386	2.03801	2.05519
<b>3-Pb,18</b>	6	1.88865	0.00429386	1.88006	1.89724

**Anexo 37. Producción de ácido láctico por el consorcio bacteriano en el tratamiento del relave minero en bioreactor**

Tiempo (días)	0	5	10	15	20
Repetición	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)
<b>1</b>	0.6525	1.35	1.35	1.4531	1.6382
<b>2</b>	0.6341	1.302	1.391	1.4287	1.6831
<b>3</b>	0.6433	1.326	1.3705	1.4409	1.6606

**Anexo 38. Tabla ANOVA para Acido Láctico (gr/Lt) por Días en el tratamiento de relave minero**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>Entre grupos</b>	1.75837	4	0.439591	1267.76	0
<b>Intra grupos</b>	0.003467	10	0.00034675		
<b>Total (Corr.)</b>	1.76183	14			

**Anexo 39. Producción de ácido láctico por la cepa 804 en el tratamiento del relave minero en bioreactor**

Tiempo (días)	0	5	10	15	20
<b>Repetición</b>	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)
<b>1</b>	0.72	1.125	1.17	1.352	1.434
<b>2</b>	0.68	1.156	1.158	1.327	1.453
<b>3</b>	0.7	1.1405	1.164	1.3395	1.4435

**Anexo 40. Producción de ácido láctico por la cepa 2M en el tratamiento del relave minero en bioreactor**

Tiempo (días)	0	5	10	15	20
<b>Repetición</b>	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)	Ácido láctico (g/Lt)
<b>1</b>	0.855	0.945	1.0125	1.259	1.372
<b>2</b>	0.875	1.003	1.124	1.287	1.421
<b>3</b>	0.865	0.974	1.06825	1.273	1.3965

**Anexo 41. Análisis de Varianza para Ácido láctico (g/Lt) 1 - Suma de Cuadrados**

**Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Cepas</b>	0.013325	1	0.0133247	23.1	0.0001
<b>B: Días</b>	1.44719	4	0.361798	627.24	0
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	0.092795	4	0.0231988	40.22	0
<b>RESIDUOS</b>	0.011536	20	0.00057681		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	1.56485	29			

**Anexo 42. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Acido láctico (gr/Lt) 1 con intervalos de confianza del 95.0%**

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Limite Superior
<b>MEDIA GLOBAL</b>	30	1.13643			
<b>Cepas</b>					
<b>2M</b>	15	1.11535	0.00620111	1.10241	1.12829
<b>804</b>	15	1.1575	0.00620111	1.14456	1.17044
<b>Días</b>					
<b>0</b>	6	0.7825	0.00980481	0.762047	0.802953
<b>10</b>	6	1.11612	0.00980481	1.09567	1.13658
<b>15</b>	6	1.30625	0.00980481	1.2858	1.3267
<b>20</b>	6	1.42	0.00980481	1.39955	1.44045
<b>5</b>	6	1.05725	0.00980481	1.0368	1.0777
<b>Cepas por Días</b>					
<b>2M,0</b>	3	0.865	0.0138661	0.836076	0.893924
<b>2M,10</b>	3	1.06825	0.0138661	1.03933	1.09717
<b>2M,15</b>	3	1.273	0.0138661	1.24408	1.30192
<b>2M,20</b>	3	1.3965	0.0138661	1.36758	1.42542
<b>2M,5</b>	3	0.974	0.0138661	0.945076	1.00292
<b>804,0</b>	3	0.7	0.0138661	0.671076	0.728924
<b>804,10</b>	3	1.164	0.0138661	1.13508	1.19292
<b>804,15</b>	3	1.3395	0.0138661	1.31058	1.36842
<b>804,20</b>	3	1.4435	0.0138661	1.41458	1.47242
<b>804,5</b>	3	1.1405	0.0138661	1.11158	1.16942

