



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

APLICACIÓN DE DIFERENTES PROPORCIONES DE DONADORES DE ELECTRONES Y SULFATO PARA LA PRECIPITACIÓN DE METALES PRODUCIDA POR CONSORCIOS MICROBIANOS SULFIDOGÉNICOS AUTÓCTONOS DE SEDIMENTOS DE UN DRENAJE ÁCIDO DE MINA DE HUALGAYOC, CAJAMARCA

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

Bach. IDELSO JAMÍN CHÁVEZ CRUZ

ASESOR

Mblgo. LUIS FELIPE VALDEZ NUÑEZ

CAJAMARCA – PERÚ

2024



CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador: **Idelso Jamín Chávez Cruz**
DNI: **71403312**
Escuela Profesional/Unidad UNC: **ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**
2. Asesor: **Mblgo. LUIS FELIPE VALDEZ NUÑEZ**
Facultad/Unidad UNC: **FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**
3. Grado académico o título profesional al que accede:
 Bachiller Título profesional Segunda especialidad
 Maestro Doctor
4. Tipo de Investigación:
 Tesis Trabajo de investigación Trabajo de suficiencia profesional
 Trabajo académico
5. Título de Trabajo de Investigación: **APLICACIÓN DE DIFERENTES PROPORCIONES DE DONADORES DE ELECTRONES Y SULFATO PARA LA PRECIPITACIÓN DE METALES PRODUCIDA POR CONSORCIOS MICROBIANOS SULFIDOGÉNICOS AUTÓCTONOS DE SEDIMENTOS DE UN DRENAJE ÁCIDO DE MINA DE HUALGAYOC, CAJAMARCA**
6. Fecha de evaluación del Software antiplagio: **5/11/2024**
7. Software antiplagio: **TURNITIN** **URKUND (ORIGINAL) (*)**
8. Porcentaje de Informe de Similitud: **10%**
9. Código Documento: **oid:3117:402353446**
10. Resultado de la Evaluación de Similitud:
 APROBADO **PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO**

Cajamarca, 6 de noviembre del 2024



* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

Copyright©

Chávez Cruz Idelso Jamín

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Chávez, I. 2024. Aplicación de diferentes proporciones de donadores de electrones y sulfato para la precipitación de metales producida por consorcios microbianos sulfidogénicos autóctonos de sedimentos de un drenaje ácido de mina de Hualgayoc, Cajamarca/ Chávez Cruz Idelso Jamín.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Luis Felipe Valdez Nuñez

Disertación Académica para optar el Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo UNC-
2024

Aplicación de diferentes proporciones de donadores de electrones y sulfato para la precipitación de metales producida por consorcios microbianos sulfidogénicos autóctonos de sedimentos de un drenaje ácido de mina de Hualgayoc, Cajamarca

Autor : Bach. Chávez Cruz Idelso Jamín

Asesor : Mblgo. Valdez Nuñez Luis Felipe

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



PRESIDENTE

Dr. Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos



SECRETARIO(A)

Blgo. Arturo Ulises Díaz Aliaga



VOCAL

MCs. Nestor Estuardo Carbajal Caballero

Cajamarca, 2024 - Perú



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 3:15 pm del 31 de octubre del 2024, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 11-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: Aplicación de diferentes concentraciones de donadores de electrones y sulfato para la precipitación de metales producida por consorcios microbianos sulfidogénicos autóctonos de sedimentos de un drenaje ácido de mina de Hualgayoc, del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas: Cajamarca.

Idelso Jamín Chávez Cruz

Siendo las 4:20 pm del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: EXCELENTE, con el calificativo de 19, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra APTO para la obtención del Título Profesional de: BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO.

Table with 2 columns: Miembros Jurado Evaluador (Nombres y Apellidos) and Firma. Rows include Presidente (Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos), Secretario(a) (Arturo Ulises Díaz Aliaga), Vocal (Néstor Estuardo Carbajal Ceballero), Accesitaria, Asesor (a) (Luis Felipe Valdez Nuñez), and Asesor (a).

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

MUY BUENO (17-18)

BUENO (14-16)

REGULAR (12-13)

REGULAR BAJO (11)

DESAPROBADO (10 a menos)

Para:

Mamá, que me acompaña siempre desde el etéreo firmamento; para papá, que nunca soltó mi mano hasta que pude andar solo; para mis hermanos, que fueron un pilar incondicional en este arduo periplo; y para mi amada abuelita Paula, a la cual ya no le alcanzó la vida para contemplar este logro final.

"Hemos probado el poder y sabemos que el mundo ya no será el mismo"
- J. Robert Oppenheimer

Agradecimientos

A Dios, por ser fuente de inagotable sabiduría y por su providencia celestial que ha iluminado mi camino, permitiendo alcanzar este anhelado objetivo.

A mis profesores universitarios, del colegio y escuela, en especial a aquellos que me dieron todas las pautas científicas y morales para emprender proyectos como este y otros aún más grandes. A aquellos que me tendieron la mano cuando más lo necesité, aquellos que me dieron consejos de vida e impulsaron mis capacidades. Sepan que, los llevaré por siempre en el corazón.

A mi asesor, el profesor Luis Felipe Valdez Núñez, quien generosamente compartió conmigo su vasto conocimiento y valiosas experiencias científicas. Gracias a su orientación, amistad y apoyo, este objetivo ha sido completado, abriéndome las puertas a nuevas oportunidades.

A los investigadores del Laboratorio de Geomicrobiología, de la Universidad de Tübingen - Alemania, que hicieron posibles los estudios más complejos de este proyecto de investigación.

Al Dr. Iván Ñancucheo, líder del laboratorio de Biominería y Microbiología de Extremófilos, de la Universidad San Sebastián - Chile, por haberme permitido desarrollar la última etapa de mi tesis en su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, que en todo momento fueron apoyo moral y técnico en el desarrollo de este proyecto.

Finalmente se agradece al CONCYTEC-PROCIENCIA, que en el marco del proyecto de investigación “Biorremediación de un drenaje ácido de mina sintético empleando consorcios microbianos sulfidogénicos nativos de la región Cajamarca“ N° PE501078509-2022-PROCIENCIA, financió la ejecución de esta tesis.

Tabla de contenido

TÍTULO	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO II.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes de investigación.....	3
2.2. Bases teóricas.....	8
2.2.1. Microorganismos sulfato reductores	8
2.2.3. Precipitación de metales por consorcios microbianos sulfidogénicos	17
CAPITULO III.....	26
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPOTESIS.....	26
3.1. Diseño de investigación.....	26
3.2. Material biológico	26
3.3. Localización y descripción del sitio de muestreo.....	26
3.4. Colección de muestras y análisis fisicoquímico	27
3.5. Ensayo de microcosmos para la obtención de CMS acidófilos.	28
3.6. Medición de parámetros fisicoquímicos.....	28
3.6.1. Monitoreo de pH y potencial de óxido – reducción (ORP).....	28
3.6.2. Cuantificación de sulfuros biogénicos	29
3.7. Ensayos de precipitación de metales empleando diferentes proporciones de donador de electrones y sulfato.....	29
3.7.1. Formulación y preparación de un DAMS	29
3.7.2. Configuración del experimento	30
3.7.3. Análisis geoquímico durante el ensayos de precipitación de metales.....	31
3.7.4. Análisis molecular	32
3.8. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	34
3.9. Técnicas de procesamiento y análisis de datos	34
CAPÍTULO IV	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1. RESULTADOS	35
4.1.1. Colección de muestras y análisis fisicoquímico de las muestras ambientales...35	
4.1.2. Actividad de CMS acidófilo	35
4.1.3. Ensayo de precipitación de metales de un DAMS	38

4.1.4. Cuantificación del genes	48
4.2. Discusión	50
CAPÍTULO V.....	61
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	62
LISTA DE REFERENCIAS.....	63
APÉNDICES	72

LISTA DE ABREVIACIONES

DAM	Drenaje Ácido de Mina
CMS	Consortios Microbianos Sulfidogénicos
BSR	Bacterias Sulfato Reductoras (Sulphate-Reducing Bacteria)
ORP	Potencial de Óxido-Reducción (Oxidation-Reduction Potential)
APS	Adenosina 5'-Fosfosulfato
DsrAB	Sulfito Reductasa Desasimilatoria
DAMS	Drenaje Ácido de Mina Sintético
MSM	Medio de Sales Minerales

GLOSARIO

Drenaje Ácido de Mina (DAM)

Es un flujo de agua ácido que se genera por la oxidación de minerales sulfurosos, caracterizado por un bajo pH y altas concentraciones de metales pesados y sulfatos. Este fenómeno es un problema ambiental significativo en áreas mineras (Rambabu et al., 2020).

Microcosmo

Sistema experimental que simula las condiciones ambientales de un ecosistema natural en un entorno controlado. Se utiliza para estudiar la actividad y comportamiento de microorganismos, como los involucrados en la biorremediación de drenajes ácidos de mina (Maisch et al., 2019).

Bioaumentación

Técnica de biorremediación que implica la introducción de microorganismos específicos en un ambiente contaminado para acelerar la degradación o transformación de contaminantes presentes (Gupta & Sar, 2020).

Bioestimulación

Estrategia que consiste en la adición de nutrientes o sustratos al ambiente para aumentar la actividad metabólica de los microorganismos existentes, mejorando así la biorremediación de contaminantes (Gupta & Sar, 2020).

Consortios Microbianos Sulfidogénicos (CMS)

Comunidades de microorganismos que colaboran en la reducción de sulfato a sulfuro, lo que facilita la precipitación de metales en ambientes ácidos, como los drenajes ácidos de mina (Christiane Dahl & Cornelius G. Friedrich, 2013; Ñancucho & Johnson, 2012b)

Biorremediación

Proceso que utiliza organismos vivos, principalmente microorganismos, para eliminar, neutralizar o transformar contaminantes en el medio ambiente, restaurando así las condiciones naturales (Tyagi & Kumar, 2020).

Precipitación de metales

Proceso mediante el cual los metales disueltos en una solución acuosa se transforman en formas sólidas e insolubles, facilitando su remoción del ambiente contaminado. Este proceso es crucial en la remediación de sistemas de drenaje ácido de mina (Le Pape et al., 2017).

APLICACIÓN DE DIFERENTES PROPORCIONES DE DONADORES DE
ELECTRONES Y SULFATO PARA LA PRECIPITACIÓN DE METALES
PRODUCIDA POR CONSORCIOS MICROBIANOS SULFIDOGÉNICOS
AUTÓCTONOS DE SEDIMENTOS DE UN DRENAJE ÁCIDO DE MINA DE
HUALGAYOC, CAJAMARCA

RESUMEN

Esta investigación buscó determinar la proporción óptima de donadores de electrones y sulfato para precipitar metales usando consorcios microbianos sulfidogénicos autóctonos de sedimentos de un DAM en Hualgayoc, Cajamarca. Para obtener los consorcios microbianos, se realizó un ensayo de microcosmos empleando sedimentos de DAM y un medio de sales (MSM) a pH 3.0 con glicerol y acetato (5 mM) como fuente de carbono. La precipitación de metales se evaluó en un ensayo de biorremediación de un DAM sintético (DAMS, pH 3.27) empleando las siguientes proporciones de donador de electrones y sulfato: proporción 1 [0.5 : 1], proporción 2 [1 : 1], y proporción 3 [2 : 1]. Los resultados mostraron que la proporción 1 con glicerol como donador de electrones fue óptima para la precipitación de metales, agrupados de la siguiente manera; (i) los que precipitaron al 100%, como el Zn; (ii) los que presentaron una precipitación superior al 90%, como el Fe (99.04%), As (95.67%) y Ni (92.21%); (iii) los que alcanzaron una precipitación superior al 80%, como el Al (85.24%), Cd (82.67%) y Mn (81.55%); y (iv) los que tuvieron una precipitación inferior al 80%, como el Co (74.33%) y el Mg (17.78%), además de alcanzar un pH final de 6.69. Estos resultados destacan el potencial de esta proporción para su aplicación en la biorremediación de DAM.

Palabras clave: Consorcio microbiano sulfidogénico, DAM, precipitación de metales pesados , ensayo de biorremediación, bacterias sulfato reductoras

ABSTRACT

This research aimed to determine the optimal ratio of electron donors and sulfate for precipitating metals using native sulfidogenic microbial consortia from sediments of an acid mine drainage (AMD) in Hualgayoc, Cajamarca. To obtain the microbial consortia, a microcosm assay was conducted using AMD sediments and a mineral salts medium (MSM) at pH 3.0 with glycerol and acetate (5 mM) as the carbon source. Metal precipitation was evaluated in a bioremediation assay using synthetic AMD (SAMD, pH 3.27) with the following electron donor and sulfate ratios: ratio 1 [0.67:1], ratio 2 [1:1], and ratio 3 [2:1]. The results showed that ratio 1 with glycerol as the electron donor was optimal for metal precipitation, grouped as follows: (i) those that precipitated 100%, such as Zn; (ii) those with precipitation above 90%, such as Fe (99.04%), As (95.67%), and Ni (92.21%); (iii) those that achieved precipitation above 80%, such as Al (85.24%), Cd (82.67%), and Mn (81.55%); and (iv) those with precipitation below 80%, such as Co (74.33%) and Mg (17.78%), with a final pH of 6.69. These results highlight the potential of this ratio for application in AMD bioremediation.

Keywords: Sulfidogenic microbial consortium, AMD, heavy metal precipitation, bioremediation assay, sulfate-reducing bacteria

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los DAM son generados principalmente por actividades antropogénicas, como la minería. Se caracterizan por su bajo pH (< 3.0) y altas concentraciones de metales y sulfatos, constituyendo un gran problema al ser liberados al ambiente (Rambabu et al., 2020). En Perú, particularmente en Cajamarca, estos DAM son comunes, y los métodos empleados para su tratamiento (p.e., neutralización química), suelen ser costosos y poco sostenibles. Por el contrario, los tratamientos biológicos, tales como la aplicación de bacterias sulfato reductores acidófilos (BSR), suelen ser viables debido a que se ha demostrado su capacidad para generar alcalinidad, reducir el sulfato y precipitar metales (Johnson & Hallberg, 2005). Sin embargo, la eficiencia de este tipo de tratamiento está influenciada por la proporción de donadores (fuentes de carbono) y aceptores de electrones (sulfato), lo cual necesita ser estudiado con mayor profundidad.

En procesos de sulfato reducción para el tratamiento biológico del DAM, la proporción normalmente empleada entre donador y aceptor de electrones es de 0.67:1. En experimentos con monocultivos, esta proporción atiende a una relación estequiométrica, sin embargo, en consorcios microbianos sulfidogénicos (CMS), esta misma proporción podría ser insuficiente dada la ocurrencia de diferentes especies de microorganismos. Así mismo, se desconoce si variar dicha proporción puede mejorar el proceso de sulfato reducción, así mismo, aumentar la eficiencia en el tratamiento del DAM.

El objetivo de esta investigación fue determinar la proporción óptima de donador y aceptor de electrones para promover la precipitación de metales mediante la reducción de

sulfato por CMS acidófilos autóctonos de sedimentos de un DAM localizado en Hualgayoc, Cajamarca. Se hipotetizó que las proporciones de donadores y aceptor de electrones de: (i) [0.5 : 1.0] y (ii) [1 : 1], serían óptimas para la precipitación de metales mediada por la sulfato reducción. Para verificar la hipótesis se utilizó un CMS acidófilo enriquecido a partir de sedimentos propios del DAM ubicado en Hualgayoc, Cajamarca. Se evaluó la capacidad de precipitar metales y producir alcalinidad en un DAMS que simuló las condiciones geoquímicas del DAM original. Se encontró que la proporción 1 es óptima para la precipitación de metales. Esta investigación ha logrado determinar la proporción de donador y aceptor de electrones óptima para favorecer la precipitación de metales mediante la aplicación de CMS acidófilos, estos hallazgos pueden ser aplicados en futuras investigaciones que busquen la biorremediación *in situ* o *ex situ* de un DAM.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de investigación

En el año 2022, con el objetivo de determinar la composición microbiana de sedimentos de DAM de tres túneles de mina de Hualgayoc, Cajamarca, se realizaron ensayos de microcosmos para describir la actividad metabólica de bacterias sulfato reductoras acidófilas (BSR) presentes en los sedimentos muestreados. Empleando microcosmos, se evaluó la reducción de sulfato a bajo pH y se encontró que el hidrógeno fue el donador de electrones más favorable. En estos microcosmos los géneros bacterianos más abundantes fueron *Desulfosporosinus* y *Desulfovibrio*, concluyendo que su investigación amplía los filos detectados en ambientes de DAM y contribuye a la comprensión de las BSR acidófilas y puede aplicarse en técnicas de biorremediación (Valdez-Nuñez et al., 2022).

En el año 2022, con el objetivo de evaluar la efectividad de la enmienda con glicerol en la estimulación de la biosulfidogénesis en ambientes afectados DAM, se realizaron experimentos de columnas Winogradsky utilizando sedimentos y aguas naturales de diferentes sitios afectados por DAM (Rio Tintillo y laguna eutrófica Brunita en Huelva y Murcia - España). Este estudio empleó una concentración de 18 mM de glicerol y columnas de Winogradsky control, monitoreando parámetros fisicoquímicos durante 18 meses de incubación en oscuridad. Se encontró que las columnas que habían sido inoculadas con glicerol desencadenaron la producción de sulfuro (biosulfidogénesis), con incremento de pH (de 2.8 hasta 6.1, en 3 meses) y precipitación de Cu, Zn, As y Cd. Concluyeron que el glicerol favorece la biosulfidogénesis por parte de las bacterias

sulfato reductoras (BSR) autóctonas de sedimentos de DAM, disminuyendo la concentración de metales tóxicos y elevando el pH en el sistema (Ilin et al., 2022).

En el año 2022, con el objetivo de caracterizar una nueva especie de bacterias sulfato reductoras moderadamente acidofílicas, llevaron a cabo un estudio utilizando cultivos enriquecidos con sedimentos ácidos del río Tinto en España. El diseño del estudio incluyó la incubación en biorreactores controlados a pH 3.9 y pH 5.0 para evaluar el crecimiento y la capacidad de oxidación completa de ácidos orgánicos, específicamente del acetato. Encontraron que la especie identificada, denominada *Acididesulfobacillus acetoxydans* gen. nov. sp. nov., no solo crecía en condiciones de bajo pH, sino que también era capaz de oxidar completamente el acetato a CO₂, un mecanismo de resistencia al estrés ácido que no es común entre otras bacterias sulfato reductoras acidofílicas. Concluyeron que *A. acetoxydans* tiene un alto potencial para ser utilizada en la biorremediación de ambientes contaminados por drenaje ácido de mina debido a su capacidad para neutralizar la acidez y precipitar metales a través de la biosulfidogénesis, sin embargo, se necesitarían estudios adicionales para comprender mejor su aplicabilidad en condiciones naturales (Andrade et al., 2013).

En el año 2021, con la finalidad de tratar un DAM sintético, se utilizaron biorreactores de lecho estructurado de flujo descendente, evaluando el incremento del pH, reducción de sulfato y precipitación de metales. El DAM sintético fue enriquecido gradualmente con Co, Cu, Fe, Ni, Mn y Zn, para favorecer la adaptación de la población microbiana, utilizando la vinaza de caña como donador de electrones para el inóculo de biomasa sulfidogénica. Se determinó una eficiencia del 55 % y 91 % para la reducción sulfato, remoción de Co y Ni superior al 80 %, y una remoción media del 70 % del Fe, 80 % del Zn, 73 % del cobre y 60% del Mn. Se concluyó que la reducción del sulfato favorece la

formación de sulfuros metálicos, los cuales reducen la toxicidad del DAM, y un incremento del pH hasta 7.5 (Nogueira et al., 2021).

En el año 2020, a partir de una muestra de sedimento de drenaje ácido de la mina Qibaoshan, China, se enriqueció un consorcio bacteriano eficiente para la biorremediación de DAM, el cual fue cultivado en un DAM sintético, compuesto por 20 mL de inóculo, 0,1 g/L de peptona, 0,1 g/L de glucosa y se simularon las condiciones de la composición *in vivo* del DAM. El análisis de comunidades microbianas reportó que los géneros bacterianos dominantes fueron *Flavocaterium*, *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas* y *Thermomonas*, y se encontró que alcanzaron eficiencias de remoción de hasta un 99.8 % y 98.9 % para el hierro y manganeso, respectivamente, durante la fase logarítmica y estacionaria de su curva de crecimiento. Al final del ensayo también se encontró un incremento del pH de 4.3 hasta 7.2, concluyendo que los consorcios microbianos tienden a adaptarse a los cambios fisicoquímicos, para seguir con la reducción del sulfato (Hou et al., 2020).

En el año 2020, con el objetivo de caracterizar la fisiología de un consorcio microbiano, se desarrolló una estrategia de biorremediación de ambientes impactados por DAM, a través del método de microcosmos, sobre el cual se aplicó técnicas de bioaumentación con bacterias *Clostridiales* y *Bacillales* capaces de reducir el Fe^{3+} y sulfato, y técnicas de bioestimulación con celulosa, encontrando una reducción del sulfato en un 97 % y un aumento del pH hasta 7.5, concluyendo que la bioaumentación y bioestimulación son estrategias exitosas para reducir la concentración de SO_4^{2-} y metales disueltos, además de elevar el pH de un DAM (Gupta & Sar, 2020).

En el año 2017, con el objetivo de eliminar el arsénico y zinc de un DAM en Francia, se experimentó con un consorcio bacteriano sulfidogénico (consorcio BSR), obtenido a

partir de sedimentos superficiales de un DAM, se incubó el consorcio BSR por triplicado en botellas de 1 L que contenían 440 mL de agua de DAM filtrada, suplementada con 0.5 g/L de glicerol, NH_4Cl y K_2PO_4 , a un pH de 4.0, monitoreando periódicamente actividad microbiana y las concentraciones de As, Zn y Fe por 94 días. Se encontró una eliminación total de As y Zn en los medios suplementados con glicerol y tan solo una eliminación del 50 % en los medios sin glicerol, concluyendo que es posible la eliminación total de As y Zn a través de la utilización de un consorcio sulfato reductor (Le Pape et al., 2017).

En el año 2014, con el objetivo de comparar el rendimiento de un proceso biosulfidogénico utilizando lactato o glicerol como sustrato para el crecimiento de BSR, se las cultivaron en reactores de lecho fluidizado, aplicando enmiendas a diferentes concentraciones de sulfato/lactato y sulfato/glicerol. Se encontró que para asegurar una reducción del sulfato mayor al 90% la relación molar óptima de [sulfato : lactato] debe ser mínimamente de [2.52 : 1], mientras que la relación molar sulfato/glicerol debe ser de 1.96:1. Se concluyó que el lactato promueve una reacción sulfidogénica mayor a la reacción mediada por el glicerol, sin embargo, el glicerol resulta ser mucho más económico (Bertolino et al., 2014).

En el año 2014, con el objetivo de determinar la eficiencia de un consorcio de bacterias sulfato reductoras (BSR) en la producción de sulfuros para la precipitación del hierro de un drenaje ácido de mina (DAM), utilizaron un diseño experimental con biorreactores anaerobios, empleando muestras de sedimentos de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) para la elaboración de columnas de Winogradsky. Estas columnas se utilizaron para extraer inóculos que se cultivaron en medios ajustados a pH 3, 4, 5 y 6. Los consorcios BSR fueron probados en biorreactores anaerobios que contenían 100 g de papel higiénico, 200 mL de DAMs y un inóculo de consorcio BSR al 4%. Los resultados

mostraron una eficiencia del 99,63% en la producción de H₂S, lo cual permitió la precipitación del hierro. Concluyeron que los consorcios BSR obtenidos de sedimentos de una planta de tratamiento de aguas residuales tienen un alto potencial para producir H₂S y precipitar metales en un DAM (Cabrera & Orrego, 2014).

En el año 2013, con el objetivo de evaluar la eficiencia de diferentes sustratos como donadores de electrones para la producción de sulfuro biogénico, se formularon medios de cultivo compuestos principalmente por lodos y sedimentos anaeróbicos, enriquecidos con acetato, lactato, etanol y peptona como sustratos, y sulfato como aceptor de electrones. Se encontró que la relación más eficiente entre donador y aceptor de electrones para la reducción del sulfato fue de: 2.5 g/L de acetato y 4000 mg/L de sulfato, alcanzando una producción de sulfuro en un 50 %, el segundo donador de electrones más eficiente fue el lactato, concluyendo que el acetato es un buen donador de electrones con potencial para la remediación de DAM que poseen concentraciones altas de metales, SO₄²⁻ y bajo pH (Andrade et al., 2013).

En el año 2010, con el objetivo de aislar bacterias sulfato reductoras acidófilas se tomaron muestras de sedimentos de efluentes ácidos de pH 2.8-3 en el sitio minero Chessy-Lens-Mines (Francia), dichos sedimentos fueron incubados en anaerobiosis y enriquecidos con glicerol y sulfato a diferentes concentraciones para realizar pruebas de crecimiento y determinar la proporción óptima de estos factores. Encontraron una nueva bacteria sulfato reductora, con características acidófilas, perteneciente al género *Desulfosporosinus* y la familia *Peptococcaceae*, capaz de crecer a un pH óptimo de 5.2 y utilizar una proporción óptima de 10 mM de glicerol y 20 mM de sulfato, concluyendo que los sedimentos de efluentes ácidos son una fuente de microbios autóctonos con potencial para biorremediar los mismos efluentes ácidos (Alazard et al., 2010).

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Microorganismos sulfato reductores

2.2.1.1. Bacterias sulfato reductoras

Las bacterias sulfato reductoras (BSR o SRB por su acrónimo en inglés) están ampliamente distribuidas (ver Figura 1) y están presentes en suelos y sedimentos, tienen la capacidad de obtener energía reduciendo sulfato y convirtiéndolo en sulfuro, este es un producto final que atrae la atención de muchos investigadores, por su potencial en biorremediación. Las BSR pueden reducir metales tóxicos y cambiar su solubilidad, ofreciendo un método potencial para remediar ambientes contaminados. Las BSR son eficientes en la remoción de sulfato y metales pesados de aguas residuales de diferentes industrias, como la minería. Las BSR han sido estudiadas desde el siglo pasado, pero fue con la aparición de la biología molecular que empezamos a entender su forma de vida y los mecanismos moleculares que usa para cumplir su nicho ecológico (Muyzer & Stams, 2008).

Las BSR cumplen un papel fundamental en el ciclo anaeróbico del carbono, y se clasifican en dos grupos según el tipo de metabolismo que posean; las BSR oxidantes incompletas, que degradan compuestos orgánicos de forma incompleta hasta acetato y BSR oxidantes completas, capaces de oxidar o mineralizar compuestos orgánicos hasta dióxido de carbono, este último grupo tienen la capacidad de utilizar el acetato como sustrato y usan dos vías para oxidarlo, un ciclo de ácido cítrico modificado por *Desulfobacter postgatei* y la vía del acetyl-CoA, empleado por *Desulfotomaculum*, por otro lado, *Desulfococcus sp.*, *Desulfobacterium sp.* y *Desulfobacca acetoxidans* son capaces de usar ambas vías (Muyzer & Stams, 2008).

