

REMOCIÓN DE METALES PESADOS DE DRENAJES ÁCIDOS DE MINAS DE CARBÓN USANDO BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS

G. A. GELVEZ, D. A. LAVERDE, H. ESCALANTE

Grupo de Investigaciones en Minerales, Biohidrometalurgia y Ambiente
Universidad Industrial de Santander, Sede Guatigura
A.A. 678 Bucaramanga, Colombia

Fecha Recepción: 3 de Marzo de 2008

Fecha Aceptación: 23 de Abril de 2008

RESUMEN

Uno de los problemas ambientales más apremiantes de la industria minera es la generación de drenajes ácidos con contenidos elevados de sulfatos y metales pesados. La remoción de los metales pesados presentes en los Drenajes Ácidos de Minas de Carbón (DAMC), es posible mediante la aplicación de bacterias reductoras de sulfato (BSR). El metabolismo de las BSR resulta en la conversión de sulfato a sulfuro, la generación de alcalinidad y la precipitación química de los metales. Este trabajo se enfocó en aislar tres diferentes especies de BSR: *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfomonas pigra* y *Desulfobacter spp* para la remoción de metales de soluciones acuosas, con el fin de estudiar su posible aplicación en el tratamiento de DAMC. Los microorganismos se aplicaron a disoluciones que simulaban las composiciones químicas de los drenajes de minas de carbón en Colombia, y los resultados mostraron un alto porcentaje de remoción de hierro, níquel, cinc, cobalto y baja remoción para el manganeso. Las concentraciones de sulfuro, requeridas para producir un elevado desempeño en la precipitación de los metales se determinó usando cálculos teóricos, los cuales fueron comparados con los resultados experimentales; demostrando la alta aplicabilidad de estos métodos para el futuro desarrollo de sistemas biológicos de BSR para el tratamiento de DAMC.

Palabras claves: *Drenajes Ácidos de Minas, Bacteria Sulfato reductora, Metales Pesados, Tratamientos Pasivos*

ABSTRACT

One of the principal environmental problem of mine industrial is the generation of acid drainage, with high levels of heavy metals. The removal of heavy metals from acid mine drainages can be obtained through the application of anaerobic bacteria from wetlands. The main reaction in these systems is the sulfate ion reduction to the sulfide ion due to the action of Sulfate-Reducing Bacteria (SRB). This paper focuses on the use of isolated of *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfomonas pigra* and *Desulfobacter spp* to remove metals from aqueous solutions, in order to study their potential application in the treatment of coal mine drainage. Their growth rate in aqueous media in the presence of iron was determined, confirming that their use in biological systems produces a low treatment kinetics. The microorganisms were applied to solutions simulating the chemical composition of coal mine drainages in Colombia, and the results indicated a high percentage of removal of iron, nickel, zinc, cobalt and lead from solutions, but no removal of manganese. The sulfide concentrations needed to produce high performance of the precipitation of metals were determinate using theoretical calculations and these were compared to the concentration of experimentally generated sulfide by the SRB to demonstrate the high applicability of these calculations to the future development of biological treatment systems.

Keywords: *Coal Mine Drainages, Sulfate-Reducing Bacteria, Heavy Metals, Passive Treatment*

INTRODUCCIÓN

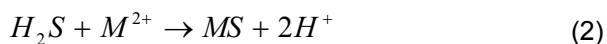
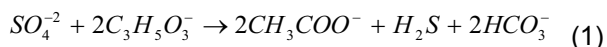
Las aguas residuales de la explotación del carbón contienen impurezas como: FeS_2 , Fe_{1-x}S , ZnS , NiS , Cu_2S , CuS y PbS ; las cuales pueden ser oxidadas por la acción del aire y microorganismos, formando lixiviados de bajo pH, y altas concentraciones de sulfatos y metales pesados que se denominan Drenajes Ácidos de Minas (DAM).

En Colombia existen cinco grandes regiones dedicadas a la explotación de minas de carbón, que están generando DAM, y que al ser vertidos a las fuentes hídricas generan un alto grado de contaminación; por consiguiente se evidencia la necesidad de plantear una solución a este problema.