**Anexo 43. Reducción de sulfato por el consorcio bacteriano en el tratamiento del relave minero en biorreactor**

Tiempo (días)	0	5	10	15	20
Repetición	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt
<b>1</b>	2.8431	1.7951	0.7743	0.9561	0.8512
<b>2</b>	2.8357	1.7851	0.7531	0.9312	0.8341
<b>3</b>	2.8394	1.7901	0.7637	0.94365	0.84265

**Anexo 44. Tabla ANOVA para Reducción Sulfato (g/Lt) 1 por Día**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>Entre grupos</b>	9.42414	4	2.35603	31069.53	0
<b>Intra grupos</b>	0.000758	10	7.5831E-05		
<b>Total (Corr.)</b>	9.42489	14			

**Anexo 45. Reducción de sulfato por la cepa 804 en el tratamiento del relave minero en bioreactor**

Tiempo (días)	0	5	10	15	20
Repetición	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt
<b>1</b>	2.8631	1.9412	1.0053	0.9491	0.9152
<b>2</b>	2.8493	1.9161	1.0132	0.9281	0.9241
<b>3</b>	2.8562	1.92865	1.00925	0.9386	0.91965

**Anexo 46. Reducción de sulfato por la cepa 2M en el tratamiento del relave minero en biorreactor**

Tiempo (días)	0	5	10	15	20
Repetición	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ] g/Lt
<b>1</b>	2.8572	1.7132	1.1521	1.2431	1.0613
<b>2</b>	2.8392	1.7052	1.1371	1.2151	1.0431
<b>3</b>	2.8482	1.7092	1.1446	1.2291	1.0522

**Anexo 47. Análisis de Varianza para Reducción Sulfato - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Cepa</b>	0.032858	1	0.0328584	419.74	0
<b>B: Día</b>	15.1584	4	3.7896	48409.17	0
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	0.219894	4	0.0549735	702.24	0
<b>RESIDUOS</b>	0.001566	20	7.8283E-05		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	15.4127	29			

**Anexo 48. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Reducción Sulfatos con intervalos de confianza del 95.0%**

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Limite Superior
<b>MEDIA GLOBAL</b>	30	1.56357			
<b>Cepa</b>					
<b>2M</b>	15	1.59666	0.00228448	1.59189	1.60143
<b>804</b>	15	1.53047	0.00228448	1.5257	1.53524
<b>Día</b>					
<b>0</b>	6	2.8522	0.00361208	2.84467	2.85973
<b>5</b>	6	1.81893	0.00361208	1.81139	1.82646
<b>10</b>	6	1.07692	0.00361208	1.06939	1.08446
<b>15</b>	6	1.08385	0.00361208	1.07632	1.09138
<b>20</b>	6	0.985925	0.00361208	0.97839	0.99346
<b>Cepa por día</b>					
<b>2M,0</b>	3	2.8482	0.00510825	2.83754	2.85886
<b>2M,5</b>	3	1.7092	0.00510825	1.69854	1.71986
<b>2M,10</b>	3	1.1446	0.00510825	1.13394	1.15526
<b>2M,15</b>	3	1.2291	0.00510825	1.21844	1.23976
<b>2M,20</b>	3	1.0522	0.00510825	1.04154	1.06286
<b>804,0</b>	3	2.8562	0.00510825	2.84554	2.86686
<b>804,5</b>	3	1.92865	0.00510825	1.91799	1.93931
<b>804,10</b>	3	1.00925	0.00510825	0.998594	1.01991
<b>804,15</b>	3	0.9386	0.00510825	0.927944	0.949256
<b>804,20</b>	3	0.91965	0.00510825	0.908994	0.930306

**Anexo 49. Precipitación de los distintos metales pesados empleando el consorcio bacteriano**

Metal pesado Repetición	Cr		Cd		Pb	
	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)
<b>1</b>	0.0863	0.05424	3.9968	0.9886	11.809	5.3111
<b>2</b>	0.0859	0.05423	3.9756	0.9965	11.796	5.3087
<b>3</b>	0.0861	0.05424	3.9862	0.9926	11.8025	5.3099