2.2.1.2. Arqueas sulfato reductoras

Estos microorganismos no han sido descritos a profundidad como las BSR, pero se conoce que tienen la capacidad de utilizar el sulfato como aceptor de electrones, las enzimas que utilizan para reducir el sulfato tienen una alta identidad genética y estructural con las empleadas por las BSR.

El metabolismo sulfidogénico compartido por bacterias y arqueas ha dilucidado la antigüedad y evolución de este metabolismo, en su mayoría se encuentran en ambientes termales comportándose como aerobios dentro de consorcios microbianos sulfidogénicos. Entre las principales archaeas con actividad sulfidogénica podemos encontrar a *Archaeoglobus profundus*, *Archaeoglobus veneficus*, *Thermocodium modestius* y *Calditerrivita quilingensis* (Figura 1). El descubrimiento de arqueas sulfidogénicas ha puesto en discusión el cambio de la terminología general de bacterias sulfato reductoras a una terminología más general como procariotas sulfato reductores o microorganismos sulfato reductores (Muyzer & Stams, 2008).

2.2.1.3. Consorcios microbianos sulfidogénicos

Un consorcio microbiano sulfidogénico es una comunidad de bacterias y arqueas que trabajan juntas para oxidar compuestos orgánicos y reducir sulfato para producir sulfuros mediante un mecanismo conocido como reducción desasimilatoria del sulfato. Estos microorganismos juegan un papel crucial en el ciclo del azufre y la biogeoquímica del sulfato. Tienen aplicaciones importantes en la biorremediación de ambientes contaminados por metales pesados y en la producción de energía renovable (Ñancuqueo & Johnson, 2012b ;Christiane Dahl, 2013).

Los consorcios microbianos sulfidogénicos acidófilos son comunidades especializadas para prosperar en ambientes ácidos, como los DAM que se caracterizan por tener un bajo $\text{pH} < 3.0$ y altas concentraciones de sulfatos y metales pesados. Estos consorcios contienen bacterias reductoras de sulfato como las del género *Desulfovibrio* y *Desulfosporosinus* y tienen la capacidad de realizar la reducción desasimilatoria del sulfato a bajo pH . Las adaptaciones metabólicas y fisiológicas de estos organismos les permiten mantener la homeostasis en ambientes extremadamente ácidos, lo que es esencial para su supervivencia y funcionalidad en estos entornos hostiles (Ñancucheo & Johnson, 2012b).

La formación de un consorcio sulfidogénico acidófilo depende de la interacción entre diferentes grupos microbianos, cada uno con diferentes capacidades de oxidación y reducción de compuestos orgánicos y sulfurados. En un consorcio sulfidogénico, ciertas bacterias son capaces de reducir el sulfato y utilizar el sulfuro como fuente de energía, mientras que otras bacterias reducen el sulfuro a sulfito o sulfato, ciclando de esta manera el azufre. Esta cooperación mutua permite a los microorganismos trabajar juntos para lograr la mineralización completa del sulfato y la producción de sulfuro (Salo & Bomberg, 2022). La comprensión de cómo funcionan los consorcios microbianos sulfidogénicos es importante para su aplicación en la biorremediación.

2.2.1.4. Metabolismos de la sulfato reducción

La sulfidogénesis o sulfato reducción es un proceso biológico en el que los microorganismos, como bacterias anaerobias y arqueas, producen compuestos sulfurados a partir de compuestos inorgánicos sulfurados. Este proceso es importante en procesos de biorremediación ya que los compuestos sulfurados pueden ser utilizados para eliminar compuestos tóxicos en suelos y agua. La sulfidogénesis es una de las herramientas más

efectivas en la biorremediación, especialmente para la eliminación de metales pesados, como el mercurio y el cadmio, que son tóxicos para los seres vivos que habitan un ambiente, y su funcionamiento está explicado por los siguientes mecanismos enzimáticos (Ñancucho & Johnson, 2012b; Christiane Dahl, 2013).

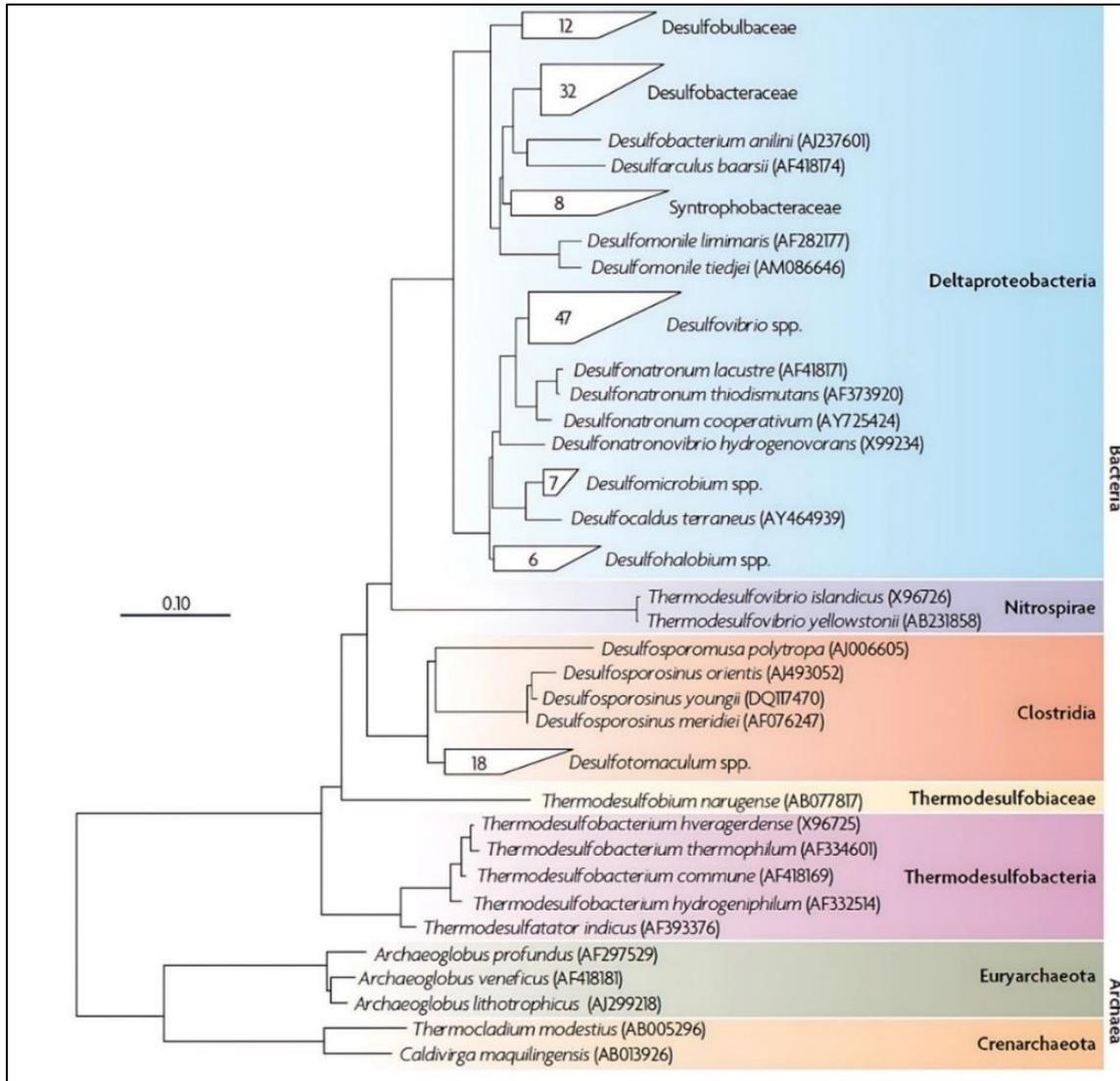


Figura 1. Árbol filogenético basado en secuencias casi completas de ARN ribosomal 16S (ARNr) de especies microbianas reductoras de sulfato (Muyzer and Stams, 2008).

Enzimología de las bacterias sulfato reductoras

La dinámica enzimática que emplean las BSR ha sido descrita de manera muy detallada en cepas de *Desulfovibrio sp.* en las cuales se han descrito tres enzimas citoplasmáticas principales, la ATP sulfurilasa activa el SO_4^{2-} generado por adenosina 5'-fosfosulfato (APS) para prepararse para la primera reducción de dos electrones, el APS luego es reducido por la APS reductasa, como producto se obtiene sulfito, que se utilizará como sustrato para la reducción de seis electrones por la sulfito reductasa, también conocida como desulfoviridina en las cepas de *Desulfovibrio*, de esta manera el trabajo conjunto de cuatro enzimas convierten el SO_4^{2-} en H_2S (Rückert, 2016; Christiane Dahl, 2013). A continuación, se presenta la ruta bioquímica de la sulfato reducción (Rückert, 2016; Rabus et al., 2015).

Activación del SO_4^{2-} , requiere 2 moléculas de ATP y la enzima a sulfurilasa (Sulfato Adeniltransferasa), esta reacción requiere de la energía de la hidrólisis del pirofosfato inorgánico (PPi) formado a ortofosfato (Pi) por una pirofosfatasa:



El par $\text{APS}=\text{HSO}_3^-$ tiene un potencial redox de punto medio E_0 de 60 mV, y esta reducción de dos electrones (ecuación 3) la realiza la enzima APS reductasa (AprBA):



Finalmente, el bisulfito se reduce a sulfuro por la sulfito reductasa desasimilatoria (DsrAB) con la participación de la proteína pequeña DsrC y el complejo de membrana DsrMKJOP (o simplemente DsrMK en algunos organismos (Rabus et al., 2015)



Donadores de electrones

Son moléculas orgánicas e inorgánicas capaces de funcionar como fuente y sustrato, y al mismo tiempo como donadores de electrones, que hacen posible la sulfato reducción, los más utilizados en investigación son el hidrógeno, formiato, metanol, etanol, melaza, lactato, glicerol, acetato, propionato - butirato, azúcar, hidrocarburos y residuos orgánicos. Todos los donadores de electrones afectan de diferente manera la cinética enzimática empleada por los microorganismos sulfidogénicos, cuando esta teoría se extrapola a ensayos de biorremediación o biorremediación propiamente dicha, la elección de un donador de electrones, pasa por el análisis del costo, disponibilidad y eficiencia que presenta un consorcio microbiano determinado, sin embargo, la relación estequiométrica teórica explica que un mol de SO_4^{2-} se reduce completamente utilizando 0.67 moles de un donador de electrones (Liamleam & Annachhatre, 2007).

a. Glicerol

Es un compuesto orgánico que se ha utilizado como donador de electrones en la sulfato reducción en sistemas microbianos. Esta técnica se basa en la utilización de compuestos orgánicos para aumentar la producción de sulfuro y la precipitación de metales. La utilización de glicerol como donador de electrones permite el crecimiento de bacterias sulfato reductoras, las cuales son responsables de la reducción de sulfato a sulfuro (Liamleam & Annachhatre, 2007). Este proceso es importante en la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados y en la producción de compuestos de interés comercial.

b. Acetato

Es un compuesto orgánico común que se encuentra en la naturaleza y puede ser utilizado como donador de electrones en la reducción de compuestos inorgánicos. En la biotecnología, el acetato se utiliza a menudo como donador de electrones en procesos biológicos, como la reducción del sulfato en la producción de sulfuros y metales. Las bacterias capaces de utilizar el acetato como donador de electrones son conocidas como bacterias acetato-oxidadoras y pueden ser encontradas en una amplia variedad de ambientes, incluyendo ambientes de aguas residuales y de minería. La utilización del acetato como donador de electrones en procesos biológicos es importante debido a su abundancia y disponibilidad, lo que lo convierte en una opción atractiva para la producción de productos valiosos a partir de compuestos inorgánicos (Liamleam & Annachhatre, 2007).

c. Lactato

Es un compuesto orgánico comúnmente utilizado como donador de electrones en procesos biológicos de descomposición. Es producido por bacterias fermentativas en la descomposición de azúcares y según la naturaleza anaeróbica o aeróbica del ambiente puede ser utilizado como fuente de energía o descompuesto. En sistemas anaeróbicos, el lactato es oxidado por bacterias lactato-dependientes y se utiliza como fuente de energía y carbono. En procesos de sulfato-reducción, el lactato es utilizado como donador de electrones para la reducción del sulfato a sulfito y sulfuro (Liamleam & Annachhatre, 2007).

Sulfato como aceptor de electrones

Es una sal aniónica que contiene el ion sulfato (SO_4^{2-}), se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza en minerales como el yeso, es uno de los principales

contaminantes de los drenajes ácidos de mina, además cumple la función de ser el único aceptor final de electrones para microorganismos sulfidogénicos, debido a que es el sustrato de este metabolismo y su reducción les provee de energía. Por estas razones el sulfato es un compuesto crucial en la obtención de consorcios microbianos y ensayos de biorremediación (Muyzer & Stams, 2008).

2.2.2. Métodos de estudio de microorganismos sulfato reductores

2.2.2.1. Métodos dependientes de cultivos

a. Microcosmos de sedimentos

Esta técnica implica la recolección de sedimentos ricos en materia orgánica y su transferencia a un recipiente cerrado con un medio de cultivo capaz de proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento y la actividad de las bacterias sulfidogénicas, mientras que limita el crecimiento de bacterias no deseadas. Los microcosmos son sistemas sellados herméticamente, durante su período de incubación los resultados positivos de esta técnica tornan los sedimentos en colores negruzcos, los cuales reflejan la producción de sulfuro como producto final. La ventaja de los microcosmos es que a partir de ellos es posible aislar cepas individuales y estudiarlas en detalle, para entender la diversidad genética y la fisiología de las bacterias sulfidogénicas y cómo interactúan en un consorcio (Chai et al., 2023).

b. Enriquecimiento en serie

Es una técnica en la que una muestra es diluida y cada dilución se agrega a un medio de cultivo específico. Esta técnica permite a los microorganismos de interés crecer en un ambiente favorable y multiplicarse hasta alcanzar densidades detectables (Chai et al., 2023).

b. Enriquecimiento selectivo:

Es una técnica en la que se utiliza un medio de cultivo que favorece el crecimiento de los microorganismos sulfidogénicos y al mismo tiempo inhibe el crecimiento de otros microorganismos no deseados (Chai et al., 2023).

c. Enriquecimiento por sustrato

Se utiliza para enriquecer consorcios microbianos que utilizan un sustrato específico para su crecimiento y metabolismo. Por ejemplo, se puede enriquecer un consorcio de bacterias sulfidogénicas agregando sulfato como sustrato (Chai et al., 2023).

d. Enriquecimiento por condiciones ambientales

Es una técnica en la que se ajustan las condiciones ambientales, como el pH, la temperatura y la presencia de oxígeno, para favorecer el crecimiento de los microorganismos sulfidogénicos. Un ejemplo son los DAM, los cuales son soluciones que se utilizan como medios de cultivo para simular las condiciones ambientales de los drenajes ácidos de las minas. Este medio contiene compuestos químicos que simulan un ambiente ácido y rico en sulfatos y metales pesados, que son ideales para el crecimiento de consorcios microbianos sulfidogénicos y la determinación de su eficiencia en biorremediación (Bekmezci et al., 2011).

2.2.2.1.1. Métodos independientes de cultivos

a. Análisis de composición microbiana

Es una técnica que permite evaluar la diversidad y abundancia de los microorganismos presentes en un consorcio. Esta técnica se basa en la secuenciación de amplicones de los genes ARNr 16S para identificar a los microorganismos presentes en el consorcio y estimar su proporción relativa respecto a otros microorganismos. El análisis de la composición microbiana de consorcios microbianos es una herramienta valiosa para

entender la dinámica de las comunidades microbianas en diferentes ambientes y para descubrir las relaciones ecológicas y funcionales entre los microorganismos en el consorcio. Además, esta técnica es útil para evaluar la estabilidad y resistencia de los consorcios microbianos en diferentes condiciones ambientales y para optimizar la eficacia de procesos biotecnológicos que dependen de consorcios microbianos (Chai et al., 2023).

2.2.3. Precipitación de metales por consorcios microbianos sulfidogénicos

2.2.3.1. Biorremediación por CMS

La biorremediación es un proceso que utiliza organismos vivos, principalmente microorganismos, plantas verdes y sus enzimas, para eliminar, degradar, mineralizar, transformar y detoxificar los contaminantes ambientales y los componentes peligrosos de los residuos ambientales en formas inofensivas o menos tóxicas durante el tratamiento de sitios contaminados, con el fin de devolverlos a su condición original. La biorremediación se ha utilizado con éxito en aplicaciones a gran escala y pequeña escala, y se puede aplicar en la limpieza de agua subterránea contaminada, suelo, lagunas, corrientes de residuos y lodos (Tyagi & Kumar, 2020).

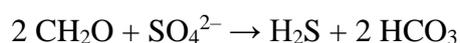
Existen más de veinte metales pesados tóxicos, como el plomo, níquel, zinc, cromo, cadmio, cobre, arsénico, plata, mercurio, arsénico y uranio, debido a su alto grado de toxicidad. La contaminación del suelo, aguas superficiales y aguas subterráneas por metales pesados se ha convertido en un grave problema ambiental en todo el mundo, debido a que los metales pesados pueden acumularse en el ambiente y afectar al ecosistema. Por esta razón, su eliminación de medios impactados es imprescindible. En el mundo, las fuentes más comunes de contaminación por metales pesados son los drenajes ácidos de mina (Le Pape et al., 2017).

La biorremediación de metales implica la utilización de sistemas biológicos como hongos, bacterias, arqueas y plantas capaces de adsorber, absorber, complejar o inmovilizar estos elementos tóxicos. Sin embargo, se ha demostrado que los organismos que actúan de manera individual tienen menor posibilidad de adaptarse a la toxicidad que genera el metabolismo de metales, frente a grupos de microorganismos que actúan en sinergia, favoreciendo el nicho ecológico de todos. Esto es lo que llamamos consorcios microbianos, y aplicado a la biorremediación de DAM serían CMS acidófilos, los cuales pueden ser añadidos por bioaumentación. Por ejemplo, en el caso de tener una cepa determinada con un alto potencial para precipitar metales, su cultivo podría ser bioaumentado con bacterias nativas del medio impactado para favorecer la aclimatación de la cepa principal. Además, se pueden aplicar técnicas de bioestimulación, añadiendo sustratos que favorezcan la capacidad de los organismos implicados. Las investigaciones relacionadas con la biorremediación de metales pesados han reportado una eliminación del 100 % de As y Zn, y un 99,3 % de metales pesados como Fe, Zn, Cd, Cu, B y Cr (Le Pape et al., 2017).

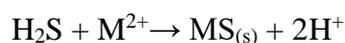
2.2.3.2. Mecanismos biológico para la precipitación de metales

Los microorganismos reductores de sulfato utilizan el SO_4^{2-} como aceptor de electrones. El producto de su reducción es el sulfuro de hidrógeno (H_2S) (Muyzer & Stams, 2008), que es un gas incoloro, inflamable y de olor fétido, similar al olor de huevos podridos; en altas concentraciones, puede ser venenoso. Las especies químicas en las que lo podemos encontrar en la naturaleza dependen del pH del medio en el que se encuentre. Esta molécula tiene la capacidad de enlazarse a metales, formando sulfuros metálicos que, en medios acuosos, precipitan. Cuando esta reacción ocurre acoplada a donadores orgánicos de electrones, también se liberan iones bicarbonato, los cuales promueven la alcalinización de un medio ácido, como lo son los DAM. A continuación, se presenta la

dinámica química sobre la precipitación de metales mediada por el H₂S (Kaksonen & Puhakka, 2007).

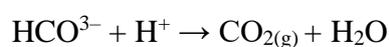


La reacción química general para la precipitación de metales se representa de la siguiente manera:



Donde, M²⁺ es un metal: Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺, o Ag⁺.

La precipitación de metales desprende iones hidrogeniones que tiende a acidificar el medio, frente a este suceso los iones bicarbonato neutralizan estos protones formando dióxido de carbono y agua



Bajo esta ruta metabólica se fundamenta el potencial de los microorganismos sulfato reductores o sulfidogénicos, para ser aplicadas en técnicas de biorremediación de DAM (Rabus *et al.*, 2015).

2.2.3.3. Ventajas de la biorremediación de metales mediante CMS

La biorremediación de metales presenta varias ventajas sobre las técnicas convencionales de remediación, como su capacidad para aplicarse directamente en los sitios contaminados, eliminar permanentemente los metales pesados y otros contaminantes acompañantes como el sulfato. Además, puede ser realizada a gran escala, es económica o de bajo costo para su aplicación, permite recuperar metales valiosos, es amigable con el medio ambiente y aceptada por el público. En comparación con métodos físico-químicos, que son más costosos y menos aceptados debido a los contaminantes peligrosos que generan, como los lodos (Tyagi & Kumar, 2020).

La biorremediación de metales pesados tiene algunas complicaciones metodológicas, como la imposibilidad de degradar ciertos compuestos tóxicos, como el acetato, y la producción de subproductos tóxicos como resultado del metabolismo de los contaminantes. Además, es un proceso científico muy riguroso, ya que se requieren estudios previos sobre las condiciones del medio impactado para determinar cuáles son las mejores condiciones en las cuales deben desarrollarse los microorganismos a utilizar (Tyagi and Kumar, 2020).

2.2.3.4. Relación donador-aceptor de electrones en la precipitación de metales

La relación donador-aceptor de electrones es fundamental en la biorremediación de DAM, dado que regula la eficiencia de los procesos bioquímicos implicados en la precipitación de metales pesados y la neutralización del pH. Las bacterias sulfato reductoras (BSR) acidófilas, que desempeñan un papel central en estos procesos, requieren un equilibrio adecuado entre los donadores de electrones, como el acetato o el glicerol, y el sulfato, que actúa como aceptor de electrones. Este equilibrio permite optimizar la reducción del sulfato a sulfuros, facilitando así la precipitación de metales como el hierro, zinc, cadmio, etc., reduciendo la toxicidad del DAM. La proporción óptima de estos componentes varía según las condiciones del DAM, pero es crucial para maximizar la eficiencia de la biorremediación (Bertolino et al., 2014).

El ajuste de la proporción entre donadores y aceptores de electrones puede mejorar significativamente la actividad metabólica de las BSR, lo que a su vez aumenta la eficiencia de los procesos de biorremediación. Teóricamente, la reducción de 1 mol de sulfato requiere 0,67 moles de demanda química de oxígeno o equivalentes de donadores de electrones, lo cual lleva a plantear la proporción teórica ideal de [0.67:1] para reducir completamente un mol de sulfato (Liamleam & Annachhatre, 2007). En el aspecto

práctico del enriquecimiento de CMS acidófilo, otras investigaciones han encontrado otras proporciones óptimas que se relacionan con la producción de sulfuro (Bertolino et al., 2014; Andrade et al., 2013); sin embargo, el estado del arte sobre las proporciones óptimas entre donador y aceptor de electrones en un ensayo de biorremediación sobre un DAM es escaso. |

2.2.3.5. Factores que afectan la precipitación de metales

Presencia de coloides portadores de metales

Los coloides y las nanopartículas que contienen metales (partículas de menos de 1 μm y 0,1 μm , respectivamente) son productos comunes durante la producción de sulfuro biogénico (Mansor, Berti, et al., 2019) (Mansor, Winkler, et al., 2019) (Mansor & Xu, 2020) . Estos coloides con metales no son deseables en la biorremediación dado que muestran una mayor capacidad de sorción, movilidad y biodisponibilidad (toxicidad) en relación con las partículas más grandes (Ubaid et al., 2020 ; Mansor & Xu, 2020).

2.2.3.6. DAM como fuente de metales

Los Drenajes Ácidos de Mina (DAM) son una seria preocupación ambiental, ya que se forman aceleradamente debido a la actividad minera. Se caracterizan por tener un pH ácido y concentraciones elevadas de sulfato y metales pesados. La formación de los DAM resulta de la oxidación de las rocas sulfuradas cuando estas están expuestas al oxígeno, agua o aire húmedo. La cantidad de DAM producida depende del volumen de roca sulfurada extraído, la superficie expuesta al aire y la cantidad de agua que entra en contacto con la roca sulfurada. Este fenómeno puede perdurar por años, incluso después del cierre de una mina (Souksen J. et al., 1998).

Las fuentes más importantes de emisión de DAM incluyen pilas de residuos, pilas de lixiviación, embalses de relaves, minas subterráneas, minas a cielo abierto, carreteras construidas, rellenos y represas (Dhir, 2018). Es necesario destacar que las fuentes de metales pesados son minerales (Tabla 1), cuya oxidación permite su liberación, y este fenómeno facilita su acumulación y toxicidad (Souksen J. et al., 1998).

Tabla 1. Fuente mineral de metales típicos de un DAM (modificado de Souksen J. et al., 1998)

Metal	Fuente	Fórmula Química	Nombre común
Fe	sulfuro de hierro	FeS ₂	pirita
Zn	sulfuro de zinc	ZnS	esfalerita
Mn	silicato de manganeso	MnSiO ₃	rodonita
Al	silicato de aluminio	Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	caolinita
Sílice	dióxido de silicio	SiO ₂	cuarzo
Ca	carbonato de calcio	CaCO ₃	calcita
Si	dióxido de silicio	SiO ₂	cuarzo
Mg	carbonato de magnesio	MgCO ₃	magnesita
Cu	sulfuro de cobre y hierro	CuFeS ₂	calcopirita
As	sulfuro de hierro y arsénico	FeAsS	arsenopirita
P	fosfato de calcio	Ca ₅ (PO ₄) ₃	apatita
K	cloruro de potasio	KCl	silvina
Cd	sulfuro de cadmio	CdS	greenockita
Ni	sulfuro de níquel y hierro	(Fe,Ni) ₉ S ₈	pentlandita
Co	sulfuro de cobalto y arsénico	CoAsS	cobaltita
Ga	elemental	Ga	no tiene fuente mineral específica
Na	Silicato de sodio y aluminio	NaAlSi ₃ O ₈	albita

2.2.3.7. Etapas y química de la formación de los DAM (Jiao et al., 2023)

Etapa I. La acidez generada es rápidamente neutralizada en las etapas iniciales cuando la roca que contiene minerales sulfurados es expuesta al oxígeno y al agua. El drenaje de agua es casi neutro. Mientras se produce la oxidación de los minerales sulfurados, existe suficiente alcalinidad disponible como para neutralizar la acidez y precipitar el hierro en

forma de hidróxido. Minerales carbonatados como la calcita, se encargan y neutralizar la acidez, bajo estas condiciones la oxidación y pirita es lenta.

Etapa II. Se agotan los minerales carbonatados, e inicia la disminución del pH del agua, cuando este parámetro alcanza los 4.5, inician reacciones de oxidación químicas y biológicas, aumentando la concentración de sulfato y iones ferroso, llevando el pH por debajo de los 3.5.

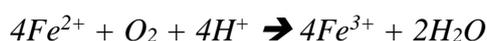
Etapa III. El hierro ferroso se convierte en hierro férrico por oxidación biológica, al mismo tiempo sustituye al oxígeno como principal oxidante, en esta etapa la oxidación biológica aumenta de 10 a un millón de veces la cinética de la oxidación química.