Los humedales anaeróbicos, las lagunas y los sistemas limestone, son las denominadas tecnologías pasivas que se han utilizado para el tratamiento de los DAM. Estas tecnologías requieren poca atención operacional y de mantenimiento, en comparación con las tradicionales, y actualmente han sido ampliamente desarrolladas [1], [2], [3].

Los humedales anaeróbicos están compuestos de un sustrato orgánico, el cual es descompuesto por la acción de las bacterias. Los complejos orgánicos de los sustratos son biodegradados a compuestos orgánicos simples, los cuales pueden ser usados por las bacterias sulfato reductoras [4], [5].

Las reacciones químicas que se llevan a cabo en un sistema que contenga BSR, ha sido descrito según [6], de acuerdo a las siguientes reacciones:



Como resultado de estas reacciones los metales pueden ser removidos de las disoluciones y debido a la producción de HCO_3^- se incrementa la alcalinidad; la cual permite neutralizar la acidez de los DAM.

Las BSR son bacterias anaeróbicas que se encuentran ampliamente distribuidas en medios libres de oxígeno, tanto acuáticos como terrestres, donde la descomposición de la materia orgánica es un proceso continuo. Algunos de los factores ambientales que más influyen en el crecimiento y desarrollo de las BSR son la temperatura, el pH,

la concentración de Cl^- , O_2 , Fe^{3+} , Mn^{4+} , y SO_4^{2-} . En estado natural las mejores condiciones para el crecimiento y desarrollo de las BSR, con el fin de ser utilizadas en sistemas biológicos, se consiguen en las regiones del trópico, por ejemplo en Colombia.

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue plantear el uso de humedales anaeróbicos para el tratamiento de DAM, con diferentes características químicas; para esto se aislaron e identificaron cepas de bacterias sulfato reductoras a las cuales se les evaluó su capacidad para reducir sulfato y metales pesados, mediante el uso de humedales a escala laboratorio, a partir de una disolución preparada a composición idéntica a los DAM de carbón.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para el tratamiento de los DAM mediante BSR se llevaron a cabo las siguientes etapas: a) aislamiento, identificación bioquímica y cinética de crecimiento de los microorganismos, b) reducción de contaminantes presentes en disoluciones sintéticas, a concentraciones similares a las de los DAM, utilizando las BSR previamente aisladas.

Aislamiento de Microorganismos

Las BSR se aislaron de lodos procedentes de los reactores UASB, de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Bucaramanga. Se tomaron muestras de lodo a 3 diferentes profundidades en los reactores: la muestra 1 a 1,75 m, la muestra 2 a 1,25 m y la muestra 3 a 0,75 m. Con el objeto de discriminar los microorganismos y facilitar el aislamiento se utilizó la metodología de columna de Winogradsky. El equipo se construyó a partir de dos probetas de 1000 cm^3 y una de 500 cm^3 , las cuales fueron alimentadas con las muestras 1, 2 y 3, respectivamente. En el espacio superior se adicionó ácido ascórbico al 1 % y aceite mineral. Las columnas se sellaron con papel aluminio y parafinado y se expusieron a la luz solar, con el fin de estimular el crecimiento de las bacterias pertenecientes a los grupos 2 y 3 del ciclo del azufre. Después de 20 días de cultivo, se tomaron muestras de la base de la columna, y se sembraron en un medio BSR – JTAC, compuesto de lactato de sodio, peptona y extracto de carne. Los nuevos cultivos se mantuvieron en cámara de anaerobiosis Oxoid, en un ambiente de 75% de N_2 ,

14% de H₂, 10% de CO₂ y 1% de O₂. Después de 4 horas de incubación a 37 °C, las cepas inoculadas fueron analizadas.

Identificación de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)

La identificación de los microorganismos anaeróbicos aislados se llevo a cabo mediante el sistema Cristal BBL Becton Dickinson. El sistema contiene 29 sustratos bioquímicos y enzimáticos deshidratados. Los microorganismos se incubaron durante cuatro horas, a 37 °C, y con la ayuda de lámparas de luz blanca y luz ultravioleta se determinó el número de perfil, el cual junto con los resultados de las pruebas de catalasa, indol y coloración de Gram, se suministraron a un programa de computación para determinar el género y la especie de los microorganismos aislados.