**Anexo 50. Precipitación de los distintos metales pesados empleando la cepa 804**

Metal pesado Repetición	Cr		Cd		Pb	
	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)
<b>1</b>	0.0853	0.0595	3.9754	1.271	11.635	6.3877
<b>2</b>	0.0848	0.0593	3.9686	1.2707	11.593	6.3874
<b>3</b>	0.0851	0.0594	3.972	1.2708	11.614	6.3876

**Anexo 51. Precipitación de los distintos metales pesados empleando la cepa 2M**

Metal pesado Repetición	Cr		Cd		Pb	
	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)
<b>1</b>	0.0855	0.0471	3.9643	0.6729	11.583	4.8686
<b>2</b>	0.0859	0.0466	3.9531	0.6725	11.601	4.8673
<b>3</b>	0.0857	0.04685	3.9587	0.6727	11.592	4.8680

**Anexo 52. Precipitación de metales pesados analizados empleando el consorcio bacteriano en el tratamiento del relave minero en biorreactor**

Metal pesado Repetición	Cu		Cd		Cr		Pb	
	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)
<b>1</b>	0.0161	0.002	0.0023	0.0005	0.0232	0.0138	0.0056	0.0022
<b>2</b>	0.0158	0.0021	0.0021	0.00048	0.0227	0.01378	0.0053	0.0023
<b>3</b>	0.016	0.00205	0.0022	0.00049	0.023	0.01379	0.0055	0.0023

**Anexo 53. Precipitación de metales pesados analizados empleando la cepa 804 en el tratamiento del relave minero en biorreactor**

Metal pesado	Cu		Cd		Cr		Pb	
	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)
<b>1</b>	0.0158	0.0029	0.0025	0.0006	0.0205	0.0133	0.0059	0.0027
<b>2</b>	0.0147	0.003	0.0023	0.0007	0.0201	0.0134	0.0057	0.0028
<b>3</b>	0.0153	0.003	0.0024	0.0006	0.0203	0.0134	0.0058	0.0028

**Anexo 54. Precipitación de metales pesados analizados empleando la cepa 2M en el tratamiento del relave minero en biorreactor**

Metal pesado	Cu		Cd		Cr		Pb	
	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)
<b>1</b>	0.0148	0.0009	0.0024	0.0004	0.0201	0.0113	0.0057	0.0019
<b>2</b>	0.0152	0.0008	0.0025	0.00038	0.0204	0.0114	0.0055	0.0021
<b>3</b>	0.0150	0.0008	0.0024	0.00039	0.0203	0.0114	0.0056	0.002

**Anexo 55. Análisis de Varianza para Concentración de metales pesados (ppm) -  
Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Metales pesados</b>	229.339	2	114.67	4006003.92	0
<b>B: Medición</b>	45.2984	1	45.2984	1582505.56	0
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	31.3793	2	15.6897	548120.78	0
<b>RESIDUOS</b>	0.00034349	12	2.8624E-05		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	306.017	17			

**Anexo 56. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Concentración de metales pesados (ppm) con intervalos de confianza del 95.0%**

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Limite Superior
<b>MEDIA GLOBAL</b>	18	3.70523			
<b>Metales Pesados</b>					
<b>Cd</b>	6	2.48938	0.0021842	2.48462	2.49414
<b>Cr</b>	6	0.0701683	0.0021842	0.0654094	0.0749273
<b>Pb</b>	6	8.55613	0.0021842	8.55137	8.56089
<b>Medición</b>					
<b>Final</b>	9	2.11886	0.00178339	2.11497	2.12274
<b>inicial</b>	9	5.2916	0.00178339	5.28771	5.29549
<b>Metales Pesados por Medición</b>					
<b>Cd, Final</b>	3	0.992567	0.00308893	0.985836	0.999297
<b>Cd, inicial</b>	3	3.9862	0.00308893	3.97947	3.99293
<b>Cr, Final</b>	3	0.0542367	0.00308893	0.0475065	0.0609669
<b>Cr, inicial</b>	3	0.0861	0.00308893	0.0793698	0.0928302
<b>Pb, Final</b>	3	5.30977	0.00308893	5.30304	5.3165
<b>Pb, inicial</b>	3	11.8025	0.00308893	11.7958	11.8092