La dinámica química que da lugar a la formación de un DAM depende de factores externos a la composición minera, hablamos de la diversidad microbiana, pH del agua y la temperatura. La reunión de todos estos factores, dan lugar a las siguientes reacciones químicas:

Oxidación de la pirita, este sulfuro es oxidado por el oxígeno formando sulfato, hierro ferroso y iones hidrogeniones.



El hierro ferroso reacciona con el oxígeno y es oxidado a hierro férrico



A un pH superior a 3.5 el hierro férrico precipita como hidróxido férrico, esta reacción le confiere la característica visual de un rojo ladrillo característico de los DAM, esta reacción libera más iones hidrogeno.



La liberación de iones hidrogeno de la primera y segunda reacción tienden a acidificar el pH, cuando se llega a niveles por debajo de 3.5 el hierro férrico deja de precipitar y sustituye al oxígeno como principal oxidante del mineral sulfurado.



2.2.3.8. Factores implicados en la formación de DAM

La oxidación de la pirita es más efectiva y rápida en ambientes con un pH superior a 4.5. Sin embargo, cuando el pH desciende por debajo de 4.5, el oxígeno pierde su eficacia y el hierro férrico se convierte en el oxidante principal, pero su proceso es más lento. En estas condiciones, los microorganismos se apoderan del medio y aceleran la oxidación de la pirita a través de una reacción biológica. Esta reacción es sostenible en el tiempo debido a la capacidad de los microbios de tolerar bajos niveles de pH; ahí radica la peligrosidad y persistencia de los DAM (Jiao et al., 2023).

La temperatura es un factor importante en la cinética de estas reacciones. En teoría, la velocidad de reacción se duplica por cada 10 °C. La oxidación de la pirita es una reacción exotérmica; el calor que desprende esta reacción es absorbido por el medio circundante. Visto de otra manera, la oxidación de la pirita promueve la aceleración de la misma reacción por elevación de la temperatura. A temperaturas elevadas, la cinética es rápida, mientras que a bajas temperaturas estas reacciones son poco eficientes y se evidencia una reducida oxidación de la pirita. Por debajo de los 4 °C, la reacción es casi imperceptible y puede ser discriminada (Jiao et al., 2023).

2.2.3.9. Manejo de la formación de DAM

La prevención, abatimiento y mitigación son los enfoques para el control de un DAM. La prevención habla de evitar la formación de un DAM, mientras que el abatimiento y mitigación se emplean después de la formación de un DAM. La prevención tiene que ver con la limitación e impedimento de la reacción de oxidación de la roca sulfurada para evitar la acidificación del agua. Esto se puede lograr mediante la eliminación de sulfuros o evitando su contacto con el oxígeno a través de una mezcla de cal y concreto. Aunque este método no es eficiente a largo plazo, por ello se opta por utilizar cubiertas y sellos que limitan la disponibilidad de oxígeno, evitando así que el pH se reduzca por debajo de 4.5. En estas condiciones, la ausencia de oxígeno inhibe la oxidación de la pirita, pero este sistema no funciona a largo plazo, pues no existe un material que impida el ingreso de aire o agua de manera perenne. El concreto, por ejemplo, tiende a agrietarse, o las raíces de las plantas tienden a reducir su resistencia. Mitigar los efectos de un DAM pasa por el control de la migración del agua, es decir, evitar que corrientes de agua tengan contacto con las rocas sulfuradas. Esto se realiza a través de zanjas y canales alternativos. También se puede interceptar el agua subterránea (Chaparro, 2015).

CAPITULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPOTESIS

3.1. Nivel de investigación

Explicativo: Esta investigación buscó entender las relaciones de causa y efecto entre las concentraciones de donadores de electrones y sulfato sobre la precipitación de metales por los CMS.

3.2. Tipo y diseño de estudio

3.2.1. Tipo de investigación

Básica: Esta investigación se avocó a generar nuevos conocimientos acerca de la proporción optima entre donador de electrones y sulfato que favorecen la precipitación metales mediada por los CMS.

3.2.2. Diseño de investigación

Experimental: En esta investigación se manipularon las variables de concentraciones de donadores de electrones y sulfato, para observar sus efectos en la precipitación de metales por los CMS.

3.3. Material biológico

En esta investigación se utilizaron muestras de sedimentos que contienen microorganismo sulfato reductores, provenientes del DAM localizado en Hualgayoc, Cajamarca.

3.4. Localización y descripción del sitio de muestreo

La presente investigación se desarrolló partiendo del muestreo de sedimentos en un túnel de minero, ubicado en el distrito de Hualgayoc, Cajamarca, con coordenadas 6440

47.2400S, 78380 24.2100O. El túnel minero genera DAM en su interior en dos puntos donde se recolectaron las muestras: PM1 a 150 m y PM2 a 300 m (Figura 2).



Figura 2. Ubicación de los puntos de muestreo para colecta de sedimentos de DAM. A) Ubicación geográfica de los puntos de muestreo B) Punto de muestreo PM1, C) Punto de muestro PM2.

3.5. Colección de muestras y análisis fisicoquímico

Las muestras de sedimento se recolectaron por triplicado, extrayendo el sedimento ubicado debajo de la fase acuosa del DAM mediante jeringas estériles de 60 mL, las cuales se llenaron completamente y se sellaron con parafilm. Las muestras colectadas se almacenaron en condiciones anóxicas dentro de una jarra de anaerobiosis rectangular, utilizando un sistema AnaeroGen (Oxoid, Reino Unido). Las muestras fueron transportadas en un cooler con hielo hasta el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la Universidad Nacional de Cajamarca. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

Parámetros como el pH y potencial redox fueron medidos *in situ* empleando un potenciómetro Hanna HI2002 y un electrodo de HI11310 con una referencia de Ag/AgCl. El examen de metales totales fue realizado por la empresa SGS del Perú S.A.C. Para ello,

se colectaron muestras de 200 mL de la fase acuosa del DAM en botellas estériles, las cuales fueron almacenadas dentro de un cooler a 4°C, para luego transportar la muestra hasta la empresa indicada.

3.6. Ensayo de microcosmos para la obtención de CMS acidófilos.

Para la obtención de CMS acidófilos, se emplearon muestras de sedimentos ácidos (pH < 2.5) colectados del túnel minero antes mencionado. Los CMS acidófilos se obtuvieron mediante un ensayo de microcosmos empleando un medio de sales minerales (MSM) siguiendo el procedimiento descrito por Valdez-Nuñez et al., (2022). El pH del medio de cultivo fue ajustado a 2.5 utilizando HCl o NaOH antes de la esterilización en autoclave (121 °C a 1 atm durante 20 min). Los microcosmos se desarrollaron por triplicado. Posterior a la esterilización por autoclave, se adicionó acetato y glicerol (5 mM) como donadores de electrones y fuente de carbono a partir de una solución stock anaeróbica de 1 M.

Las botellas fueron rotuladas según el donador de electrones, con acetato “AceMix” y a con glicerol “GlyMix” y se incubaron de forma estática en oscuridad a 30 °C durante un mínimo de 20 días. Transcurrido el tiempo de incubación, se colectó 5 mL de cada cultivo de enriquecimiento y se inoculó en un medio de cultivo fresco (primera transferencia). Se realizaron hasta 3 transferencias.

3.7. Medición de parámetros fisicoquímicos

3.7.1. Monitoreo de pH y potencial de óxido – reducción (ORP)

El pH y el ORP fueron monitoreados periódicamente cada 7 días en los microcosmos, usando un equipo multiparámetro (Hanna instruments). Previamente se agitó cada botella para obtener muestras homogéneas. Las mediciones se realizaron en el interior de una

bolsa de plástico anaeróbica para asegurar un sistema reductor similar al del interior de cada microcosmo del ensayo de biorremediación.

3.7.2. Cuantificación de sulfuros biogénicos

El sulfuro disuelto se monitoreó cada 7 días, empleando el ensayo de azul de metileno sugerido por (Cline, 1969). La medición de sulfuro libre se realizó empleando un fotómetro (Spectroquant Move 100, Merck), preparando un blanco en cada medición y la cuantificación de cada muestra tomada.

3.8. Ensayos de precipitación de metales empleando diferentes proporciones de donador de electrones y sulfato

3.8.1. Formulación y preparación de un DAMs

Este medio de cultivo consistió en una solución de metales (MS) y una solución de hierro (IS). Para la MS se añadieron las sales de acuerdo con la Tabla 2. Se utilizó un agitador magnético a 600 RPM para disolver uniformemente las sales. El pH de esta solución fue estandarizado a ~3.0 después de la mezcla. Se almacenó la solución a temperatura ambiente en una botella Schott de 1000 mL. Para la IS, se añadió 324.70 mM (45.137 g) de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, una vez mezclada la solución se dejó reposar.

Se llenaron 500 mL de dH_2O en una botella Schott de 1000 mL y se siguió el procedimiento para la preparación del MSM (ver sección 3.5.) con la diferencia de que la MS e IS fueron agregadas (10 % v/v). Finalmente se estandarizó una concentración final de 50 mM de sulfato. Se aforó el volumen hasta 770 mL.

3.8.2. Configuración del experimento

El ensayo se configuró en 2 lotes, uno con acetato y otro glicerol como fuente de carbono y donador de electrones. Así también, en cada lote se empleó 3 proporciones diferentes de donador y aceptor de electrones, las cuales fueron: (i) [0.5 : 1], (ii) [1 : 1], y (iii) [2:1], correspondiendo cada una a la concentración milimolar de: (i) [23.84 : 47.68], (ii) [47.68 : 47.68], (iii) [71.52 : 47.68]. El ensayo se realizó por triplicado y el esquema de tratamientos se realizó de igual forma para ambos donadores de electrones (tabla 3).

Tabla 2. Tratamientos formulados para el ensayo de precipitación de metales

Tratamiento	Nombre largo	Nombre corto
ACETATO Proporción 1	Proporción 1 – Ace 1	P1A1
	Proporción 1 – Ace 2	P1A2
	Proporción 1 – Ace 3	P1A3
	Proporción 1 – Ace C	P1AC
ACETATO Proporción 2	Proporción 2 – Ace 1	P2A1
	Proporción 2 – Ace 2	P2A2
	Proporción 2 – Ace 3	P2A3
	Proporción 2 – Ace C	P2AC
ACETATO Proporción 3	Proporción 3 – Ace 1	P3A1
	Proporción 3 – Ace 2	P3A2
	Proporción 3 – Ace 3	P3A3
	Proporción 3 – Ace C	P3AC
GLICEROL Proporción 1	Proporción 1 – Gly 1	P1G1
	Proporción 1 – Gly 2	P1G2
	Proporción 1 – Gly 3	P1G3
	Proporción 1 – Gly C	P1GC
GLICEROL Proporción 2	Proporción 1 – Gly 1	P2G1
	Proporción 2 – Gly 2	P2G2
	Proporción 2 – Gly 3	P2G3
	Proporción 2 – Gly C	P2GC
GLICEROL Proporción 3	Proporción 3 – Gly 1	P3G1
	Proporción 3 – Gly 2	P3G2
	Proporción 3 – Gly 3	P3G3
	Proporción 3 – Gly C	P3GC

Una vez constituido el medio de cultivo se procedió a realizar la adición de los CMS acidófilos al medio DAMs. El incremento de pH, la reducción de sulfato y la generación de sulfuros metálicos fueron considerados como parámetros positivos para la biorremediación del DAMs. Después de 28 y 84 días se realizó una segunda y tercera inoculación, respectivamente (bioaumentación). Las botellas se incubaron estáticamente en oscuridad a 30 °C durante 140 días.

3.8.3. Análisis geoquímico durante el ensayos de precipitación de metales

3.8.3.1. Análisis fisicoquímicos y cuantificación de sulfuros biogénicos

El pH, ORP y cuantificación de sulfuros se monitoreó periódicamente cada 7 días como se indica en la sección 3.6.

3.8.3.2. Preparación de muestras para la cuantificación glicerol y sulfatos

Para estos análisis, las muestras fueron colectadas periódicamente cada 14 días. Las muestras (1 mL) se filtraron (mediante filtros de jeringa de nailon de 20 µm) y se conservaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. La cuantificación de sulfato se realizó mediante cromatografía iónica a través de un sistema DIONEX ICS-5000®, equipado con un autosampler Dionex® AS-AP y conectado a un supresor Dionex® (AERS 500 4 mm) y un detector de conductividad Dionex ICS-5000+® de Thermo Scientific. La cuantificación de glicerol y acetato se realizaron por HPLC. Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Geomicrobiología, de la Universidad de Tübingen (Alemania), así como en el laboratorio de Biominería y Microbiología de Extremófilos, de la Universidad San Sebastián (Chile).

3.8.3.3. Preparación de muestras para la cuantificación metales disueltos.

Estas muestras fueron colectadas periódicamente cada 14 días. Se colectó y filtró 1 mL en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, adicionalmente cada muestra fue acidificada con una gota de HNO₃ y se desgasificaron insuflando N₂ durante 5 minutos para garantizar la eliminación completa del sulfuro. La cuantificación de metales disueltos se realizó utilizando un Espectrómetro de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS Agilent 7900). Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Geomicrobiología, de la Universidad de Tübingen (Alemania), así como en el laboratorio de Biominería y Microbiología de Extremófilos, de la Universidad San Sebastián (Chile).

3.8.3.4. Análisis de coloides portadores de metales

Para comprobar su presencia, se tomaron muestras bajo condiciones anaeróbicas y se filtraron en paralelo a través de filtros de tamaño de poro de 1 µm, 0,45 µm y 3 kDa (aprox. 1 nm). La distribución del tamaño de las partículas en la fracción < 1 µm se midió a través de la dispersión de luz dinámica (DLD) en el Zetasizer Nano ZS.

3.8.4. Análisis molecular

3.8.4.1. Extracción de ARN

El ARN se extrajo de los ensayos de precipitación de metales cada 5 días. Las repeticiones de cada ensayo de precipitación de metales (teniendo en cuenta el donador de electrones) con el mejor incremento de pH, reducción de sulfato y producción de sulfuro metálico fueron objeto de este análisis. Se colectaron 2 ml de muestra de cada botella y se centrifugaron a 11200 g durante 10 min a 4 °C, luego se desechó el sobrenadante y el pellet celular se almacenó a -80 °C. El ARN total se extrajo según el método de Lueders et al., 2004, en el laboratorio de “Biología Molecular” de la

Universidad de Tubingem (Alemania). El ADN se eliminó con el kit TURBO DNA-Free (Invitrogen, USA), y la PCR confirmó la eliminación exitosa del ADN con primers bacterianos universales como se ha descrito en otros estudios (Huang et al., 2021; Lueders et al., 2004). La calidad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) y la concentración de ARN se cuantificó mediante espectrofotometría en un fluorofotómetro Qubit 2.0 (Invitrogen, USA). El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 0,5 g del ARN previamente aislado. Las reacciones de transcripción inversa se realizaron con SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del manual utilizando primers de hexámeros aleatorios.

3.8.4.2. qPCR

Este análisis se realizó en el laboratorio de “Biología Molecular” de la Universidad de Tubingem (Alemania), con la finalidad de cuantificar la abundancia y la actividad transcripcional del gen *dsrA* relacionado al proceso de reducción del sulfato en los microcosmos y en los ensayos de precipitación de metales . Se utilizó un par de primers específicos para el gen *dsrA* que codifica para la subunidad A de la sulfito reductasa desasimilatoria: *dsrR*: 5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3' y *dsr2060F*: 5'-CAACATCGTYCAYACCCAGGG-3' (Geets et al., 2006). Se utilizó el SsO Advanced Universal SYBR Green Super Mix (Bio-Rad, USA) en un equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA). El análisis cuantitativo de las muestras se realizó por triplicado utilizando 10 µL como volumen total de reacción para la PCR. La mezcla de PCR estuvo compuesta por 5 pmol de primers *dsrA* y 2 µl de ADNc como templado. Los detalles de las condiciones de amplificación se especificaron en Gupta & Sar, (2020). Después de la amplificación por ciclos térmicos, se desarrolló una curva de fusión (melting curve) para comprobar la especificidad de la PCR. La observación de un

solo pico predominante indicó la especificidad del producto de PCR (Liu et al., 2016). Se construyeron curvas estándar con diluciones en serie de cantidades conocidas del gen *dsrA*, que se amplificaron con los primers *dsr4R* y *dsr2060F* de un cultivo puro de *Desulfosporosinus sp.* Los amplicones se purificaron empleando el kit Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega, USA) según las instrucciones del fabricante y, posteriormente, se clonaron en el vector de clonación pDrive con el kit de clonación PCR (Qiagen, The Netherlands). La cuantificación de las copias del gen *dsrA* se realizó comparando los resultados de la amplificación frente a la cuantificación de los estándar antes elaborados.

3.9. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se realizará a través de fichas de recolección de datos (Apéndice 1), además se utilizará una bitácora de laboratorio.

3.10. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de las diferentes proporciones, se empleó el software de análisis de datos y gráficos científicos “OriginPro 2024b (64-bit) 10.1.5.132 (Learning Edition)”. La normalidad fue determinada mediante la prueba de Prueba de Shapiro-Wilk y la esfericidad mediante la prueba de Mauchly's, si este último supuesto estadístico fue violado, se aplicaron las correcciones de Greenhouse-Geisser, Huynh-Feldt y Lower-bound, posteriormente se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas unidireccionales y una prueba *post hoc* de Tukey, con un nivel de confianza de 95 % y un $p < 0.05$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Colección de muestras y análisis fisicoquímico de las muestras ambientales

Los puntos de generación de DAM PM1 y PM2 tuvieron un pH de 1.53 y 2.01 y valores de ORP de 377.4 y 534.8 mV, respectivamente.

4.1.2. Actividad de CMS acidófilo

Los CMS acidófilos se establecieron luego de realizar la tercera transferencia del ensayo de microcosmos. Los cultivos mostraron un aumento del pH, así como la presencia de precipitados de color negro debido a la producción de sulfuro biogénico (Figura 3 - 7).

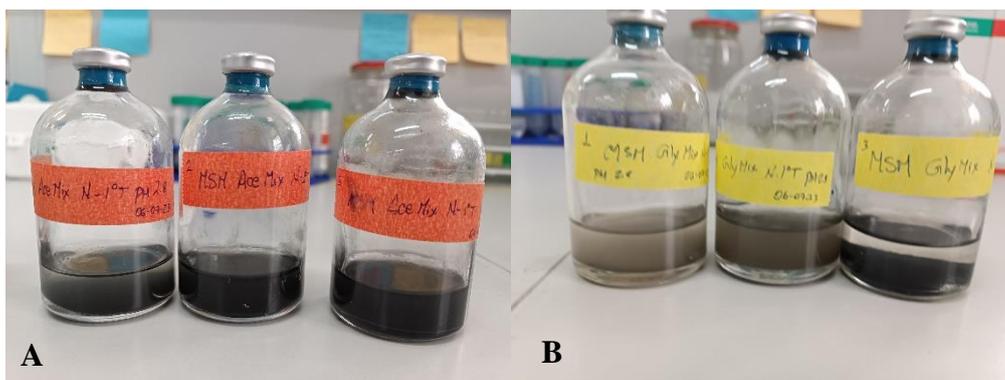


Figura 3. Consorcios microbianos sulfidogénicos autóctonos de la tercera transferencia obtenidos mediante el ensayo de microcosmos. A) Consorcios microbianos con acetato (AceMix, rotulo rojo), B) Consorcios microbianos con glicerol (GlyMix, rotulo amarillo).

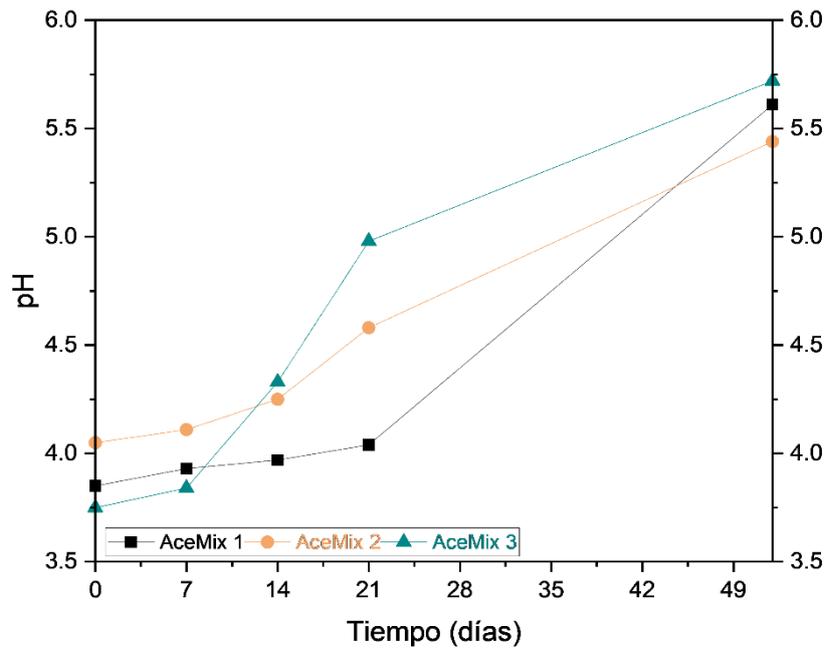


Figura 4. Variación del pH en el ensayo de microcosmos con acetato. AceMix 1, 2 y 3 son los CMS obtenidos después de la tercera transferencia.

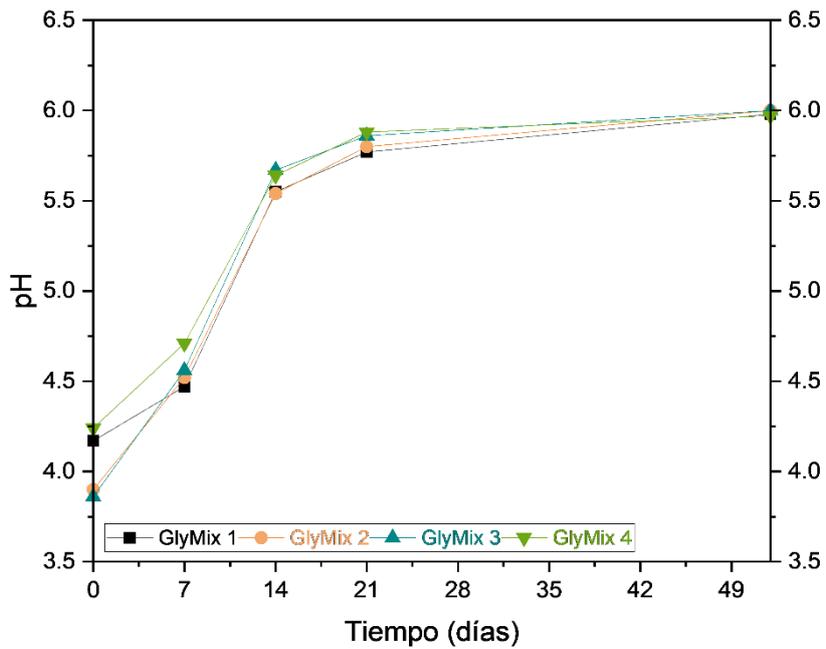


Figura 5. Variación del pH en el ensayo de microcosmos con glicerol. GlyMix 1, 2, 3 y 4 son los CMS obtenidos después de la tercera transferencia.

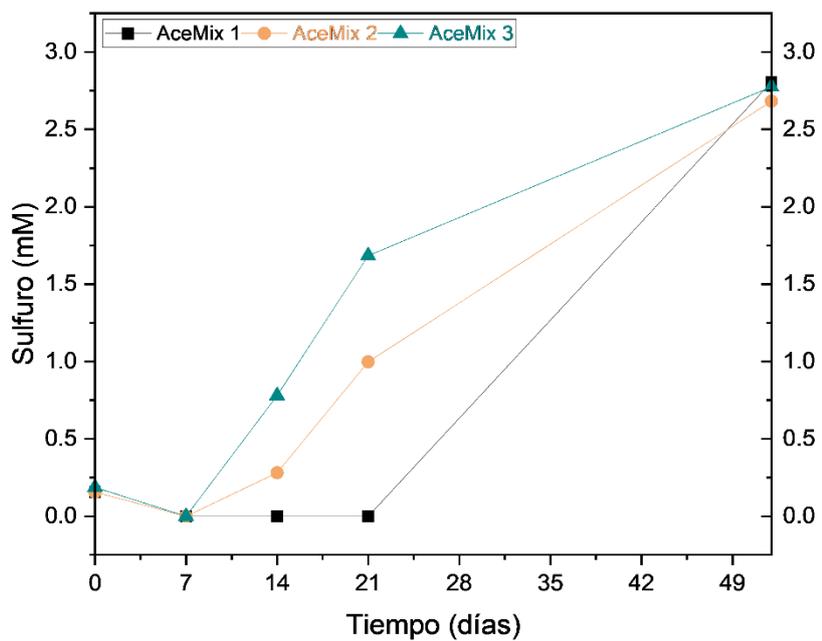


Figura 6. Producción de sulfuros biogénicos en el ensayo de microcosmos con acetato. AceMix 1, 2 y 3 son los CMS obtenidos después de la tercera transferencia.

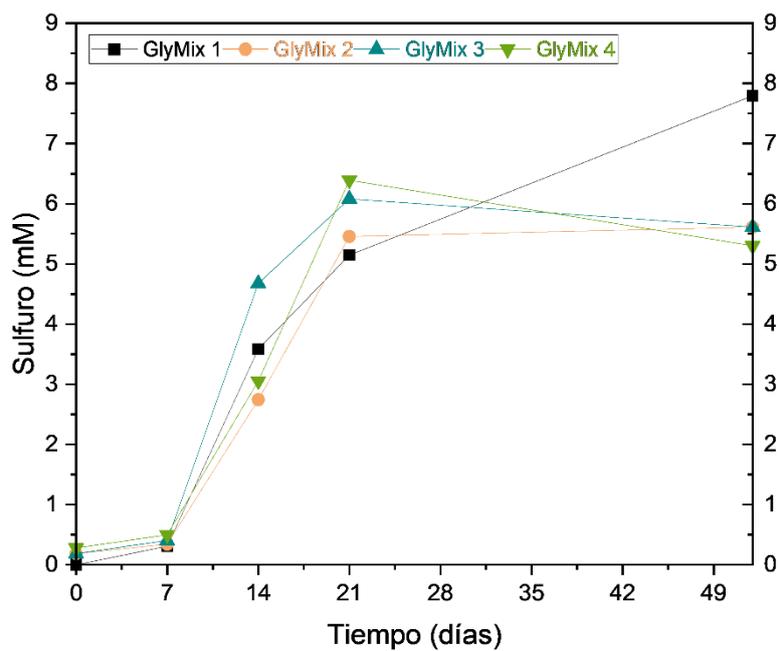


Figura 7. Producción de sulfuros biogénicos en el ensayo de microcosmos con glicerol. GlyMix 1, 2, 3 y 4 son los CMS obtenidos después de la tercera transferencia.