Curvas de crecimiento de las BSR

Las curvas de crecimiento de los microorganismos aislados, se realizaron cuantificando las bacterias en una cámara de Neubauer, y llevando a cabo el recuento en un microscopio de campo oscuro.

Ensayos de bio-reducción y precipitación de metales

Dada la importancia del hierro en los DAM, el cual puede llegar a encontrarse hasta concentraciones de 1000 mg/l, inicialmente se realizaron bioensayos que permitieron evaluar el comportamiento de los microorganismos aislados, al entrar en contacto con sustratos que presentan concentraciones típicas de este metal. Posteriormente se evaluó el biotratamiento de las disoluciones que contenían manganeso, plomo, zinc, níquel y cobalto, dentro de los rangos de concentraciones que se especifican en la tabla 1.

Tabla 1. Concentración de metales utilizados para tratamientos con BSR.

| Metal | Concentración mínima mg/l | Concentración máxima mg/l |
|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Fe | 100 | 800 |
| Mn | 20 | 300 |
| Pb | 2 | 20 |
| Ni | 2 | 20 |
| Co | 2 | 20 |
| Zn | 5 | 50 |
| SO ₄ ⁻² | Dependiente de los metales | 3000 |

Se prepararon disoluciones en el laboratorio con características fisicoquímicas similares a las de los DAM utilizando los siguientes reactivos químicos de grado analítico: FeSO₄·7H₂O; Mn SO₄·H₂O; Zn SO₄ H₂O.; NiSO₄·6 H₂O; CoSO₄·7 H₂O; Pb SO₄. La concentración de los iones sulfatos fue regulada mediante la adición de ácido sulfúrico. Las pruebas de remoción de metales pesados se llevaron a cabo en elermeyers con capacidad de 250 ml envueltos en papel de aluminio, para garantizar completa oscuridad. Los volúmenes de medio de cultivo y disolución de metales se regularon, con el objeto de obtener la concentración final deseada. Finalmente se agregó el inoculó y se ajustó el valor del pH. Como variables respuesta, de la evolución del proceso, se evaluaron pH, Eh, concentración de metales, sulfatos y alcalinidad. Simultáneamente, mediante microscopía de campo oscuro, se realizó el monitoreo de las bacterias.

Las concentraciones de los metales en disolución se determinaron mediante la técnica de Absorción Atómica, utilizando un espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer PE 2380. La concentración de sulfato, el pH y el Eh se determinaron de acuerdo a la técnica propuesta en el Métodos Estándar para Análisis de Aguas Residuales [7].

ANALISIS DE RESULTADOS

Aislamiento e identificación bioquímica de las BSR

Como resultado de la etapa de cultivo con los lodos del UASB de la CDMB, se encontraron tres cepas de bacterias diferentes: BSR-1, BSR-2 y BSR-3, las cuales fueron aisladas e identificadas con el sistema BBL-Crystal.

Dado que los DAM tienen bajo pH; y el efecto de esta variable es crítica para el crecimiento y desarrollo de las BSR, se realizaron ensayos preeliminarios a fin de identificar el rango de pH en que pudiesen desarrollarse. Se sembraron inóculos de las BSR en medios líquidos cuyos pH variaban entre 3,5 y 7. En la tabla 2 se presenta la identificación de las cepas de BSR, y el mínimo nivel de pH, al cual es posible su desarrollo.