**Anexo 57. Análisis de Varianza para concentración de metales pesados (ppm) -  
Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Cepas</b>	2.26621	1	2.26621	2298456.29	0
<b>B: Metales pesados</b>	107.188	2	53.5939	54356385.3	0
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	1.73205	2	0.866027	878348.17	0
<b>RESIDUOS</b>	1.18317E-05	12	9.86E-07		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	111.186	17			

**Anexo 58. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para concentración de metales pesados (ppm) con intervalos de confianza del 95.0%**

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
<b>MEDIA GLOBAL</b>	18	2.21778			
<b>Cepa</b>					
<b>2M</b>	9	1.86295	0.000330987	1.86223	1.86367
<b>804</b>	9	2.5726	0.000330987	2.57188	2.57332
<b>Metales pesados</b>					
<b>Cd</b>	6	0.972433	0.000405375	0.97155	0.973317
<b>Cr</b>	6	0.053125	0.000405375	0.0522418	0.0540082
<b>Pb</b>	6	5.62777	0.000405375	5.62688	5.62865
<b>Cepa por Metales pesados</b>					
<b>2M, Cd</b>	3	0.674033	0.000573286	0.672784	0.675282
<b>2M, Cr</b>	3	0.04685	0.000573286	0.0456009	0.0480991
<b>2M, Pb</b>	3	4.86797	0.000573286	4.86672	4.86922
<b>804, Cd</b>	3	1.27083	0.000573286	1.26958	1.27208
<b>804, Cr</b>	3	0.0594	0.000573286	0.0581509	0.0606491
<b>804, Pb</b>	3	6.38757	0.000573286	6.38632	6.38882

**Anexo 59. Análisis de Varianza para Concentración - Suma de Cuadrados Tipo III en biorreactor**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor -P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Metales Pesados</b>	0.00102006	3	0.000340021	21582.93	0
<b>B: Medición</b>	0.00029407	1	0.00029407	18666.17	0
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	0.0001425	3	4.75011E-05	3015.15	0
<b>RESIDUOS</b>	2.52E-07	16	1.58E-08		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	0.00145689	23			

**Anexo 60. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Concentración con intervalos de confianza del 95.0% en bioreactor**

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Limite Superior
<b>MEDIA GLOBAL</b>	24	0.00814958			
<b>Metales Pesados</b>					
<b>Cd</b>	6	0.001345	5.12415E-05	0.00123637	0.00145363
<b>Cr</b>	6	0.0183783	5.12415E-05	0.0182697	0.018487
<b>Cu</b>	6	0.00900833	5.12415E-05	0.00889971	0.00911696
<b>Pb</b>	6	0.00386667	5.12415E-05	0.00375804	0.00397529
<b>Medición</b>					
<b>Final</b>	12	0.00464917	3.62332E-05	0.00457236	0.00472598
<b>inicial</b>	12	0.01165	3.62332E-05	0.0115732	0.0117268
<b>Metales Pesados por Medición</b>					
<b>Cd, Final</b>	3	0.00049	7.24665E-05	0.00033637 8	0.00064362 2
<b>Cd, inicial</b>	3	0.0022	7.24665E-05	0.00204638	0.00235362
<b>Cr, Final</b>	3	0.01379	7.24665E-05	0.0136364	0.0139436
<b>Cr, inicial</b>	3	0.0229667	7.24665E-05	0.022813	0.0231203
<b>Cu, Final</b>	3	0.00205	7.24665E-05	0.00189638	0.00220362
<b>Cu, inicial</b>	3	0.0159667	7.24665E-05	0.015813	0.0161203
<b>Pb, Final</b>	3	0.00226667	7.24665E-05	0.00211304	0.00242029
<b>Pb, inicial</b>	3	0.00546667	7.24665E-05	0.00531304	0.00562029