4.1.3. Ensayo de precipitación de metales de un DAMS

Los CMS AceMix 1, AceMix 3, GlyMix 1 y GlyMix 3 fueron escogidos para ser inoculados en el ensayo de precipitación de metales, debido a que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en el incremento de pH y producción de sulfuros en los CMS AceMix y GlyMix, por lo que se asumió que todos fueron aptos para el ensayo de precipitación de metales. Sin embargo, se seleccionaron aquellos con mejor actividad microbiana final. Los CMS del mismo donador de electrones se inocularon en partes iguales en cada tratamiento del ensayo.

4.1.3.1. Variación del pH, ORP y producción de sulfuros

En el ensayo con acetato no se evidenció incremento de pH, ni variación favorable respecto al ORP en ninguno de las tres proporciones (Figura 8 y 9). Respecto a la producción de sulfuros, se logró cuantificar a los 49 días del ensayo (0.17 mM), sin embargo, este parámetro no tuvo una mejora significativa, alcanzando tan solo una concentración de 0.7 mM en la proporción 1 (Figura 10), además no se evidenciaron las coloraciones negruzcas propias de la formación de sulfuro de hierro (Figura 11).

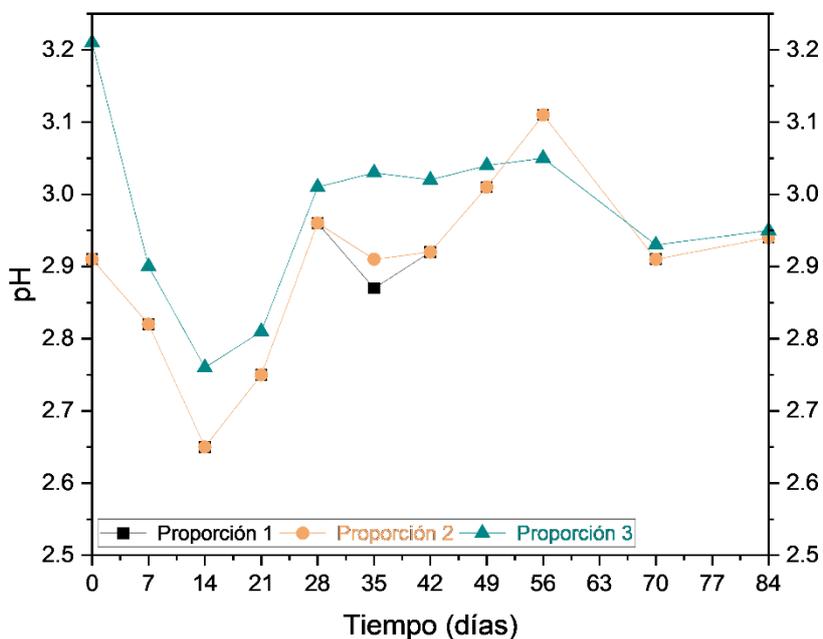


Figura 8. Variación media del pH en función de cada proporción aplicada en el ensayo de precipitación de metales sobre un DAMS con acetato.

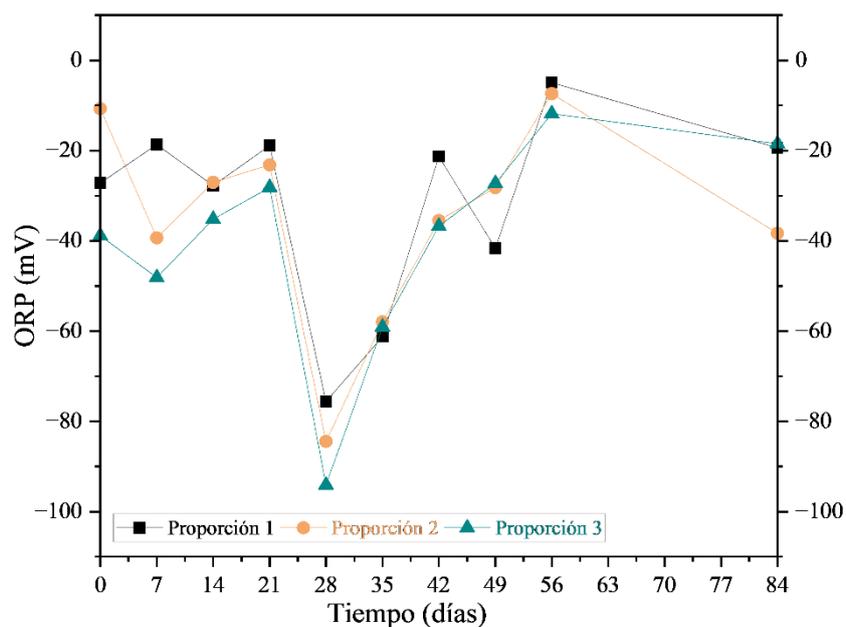


Figura 9. Variación media del ORP en función de cada proporción aplicada en el ensayo de precipitación de metales sobre un DAMS con acetato.

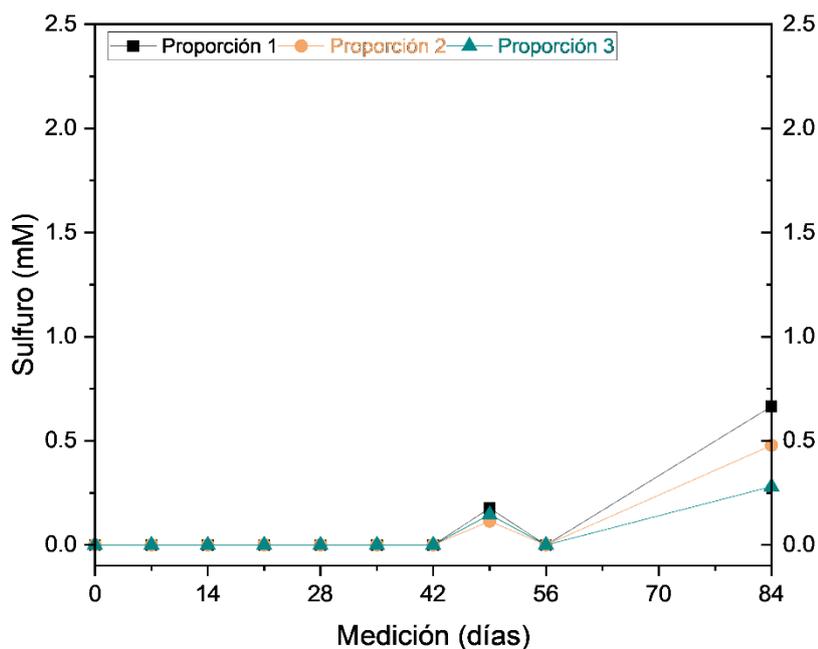


Figura 10. Variación media de la producción de sulfuros biogénicos en función de cada proporción aplicada en el ensayo de precipitación de metales sobre un DAMS con acetato.

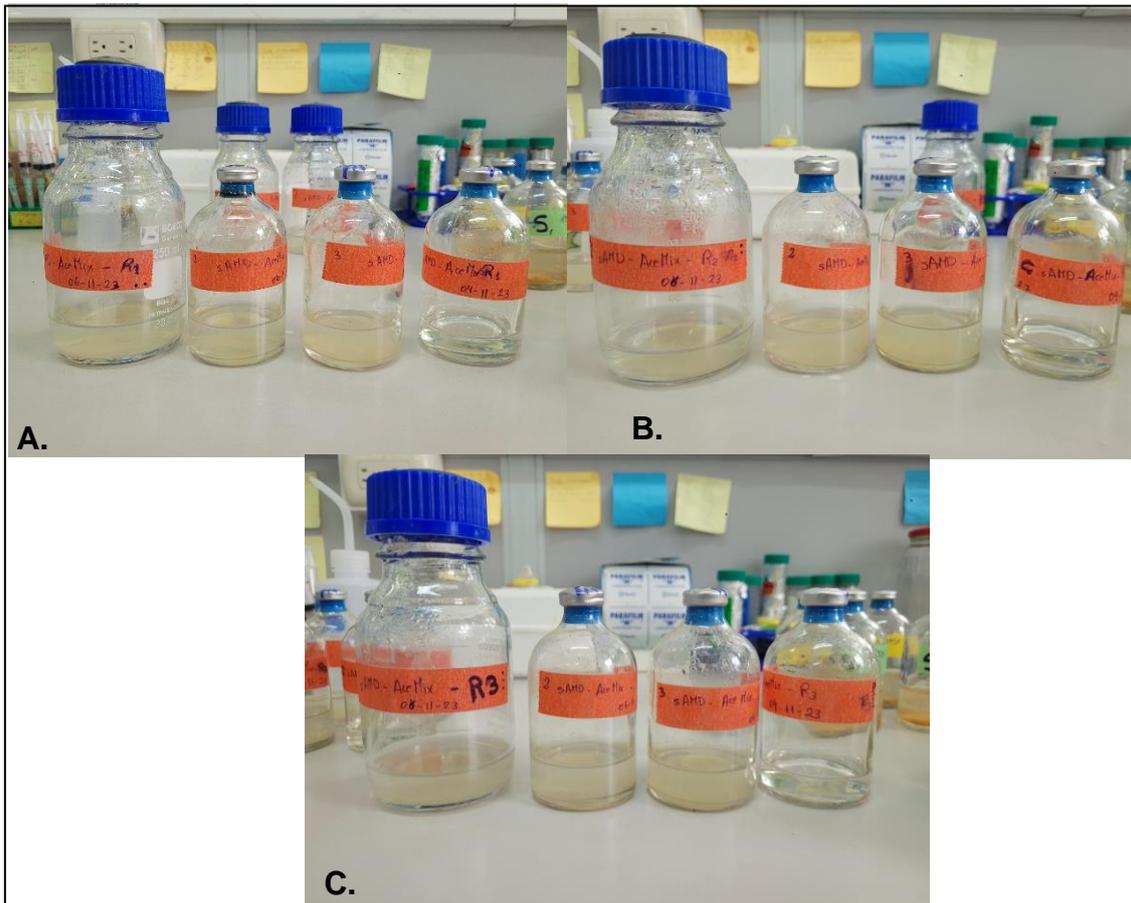


Figura 11. Ensayo de precipitación de metales con acetato. Tras 84 días de ensayo los cultivos no mostraron coloraciones propias de la producción de sulfuros. A) Proporción 1, B) Proporción 2, C) Proporción 3.

En los cultivos con glicerol, los valores de pH fueron los más altos (Figura 12), y los valores de ORP fueron electronegativos alcanzando valores de -190 mV (Figura 13). En cuanto a la cuantificación de sulfuros, la concentración más alta fue de 4.56 mM (Figura 14). En todas las botellas se observó la presencia de precipitados de coloración negra (Figura 15). La proporción 1 mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los 3 parámetros, mostrándose como una proporción óptima frente a las dos proporciones restantes.

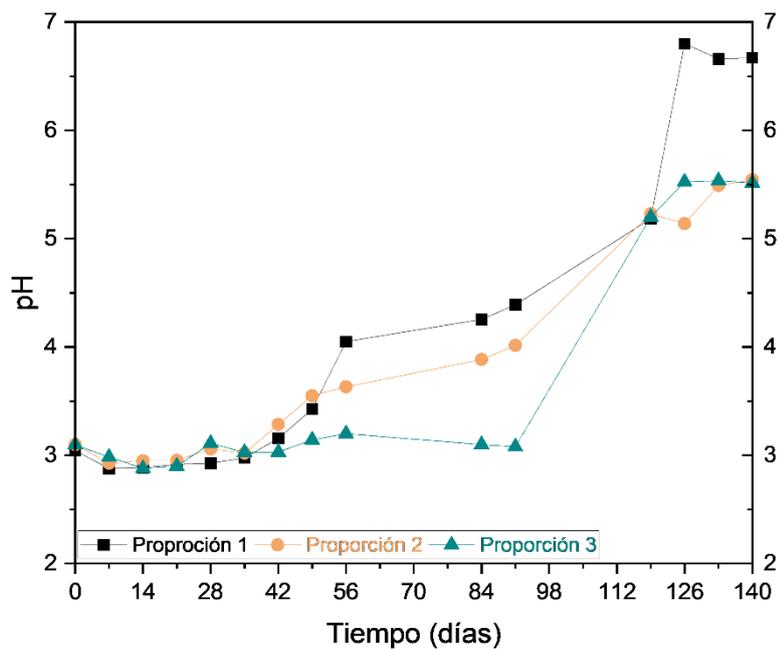


Figura 12. Variación media del pH en función de cada proporción aplicada en el ensayo de precipitación de metales sobre un DAMS con glicerol.

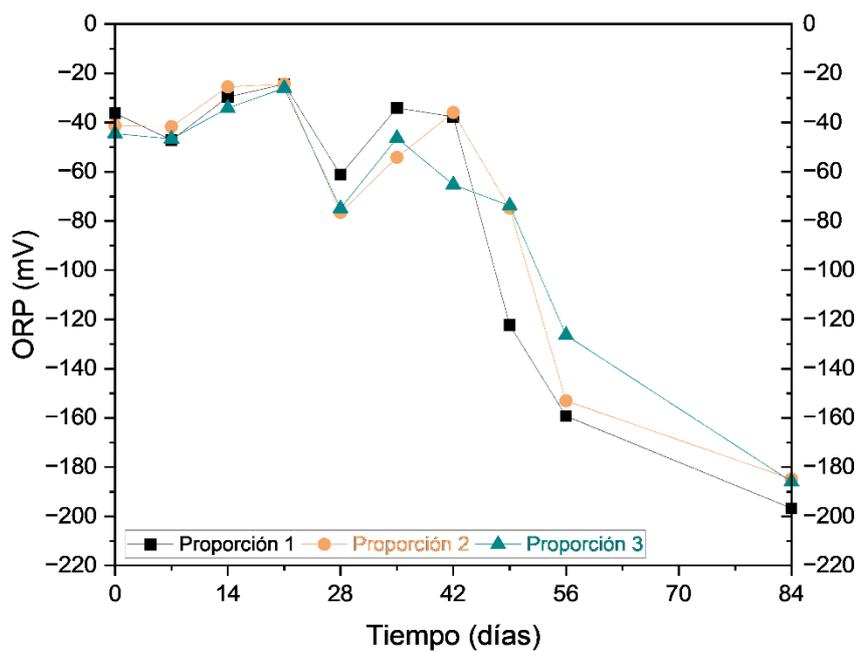


Figura 13. Variación media del ORP en función de cada proporción aplicada en el ensayo de precipitación de metales sobre un DAMS con glicerol.

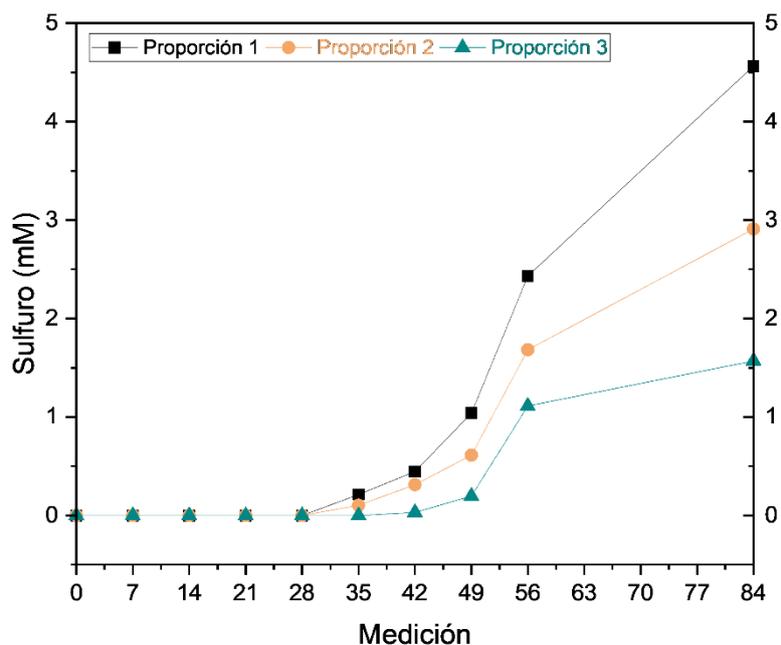


Figura 14. Variación media de la producción de sulfuros biogénicos en función de cada proporción aplicada en el ensayo de precipitación de metales sobre un DAMS con glicerol.

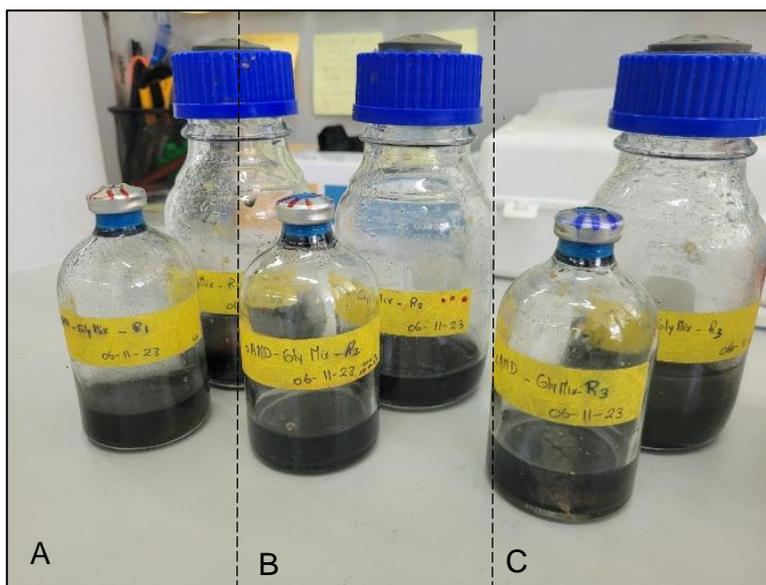


Figura 15. Ensayo de precipitación de metales con glicerol. Se muestran solo dos botellas por proporción debido a que la tercera botella fue transportada a Alemania para análisis moleculares. A) Proporción 1, B) Proporción 2, C) Proporción 3.

4.1.3.2. Cuantificación de acetato, glicerol y sulfato

En los cultivos con acetato, se encontraron diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la proporción 2, debido a que mostró la menor concentración final de acetato y sulfato (Figura 16 y 17), mientras que las otras 2 proporciones mostraron resultados menos sobresalientes en ambos parámetros.

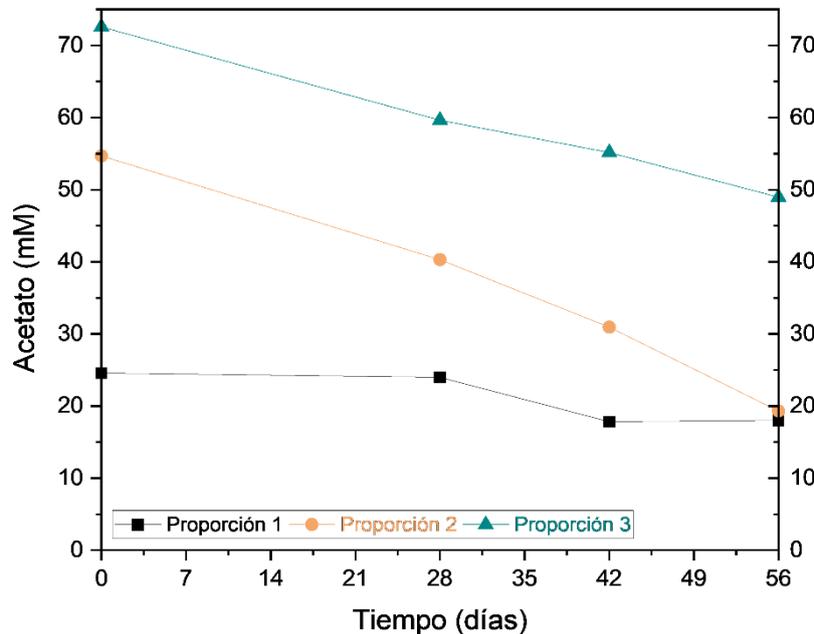


Figura 16. Variación media de la cuantificación de acetato en función de cada proporción aplicada en el ensayo de precipitación de metales sobre un DAMS con acetato.

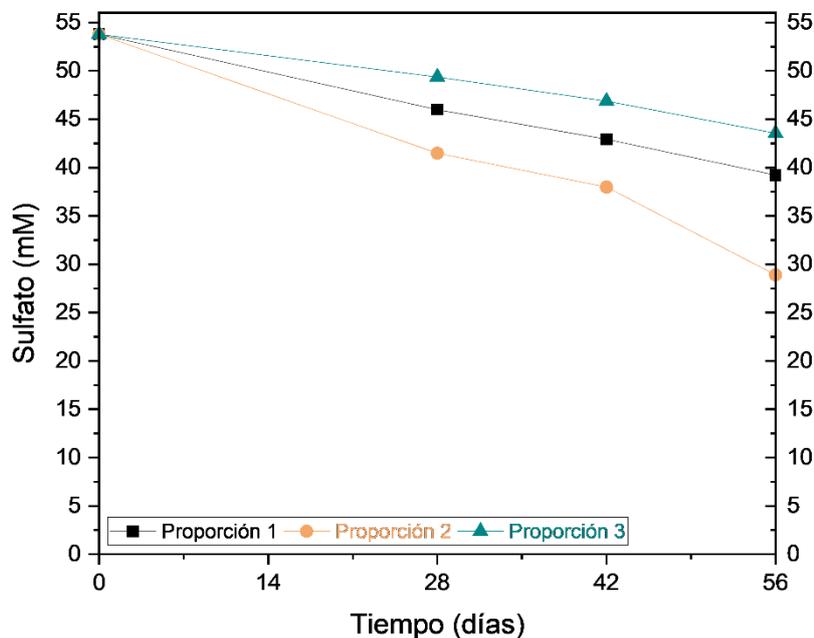


Figura 17. Variación media de la cuantificación de sulfato en función de cada proporción aplicada en el ensayo de precipitación de metales sobre un DAMS con acetato.

En los cultivos con glicerol, las 3 proporciones consumieron todo el glicerol, sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la proporción 1, mostrándose como una proporción óptima frente a las dos proporciones restantes. Se observó el consumo del 99.99 % de sulfato (Figura 18 y 19), sin diferencias estadísticamente significativas entre proporciones ($p > 0.05$). En cuanto a la cuantificación de acetato, esta fue fluctuante en el tiempo, tras 56 días la proporción 1 dejó de ser cuantificable, mientras que en la proporción 2 y 3 este parámetro fluctuó entre incremento y reducción (Figura 20).

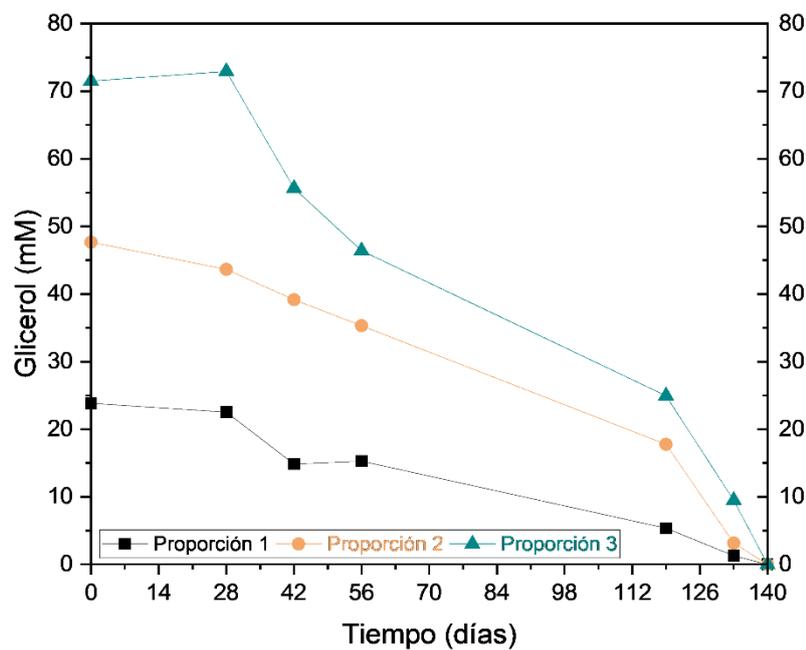


Figura 18. Variación media de la cuantificación de glicerol en función de cada proporción aplicada en el ensayo de precipitación de metales sobre un DAMS con glicerol.

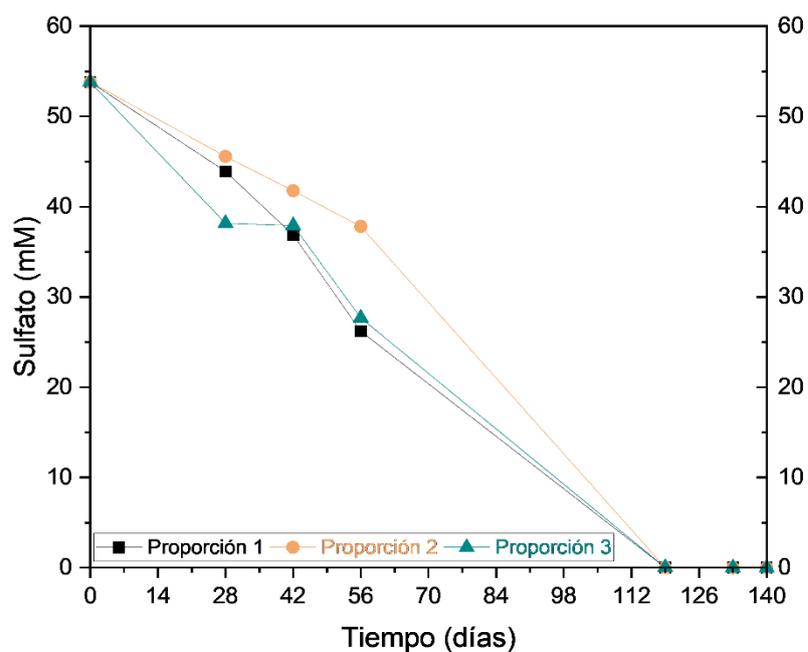


Figura 19. Variación media de la cuantificación de sulfato en función de cada proporción aplicada en el ensayo de precipitación de metales sobre un DAMS con glicerol.