Tabla 2. Identificación Bioquímica de las BSR aisladas de lodo del UASB de la CDMB.

| Colonia | Prueba de Catalasa | Prueba de Indol | Coloración de Garm | Identificación | M[inimo valor de pH para su crecimiento |
|---------|--------------------|-----------------|---|--|---|
| BSR1 | Positivo | Negativo | Bacilos GRAM variable Cortos, Curvos, Delgados | <i>Desulfovibrium desulfuricans</i> | 4,9 |
| BSR2 | Positivo | Negativo | Bacilos GRAM variables Largos, Cortos, Delgados | <i>Desulfovibrium pigra</i> <i>Ddesulfovibrium spp.</i> | 5,1 |
| BSR3 | Negativo | Negativo | Bacilos GRAM variables Largos, Cortos, Delgados | <i>Desulfovibrium pigra</i> <i>Ddesulfovibrium spp.</i> | 4,7 |

La identificación de los microorganismos mostró que la colonia BSR1 corresponde al *Desulfovibrio desulfuricans*, mientras que para las colonias BSR2 y BSR3 no fue posible diferenciar entre los *Desulfomonas pigra* y *Desulfomonas spp.* Sin embargo se consiguió el objetivo de corroborar la presencia de bacterias reductoras de sulfato. Se observa en la tabla 2. que para el desarrollo de los cultivos el pH debe estar entre 4,7 a 5,1; por consiguiente el contacto directo del microorganismo con el DAM puede ser crítico, ya que estas disoluciones presentan valores del pH muy bajo. Por consiguiente es necesario regular el pH del DAM antes del tratamiento con las BSR, y de acuerdo con los anteriores resultados se optó por realizar las siguientes etapas experimentales de la investigación a pH inicial de 5,5.

Cinética de crecimiento de las BSR aisladas

El conteo directo de las bacterias, en la cámara de Newbauer, durante periodos de 600 horas, permitió determinar las curvas de crecimiento. Tomando los datos de la zona exponencial se determinó la velocidad de crecimiento específico, teniendo en cuenta que a cualquier tiempo en esta fase la concentración de los microorganismos esta definida por la ecuación: [8]

$$X \equiv e^{\mu t} X_0 \tag{3}$$

Donde:

- X = concentración de microorganismos (microorganismos/ml)
- Xo = concentración inicial de microorganismos, al inicio de la fase (microorganismos/ml)
- μ = velocidad específica de crecimiento (t⁻¹)

t = tiempo en el cual la concentración de los microorganismos es igual a X.

Linealizando la ecuación (3), se evaluó la pendiente y el corte de la línea recta, para obtener el valor de μ y el tiempo de duplicación.

En la tabla 3 se presenta los resultados para cada uno de los cultivos en estudio.

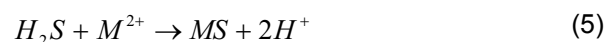
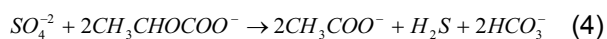
Se observa que las velocidades específicas de crecimiento de las cepas de BSR aisladas son lentos, por consiguiente los tratamientos de disoluciones con altos contenidos de metales responden también a tiempos de residencia grandes.

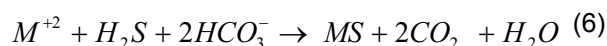
Tabla 3. Tiempos de duplicación y velocidad específica de crecimiento para las cepas de BSR aisladas.

| Cepa | m(h ⁻¹) | Tiempo de duplicación (h) |
|-------|---------------------|---------------------------|
| BSR1 | 0,1514 | 4.58 |
| BSR-2 | 0,1232 | 5.63 |
| BSR-3 | 0,2548 | 2.72 |

Bioreducción de sulfato y precipitación de metales

El proceso de reducción de sulfato por parte de las BSR, donde el lactato es el sustrato donador de electrones, puede describirse de acuerdo a las reacciones:





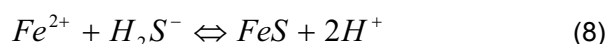
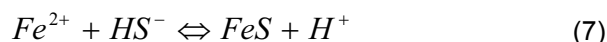
Se observa que las BSR generan iones bicarbonato, como resultado de la reducción de sulfato a sulfuro; así mismo la precipitación de los metales conlleva un aumento de la concentración de H^+ , ocasionando la disminución del pH de la disolución. La ecuación (6) permite explicar el fenómeno por el cual el pH del sistema permanece cercano a la neutralidad.