**Anexo 61. Análisis de Varianza para concentración (ppm) por cepa en bioreactor  
- Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Cepa</b>	3.83598E-05	1	3.83598E-05	2.72	0.109
<b>B: Metales Pesados</b>	0.00161852	3	0.000539506	38.23	0
<b>C: Medición</b>	0.000363825	1	0.000363825	25.78	0
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	5.77715E-05	3	1.92572E-05	1.36	0.2712
<b>AC</b>	3.35838E-05	1	3.35838E-05	2.38	0.1328
<b>BC</b>	0.000105002	3	3.50006E-05	2.48	0.0789
<b>ABC</b>	5.34618E-05	3	1.78206E-05	1.26	0.3037
<b>RESIDUOS</b>	0.000451604	32	1.41126E-05		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	0.00272213	47			

**Anexo 62. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para concentración (ppm)  
con intervalos de confianza del 95.0% en bioreactor**

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
<b>MEDIA GLOBAL</b>	48	0.00813104			
<b>Cepa</b>					
<b>2M</b>	24	0.00723708	0.000766829	0.0056751	0.00879907
<b>804</b>	24	0.009025	0.000766829	0.00746302	0.010587
<b>Metales Pesados</b>					
<b>Cd</b>	12	0.00146417	0.00108446	-0.00074481	0.00367314
<b>Cr</b>	12	0.016325	0.00108446	0.014116	0.018534
<b>Cu</b>	12	0.0106933	0.00108446	0.00848436	0.0129023
<b>Pb</b>	12	0.00404167	0.00108446	0.00183269	0.00625064
<b>Medición</b>					
<b>Final</b>	24	0.00537792	0.000766829	0.00381593	0.0069399
<b>Inicial</b>	24	0.0108842	0.000766829	0.00932218	0.0124461

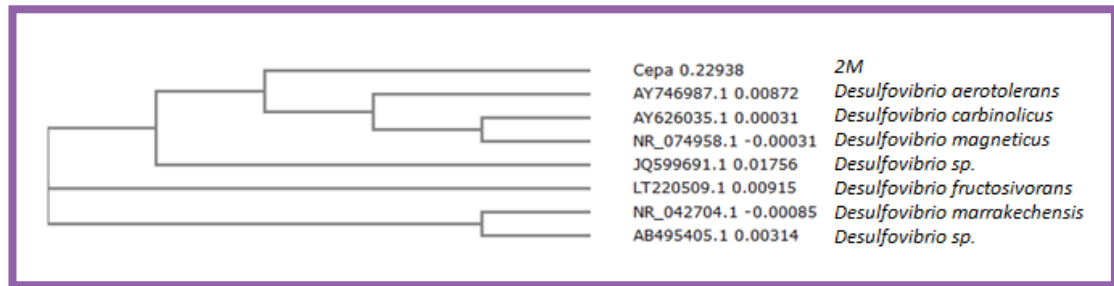
<b>Cepa por Metales Pesados</b>					
<b>2M, Cd</b>	6	0.00141167	0.00153366	-0.0017123	0.00453563
<b>2M, Cr</b>	6	0.0158167	0.00153366	0.0126927	0.0189406
<b>2M, Cu</b>	6	0.00792	0.00153366	0.00479604	0.011044
<b>2M, Pb</b>	6	0.0038	0.00153366	0.000676035	0.00692396
<b>804, Cd</b>	6	0.00151667	0.00153366	-0.0016073	0.00464063
<b>804, Cr</b>	6	0.0168333	0.00153366	0.0137094	0.0199573
<b>804, Cu</b>	6	0.0134667	0.00153366	0.0103427	0.0165906
<b>804, Pb</b>	6	0.00428333	0.00153366	0.00115937	0.0074073
<b>Cepa por medición</b>					
<b>2M, Final</b>	12	0.0036475	0.00108446	0.00143852	0.00585648
<b>2M, Inicial</b>	12	0.0108267	0.00108446	0.00861769	0.0130356
<b>804, Final</b>	12	0.00710833	0.00108446	0.00489936	0.00931731
<b>804, Inicial</b>	12	0.0109417	0.00108446	0.00873269	0.0131506
<b>Metales Pesados por medición</b>					
<b>Cd, Final</b>	6	0.000511667	0.00153366	-0.0026123	0.00363563
<b>Cd, Inicial</b>	6	0.00241667	0.00153366	-0.000707298	0.00554063
<b>Cr, Final</b>	6	0.0123667	0.00153366	0.0092427	0.0154906
<b>Cr, Inicial</b>	6	0.0202833	0.00153366	0.0171594	0.0234073
<b>Cu, Final</b>	6	0.00625	0.00153366	0.00312604	0.00937396
<b>Cu, Inicial</b>	6	0.0151367	0.00153366	0.0120127	0.0182606
<b>Pb, Final</b>	6	0.00238333	0.00153366	-0.000740631	0.0055073
<b>Pb, Inicial</b>	6	0.0057	0.00153366	0.00257604	0.00882396