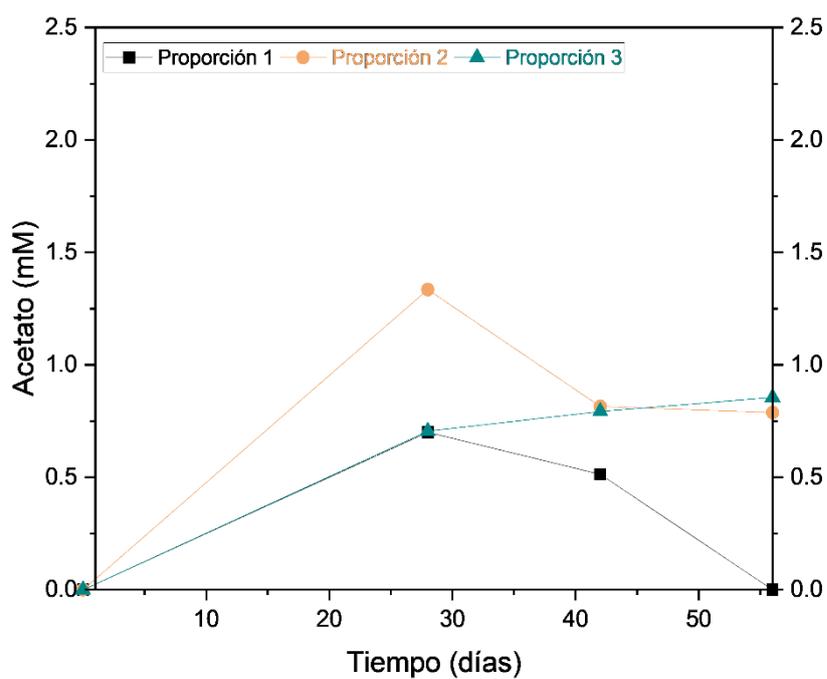


Figura 20. Variación media de la cuantificación de acetato en función de cada proporción aplicada en el ensayo de precipitación de metales sobre un DAMS con glicerol.

4.1.3.3. Cuantificación de metales disueltos

En los cultivos con acetato, luego de 56 días de ensayo, se observó que los metales no precipitaron de forma similar en las 3 proporciones evaluadas. Se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la proporción 1, por ello se puede decir que fue estadísticamente mejor en la precipitación de metales frente a las otras dos proporciones, sin embargo, en los casos que superó el 40 % de precipitaciones de metales lo logró en el grupo de metales que se encuentran en menor concentración del DAMS como lo son el Cd y el As (Figura 21).

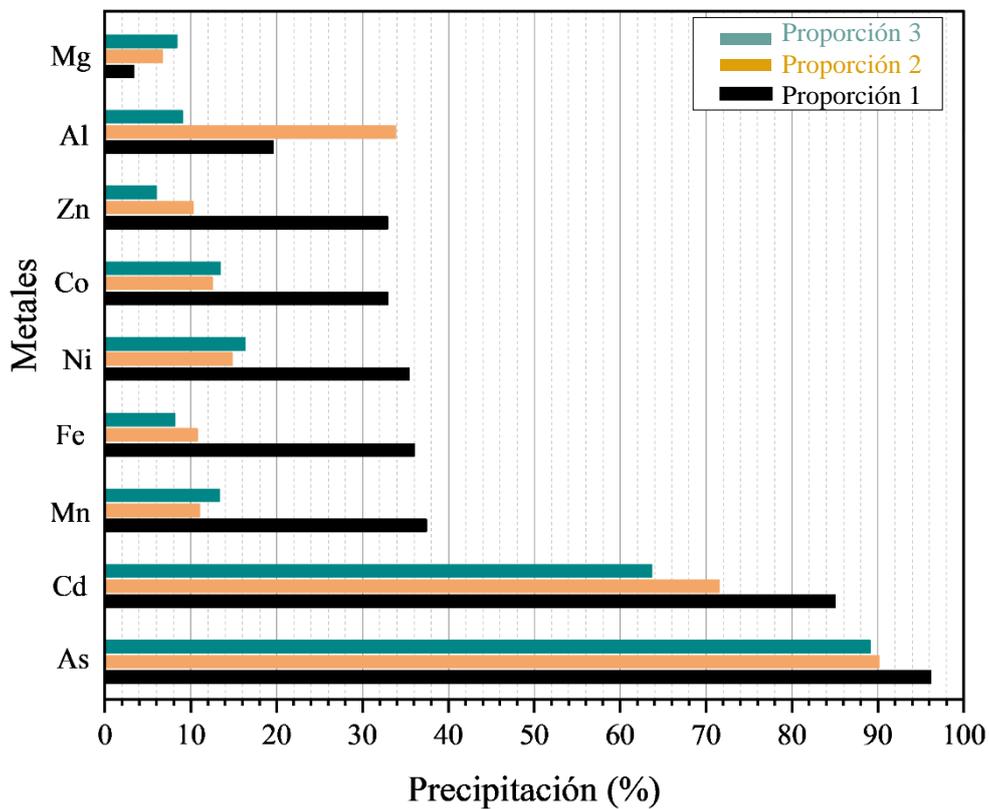


Figura 21. Precipitación media de metales en función de cada proporción aplicada en el ensayo de precipitación de metales sobre un DAMS con acetato

En los cultivos con glicerol, luego de 140 días de ensayo, se observó que los metales precipitaron de forma variable en las 3 proporciones evaluadas. La proporción 2 mostró mayor precipitación de As, Cd y Fe. La proporción 3 promovió la precipitación Ni, Al y Co. Por último, la proporción 1 mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), debido a que logró de forma integral la precipitación de la mayoría de los metales, en porcentajes superiores al 80% (Figura 22).

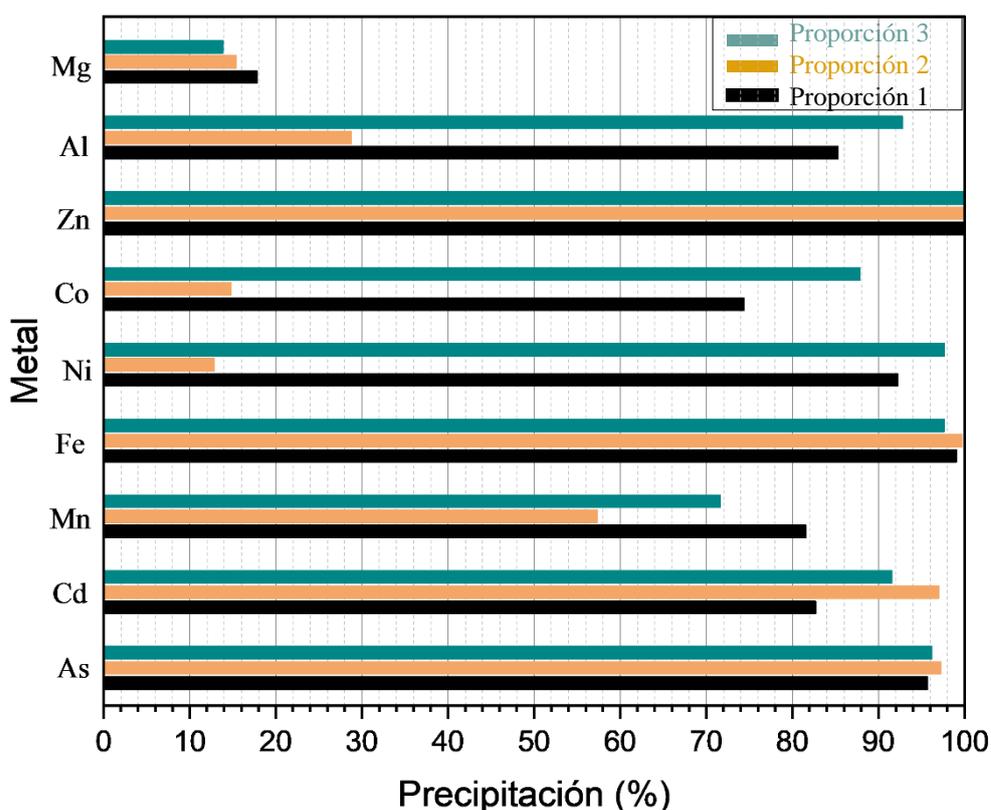


Figura 22. Precipitación media de metales en función de cada proporción aplicada en el ensayo de precipitación de metales sobre un DAMS con glicerol.

4.1.3.4. Monitoreo de la producción de coloides portadores

No se detectaron coloides portadores en ninguno de las proporciones luego de 140 días de incubación.

4.1.4. Cuantificación del genes

En cuanto a la cuantificación del gen *dsrA*, en los cultivos con acetato, la cuantificación final disminuye en la proporción 1 y 2, mientras que en la proporción 3 aumentó alcanzando 0.44 copias/ μ L. En los cultivos con glicerol, se observó un aumento de la cuantificación final, terminando con una concentración homogénea entre proporciones, alcanzando un valor máximo de 0.38 copias/ μ L en la proporción 3 (Figura 23).

En cuanto a la cuantificación del gen ARNr 16S, se observa que en los cultivos con acetato (Figura 24), la cuantificación final disminuye en las proporciones 2 y 1, mientras que en la proporción 3 hay un aumento significativo. En los cultivos con glicerol (Figura 25), se registra un incremento en la cuantificación final de todas las proporciones, con valores especialmente altos en la proporción 3.

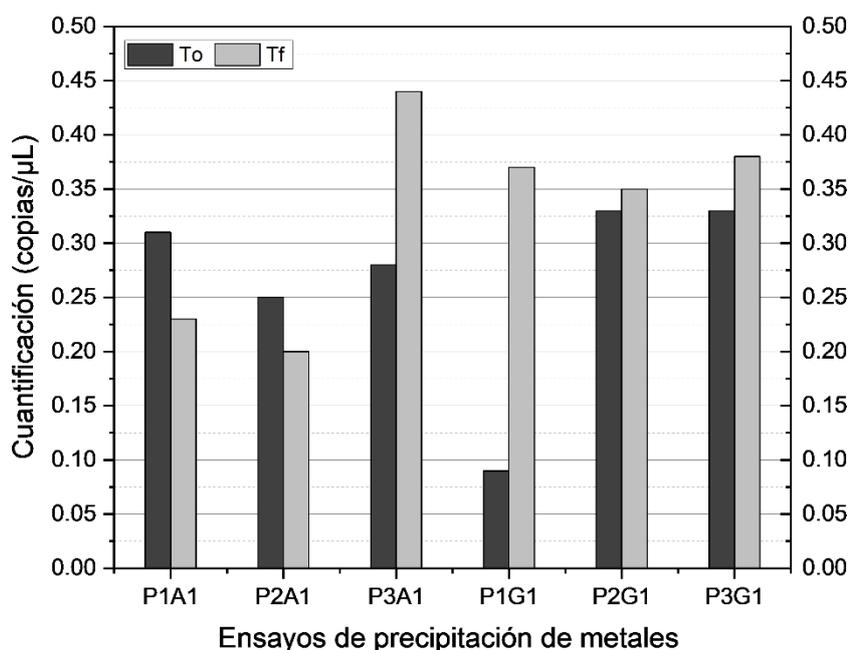


Figura 23. Cuantificación del gen *dsrA* en ensayo de precipitación de metales con acetato y glicerol. To = Tiempo inicial, muestra tomada el mismo día de la inoculación del DAMS, Tf = Tiempo final, muestra tomada cuando el ensayo concluyó a los 140 días, P1 = Proporción 1, P2 = Proporción 2, P3 = Proporción 3, A1 = Acetato 1, G1 = Glicerol 1.

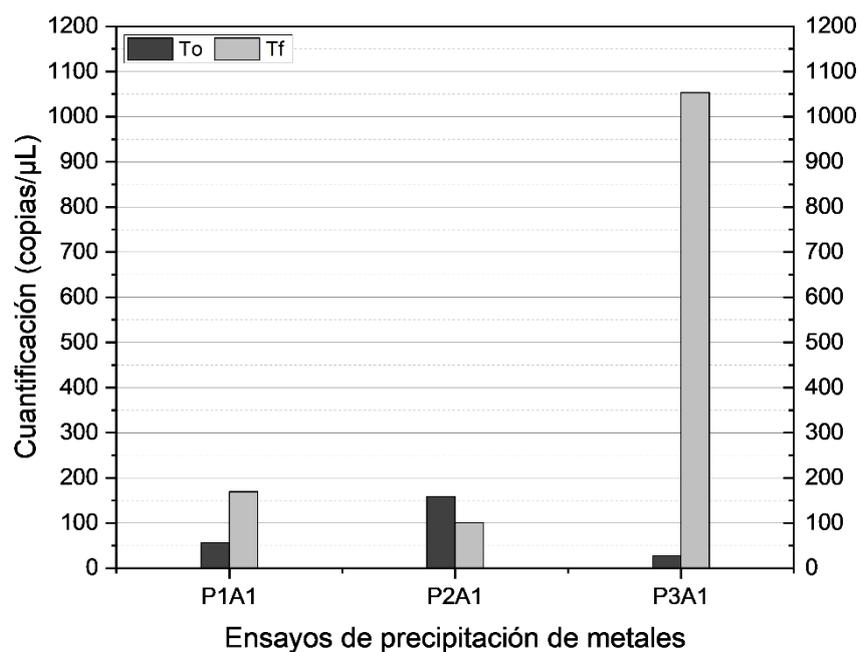


Figura 24. Cuantificación del gen ARNr 16S en ensayo de precipitación de metales con acetato. To = Tiempo inicial, muestra tomada el mismo día de la inoculación del DAMS, Tf = Tiempo final, muestra tomada cuando el ensayo concluyó a los 140 días, P1 = Proporción 1, P2 = Proporción 2, P3 = Proporción 3, A1 = Acetato 1.

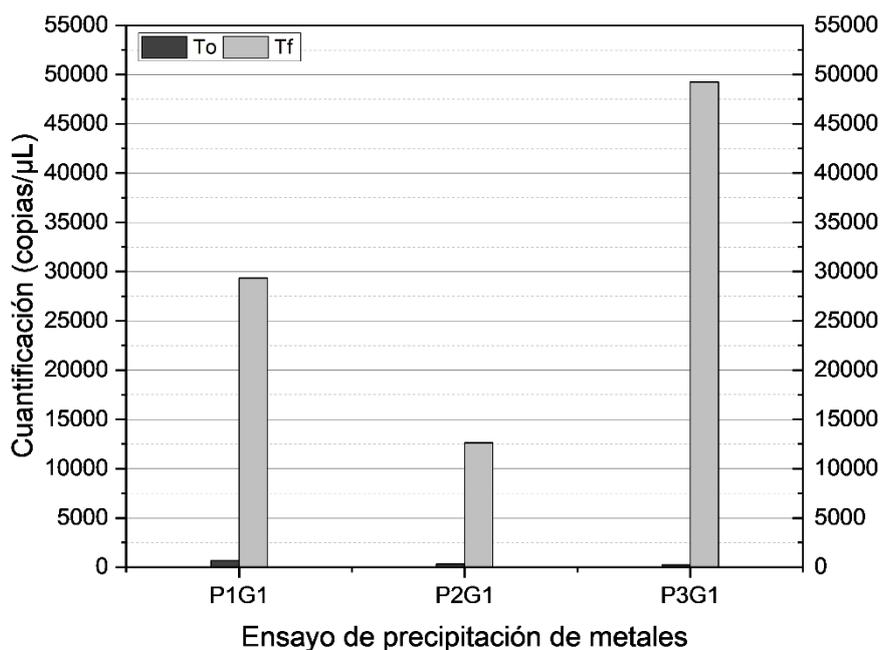


Figura 25. Cuantificación del gen ARNr 16S en ensayo de precipitación de metales con glicerol. To = Tiempo inicial, muestra tomada el mismo día de la inoculación del DAMS, Tf = Tiempo final, muestra tomada cuando el ensayo concluyó a los 140 días, P1 = Proporción 1, P2 = Proporción 2, P3 = Proporción 3, G1 = Glicerol 1.

4.2. Discusión

Características del túnel minero: un ambiente extremo

El túnel minero estudiado en la presente investigación se caracteriza por albergar condiciones extremas para la vida, tales como bajo pH (< 3.0) y altas concentraciones de metales pesados (p.e. Fe a 32.47 mM). La presencia de estos elementos permite la adaptación y establecimiento de poblaciones microbianas especializadas, con intervención clave en los ciclos biogeoquímicos, por ejemplo, oxidantes/reductores de hierro (p.e. *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis*, *Desulfuromonas acetoxidans*) y azufre (*Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Desulfotomaculum spp.*) (González-Toril et al., 2011; Muyzer & Stams, 2008) . Es importante mencionar que algunos de estos grupos microbianos pueden tener roles en la atenuación natural (elevación del pH y precipitación de metales) de estos mismos ambientes, pudiendo ser empleados en procesos biotecnológicos tales como la biominería y/o biorremediación (Ñancuqueo & Johnson, 2012b).

Los metales encontrados en agua del DAM tales como hierro, zinc, manganeso y aluminio son usualmente reportados como parte de otros minerales (Tabla 1), por ejemplo, el hierro se encuentra como sulfuro de hierro (FeS_2 , pirita), el Zinc como sulfuro de zinc (ZnS , esfalerita), el manganeso como silicato de manganeso (MnSiO_3 , rodonita) y el aluminio como silicato de aluminio hidratado ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$, caolinita) (Souksen J. et al., 1998).

Actividad del CMS acidófilo

El CMS acidófilo obtenido con glicerol como fuente de carbono y donador de electrones mostró la capacidad de elevar el pH (de 3.8 a 5.98) del medio, así como de producir sulfuro (hasta 7.79 mM). Esta investigación ha encontrado mejores resultados que otras investigaciones como las de Valdez-Nuñez et al., 2022 y González et al., 2019, las cuales

han empleado una metodología similar a la aplicada en esta investigación, dichos autores emplearon 5 y 3 mM de glicerol respectivamente, pero tan solo lograron un máximo incremento de pH en torno a 5.4 y una producción de sulfuros menor 5.4. El hecho de haber obtenido un CMS acidófilo con la capacidad de emplear glicerol como fuente de carbono corrobora que la mayoría de estos organismos sulfato reductores son oxidantes incompletos y tan solo oxidan el glicerol hasta acetato (Gao et al., 2023). Esto podría ser relevante, puesto que el empleo de fuentes tales como el glicerol aseguran la reproducibilidad de los experimentos, debido a que este compuesto es más económico, ya que suele ser obtenido como un subproducto de la industria del biodiesel (Kosamia et al., 2020), asegurando que este ensayo pueda ser replicado en futuras investigaciones o incluso en la aplicación *in situ* de esta técnica.

Los resultados favorables en la reducción de sulfato utilizando glicerol, en comparación con el acetato, pueden explicarse por el comportamiento de estos compuestos a bajo pH. El glicerol presenta toxicidad significativamente menor en estas condiciones, ya que no es un compuesto iónico, lo que lo convierte en un donador de electrones más adecuado para ambientes ácidos. Por el contrario, el acetato se vuelve tóxico a bajo pH debido a su protonación, que provoca la transición de su forma iónica (CH_3COO^-) a su forma ácida (CH_3COOH), una vez que ingresa a la célula provoca la acidificación del citoplasma, volviendo inviable al subsistencia del microorganismo. Es importante mencionar que la acidificación del citoplasma puede inhibir enzimas esenciales para la reducción de sulfatos, como la sulfito reductasa. Además, la acumulación de acetato propicia las condiciones necesarias para que exista competencia con otros grupos microbianos como los metanogénicos, disminuyendo aún más la efectividad del proceso de sulfato reducción. Estos efectos combinados hacen del acetato un donador de electrones menos

favorable en comparación al glicerol, especialmente en ambientes ácidos donde la eficiencia del proceso suele ser afectada por este parámetro (Kaksonen & Puhakka, 2007; Ma et al., 2017; Madigan et al., 2015; Valdez-Nuñez et al., 2024)

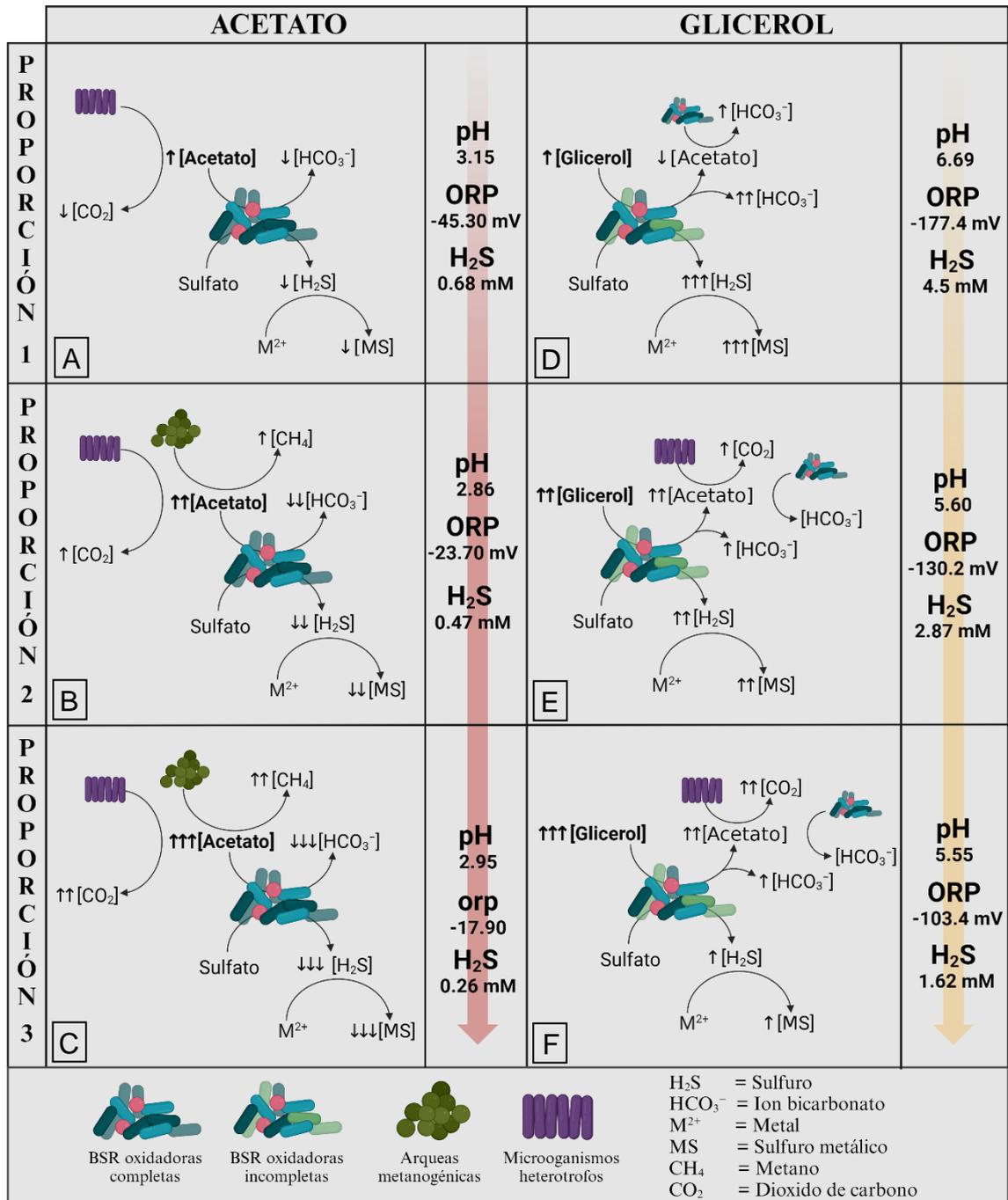


Figura 26. Esquema de discusión del efecto de cada proporción sobre la actividad de los CMS. A) Proporción 1 con acetato, B) Proporción 2 con acetato, C) Proporción 3 con acetato, D) Proporción 1 con glicerol, E) Proporción 2 con glicerol, F) Proporción 3 con glicerol. * Composición propia basada en (Valdez-Nuñez et al., 2024; Andrade et al., 2013; Christiane Dahl & Cornelius G. Friedrich, 2013; Liamleam & Annachhatre, 2007; Muyzer & Stams, 2008; Nancucheo & Johnson, 2012a, 2012b; Sharma et al., 2016; Wakao et al., 2002;)

Ensayo de precipitación de metales con acetato

El ensayo de precipitación de metales con acetato no produjo cambios notables respecto al pH y ORP en ninguna de las 3 proporciones empleadas a pesar de haber sido inoculado 2 veces con los CMS acidófilos. En nuestro estudio, la concentración de acetato en el medio varió entre 23,84, 47.68 y 71.52 mM para la proporción 1, 2 y 3 respectivamente. Campos-Quevedo et al., (2021), reportó que las concentraciones de acetato superiores a 10 mM no son favorables para la reducción sulfato. Como se mencionó antes el acetato en altas concentraciones suele ser tóxico para los microorganismos sulfato reductores, debido a que a bajo pH se protona y se convierte en ácido acético y al ingresar al interior de la célula este compuesto libera protones que acidifican el medio intracelular. Por consiguiente, nuestros hallazgos corroboran que este metabolismo pudo haberse inhibido por las altas concentraciones de acetato en el medio. No obstante, la búsqueda de nuevos microorganismos o consorcios de sulfato reductores con capacidad de tolerar y metabolizar altas concentraciones de acetato sigue vigente, debido a la capacidad que tienen de reducir la toxicidad por subproducto además del bajo costo que implica la utilización de este sustrato (Egas et al., 2024) .

Durante el ensayo de precipitación de metales con acetato, el ORP no superó los -40 mV (Figura 26A), lo que implica una limitación fisicoquímica para que ocurra la sulfato reducción (> -100 mV). Esto se debe probablemente a la toxicidad del acetato producida por el bajo pH, dificultando su oxidación, e impidiendo la transferencia de electrones necesarios para la sulfato reducción. Como resultado, el medio no se vuelve lo suficientemente electronegativo para favorecer el metabolismo sulfidogénico (Xu & Chen, 2020).

El monitoreo de la concentración de sulfato muestra una reducción de este analito, este evento implica que, a pesar de la inhibición causada por las altas concentraciones de acetato, ocurrió un consumo de sulfato por el CMS acidófilo. Es importante recalcar que las 3 proporciones presentaron diferentes comportamientos. La proporción 2 fue el que redujo la mayor cantidad de sulfato (de 53.75 a 28.90 mM), y se encontró que el consumo de sulfato se dio de siguiente manera: proporción 2 > proporción 1 > proporción 3. La proporción 2 fue la que redujo la mayor cantidad de sulfato de 53.75 a 28.90 mM (Figura 26B). A pesar de ello, este evento no fue suficiente para generar una adecuada concentración de sulfuro biogénico, el cual se esperaba llegase a aumentar con conforme el paso del tiempo de incubación.

El consumo del sulfato se justifica en la sulfato reducción lenta, la cual ya ha sido descrita por otros autores, como Geets et al., 2005, quien encontró que los ensayos de precipitación de metales configurados con acetato en batch no mostraron más del 33% de eliminación de SO_4^{2-} , incluso después de 24 semanas (168 días). Sin embargo, como se mencionó antes este ensayo se realizó con la finalidad de obtener un consorcio microbiano rico en microorganismos sulfato reductores oxidadores completos que no tengan problemas para metabolizar el acetato y reducir eficientemente el sulfato.

El consumo de acetato durante el ensayo de precipitación de metales contrasta la presencia de otros grupos microbianos consumidores de este sustrato. Se encontró que el consumo de acetato se dio de la siguiente forma: proporción 3 > proporción 2 > proporción 1, este comportamiento corrobora la presencia de grupos microbianos alternativos capaces de metabolizar el acetato y que no necesariamente se trata de BSRa (Ma et al., 2017). Entre los microorganismos que podrían estar presentes consumiendo el

acetato se encuentran bacterias heterótrofas como *Acidocella aromatica*, *Acidobacterium sp.*, *Acidiphilium sp.*, que son conocida por prosperar en ambientes ácidos y en el caso particular de las concentraciones más elevadas de acetato como en la proporción 2 y 3 se favorecen las condiciones para la reactivación y proliferación de arqueas metanogénicas (Figura 26A, 26B, 26C). Estos microorganismos desempeñan un papel importante en la degradación de materia orgánica a bajo pH, complementando la actividad de las bacterias sulfato reductoras (Sharma et al., 2016 ; Wakao et al., 2002; Ñancuqueo & Johnson, 2012).