Los cambios en la concentración de sulfato durante el tratamiento de los DAM, preparados en el laboratorio, utilizando las cepas de BSR aisladas, y una mezcla de ellas, se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Velocidad de cambio de la concentración de sulfato durante el tratamiento con BSR, de un DAM que contiene 300mg/l de hierro.

| Cultivo de BSR | Densidad bacteriana inicial (BSR/ml) | Velocidad de cambio de la concentración de sulfato ($\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$) |
|----------------|--------------------------------------|--|
| BSR1 | 8.75×10^{10} | -70,015 |
| BSR2 | 8.25×10^9 | -81,7 |
| BSR3 | 2.05×10^9 | -104,87 |
| Mmezcla de BSR | 4.50×10^{11} | -82,45 |

En los resultados se observa que la reducción de sulfato obtenida al utilizar la mezcla de BSR, fue aproximadamente el valor promedio de las velocidades obtenidas a partir de los cultivos puros. A si mismo la cepa de BSR3 presentó el más alto valor de reducción de sulfato, lo cual era de esperarse debido a que esta cepa mostró el más bajo valor de tiempo de duplicación y el mayor valor de μ . La velocidad de generación de sulfato es un parámetro esencial para el diseño de un proceso biológico de tratamiento de DAM a partir de BSR, y la precipitación del hierro con el sulfito, por parte de las BSR, puede ser representada por las siguientes ecuaciones:



La concentración de sulfito producida por los microorganismos fue difícilmente evaluada, ya que este ión es continuamente utilizado en la remoción de los metales en disolución. La concentración del sulfito en agua se pudo detectar únicamente cuando los metales habían sido removidos. La reducción de sulfato, por parte de las BSR, es un proceso

irreversible que produce estequiométricamente sulfito a partir de iones sulfato, 1mmol de SO_4^{2-} puede generar 1 mmol de H_2S o S^{2-} [9], [10], [11]. En este trabajo la concentración del sulfito, generado por las BSR, se evaluó mediante la ecuación linealizada para la reducción de la concentración de sulfato, y se comparó con los valores experimentales de concentración de hierro disuelto.

En la figura 1 se presentan los resultados, y se observa que al periodo inicial de tiempo, la concentración de sulfito se incrementa, mientras que la concentración de hierro permanece constante. Se presenta un punto de corte, para la concentración de hierro, cuando la concentración de iones sulfito fue suficiente para satisfacer las condiciones del equilibrio planteado por las ecuaciones (7), (8) y (9).

La precipitación del hierro (0,004 mol/l) no ocurrió cuando la concentración de H_2S correspondió a la cantidad estequiométrica de sulfuro, de acuerdo a la reacción (8). En los cuatro casos se puede apreciar que la precipitación del hierro se llevó a cabo a partir de una concentración de H_2S por encima de 0,006 mol/l, y al finalizar el proceso la concentración de sulfito fue de 0,008 ml/l. Por consiguiente se deduce que se requiere una concentración entre 0,006 y 0,008 mol/l de sulfito para precipitar el metal presente en una disolución de DAM. Luego de 100 horas de experimentación, el porcentaje de hierro removido fue alto, sin embargo en términos generales se asume que la velocidad del tratamiento de remoción con las BSR fue lenta.

Estudio comparativo de la precipitación de hierro a partir de datos experimentales y calculados

Utilizando el software HSC4.0 se construyeron diagramas de equilibrio para la adición de H_2S y $NaHCO_3$ a una disolución de sulfato ferroso. La simulación del proceso de precipitación de hierro, por la adición de sulfito, fue posible mediante el seguimiento de las especies sólidas y líquidas de: $Fe(OH)_2$, $Fe(OH)_3$, $FeO_3 \cdot H_2O$, FeS , FeS_2 , Fe^{3+} , Fe^{2+} , $Fe(OH)_3(aq)$, $FeOH^{2+}$, $Fe(OH)^{3-}$, $FeSO_4(aq)$, OH^- , H^+ , S^{2-} , H_2S , HS^- , SO_4^{2-} , Na , y $NaHCO_3(aq)$; adicionalmente fue posible simular la formación de iones bicarbonato, lo cual ocurre al mismo tiempo que el proceso de reducción del sulfato. La cantidad de HCO_3^- adicionado fue el doble de la