### Anexo 63. Secuencia del gen 16S RNAr de la cepa 2M

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGTGGCGTGC TTAACACATG  
CAAGTCGAGCGAGAAAGCTCCTTCGGGAGTGAGTAGAGCGGCGCACGGG  
TGAGTAACGCGTGGATGATCTACCCAGATGATCGGGATAACAGTTGGAA  
ACGACTGCTAATACCGGATACGCTCCCATTTCGAACTGGGGGGCGCACGT  
AGGCTGTTTGGTAAGTCAGGGGTGAAATCCC GCGGCTCAACCGCGGAAT  
TGCCCTTGATACTGCTGGACTTGAGTTCGGGAGAGGGTGGCGGAATTCCA  
GGTGTAGGAGTGAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAG  
GCGGCCACCTGGACCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGC  
AAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGGATGAAG  
GGAAGAAACGCGCCATTTCAAATAGGCTTGCGTCTGACGGTACCTTCAG

AGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT  
GCGAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTACGTAGGCCGGCGTG  
TCAAGTCAGGTGTGAAAGCCCTCGGCTCAACCGGGGAATTGCACTTGAA  
ACTGATATGCTAGAGTTCTGGAGGGGGTAGCGGAATTCCCGGTGTAGGA  
GTGAAATCCGTAGATATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACC  
TGGACAGTAACTGA

**Anexo 64. Árbol filogenético de la cepa 2M en comparación con otras especies**



**Anexo 65. Secuencia del gen 16S RNAr de la cepa 804**

TGCTTAACACATGCAAGTCGTGCGAGAAAGTTTCCTTCGGGAGATGAGTA  
GAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAATCTACCCGACAGATCGG  
GATAACAGGCGGAAACGCCTGCTAATACCGGATACGCTTCGTATTTAACT  
TTACGGGGGAAAGGTGGCCTCTACATGTAAGCTACCACTGTCGGATGGG  
CCCGCGTCTCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGA  
TGAGTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAAACACG  
GCCGTAGGAGTGAAATCCGTAGATATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAG  
GCGGCCACCTGGACCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTTCGT  
AAACCGCTGTCAGGAGGGAAGAAACCATTAGAGTTCGAATAGGCTCTTTT  
GCTGACGGTACCTCCAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC  
GCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAG  
CGTGCGTAGGCGGCGCAGTAAGTCAGGGGTGAAAGCCCTCGGCTCAACC  
GAGGAATTGCCTCTGATACTGCTGTGCTTGAGGCTTGAGAGGCAGGCG  
GAATCCAGGTGTAGGAGTGAAATCCGTAGATATC

**Anexo 66. Árbol filogenético de la cepa 804 en comparación con otras especies**