Respecto a la concentración de metales precipitados, se pudo observar principalmente la precipitación de arsénico y el cadmio, las tres proporciones precipitaron aproximadamente el 90 % de estos metales y se encontró que la precipitación de metales se dio de la siguiente forma: proporción 1 > proporción 2 > proporción 3. Los metales tales como el hierro, zinc, aluminio y magnesio, precipitaron por debajo del 35 %, probablemente porque, hubo una producción de sulfuros muy baja, y la otra opción que hace posible este fenómeno es el arrastre de sulfuros realizados durante las inoculaciones, tal y como se plantea en otros estudios como el de Mikhailova et al., (2015), finalmente en ambos supuestos la concentración de sulfuros no fue suficiente para precipitar todos los metales presentes.

El ensayo de precipitación de metales con acetato estuvo limitado por su toxicidad a bajo pH, lo que impidió el establecimiento del CMS acidófilo. Aunque se detectó consumo de sulfato, y al mismo tiempo esta evidencia indica actividad metabólica de bacterias sulfato reductoras, la precipitación de metales observada aparentemente está relacionada con la introducción de sulfuros durante las inoculaciones realizadas a manera de

bioaumentación. Este hallazgo sugiere que la precipitación no fue únicamente el resultado de la actividad microbiana sulfogénica continua, sino también de factores externos que pudieron haber distorsionado los resultados. Dado este escenario, es evidente que el experimento con acetato requiere ser estudiado a profundidad. Para optimizar los resultados, se debería reducir la concentración inicial de acetato para minimizar su toxicidad en condiciones de pH bajo, o considerar su uso en sistemas donde el pH sea más elevado y la toxicidad sea baja o nula. Esto permitiría evaluar de manera más precisa el potencial del acetato como donador de electrones en la biorremediación de drenajes ácidos de mina empleando consorcios microbianos, asegurando que la precipitación de metales se deba predominantemente a procesos biogénicos sostenibles.

Ensayo de precipitación de metales con glicerol

Los experimentos de precipitación de metales con glicerol como donador de electrones brindaron resultados positivos en cuanto a la reducción de sulfato (elevación de pH y disminución del ORP), y precipitación de metales, especialmente, luego de realizar inoculaciones adicionales (bioaumentación) (Figura 12 - 14). En cuanto al pH, la proporción 1 fue el más eficiente pues alcanzó valores de hasta 6.69, mientras que las proporciones 2 y 3 elevaron el pH tan solo hasta 5.60 y 5.55 respectivamente. Estos resultados estarían directamente relacionado con la viabilidad del CMS acidófilo y la acumulación de subproductos de la oxidación incompleta del glicerol como lo es el acetato. Esto se contrastó al cuantificar el acetato producido en cada proporción (Gráfico 13), pues la cuantificación de este analito en la proporción 1 fue notable hasta el día 56 del experimento, desapareciendo luego, estos resultados se contrastan se pueden justificar con la presencia de BSR oxidadores completas, que son capaces de metabolizar el acetato conforme se va produciendo o acumulando (Figura 26D)(Muyzer & Stams, 2008). Lo

contrario ocurrió con las proporciones 2 y 3 que mostraron presencia de acetato hasta en la última medición, probablemente esto ocurrió por la acumulación de acetato y la aparición de otros grupos microbianos heterótrofos capaces de consumir el acetato (Figura 26E, 26F) (Kimura et al., 2006). Estos hallazgos sugieren que la proporción 1 podría ofrecer una estrategia más eficiente para la biorremediación en sistemas con condiciones similares, optimizando la neutralización de la acidez y la precipitación de metales, lo que podría tener implicaciones significativas para el tratamiento de aguas contaminadas y la gestión ambiental.

La disminución del gen *dsrA* en cultivos con acetato sugiere una menor actividad de las BSR, probablemente debido a la inhibición del metabolismo de acetato en condiciones de bajo pH (Sánchez-Andrea et al., 2022), lo que afectó la capacidad de precipitar metales. Aunque en la proporción 3 se encontró una mayor cuantificación del gen *dsrA*, no se ha encontrado evidencias bibliográficas que lo respalden, además de ello este evento no se acompaña con los resultados del incremento del pH, consumo de sulfato, producción de sulfuros ni mucho menos con la precipitación de metales, esta sumatoria de evidencias sugieren un error en la cuantificación de este gen en la proporción 3. En contraste, los cultivos con glicerol mostraron un aumento en la actividad sulfidogénica y una mayor precipitación de metales, indicando que el glicerol favorece la reducción de sulfato mediada por un aumento de la biomasa microbiana, esta evidencia al mismo tiempo fundamentada en un aumento de la cuantificación del gen *dsrA*.

Respecto al gen ARNr 16S, los cultivos con acetato mostraron baja cuantificación en las proporciones 1 y 2, sugiriendo que las BSR probablemente entraron en la fase estacionario o de muerte respecto a la curva del crecimiento microbiano, mientras que en

la proporción 3, la inhibición de BSR permitió la proliferación de otros microorganismos, como fermentadores de acetato y archaeas metanogénicas (Figura 26 A, 26B y 26C) (Ma et al., 2017; Valdez-Nuñez et al., 2022). En contraste, el glicerol promovió una mayor actividad de las BSR y un crecimiento general de la biomasa de la comunidad microbiana en todas las proporciones, por ello el aumento en la cuantificación del gen en cuestión, este evento se respalda también en el aumento de la cuantificación del gen *dsrA*.

La cuantificación de acetato entre las distintas proporciones con glicerol puede explicarse por la presencia y actividad de diferentes microorganismos en cada una de ellas. En la proporción 1, donde se observó la desaparición del acetato en la última medición, es probable que hayan predominado microorganismos fermentadores, como algunas especies de *Acidocella sp.*, que son capaces de oxidar el acetato en condiciones ácidas y anaerobias (Kimura et al., 2006). Estos microorganismos podrían haber consumido el acetato producido, evitando su acumulación y permitiendo una mayor eficiencia en la elevación del pH y la precipitación de metales. Por otro lado, en las proporciones 2 y 3, la presencia de acetato en la última medición implica la ocurrencia de microorganismos fermentadores tales como *Clostridium sp.*, lo que generó la acumulación de este subproducto. Esta acumulación podría haber limitado el aumento del pH, inhibiendo parcialmente la actividad de las bacterias sulfato-reductoras debido a la toxicidad del acetato en condiciones de bajo pH (Ñancuqueo & Johnson, 2012).

En cuanto a la producción de sulfuros, se determinó sulfuro biogénico en las 3 proporciones (Figura 6), sin embargo, la proporción 1 presentó la mayor producción de sulfuros a diferencia de las proporciones 2 y 3 a pesar de tener mayor concentración de glicerol. A causa de la mayor producción de sulfuro en la proporción 1 se logró una mayor

precipitación de metales en la misma proporción (Gráfico 17), mientras que en las otras proporciones con mayor concentración de glicerol se generó también una mayor producción de acetato, este fenómeno antes discutido genera toxicidad, lo que redujo la eficiencia de las otras dos proporciones para la producción de sulfuros y precipitación de metales.

Después de 140 días de incubación, las 3 proporciones precipitaron todos los metales analizados sobre un 70 % (tabla 17). Se encontró que la forma en que se precipitaron los metales fue de la siguiente forma: Proporción 1 > proporción 2 > proporción 3. Esto se contrasta con la cuantificación de sulfuros encontrado en cada proporción, debido a que la producción de sulfuros es directamente proporcional a la precipitación de metales ya que por cada mol de sulfuro producido precipita un mol de un metal determinado (Kaksonen & Puhakka, 2007).

La proporción 1 fue el más eficiente en la precipitación de metales, alineándose con estudios previos (Bertolino et al., 2014; Ilin et al., 2022), los cuales identificaron que la proporción teórica óptima de glicerol (0.67 moles de glicerol/mol de sulfato) era idónea. La obtención de estos resultados implica que aplicar dicha proporción es suficiente para promover la reducción de sulfato para la biorremediación del DAM aun cuando se emplea consorcios microbianos. Dentro de las ventajas de emplear esta proporción, se podría mencionar que existe una reducción en la producción de acetato limitando su toxicidad.

El uso de glicerol en la biorremediación de drenajes ácidos de minas (DAM) es ventajoso debido a su bajo costo y disponibilidad como subproducto industrial. Cuando se utiliza en la proporción adecuada con sulfato, maximiza la eficiencia de la reducción de sulfato

y minimiza la producción de subproductos indeseables como el acetato. Esto no solo favorece la actividad de las bacterias sulfato reductoras, sino que también optimiza la precipitación de metales, haciendo del glicerol un sustrato ideal para la biorremediación de DAMs a un costo operativo reducido.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

La proporción 1 de glicerol y sulfato utilizada por los consorcios microbianos sulfidogénicos acidófilos, es óptima para la precipitación de metales en DAMS. Con esta proporción se logró precipitar todos los metales, clasificados en: (i) aquellos que precipitaron al 100%, como el Zn; (ii) aquellos que presentaron una precipitación superior al 90%, como el Fe (99.04%), As (95.67%) y Ni (92.21%); (iii) aquellos que alcanzaron una precipitación superior al 80%, como el Al (85.24%), Cd (82.67%) y Mn (81.55%); y (iv) aquellos que tuvieron una precipitación inferior al 80%, como el Co (74.33%) y el Mg (17.78%).

Los consorcios microbianos sulfidogénicos acidófilos demostraron ser capaces de utilizar tanto glicerol como acetato como donadores de electrones, aunque el glicerol resultó ser óptimo, logrando un incremento del pH hasta 6.69 y una mayor expresión del gen *dsA*, lo que indicó un aumento en la biomasa microbiana y una mejora en la precipitación de metales. Por otro lado, el acetato, en concentraciones elevadas y a bajo pH, mostró toxicidad para los consorcios sulfidogénicos acidófilos, lo que se reflejó en una disminución en la expresión del gen *dsA* y una precipitación de metales menor.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios preliminares para determinar la concentración máxima de acetato que las BSR pueden tolerar sin inhibir su actividad. Esto permitirá evitar la inhibición del metabolismo bacteriano y asegurar una mayor eficiencia en la reducción de sulfato.

Se sugiere llevar a cabo un proceso de adaptación gradual de los CMS acidófilos a concentraciones más altas de acetato. Este proceso de adaptación podría incrementar la tolerancia de los microorganismos al acetato, permitiendo su uso en condiciones donde este sustrato esté presente en concentraciones elevadas.

Considerando que el pH afecta significativamente la eficacia del acetato como donador de electrones, se recomienda evaluar su uso con valores de pH superiores a los investigados en este estudio. Esto podría revelar un rango de pH óptimo para el uso del acetato en biorremediación.

Se recomienda la implementación y evaluación de biorreactores de flujo continuo para la remediación de DAM. Este tipo de sistema podría proporcionar un control más eficiente sobre las condiciones operativas y mejorar la estabilidad del proceso de biorremediación a largo plazo, favoreciendo la reducción continua de sulfato en ambientes contaminados.

LISTA DE REFERENCIAS

- Alazard, D., Joseph, M., Battaglia-Brunet, F., Cayol, J. L., & Ollivier, B. (2010). *Desulfosporosinus acidiphilus* sp. nov.: A moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments. *Extremophiles*, 14(3), 305–312. <https://doi.org/10.1007/s00792-010-0309-4>
- Andrade, V., Ochoa-Herrera, V., & Ochoa-Herrera, A. (2013). *Effect of the substrate as electron donor during the microbial sulfate reduction and its possible applications in the biological treatment of acid mine drainage C31-C38* (Vol. 5, Issue 1). Pags. <http://www.usfq.edu.ec/Publicaciones/Avances/>
- Bekmezci, O. K., Ucar, D., Kaksonen, A. H., & Sahinkaya, E. (2011). Sulfidogenic biotreatment of synthetic acid mine drainage and sulfide oxidation in anaerobic baffled reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 189(3), 670–676. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.087>
- Bertolino, S. M., Melgaço, L. A., Sá, R. G., & Leão, V. A. (2014). Comparing lactate and glycerol as a single-electron donor for sulfate reduction in fluidized bed reactors. *Biodegradation*, 25(5), 719–733. <https://doi.org/10.1007/s10532-014-9694-1>
- Campos-Quevedo, N. G., Sánchez-Andrea, I., López-Lozano, N. E., Stams, A. J. M., & Celis, L. B. (2021). In search of sulfate-reducing consortia able to degrade acetate under acidic conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 96(5), 1228–1236. <https://doi.org/10.1002/jctb.6635>
- Chai, G., Wang, D., Zhang, Y., Wang, H., Li, J., Jing, X., Meng, H., Wang, Z., Guo, Y., Jiang, C., Li, H., & Lin, Y. (2023). Effects of organic substrates on sulfate-reducing microcosms treating acid mine drainage: Performance dynamics and

- microbial community comparison. *Journal of Environmental Management*, 330. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.117148>
- Chaparro, T. (2015). Drenajes ácidos de mina: formación y manejo. In *Junio Bucaramanga-Colombia Revista ESAICA* (Vol. 1). https://www.researchgate.net/publication/296639939_Drenajes_acidos_de_mina_formacion_y_manejo/fulltext/56eb7fe008ae9dcdd82acbc5/Drenajes-acidos-de-mina-formacion-y-manejo.pdf
- Christiane Dahl, & Cornelius G. Friedrich. (2013). Microbial sulfur metabolism. *Springer*. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-540-72682-1>
- Cline, J. (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in Natural Waters. *Department of Oceanography, University of Washington, Seattle*. <https://doi.org/10.4319/lo.1969.14.3.0454>
- Dhir, B. (2018). Acid mine drainage: biotechnological tools for remediation of acid mine drainage (removal of metals from wastewater and leachate). *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812986-9.00004-X>
- Egas, R. A., Sahonero-Canavesi, D. X., Bale, N. J., Koenen, M., Yildiz, Ç., Villanueva, L., Sousa, D. Z., & Sánchez-Andrea, I. (2024). Acetic acid stress response of the acidophilic sulfate reducer *Acididesulfobacillus acetoxydans*. *Environmental Microbiology*, 26(2). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16565>
- Gao, P., Zhang, X., Huang, X., Chen, Z., Marietou, A., Holmkvist, L., Qu, L., Finster, K., & Gong, X. (2023). Genomic insight of sulfate reducing bacterial genus *Desulfofaba* reveals their metabolic versatility in biogeochemical cycling. *BMC Genomics*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09297-2>

- Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., & Vanbroekhoven, K. (2006). DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.11.002>
- Geets, J., Borremans, B., Vangronsveld, J., Diels, L., & van der Lelie, D. (2005). Molecular monitoring of SRB community structure and dynamics in batch experiments to examine the applicability of in situ precipitation of heavy metals for groundwater remediation. *Journal of Soils and Sediments*, 5(3), 149–163. <https://doi.org/10.1065/jss2004.12.125>
- González, D., Liu, Y., Villa Gomez, D., Southam, G., Hedrich, S., Galleguillos, P., Colipai, C., & Nancucheo, I. (2019). Performance of a sulfidogenic bioreactor inoculated with indigenous acidic communities for treating an extremely acidic mine water. *Minerals Engineering*, 131, 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2018.11.011>
- González-Toril, E., Águilera, Á., Souza-Egipsy, V., Pamo, E. L., España, J. S., & Amils, R. (2011). Geomicrobiology of La Zarza-Perrunal acid mine effluent (Iberian Pyritic Belt, Spain). *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2685–2694. <https://doi.org/10.1128/AEM.02459-10>
- Gupta, A., & Sar, P. (2020). Characterization and application of an anaerobic, iron and sulfate reducing bacterial culture in enhanced bioremediation of acid mine drainage impacted soil. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 55(4), 464–482. <https://doi.org/10.1080/10934529.2019.1709362>
- Hou, D., Zhang, P., Wei, D., Zhang, J., Yan, B., Cao, L., Zhou, Y., & Luo, L. (2020). Simultaneous removal of iron and manganese from acid mine drainage by

- acclimated bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 396.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122631>
- Ilin, A. M., van der Graaf, C. M., Yusta, I., Sorrentino, A., Sánchez-Andrea, I., & Sánchez-España, J. (2022). Glycerol amendment enhances biosulfidogenesis in acid mine drainage-affected areas: An incubation column experiment. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.978728>
- Jiao, Y., Zhang, C., Su, P., Tang, Y., Huang, Z., & Ma, T. (2023). A review of acid mine drainage: Formation mechanism, treatment technology, typical engineering cases and resource utilization. In *Process Safety and Environmental Protection* (Vol. 170, pp. 1240–1260). Institution of Chemical Engineers.
<https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.12.083>
- Johnson, D. B., & Hallberg, K. B. (2005). Acid mine drainage remediation options: A review. *Science of the Total Environment*, 338(1-2 SPEC. ISS.), 3–14.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.09.002>
- Kaksonen, A. H., & Puhakka, J. A. (2007). Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. In *Engineering in Life Sciences* (Vol. 7, Issue 6, pp. 541–564).
<https://doi.org/10.1002/elsc.200720216>
- Kimura, S., Hallberg, K. B., & Johnson, D. B. (2006). Sulfidogenesis in low pH (3.8–4.2) media by a mixed population of acidophilic bacteria. *Biodegradation*, 17(2), 159–167. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-3050-4>
- Kosamia, N. M., Samavi, M., Uprety, B. K., & Rakshit, S. K. (2020). Valorization of biodiesel byproduct crude glycerol for the production of bioenergy and biochemicals. *Catalysts*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/catal10060609>

- Le Pape, P., Battaglia-Brunet, F., Parmentier, M., Joulain, C., Gassaud, C., Fernandez-Rojo, L., Guigner, J. M., Ikogou, M., Stetten, L., Olivi, L., Casiot, C., & Morin, G. (2017). Complete removal of arsenic and zinc from a heavily contaminated acid mine drainage via an indigenous SRB consortium. *Journal of Hazardous Materials*, 321, 764–772. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.09.060>
- Liamleam, W., & Annachhatre, A. P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. In *Biotechnology Advances* (Vol. 25, Issue 5, pp. 452–463). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.05.002>
- Liu, J., Sui, Y., Yu, Z., Yao, Q., Shi, Y., Chu, H., Jin, J., Liu, X., & Wang, G. (2016). Diversity and distribution patterns of acidobacterial communities in the black soil zone of northeast China. *Soil Biology and Biochemistry*, 95, 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.12.021>
- Lueders, T., Manefield, M., & Friedrich, M. W. (2004). Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology*, 6(1), 73–78. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00536.x>
- Ma, T. T., Liu, L. Y., Rui, J. P., Yuan, Q., Feng, D. S., Zhou, Z., Dai, L. R., Zeng, W. Q., Zhang, H., & Cheng, L. (2017). Coexistence and competition of sulfate-reducing and methanogenic populations in an anaerobic hexadecane-degrading culture. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0895-9>
- Madigan, M., Southern, J. M. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock biology of microorganisms* (15th ed.).

<https://www.pearson.com/en-gb/subject-catalog/p/brock-biology-of-microorganisms-global-edition/P200000004789/9781292740744>

- Maisch, M., Lueder, U., Laufer, K., Scholze, C., Kappler, A., & Schmidt, C. (2019). Contribution of microaerophilic iron(II)-oxidizers to iron(III) mineral formation. *Environmental Science and Technology*, *53*(14), 8197–8204. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01531>
- Mansor, M., Berti, D., Hochella, M. F., Murayama, M., & Xu, J. (2019). Phase, morphology, elemental composition, and formation mechanisms of biogenic and abiogenic Fe-Cu-sulfide nanoparticles: A comparative study on their occurrences under anoxic conditions. *American Mineralogist*, *104*(5), 703–717. <https://doi.org/10.2138/am-2019-6848>
- Mansor, M., Winkler, C., Hochella, M. F., & Xu, J. (2019). Nanoparticulate nickel-hosting phases in sulfidic environments: Effects of ferrous iron and bacterial presence on mineral formation mechanism and solid-phase nickel distribution. *Frontiers in Earth Science*, *7*. <https://doi.org/10.3389/feart.2019.00151>
- Mansor, M., & Xu, J. (2020). Benefits at the nanoscale: a review of nanoparticle-enabled processes favouring microbial growth and functionality. In *Environmental Microbiology* (Vol. 22, Issue 9, pp. 3633–3649). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15174>
- Mikhailova, A. N., Faiberg, A. A., Gudkov, S. S., & Dementev, V. Ye. (2015). New technology of base metals precipitation with hydrogen sulfide obtained using *Desulfurella acetivorans* and *Desulfurella kamchatkenis*. *Advanced Materials Research*, *1130*, 477–481. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.1130.477>

- Muyzer, G., & Stams, A. J. M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 6, Issue 6, pp. 441–454). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>
- Ñancucheo, I., & Johnson, D. B. (2012a). Acidophilic algae isolated from mine-impacted environments and their roles in sustaining heterotrophic acidophiles. *Frontiers in Microbiology*, 3(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00325>
- Ñancucheo, I., & Johnson, D. B. (2012b). Selective removal of transition metals from acidic mine waters by novel consortia of acidophilic sulfidogenic bacteria. *Microbial Biotechnology*, 5(1), 34–44. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00285.x>
- Nogueira, E. W., Gouvêa de Godoi, L. A., Marques Yabuki, L. N., Brucha, G., & Zamariolli Damianovic, M. H. R. (2021). Sulfate and metal removal from acid mine drainage using sugarcane vinasse as electron donor: Performance and microbial community of the down-flow structured-bed bioreactor. *Bioresource Technology*, 330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124968>
- Rabus, R., Venceslau, S. S., Wöhlbrand, L., Voordouw, G., Wall, J. D., & Pereira, I. A. C. (2015). A post-genomic view of the ecophysiology, catabolism, and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 66, pp. 55–321). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2015.05.002>
- Rambabu, K., Banat, F., Pham, Q. M., Ho, S. H., Ren, N. Q., & Show, P. L. (2020). Biological remediation of acid mine drainage: Review of past trends and current outlook. In *Environmental Science and Ecotechnology* (Vol. 2). Editorial Board, Research of Environmental Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.es.2020.100024>

- Rückert, C. (2016). Sulfate reduction in microorganisms — recent advances and biotechnological applications. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 33, pp. 140–146). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.007>
- Salo, M., & Bomberg, M. (2022). Sulfate-reducing bioreactors subjected to high sulfate loading rate or acidity: variations in microbial consortia. *AMB Express*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01438-2>
- Sánchez-Andrea, I., van der Graaf, C. M., Hornung, B., Bale, N. J., Jarzembowska, M., Sousa, D. Z., Rijpstra, W. I. C., Sinninghe Damsté, J. S., & Stams, A. J. M. (2022). Acetate degradation at low pH by the moderately acidophilic sulfate reducer *Acididesulfobacillus acetoxydans* gen. nov. sp. nov. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.816605>
- Sharma, A., Parashar, D., & Satyanarayana, T. (2016). Acidophilic microbes: biology and applications. In *Grand Challenges in Biology and Biotechnology* (Vol. 1, pp. 215–241). Springer Science and Business Media B.V. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13521-2_7
- Souksen J., Rose A., Foreman J., Evans R., & HELLIER W. (1998). *Handbook of technologies for avoidance and remediation of acid mine drainage: acid drainage technology initiative (ADTI)*. <https://www.wvu.edu/files/d/c2e42b2b-e40d-4ada-8bad-3c264d867e76/99-handbook-avoidance-remediation.pdf>
- Tammy Cabrera, & Salvador Orrego. (2014). *Eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de hierro en drenaje ácido por consorcios bacterianos sulfato reductores tolerantes a la acidez, 2014*. <https://hdl.handle.net/20.500.12893/802>

- Tyagi, B., & Kumar, N. (2020). Bioremediation: Principles and applications in environmental management. In *Bioremediation for Environmental Sustainability: Toxicity, Mechanisms of Contaminants Degradation, Detoxification and Challenges* (pp. 3–28). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820524-2.00001-8>
- Ubaid, K. A., Zhang, X., Sharma, V. K., & Li, L. (2020). Fate and risk of metal sulfide nanoparticles in the environment. In *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 18, Issue 1, pp. 97–111). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00920-x>
- Valdez-Nuñez, L. F., Ayala-Muñoz, D., Sánchez-España, J., & Sánchez-Andrea, I. (2022). Microbial communities in Peruvian acid mine drainages: low-abundance sulfate-reducing bacteria with high metabolic activity. *Geomicrobiology Journal*, 39(10), 867–883. <https://doi.org/10.1080/01490451.2022.2087808>
- Valdez-Nuñez, L. F., Kappler, A., Ayala-Muñoz, D., Chávez, I. J., & Mansor, M. (2024). Acidophilic sulphate-reducing bacteria: Diversity, ecophysiology, and applications. In *Environmental microbiology reports* (Vol. 16, Issue 5, p. e70019). <https://doi.org/10.1111/1758-2229.70019>
- Wakao, N., Yasuda, T., Jojima, Y., Yamanaka, S., & Hiraishi, A. (2002). *Enhanced growth of Acidocella facilis and related acidophilic bacteria at high concentrations of aluminum* (Vol. 17, Issue 2). <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsme2/>
- Xu, Y. N., & Chen, Y. (2020). Advances in heavy metal removal by sulfate-reducing bacteria. *Water Science and Technology*, 81(9), 1797–1827. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.227>

APÉNDICES

Apéndice 1. Fichas de recolección de datos

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS		Código de muestra:
Fecha:	Punto de muestreo:	
Nombres del responsable		
pH del DAM		
Volumen de sedimento colectado		
Número de muestras colectadas		

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS		Código de microcosmo:	
Fecha			
Nombres del responsable			
pH			
Donador de electrones	glicerol	acetato	
Proporción [donador de electrones: sulfato]	[0.67:1]	[1:2]	[1:3]
Selección de consorcio microbiano sulfidogénico	SÍ	NO	
Ensayos de biorremediación			
pH [inicial final]			
Potencial de oxido-reducción [inicial final]			
Cuantificación de sulfuro biogénico [inicial final]			
Cuantificación de sulfuros metálicos [inicial final]			
Cuantificación de metales disueltos [inicial final]			
Coloides portadores (Presencia y cuantificación)	SÍ	NO	
Géneros microbianos encontrados			

Apéndice 2. Concentración de metales en el DAMS

Metal	mM
Aluminio	26.95
Arsénico	1.4
Cadmio	0.22
Cobalto	0.14
Potasio	0.66
Magnesio	17.73
Manganeso	31.33
Sodio	0.25
Níquel	0.14
Zinc	39.68
Hierro	32.47

Apéndice 3. Monitoreo de la actividad del CMS acidófilo

TIEMPO (días)	Tercer enriquecimiento pH 2.5							
		Ace 1	Ace 2	Ace 3	Gly 1	Gly 2	Gly 3	Gly 4
First (0 d)	pH	2.7	2.58	2.81	2.26	2.3	2.24	
	H₂S	Int	Int	Int	Int	Int	Int	
Second (4 d)	pH	4.42	4.3	4.44	3.05	3.52	3.19	
	H₂S	Int	Int	Int	Int	Int	Int	
Third (8 d)	pH	4.69	4.51	4.8	3.31	4.14	3.46	
	H₂S	Int	Int	Int	Int	Int	Int	
Fourth (12 d)	pH	4.88	4.73	4.84	3.14	4.69	3.61	
	H₂S	Int	Int	Int	Int	Int	Int	
Fifth (18 d)	pH	5.54	5.27	5.54	5.32	5.48	5.6	
	H₂S	Int	Int	Int	Int	Int	Int	
Primera transferencia pH 2.8								
First (0 d)	pH	4.26	4.37	4.53	2.82	3	2.92	
	H₂S	0.18	UR	0.17	0.13	0.16	0.18	
Second (4 d)	pH	4.97	4.67	5.05	3.25	3.46	3.77	
	H₂S	0.11	0.05	0.11	0.07	0.07	UR	
Third (8 d)	pH	4.93	4.61	5.08	2.9	3.27	3.67	
	H₂S	0.13	0.07	0.18	0.08	0.07	UR	
Fourth (12 d)	pH	4.85	4.69	5.08	2.78	3.57	4.6	
	H₂S	0.17	0.23	0.49	UR	0.11	0.12	
Fifth (16 d)	pH	5.21	4.99	5.24	2.93	4.55	4.92	
	H₂S	0.19	0.4	0.68	0.06	0.59	0.38	
	pH	5.34	5.38	5.32	3.04	5.01	5.02	

Sixth (20 d)	H₂S	0.24	0.41	0.75	0.07	0.8	0.52	
Seventh (24 d)	pH	5.65	5.53	5.4	2.99	5	5.09	
	H₂S	0.31	0.53	0.64	0.06	0.87	0.49	
Seventh (32 d)	pH	5.59	5.63	5.54	3.01	5.25	5.21	
	H₂S	0.31	0.65	1.65	0.06	0.71	0.59	
Segunda transferencia pH 2.8								
First (0 d)	pH	3.96	3.93	3.94	3.42	3.42	3.43	3.48
	H₂S	0.06	0.08	0.1	0.13	0.12	0.08	0.12
Second (7 d)	pH	4.31	4.12	4.18	3.65	3.67	3.73	3.94
	H₂S	UR						
Third (14 d)	pH	4.13	4.01	4.23	3.73	3.82	3.6	4.4
	H₂S	UR	UR	0.13	UR	0.07	UR	0.14
Fourth (21 d)	pH	4.28	4.08	4.97	5.59	5.78	5.77	D
	H₂S	UR	UR	0.46	0.31	0.95	0.73	D
Tercera transferencia pH 2.8								
First (0 d)	pH	3.85	4.05	3.75	4.17	3.9	3.86	4.24
	H₂S	0.05	0.05	0.06	UR	0.06	0.06	0.09
Second (7 d)	pH	3.93	4.11	3.84	4.47	4.52	4.56	4.71
	H₂S	UR	UR	UR	0.1	0.11	0.13	0.16
Third (14 d)	pH	3.97	4.25	4.33	5.55	5.54	5.67	5.64
	H₂S	UR	0.09	0.25	1.15	0.88	1.5	0.98
Fourth (21 d)	pH	4.04	4.58	4.98	5.77	5.8	5.86	5.88
	H₂S	UR	0.32	0.54	1.65	1.75	1.95	2.05
Fifth (52 d)	pH	5.61	5.44	5.72	5.98	6	6	5.97
	H₂S	0.9	0.86	0.89	2.5	1.8	1.8	1.7
*[H ₂ S] = muestras 100 veces diluidas, mg/L *int = interferencia *UR = Bajo el rango de detección (under range)								

Apéndice 4. Monitoreo de pH, ORP y producción de sulfuros del ensayo de precipitación de metales con acetato

		P1				P2				P3			
		P1A1	P1A2	P1A3	P1AC	P2A1	P2A2	P2A3	P2AC	P3A1	P3A2	P3A3	P3AC
M1	pH	2.98	2.88	2.91	2.95	3.15	3.06	3.00	2.98	3.24	3.23	3.18	2.93
	ORP	-9.60	-38.00	-33.90	-2.90	-36.40	32.80	-28.50	-5.60	-31.60	-37.40	-47.60	4.00
	H ₂ S	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR
M2	pH	2.83	2.75	2.80	2.68	2.88	2.89	2.79	2.73	2.91	2.94	2.90	2.68
	ORP	-1.10	-20.00	-34.90	3.20	-35.90	-40.90	-41.20	11.90	-51.30	-47.40	-45.70	9.90
	H ₂ S	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR
M3	pH	2.62	2.64	2.61	2.50	2.71	2.71	2.63	2.59	2.78	2.79	2.77	2.55
	ORP	-20.80	-26.40	-36.10	-4.00	-23.60	-28.90	-28.60	-15.40	-23.70	-41.20	-40.70	3.70
	H ₂ S	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR
M4	pH	2.76	2.77	2.72	2.74	2.81	2.80	2.70	2.68	2.85	2.90	2.85	2.63
	ORP	-6.60	-22.70	-27.40	-8.00	-11.10	-29.40	-29.00	-0.50	-2424.00	-33.70	-26.40	-1.70
	H ₂ S	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR
M5	pH	2.97	3.02	2.97	2.65	3.05	3.12	2.98	2.74	3.11	3.15	3.11	2.73
	ORP	-67.20	-77.80	-81.80	4.70	-85.70	-86.50	-81.20	-17.00	-94.30	-92.40	-95.60	0.40
	H ₂ S	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR
M6	pH	2.92	3.01	2.93	2.70	3.02	3.05	2.97	2.72	3.05	3.06	3.05	2.65
	ORP	-51.50	-70.80	-61.30	6.00	-49.10	-57.50	-67.20	-4.90	-60.30	-57.00	-60.00	-1.60
	H ₂ S	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR
M7	pH	2.93	3.00	2.90	2.65	3.03	3.00	2.95	2.70	3.01	3.02	3.01	2.64
	ORP	-11.40	-22.50	-30.00	12.80	-26.40	-38.90	-41.20	2.90	-35.10	-3.80	-44.40	10.00
	H ₂ S	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR
M8	pH	3.32	3.21	3.05	2.64	3.06	3.10	3.02	2.82	3.14	3.15	3.14	2.76
	ORP	-41.20	-45.30	-38.40	16.80	-21.90	-32.60	-30.10	12.90	-22.80	-30.10	-29.00	23.00
	H ₂ S	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR

M9	pH	3.16	3.24	3.11	2.81	3.18	3.18	3.12	2.90	3.20	3.20	3.18	2.81
	ORP	-9.10	-3.60	-2.10	22.00	-8.40	-1.60	-12.20	15.80	-7.20	-14.90	-13.40	31.60
	H ₂ S	0.07	0.05	0.05	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.08	0.00
M10	pH	2.95	3.10	2.96	2.62	2.94	3.02	2.90	2.72	2.93	2.97	3.38	2.63
	ORP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ S	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR
M11	pH	2.88	3.15	2.80	2.55	2.85	2.86	2.86	2.70	2.94	2.95	2.96	2.58
	ORP	-19.10	-17.80	-23.70	17.20	-33.80	-37.20	-43.91	11.20	-17.90	-20.90	-16.70	11.80
	H ₂ S	0.24	0.12	0.28	UR	0.	0.24	0.22	UR	0.09	0.08	0.10	UR

*[H₂S] = muestras 100 veces diluidas, mg/L *UR = Bajo el rango de detección (under range) * ORP = mV

Apéndice 5. Cuantificación de metales por ICP-MS de ensayo de precipitación de metales para acetato y glicerol

Tiempo	Dilución	Na	Mg	Al	K	Mn	Fe	Co	Ni	Zn	As	Cd
Días	:100	ppb										
0	P1C	6639.967	1482.134	1305.495	1176.97	37.412	18070.47	7.965	7.553	2111.964	87.269	19.72
	P2C	13541.221	1645.644	1465.963	1556.684	41.374	20005.967	9.062	8.744	2413.352	99.354	21.668
	P3C	18655.636	1629.607	1425.178	1843.461	38.113	18555.644	8.916	8.461	2352.294	98.162	21.624
	P1A1	8683.008	1445.774	1247.222	1691.577	33.706	16126.326	7.938	7.503	1918.56	16.83	6.174
	P2A1	14062.075	1474.503	1170.531	1769.093	36.982	17548.589	7.977	7.503	1864.879	14.675	11.633
	P3A1	19583.996	1423.933	1072.239	2035.975	35.226	16536.93	7.905	7.381	1814.318	18.711	16.884
28	P1C	1637.659	1427.163	1320.954	1527.676	36.725	17823.667	8.205	7.747	2157.879	79.166	18.754
	P2C	1353.749	1873.882	1576.106	2360.202	48.684	22856.496	10.365	9.949	2764.298	99.545	27.827
	P3C	<0.000	<0.000	1.315	<0.000	0.082	3.761	0.003	<0.000	0.239	0.014	0.013
	P1G1	3001.519	1300.414	988.387	1844.224	29.958	14210.097	6.786	6.219	1360.095	4.003	4.602
	P2G1	3120.351	1338.406	1037.048	1747.295	34.976	16547.067	7.104	6.958	1850.9	2.552	0.624
	P3G1	2913.985	1362.398	181.824	1739.179	34.232	15922.159	3.194	1.258	345.711	4.598	3.094
56	P1C	7811.392	1731.442	1397.692	1502.921	39.778	19090.144	8.883	8.559	2300.715	91.627	21.216
	P2C	13852.566	1612.822	1497.792	1800.907	42.755	20660.759	9.247	9.015	2464.404	99.618	21.976
	P3C	18807.89	1632.857	1447.084	1967.222	38.737	18911.183	9.002	8.69	2366.848	98.604	21.219
	P1A1	8844.71	1470.791	1259.842	1752.596	34.405	16165.118	8.092	7.707	1950.52	23.574	8.183
	P2A1	13567.581	1408.885	1138.866	1769.214	35.49	16676.458	7.723	7.227	1893.453	19.886	16.299
	P3A1	19481.048	1370.96	1044.705	1753.164	34.588	16358.489	7.645	7.098	1823.17	16.228	12.197
84	P1C	1959.353	1680.546	1410.035	1572.237	41.651	20141.97	8.857	8.444	2323.234	80.755	14.781
	P2C	1267.224	1627.517	1413.96	1983.143	42.819	20760.673	9.18	8.608	2341.155	88.014	16.281
	P3C	1315.968	1390.572	1135.943	1421.771	36.628	17910.149	7.167	6.748	1882.781	74.352	15.668
	P1G1	3019.884	1501.822	214.85	1868.492	36.681	16642.696	2.14	0.622	352.2	7.721	3.56
	P2G1	3347.8	1542.492	1097.635	1875.124	39.945	18434.372	7.745	7.421	1377.672	4.066	2.483
	P3G1	2972.531	1361.559	105.662	1723.243	33.214	15039.625	1.016	0.19	138.711	3.537	1.742
119	P1C	8246.778	1628.423	1393.287	2022.479	42.737	20666.901	8.669	8.323	2293.113	82.022	19.444
	P2C	13497.413	1591.591	1426.339	1679.128	41.955	20446.353	9.216	8.877	2462.234	91.709	21.236
	P3C	16847.571	1574.116	1331.908	1768.151	36.026	17595.095	8.465	8.093	2241.653	83.355	19.362

	P1A1	6760.199	1088.958	936.97	1424.932	24.958	11895.025	5.921	5.477	1566.101	3.537	3.126
	P2A1	14580.632	1493.278	1317.318	1750.888	37.066	17604.523	7.849	7.353	2095.278	9.191	5.932
	P3A1	20572.108	1499.309	1181.038	1751.906	38.311	17074.878	7.973	7.445	2194.475	10.082	7.571
	P1C	1725.939	1658.598	1522.098	1488.542	41.976	20311.222	9.428	9.007	2491.719	90.706	21.814
	P2C	1207.438	1491.796	1297.35	1836.534	39.095	19039.011	8.304	7.844	2159.931	81.515	19.623
	P3C	630.404	838.574	752.171	699.554	22.926	11214.137	4.779	4.196	1237.898	46.14	10.557
140	P1G1	2898.042	1456.406	1204.594	1560.187	36.557	16812.321	8.109	7.681	2129.686	12.582	7.126
	P2G1	2890.871	1352.469	1095.611	1605.538	35.521	16944.139	7.263	7.1	1974.77	8.747	2.017
	P3G1	3184.153	1465.931	1203.587	1774.262	37.258	17398.658	7.778	7.6	1715.698	13.981	10.89
*Unidades = ppb												

Apéndice 6. ANOVA de medidas repetidas unidireccionales de la cuantificación de metales - Ensayo de precipitación de metales con acetato

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.52092	1.30431	2	0.52092	0.6761	1	0.5

Tests of Within-Subjects Effects						
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
Rotulo	Sphericity Assumed	4.17706E-7	2	2.08853E-7	0.0117	0.98839
	Greenhouse-Geisser	4.17706E-7	1.35219	3.0891E-7	0.0117	0.96036
	Huynh-Feldt	4.17706E-7	2	2.08853E-7	0.0117	0.98839
	Lower-bound	4.17706E-7	1	4.17706E-7	0.0117	0.9207
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	1.07119E-4	6	1.78532E-5		
	Greenhouse-Geisser	1.07119E-4	4.05658	2.64063E-5		
	Huynh-Feldt	1.07119E-4	6	1.78532E-5		
	Lower-bound	1.07119E-4	3	3.57065E-5		

Tests of Between-Subjects Effects					
	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
Intercept	0.02496	1	0.02496	3.04086	0.17954
Error	0.02463	3	0.00821		

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	0.04551	0.02654	-0.03896	0.12998
R2	0.04545	0.02614	-0.03774	0.12863
R3	0.04587	0.02595	-0.03671	0.12845

Pairwise Comparison	
---------------------	--

As

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.09957	4.6137	2	0.09957	0.5262	0.56726	0.5

Tests of Within-Subjects Effects						
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
Rotulo	Sphericity Assumed	4.24804E-5	2	2.12402E-5	6.2086	0.03458
	Greenhouse-Geisser	4.24804E-5	1.0524	4.03654E-5	6.2086	0.08395
	Huynh-Feldt	4.24804E-5	1.13451	3.74437E-5	6.2086	0.07753
	Lower-bound	4.24804E-5	1	4.24804E-5	6.2086	0.08835
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	2.05265E-5	6	3.42109E-6		
	Greenhouse-Geisser	2.05265E-5	3.15719	6.50153E-6		
	Huynh-Feldt	2.05265E-5	3.40354	6.03094E-6		
	Lower-bound	2.05265E-5	3	6.84218E-6		

Tests of Between-Subjects Effects					
	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
Intercept	0.00852	1	0.00852	0.01955	
Error	0.02127	3	0.00709		

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	0.00852	0.00346	-0.0025	0.01955
R2	0.01217	0.00284	0.00313	0.02121
R3	0.01279	0.00256	0.00465	0.02092

Pairwise Comparison	
---------------------	--

Cd

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.24293	2.82995	2	0.24293	0.56913	0.68566	0.5

Tests of Within-Subjects Effects						
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
Rotulo	Sphericity Assumed	1.37991E-4	2	6.89956E-5	3.12062	0.11775
	Greenhouse-Geisser	1.37991E-4	1.13826	1.2123E-4	3.12062	0.16585
	Huynh-Feldt	1.37991E-4	1.37132	1.00627E-4	3.12062	0.15092
	Lower-bound	1.37991E-4	1	1.37991E-4	3.12062	0.17548
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	1.32657E-4	6	2.21096E-5		
	Greenhouse-Geisser	1.32657E-4	3.41478	3.8848E-5		
	Huynh-Feldt	1.32657E-4	4.11395	3.22457E-5		
	Lower-bound	1.32657E-4	3	4.42191E-5		

Tests of Between-Subjects Effects					
	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
Intercept	0.06049	1	0.06049	0.07836	
Error	0.06798	3	0.02266		

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	0.06049	0.00561	0.04262	0.07836
R2	0.06798	0.00167	0.06268	0.07329
R3	0.06734	0.00229	0.06006	0.07462

Pairwise Comparison	
---------------------	--

Mn

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.12423	4.17126	2	0.12423	0.53311	0.58562	0.5

Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
Rotulo	Sphericity Assumed	20.91581	2	10.4579	1.76537	0.2495	
	Greenhouse-Geisser	20.91581	1.06623	19.61663	1.76537	0.27445	
	Huynh-Feldt	20.91581	1.17124	17.85782	1.76537	0.27189	
	Lower-bound	20.91581	1	20.91581	1.76537	0.27598	
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	35.54342	6	5.9239			
	Greenhouse-Geisser	35.54342	3.19868	11.11189			
	Huynh-Feldt	35.54342	3.51372	10.1156			
	Lower-bound	35.54342	3	11.84781			

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	28.10778	2.49152	20.17866	36.03691
R2	31.07998	0.83235	28.43107	33.72889
R3	30.69749	0.90717	27.81046	33.58453

Pairwise Comparison				
---------------------	--	--	--	--

Fe

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.00568	10.34318	2	0.00568	0.50142	0.50356	0.5

Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
Rotulo	Sphericity Assumed	8.4792E-7	2	4.2396E-7	0.52749	0.61513	
	Greenhouse-Geisser	8.4792E-7	1.00285	8.45514E-7	0.52749	0.52057	
	Huynh-Feldt	8.4792E-7	1.00712	8.41922E-7	0.52749	0.52113	
	Lower-bound	8.4792E-7	1	8.4792E-7	0.52749	0.5202	
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	4.82243E-6	6	8.03738E-7			
	Greenhouse-Geisser	4.82243E-6	3.00854	1.60291E-6			
	Huynh-Feldt	4.82243E-6	3.02137	1.5961E-6			
	Lower-bound	4.82243E-6	3	1.60748E-6			

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	0.01242	0.00109	0.00895	0.0159
R2	0.01302	4.86056E-4	0.01147	0.01457
R3	0.01295	5.15304E-4	0.01131	0.01459

Pairwise Comparison				
---------------------	--	--	--	--

Ni

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.00273	11.80818	2	0.00273	0.50068	0.50171	0.5

Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
Rotulo	Sphericity Assumed	1.20603E-6	2	6.03016E-7	0.75252	0.51097	
	Greenhouse-Geisser	1.20603E-6	1.00137	1.20439E-6	0.75252	0.44962	
	Huynh-Feldt	1.20603E-6	1.00342	1.20192E-6	0.75252	0.4498	
	Lower-bound	1.20603E-6	1	1.20603E-6	0.75252	0.4495	
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	4.80798E-6	6	8.0133E-7			
	Greenhouse-Geisser	4.80798E-6	3.0041	1.60047E-6			
	Huynh-Feldt	4.80798E-6	3.01025	1.5972E-6			
	Lower-bound	4.80798E-6	3	1.60266E-6			

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	0.01306	0.00106	0.0097	0.01642
R2	0.01373	4.23036E-4	0.01239	0.01508
R3	0.01372	4.34348E-4	0.01234	0.01511

Pairwise Comparison				
---------------------	--	--	--	--

Co

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.01487	8.41707	2	0.01487	0.50374	0.5094	0.5

Tests of Within-Subjects Effects						
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
Rotulo	Sphericity Assumed	0.06496	2	0.03248	0.38824	0.69413
	Greenhouse-Geisser	0.06496	1.00749	0.06447	0.38824	0.57859
	Huynh-Feldt	0.06496	1.01879	0.06376	0.38824	0.5804
	Lower-bound	0.06496	1	0.06496	0.38824	0.57738
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	0.50194	6	0.08366		
	Greenhouse-Geisser	0.50194	3.02247	0.16607		
	Huynh-Feldt	0.50194	3.05638	0.16423		
	Lower-bound	0.50194	3	0.16731		

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	2.97174	0.24015	2.20748	3.736
R2	3.13179	0.16613	2.60308	3.66049
R3	3.12351	0.20157	2.48203	3.76498

Pairwise Comparison				
---------------------	--	--	--	--

Zn

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.52292	1.29665	2	0.52292	0.67701	1	0.5

Tests of Within-Subjects Effects						
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
Rotulo	Sphericity Assumed	0.44247	2	0.22124	2.11984	0.20118
	Greenhouse-Geisser	0.44247	1.35402	0.32678	2.11984	0.22662
	Huynh-Feldt	0.44247	2	0.22124	2.11984	0.20118
	Lower-bound	0.44247	1	0.44247	2.11984	0.24142
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	0.62619	6	0.10436		
	Greenhouse-Geisser	0.62619	4.06207	0.15416		
	Huynh-Feldt	0.62619	6	0.10436		
	Lower-bound	0.62619	3	0.20873		

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	4.67215	0.23999	3.90839	5.4359
R2	4.50289	0.37181	3.31964	5.68615
R3	4.96758	0.10174	4.6438	5.29136

Pairwise Comparison				
---------------------	--	--	--	--

Al

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.49871	1.39145	2	0.49871	0.66609	0.99794	0.5

Tests of Within-Subjects Effects						
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
Rotulo	Sphericity Assumed	0.04066	2	0.02033	2.78383	0.13955
	Greenhouse-Geisser	0.04066	1.33219	0.03052	2.78383	0.17353
	Huynh-Feldt	0.04066	1.99589	0.02037	2.78383	0.13973
	Lower-bound	0.04066	1	0.04066	2.78383	0.19381
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	0.04382	6	0.0073		
	Greenhouse-Geisser	0.04382	3.99657	0.01096		
	Huynh-Feldt	0.04382	5.98766	0.00732		
	Lower-bound	0.04382	3	0.01461		

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	6.05823	0.04273	5.92225	6.19421
R2	5.93995	0.10048	5.62019	6.25971
R3	5.93014	0.11495	5.56432	6.29595

Pairwise Comparison				
---------------------	--	--	--	--

Mg

Apéndice 7. Monitoreo del consumo del sulfato (mM), ensayo de precipitación de metales con acetato

Días	P1A1	P1C	P2A1	P2C	P3A1	P3C
0	53.8	55.76	53.8	53.75	53.8	51.82
28	45.98	58.81	59.48	54.63	49.36	53.42
42	45.92	55.73	49.99	53.86	46.87	51.89
56	45.22	52.75	28.90	52.77	45.55	50.15

Apéndice 8. Cuantificación de acetato (mM), ensayo de precipitación de metales con acetato

días	0	28	42	56
P1A1	24.59	22.01	21.45	18.31
P1A2	24.59	33.77	18.05	21.5
P1A3	24.59	16.16	13.96	14.22
P1C	23.84	21.69	28.97	23.85
P2A1	54.68	43.41	34.41	22.01
P2A2	54.68	45.81	31.49	19.77
P2A3	54.68	31.66	26.96	16.16
P2C	47.68	52.09	64.75	54.21
P3A1	72.57	47.75	41.12	42.39
P3A2	72.57	63.89	61.41	43.84
P3A3	72.57	67.28	62.97	60.64
P3C	71.52	72.46	72.92	73.39

Apéndice 9. ANOVA de medidas repetidas unidireccionales del consumo de sulfato de la proporción 1 en ensayo de precipitación de metales con acetato

	Value	F	Num df	DF	Prob>F	
R1	Pillai's Trace	0.72015	2.57338	2	2	0.27985
	Wilks' Lambda	0.27985	2.57338	2	2	0.27985
	Hotelling's Trace	2.57338	2.57338	2	2	0.27985
	Roy's Largest Root	2.57338	2.57338	2	2	0.27985

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
R1	0.43588	1.66078	2	0.43588	0.63934	0.90474	0.5

Tests of Within-Subjects Effects						
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
R1	Sphericity Assumed	106.41575	2	53.20788	2.92441	0.12985
	Greenhouse-Geisser	106.41575	1.27867	83.22358	2.92441	0.16785
	Huynh-Feldt	106.41575	1.80947	58.8104	2.92441	0.13882
	Lower-bound	106.41575	1	106.41575	2.92441	0.18578
Error(R1)	Sphericity Assumed	109.1663	6	18.19438		
	Greenhouse-Geisser	109.1663	3.83602	28.45822		
	Huynh-Feldt	109.1663	5.42842	20.11016		
	Lower-bound	109.1663	3	36.38877		

Tests of Between-Subjects Effects				
Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1A1	21.4	1.15133	17.73595	25.06405
R1A2	24.28875	3.37515	13.5475	35.03
R1A3	17.04375	2.31772	9.66772	24.41978

Pairwise Comparison	
---------------------	--

Apéndice 10. ANOVA de medidas repetidas unidireccionales del consumo de sulfato de la proporción 2 en el ensayo de precipitación de metales con acetato

Notes							
Input Data							
Multivariate Tests							
		Value	F	Num df	DF	Prob>F	
R2	Pillai's Trace	0.74253	2.884	2	2	0.25747	
	Wilks' Lambda	0.25747	2.884	2	2	0.25747	
	Hotelling's Trace	2.884	2.884	2	2	0.25747	
	Roy's Largest Root	2.884	2.884	2	2	0.25747	
Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
R2	0.34417	2.13325	2	0.34417	0.60393	0.78995	0.5
Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
R2	Sphericity Assumed	94.321	2	47.1605	4.29158	0.06965	
	Greenhouse-Geisser	94.321	1.20785	78.08989	4.29158	0.11376	
	Huynh-Feldt	94.321	1.5799	59.7008	4.29158	0.09004	
	Lower-bound	94.321	1	94.321	4.29158	0.13004	
Error(R2)	Sphericity Assumed	65.93448	6	10.98908			
	Greenhouse-Geisser	65.93448	3.62355	18.19608			
	Huynh-Feldt	65.93448	4.73969	13.91115			
	Lower-bound	65.93448	3	21.97816			
Tests of Between-Subjects Effects							
Descriptive Statistics							
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL			
R2A1	36.8775	5.67523	18.81637	54.93863			
R2A2	36.18375	6.55989	15.30724	57.06026			
R2A3	30.61375	6.54953	9.77019	51.45731			
Pairwise Comparison							

Apéndice 11. ANOVA de medidas repetidas unidireccionales del consumo de sulfato de la proporción 3 en ensayo de precipitación de metales con acetato

Notes							
Input Data							
Multivariate Tests							
		Value	F	Num df	DF	Prob>F	
R3	Pillai's Trace	0.7489	2.98241	2	2	0.2511	
	Wilks' Lambda	0.2511	2.98241	2	2	0.2511	
	Hotelling's Trace	2.98241	2.98241	2	2	0.2511	
	Roy's Largest Root	2.98241	2.98241	2	2	0.2511	
Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
R3	0.89038	0.23222	2	0.89038	0.90121	1	0.5
Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
R3	Sphericity Assumed	455.24	2	227.62	5.14351	0.05	
	Greenhouse-Geisser	455.24	1.80242	252.57187	5.14351	0.05798	
	Huynh-Feldt	455.24	2	227.62	5.14351	0.05	
	Lower-bound	455.24	1	455.24	5.14351	0.10813	
Error(R3)	Sphericity Assumed	265.5228	6	44.2538			
	Greenhouse-Geisser	265.5228	5.40725	49.10493			
	Huynh-Feldt	265.5228	6	44.2538			
	Lower-bound	265.5228	3	88.5076			
Tests of Between-Subjects Effects							
Descriptive Statistics							
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL			
R3A1	50.69375	7.08894	28.13356	73.25394			
R3A2	60.16375	5.85257	41.53825	78.78925			
R3A3	65.6	2.40521	57.94556	73.25444			
Pairwise Comparison							

Apéndice 12. Consumo medio de acetato por proporción (mM), ensayo de precipitación de metales con acetato

Días	P1	P2	P3
0	0.00	0.00	0.00
28	0.61	14.39	12.94
42	6.77	23.73	17.41
56	6.58	35.37	23.62

Apéndice 13. Análisis de varianza de medidas repetidas unidireccionales del consumo medio de acetato por proporción, ensayo de precipitación de metales con acetato

Notes
 Input Data
 Multivariate Tests

		Value	F	Num df	DF	Prob>F
RATIO	Pillai's Trace	0.72815	2.67844	2	2	0.27185
	Wilks' Lambda	0.27185	2.67844	2	2	0.27185
	Hotelling's Trace	2.67844	2.67844	2	2	0.27185
	Roy's Largest Root	2.67844	2.67844	2	2	0.27185

Mauchly's Test of Sphericity

	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
RATIO	0.13911	3.94493	2	0.13911	0.53738	0.59707	0.5

Tests of Within-Subjects Effects

		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
RATIO	Sphericity Assumed	460.577	2	230.2885	6.27247	0.03387
	Greenhouse-Geisser	460.577	1.07476	428.54071	6.27247	0.08117
	Huynh-Feldt	460.577	1.19415	385.69485	6.27247	0.07225
	Lower-bound	460.577	1	460.577	6.27247	0.08736
Error(RATIO)	Sphericity Assumed	220.28514	6	36.71419		
	Greenhouse-Geisser	220.28514	3.22427	68.32093		
	Huynh-Feldt	220.28514	3.58245	61.49015		
	Lower-bound	220.28514	3	73.42838		

Tests of Between-Subjects Effects

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	3.48792	1.84274	-2.3765	9.35233
R2	18.3726	7.47812	-5.42615	42.17136
R3	13.48974	5.0017	-2.42792	29.4074

Pairwise Comparison

Tukey Test

	Index	Mean Difference	Std. Error	DF	q Value	Prob	Alpha	Sig Flag	95.00% LCL	95.00% UCL
R1 R2	0	-14.88469	4.28452	6	4.91307	0.03063	0.05	1	-28.03108	-1.7383
R1 R3	1	-10.00182	4.28452	6	3.30135	0.12609	0.05	0	-23.14822	3.14457
R2 R3	2	4.88286	4.28452	6	1.61171	0.52703	0.05	0	-8.26353	18.02926

Grouping Letters Table

Tukey Test

	Mean	Groups
R2	18.3726	A
R3	13.48974	A B
R1	3.48792	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0.05 level.
 Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0.05 level.
 Sig equals -1 indicates that the difference of the means is not tested.

Apéndice 14. Monitoreo de pH, ORP y producción de sulfuros, ensayo de precipitación de metales con glicerol

		P1				P2				P3			
		P1G1	P1G2	P1G3	P1C	P2G1	P2G2	P2G3	P2C	P3G1	P3G2	P3G3	P3C
M1	pH	3.11	3.01	3.01	2.98	3.07	3.13	3.10	3.00	3.10	3.12	3.07	3.02
	ORP	-25.70	-28.00	-55.00	37.00	-59.60	-34.20	-30.00	19.90	-53.30	-20.60	-59.60	-1.70
	H2S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M2	pH	2.90	2.80	2.93	2.82	2.96	2.91	2.91	2.85	3.03	2.97	2.95	2.85
	ORP	-31.70	-45.20	-64.40	24.30	-48.20	-29.80	-47.00	-3.80	-40.30	-54.80	-44.80	-3.00
	H2S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M3	pH	2.79	2.78	2.83	2.71	2.85	2.78	2.78	2.68	2.85	2.80	267.00	2.71
	ORP	-20.90	-23.80	-44.20	-8.20	-17.10	-30.10	-29.40	-8.80	-28.20	-31.90	-42.20	-7.60
	H2S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M4	pH	2.98	2.85	2.92	2.82	2.93	2.92	2.88	2.75	2.93	2.92	2.85	2.80
	ORP	-21.80	-17.90	-33.50	-2.70	-20.30	-28.60	-24.30	8.50	-20.80	-23.50	-33.80	-1.70
	H2S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M5	pH	3.04	3.04	2.99	2.89	3.10	3.02	3.06	2.82	3.12	3.12	3.09	3.81
	ORP	-60.40	-52.80	-70.40	-12.20	-71.50	-72.10	-86.10	-7.60	-84.60	-66.30	-73.80	0.60
	H2S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M6	pH	2.97	2.90	2.94	2.76	2.96	2.40	2.88	2.74	3.08	3.02	2.98	2.79
	ORP	-41.90	-16.70	-43.60	-4.30	-51.00	-45.80	-95.70	-3.00	-69.10	-34.20	-35.60	-1.20
	H2S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M7	pH	3.32	3.24	3.16	2.90	3.08	3.05	3.73	2.80	4.39	3.02	3.00	2.78
	ORP	-26.00	-50.60	-36.40	-2.30	-31.30	-22.60	-123.80	7.20	-56.00	-78.00	-61.70	-2.00
	H2S	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.89	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00
M8	pH	4.11	3.24	3.15	2.95	3.14	3.07	4.50	2.98	4.59	3.21	3.05	2.80
	ORP	-111.40	-26.90	-28.40	22.30	-20.30	-21.20	-120.90	6.70	-85.20	-53.80	-32.40	-1.60
	H2S	0.75	0.40	0.30	0.00	0.05	0.00	0.88	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00
M9	pH	4.72	4.49	3.74	3.02	3.34	3.28	4.63	3.10	4.77	3.39	3.38	3.36
	ORP	-177.40	-156.60	-93.70	11.00	-26.40	-35.00	-137.20	3.40	-103.40	-21.50	16.40	-4.70
	H2S	0.84	0.72	0.55	0.00	0.06	0.00	0.80	0.00	0.40	0.06	0.00	0.00
	pH	4.21	-	4.50	2.90	4.44	3.05	-	2.83	4.48	-	3.01	-

M10	ORP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H2S	0.85	0.00	0.74	0.00	0.65	0.00	-	0.00	0.68	-	0.05	0.00
M11	pH	4.39	-	4.57	2.83	4.61	3.09	-	2.83	4.69	-	2.98	-
	ORP	-212.70	-	-173.00	16.90	-189.50	-53.60	-	16.00	-194.00	-	-51.20	-
M12	H2S	1.70	-	1.15	-	0.80	0.06	-	-	0.52	-	0.00	0.00
	pH	5.17	-	5.22	-	5.24	5.22	-	-	5.19	-	5.21	-
M13	pH	6.69	-	4.92	-	5.08	5.10	-	-	5.55	-	4.96	-
M14	pH	6.72	-	6.39	-	5.48	5.90	-	-	5.55	-	5.05	--
M15	pH	6.69	-	6.39	-	5.49	5.60	-	-	5.48	-	5.55	-

*[H₂S] = muestras 100 veces diluidas, mg/L

*UR = Bajo el rango de detección (under range)

* ORP = mV

Apéndice 15. ANOVA de medidas repetidas unidireccionales del monitoreo de pH de las 3 proporciones - Ensayo de precipitación de metales con glicerol

Mauchly's Test of Sphericity

	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
B	0.70748	2.76839	2	0.25053	0.77368	0.90395	0.5

Tests of Within-Subjects Effects

		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
B	Sphericity Assumed	68.74467	2	34.37233	0.19709	0.82286
	Greenhouse-Geisser	68.74467	1.54736	44.42699	0.19709	0.76806
	Huynh-Feldt	68.74467	1.8079	38.02458	0.19709	0.80185
	Lower-bound	68.74467	1	68.74467	0.19709	0.66756
Error(B)	Sphericity Assumed	3139.13533	18	174.39641		
	Greenhouse-Geisser	3139.13533	13.92627	225.41114		
	Huynh-Feldt	3139.13533	16.27111	192.92697		
	Lower-bound	3139.13533	9	348.79281		

Tests of Between-Subjects Effects

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	-74.85	19.52336	-119.0149	-30.6851
R2	-71.22	17.39622	-110.57299	-31.86701
R3	-72.38	15.49126	-107.42366	-37.33634

Pairwise Comparison

Apéndice 16. ANOVA de medidas repetidas unidireccionales de la cuantificación de sulfuros de la media de las 3 proporciones - Ensayo de precipitación de metales con glicerol

Mauchly's Test of Sphericity

	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
B	0.00582	46.31144	2	<0.0001	0.50146	0.50195	0.5

Tests of Within-Subjects Effects

		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
B	Sphericity Assumed	1566.10606	2	783.05303	3.52698	0.04875
	Greenhouse-Geisser	1566.10606	1.00292	1561.54532	3.52698	0.08966
	Huynh-Feldt	1566.10606	1.0039	1560.02901	3.52698	0.08961
	Lower-bound	1566.10606	1	1566.10606	3.52698	0.08981
Error(B)	Sphericity Assumed	4440.3569	20	222.01785		
	Greenhouse-Geisser	4440.3569	10.02921	442.74259		
	Huynh-Feldt	4440.3569	10.03895	442.31267		
	Lower-bound	4440.3569	10	444.03569		

Tests of Between-Subjects Effects

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	25.34848	14.07535	-6.01334	56.71031
R2	16.39394	9.12968	-3.94827	36.73615
R3	8.48485	5.26977	-3.25692	20.22662

Pairwise Comparison

Tukey Test

Grouping Letters Table

	Mean	Groups
R1	25.34848	A
R2	16.39394	A B
R3	8.48485	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Apéndice 17. Precipitación de metales por proporción en mM y porcentaje en ensayo de precipitación de metales con glicerol

Metal	[inicial]	PROPORCIÓN 1		PROPORCIÓN 2		PROPORCIÓN 3	
	mM	mM	%	mM	%	mM	%
As	0.123	0.118	95.67	0.120	97.24	0.119	96.18
Cd	0.018	0.015	82.67	0.018	96.96	0.017	91.52
Mn	0.074	0.061	81.55	0.043	57.32	0.053	71.59
Fe	34.933	34.597	99.04	34.817	99.67	34.095	97.60
Ni	0.014	0.013	92.21	0.002	12.81	0.013	97.62
Co	0.014	0.011	74.33	0.002	14.78	0.012	87.81
Zn	3.667	3.667	100.00	3.667	100.00	3.667	100.00
Al	5.396	4.600	85.24	1.553	28.77	5.004	92.74
Mg	6.507	1.157	17.78	1.001	15.38	0.902	13.86

Apéndice 18. ANOVA de medidas repetidas unidireccionales de la cuantificación de metales - Ensayo de precipitación de metales con glicerol

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.46957	1.51189	2	0.46957	0.65341	0.95302	0.5

Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
Rotulo	Sphericity Assumed	0.063	2	0.0315	1.37731	0.32191	
	Greenhouse-Geisser	0.063	1.30682	0.04821	1.37731	0.32606	
	Huynh-Feldt	0.063	1.90604	0.03305	1.37731	0.32274	
	Lower-bound	0.063	1	0.063	1.37731	0.32525	
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	0.13722	6	0.02287			
	Greenhouse-Geisser	0.13722	3.92046	0.035			
	Huynh-Feldt	0.13722	5.71813	0.024			
	Lower-bound	0.13722	3	0.04574			

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	0.70722	0.2801	-0.18417	1.59861
R2	0.73597	0.2457	-0.04596	1.51791
R3	0.56992	0.21487	-0.11389	1.25374

Mg

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.80578	0.43189	2	0.80578	0.83737	1	0.5

Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
Rotulo	Sphericity Assumed	5.85808	2	2.92904	2.16019	0.1965	
	Greenhouse-Geisser	5.85808	1.67473	3.49792	2.16019	0.20924	
	Huynh-Feldt	5.85808	2	2.92904	2.16019	0.1965	
	Lower-bound	5.85808	1	5.85808	2.16019	0.23797	
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	8.13549	6	1.35592			
	Greenhouse-Geisser	8.13549	5.0242	1.61926			
	Huynh-Feldt	8.13549	6	1.35592			
	Lower-bound	8.13549	3	2.71183			

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	1.81606	0.99312	-1.34451	4.97663
R2	0.95401	0.34262	-0.13637	2.04439
R3	2.66544	1.28444	-1.42224	6.75312

Al

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.59128	1.05094	2	0.59128	0.70986	1	0.5

Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
Rotulo	Sphericity Assumed	3.6896E-5	2	1.8448E-5	2.1172	0.2015	
	Greenhouse-Geisser	3.6896E-5	1.41973	2.59881E-5	2.1172	0.22418	
	Huynh-Feldt	3.6896E-5	2	1.8448E-5	2.1172	0.2015	
	Lower-bound	3.6896E-5	1	3.6896E-5	2.1172	0.24165	
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	5.22805E-5	6	8.71341E-6			
	Greenhouse-Geisser	5.22805E-5	4.25918	1.22748E-5			
	Huynh-Feldt	5.22805E-5	6	8.71341E-6			
	Lower-bound	5.22805E-5	3	1.74268E-5			

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	0.00338	0.00245	-0.0044	0.01117
R2	0.00123	4.70443E-4	-2.68108E-4	0.00273
R3	0.00552	0.00302	-0.00408	0.01513

Pairwise Comparison	
---------------------	--

Co

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.774	0.51237	2	0.774	0.81566	1	0.5

Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
Rotulo	Sphericity Assumed	5.6353E-5	2	2.81765E-5	1.9954	0.2166	
	Greenhouse-Geisser	5.6353E-5	1.63132	3.45444E-5	1.9954	0.22957	
	Huynh-Feldt	5.6353E-5	2	2.81765E-5	1.9954	0.2166	
	Lower-bound	5.6353E-5	1	5.6353E-5	1.9954	0.25265	
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	8.47242E-5	6	1.41207E-5			
	Greenhouse-Geisser	8.47242E-5	4.89396	1.7312E-5			
	Huynh-Feldt	8.47242E-5	6	1.41207E-5			
	Lower-bound	8.47242E-5	3	2.82414E-5			

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	0.00401	0.00292	-0.00527	0.01329
R2	0.00105	3.86524E-4	-1.81493E-4	0.00228
R3	0.00634	0.0035	-0.00479	0.01748

Pairwise Comparison	
---------------------	--

Ni

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.87256	0.27264	2	0.87256	0.88697	1	0.5

Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
Rotulo	Sphericity Assumed	1.9354E-5	2	9.67701E-6	2.56061	0.15704	
	Greenhouse-Geisser	1.9354E-5	1.77393	1.09102E-5	2.56061	0.16718	
	Huynh-Feldt	1.9354E-5	2	9.67701E-6	2.56061	0.15704	
	Lower-bound	1.9354E-5	1	1.9354E-5	2.56061	0.20786	
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	2.26751E-5	6	3.77918E-6			
	Greenhouse-Geisser	2.26751E-5	5.3218	4.2608E-6			
	Huynh-Feldt	2.26751E-5	6	3.77918E-6			
	Lower-bound	2.26751E-5	3	7.55837E-6			

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	0.0845	0.02826	-0.00545	0.17445
R2	0.08748	0.02921	-0.00549	0.18046
R3	0.08523	0.02858	-0.00573	0.17619

Pairwise Comparison	
---------------------	--

As

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Rotulo	0.34857	2.10785	2	0.34857	0.60554	0.79497	0.5

Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
Rotulo	Sphericity Assumed	1.42513E-5	2	7.12564E-6	2.13851	0.199	
	Greenhouse-Geisser	1.42513E-5	1.21107	1.17675E-5	2.13851	0.2308	
	Huynh-Feldt	1.42513E-5	1.58993	8.96344E-6	2.13851	0.215	
	Lower-bound	1.42513E-5	1	1.42513E-5	2.13851	0.23981	
Error(Rotulo)	Sphericity Assumed	1.99923E-5	6	3.33205E-6			
	Greenhouse-Geisser	1.99923E-5	3.63321	5.50266E-6			
	Huynh-Feldt	1.99923E-5	4.7698	4.19143E-6			
	Lower-bound	1.99923E-5	3	6.6641E-6			

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	0.01031	0.0035	-8.30605E-4	0.02145
R2	0.01257	0.0042	-8.11333E-4	0.02595
R3	0.01021	0.00385	-0.00203	0.02246

Cd

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
ratio	0.70953	1.3726	2	0.50344	0.77491	1	0.5

Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
ratio	Sphericity Assumed	5.41686	2	2.70843	2.44908	0.13625	
	Greenhouse-Geisser	5.41686	1.54983	3.49514	2.44908	0.15418	
	Huynh-Feldt	5.41686	2	2.70843	2.44908	0.13625	
	Lower-bound	5.41686	1	5.41686	2.44908	0.17837	
Error(ratio)	Sphericity Assumed	11.05899	10	1.1059			
	Greenhouse-Geisser	11.05899	7.74913	1.42713			
	Huynh-Feldt	11.05899	10	1.1059			
	Lower-bound	11.05899	5	2.2118			

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	14.69779	6.34338	-1.60839	31.00396
R2	13.36254	6.63288	-3.68783	30.4129
R3	14.16073	6.18322	-1.73374	30.05521

Fe

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
ratio	0.50009	2.7719	2	0.25009	0.66671	0.81826	0.5

Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
ratio	Sphericity Assumed	1.76456	2	0.88228	2.71231	0.11453	
	Greenhouse-Geisser	1.76456	1.33341	1.32335	2.71231	0.14366	
	Huynh-Feldt	1.76456	1.63652	1.07824	2.71231	0.12961	
	Lower-bound	1.76456	1	1.76456	2.71231	0.16049	
Error(ratio)	Sphericity Assumed	3.25289	10	0.32529			
	Greenhouse-Geisser	3.25289	6.66705	0.4879			
	Huynh-Feldt	3.25289	8.18262	0.39754			
	Lower-bound	3.25289	5	0.65058			

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	2.07608	0.67081	0.35172	3.80044
R2	1.72893	0.64556	0.06946	3.3884
R3	2.49475	0.64337	0.84091	4.14859

Zn

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
ratio	0.08041	10.08248	2	0.00647	0.52094	0.53704	0.5

Tests of Within-Subjects Effects						
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
ratio	Sphericity Assumed	4.73088E-4	2	2.36544E-4	2.93941	0.09906
	Greenhouse-Geisser	4.73088E-4	1.04189	4.54068E-4	2.93941	0.14474
	Huynh-Feldt	4.73088E-4	1.07408	4.40458E-4	2.93941	0.14293
	Lower-bound	4.73088E-4	1	4.73088E-4	2.93941	0.14711
Error(ratio)	Sphericity Assumed	8.04732E-4	10	8.04732E-5		
	Greenhouse-Geisser	8.04732E-4	5.20945	1.54476E-4		
	Huynh-Feldt	8.04732E-4	5.37041	1.49846E-4		
	Lower-bound	8.04732E-4	5	1.60946E-4		

Descriptive Statistics				
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	0.02598	0.01121	-0.00282	0.05479
R2	0.01347	0.00633	-0.0028	0.02974
R3	0.01883	0.00782	-0.00128	0.03893

Pairwise Comparison	
---------------------	--

Mn

Apéndice 19. Monitoreo del consumo o reducción de sulfato, ensayo de precipitación de metales con glicerol

tiempo (dd)	P1	P1C	P2	P2C	P3	P3C
0	53.80000	53.80000	53.80000	53.80000	53.80000	53.80000
28	43.90300	52.73771	45.57500	58.64651	38.17400	-
42	36.85400	51.67541	41.76300	63.49303	37.91200	-
56	26.20000	53.61000	37.81000	53.73000	27.68000	-
119	0.01711	0.00000	0.02249	0.53733	0.02635	-
133	0.00216	0.00000	0.00286	0.53733	0.00312	-
140	0.00069	0.00000	0.00083	0.53733	0.00282	-

Apéndice 20. Monitoreo del consumo de glicerol, ensayo de precipitación de metales con glicerol

Días	P1 G1	P1 G2	P1 G3	P1 C	P2 G1	P2 G2	P2 G3	P2 C	P3 G1	P3 G2	P3 G3	P3 C
0	23.84	23.84	23.84	26.31	47.68	47.68	47.68	46.19	71.52	71.52	71.52	71.52
28	22.52	15.13	18.18	26.60	43.65	41.46	34.53	49.47	72.94	44.01	65.32	-
42	14.85	18.59	17.50	26.43	39.17	41.80	34.06	41.12	45.65	65.06	57.29	-
56	15.28	16.59	13.25	25.91	35.33	39.62	33.36	47.99	52.42	50.48	60.17	-
119	5.37		3.00		17.78	19.10			4.95		17.82	
133	1.30		3.48		0.17	0.37			2.48		2.82	
140	0.00		0.00		0.00	0.00			0.00		0.00	

Apéndice 21. ANOVA de medidas repetidas unidireccionales del consumo de glicerol de la media de las 3 proporciones- Ensayo de precipitación de metales con glicerol

Mauchly's Test of Sphericity

	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
RATIO	0.13085	10.16834	2	0.00619	0.535	0.5568	0.5

Tests of Within-Subjects Effects

		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
RATIO	Sphericity Assumed	2796.92409	2	1398.46204	14.03289	7.21848E-4
	Greenhouse-Geisser	2796.92409	1.07001	2613.92871	14.03289	0.00795
	Huynh-Feldt	2796.92409	1.1136	2511.59871	14.03289	0.00709
	Lower-bound	2796.92409	1	2796.92409	14.03289	0.00955
Error(RATIO)	Sphericity Assumed	1195.87219	12	99.65602		
	Greenhouse-Geisser	1195.87219	6.42005	186.27157		
	Huynh-Feldt	1195.87219	6.68162	178.97942		
	Lower-bound	1195.87219	6	199.31203		

Tests of Between-Subjects Effects

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R1	11.87794	3.69067	2.8472	20.90869
R2	26.68097	7.40516	8.56118	44.80075
R3	40.13596	11.0434	13.11374	67.15817

Pairwise Comparison

Tukey Test

Grouping Letters Table

	Mean	Groups
R3	40.13596	A
R2	26.68097	A
R1	11.87794	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Apéndice 22. Monitoreo de la producción de acetato en ensayo de precipitación de metales con glicerol

Días	P1 G1	P1 G2	P1 G3	P1 C	P2 G1	P2 G2	P2 G3	P2 C	P3 G1	P3 G2	P3 G3	P3 C
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
28	0.57	0.60	0.93	0.00	0.81	2.05	1.15	0.00	0.56	0.67	0.89	0.00
42	0.00	0.78	0.76	0.00	0.73	0.73	0.99	0.00	0.69	0.86	0.83	0.00
56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.95	0.66	0.76	0.00	0.82	0.95	0.80	0.00

Apéndice 23. ANOVA de medidas repetidas unidireccionales de la producción de acetato por proporción - Ensayo de precipitación de metales con glicerol

Mauchly's Test of Sphericity

	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
TRIPLICADO	0.08225	4.99592	2	0.08225	0.52145	0.55479	0.5

Tests of Within-Subjects Effects

		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
TRIPLICADO	Sphericity Assumed	0.00648	2	0.00324	1.65756	0.26723
	Greenhouse-Geisser	0.00648	1.04289	0.00621	1.65756	0.28759
	Huynh-Feldt	0.00648	1.10958	0.00584	1.65756	0.28646
	Lower-bound	0.00648	1	0.00648	1.65756	0.28827
Error(TRIPLICADO)	Sphericity Assumed	0.01172	6	0.00195		
	Greenhouse-Geisser	0.01172	3.12867	0.00375		
	Huynh-Feldt	0.01172	3.32873	0.00352		
	Lower-bound	0.01172	3	0.00391		

Tests of Between-Subjects Effects

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL
R2G1	0.0755	0.04391	-0.06425	0.21525
R2G2	0.12375	0.04282	-0.01253	0.26003
R2G3	0.12575	0.04206	-0.00812	0.25962

Pairwise Comparison

Apéndice 24. ANOVA de medidas repetidas unidireccionales de la producción de acetato rol de la media de las 3 proporciones - Ensayo de precipitación de metales con glicerol

Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
RATIO	0.04818	6.06542	2	0.04818	0.51234	0.53124	0.5

Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
RATIO	Sphericity Assumed	5.93994	2	2.96997	1.4399	0.30849	
	Greenhouse-Geisser	5.93994	1.02469	5.79684	1.4399	0.31631	
	Huynh-Feldt	5.93994	1.06249	5.59059	1.4399	0.31633	
	Lower-bound	5.93994	1	5.93994	1.4399	0.31628	
Error(RATIO)	Sphericity Assumed	12.37578	6	2.06263			
	Greenhouse-Geisser	12.37578	3.07406	4.02587			
	Huynh-Feldt	12.37578	3.18747	3.88264			
	Lower-bound	12.37578	3	4.12526			

Tests of Between-Subjects Effects					
	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F
Intercept	13.52209	1	13.52209	2.58075	0.20653
Error	15.71881	3	5.2396		

Descriptive Statistics
 Pairwise Comparison

Apéndice 25. Análisis qPCR del gen *dsrA*

Cultivo	Medición	SQ medido	SQ standar
P1G1	Jamin 1st time	0.31	0.31
P2G1	Jamin 1st time	0.25	0.26
P3G1	Jamin 1st time	0.28	0.28
P1A1	Jamin 1st time	0.09	0.09
P2A1	Jamin 1st time	0.33	0.34
P3A1	Jamin 1st time	0.33	0.41
P1G1	Jamin last time	0.23	0.22
P2G1	Jamin last time	0.20	0.23
P3G1	Jamin last time	0.44	0.45
P1A1	Jamin last time	0.37	0.38
P2A1	Jamin last time	0.35	0.35
P3A1	Jamin last time	0.38	0.38

Apéndice 26. Análisis qPCR del gen ARNr 16S

Cultivo	Medición	SQ medido	SQ standar
P1G1	Jamin 1st time	5.68E+01	5.79E+01
P2G1	Jamin 1st time	1.59E+02	1.61E+02
P3G1	Jamin 1st time	2.76E+01	2.82E+01
P1A1	Jamin 1st time	6.69E+02	6.77E+02
P2A1	Jamin 1st time	3.25E+02	3.29E+02
P3A1	Jamin 1st time	2.40E+02	2.33E+02
P1G1	Jamin last time	1.69E+02	1.90E+02
P2G1	Jamin last time	1.01E+02	1.30E+02
P3G1	Jamin last time	1.05E+03	1.06E+03
P1A1	Jamin last time	2.94E+04	2.94E+04
P2A1	Jamin last time	1.26E+04	1.27E+04
P3A1	Jamin last time	4.93E+04	4.92E+04