cantidad de sulfuro, considerando, de acuerdo a la reacción (1), que por un mol de SO_4^{2-} reducido se produce simultáneamente un mol de H_2S y 2 moles de HCO_3^- . El pH se ajustó al valor de los experimentos con las BSR. Los resultados se presentan en la figura 2., donde se observa que cuando se obtuvo una concentración de H_2S entre 0,006 y 0,008 mol/l, se produjo la precipitación del hierro. Así mismo se aprecia que la concentración

experimental de sulfuro, necesaria para precipitar el hierro, se correlaciona muy bien con el valor teórico calculado con la simulación. La velocidad de generación de sulfuro permite determinar la velocidad de reducción de sulfato, en un sistema sin ningún tipo de tratamiento; y a partir de esta información es posible calcular más fácilmente las dimensiones reales del sistema biológico a utilizar para el tratamiento de un DAM con BSR.

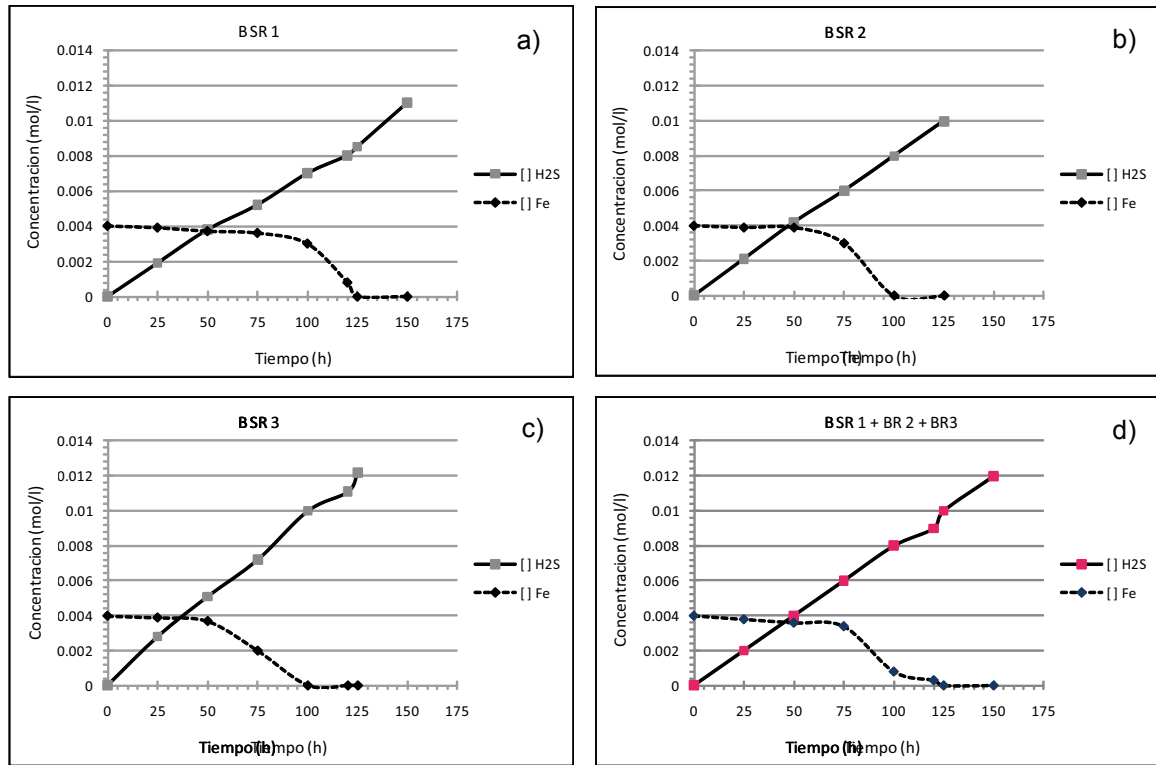


Figura 1. Comparación de las concentraciones experimentales de hierro y las concentraciones calculadas de sulfuro, durante el bioproceso con las diferentes cepas aisladas. (a) BSR1, (b) BSR2, (3) BSR3 y (d) mezcla de BSR.

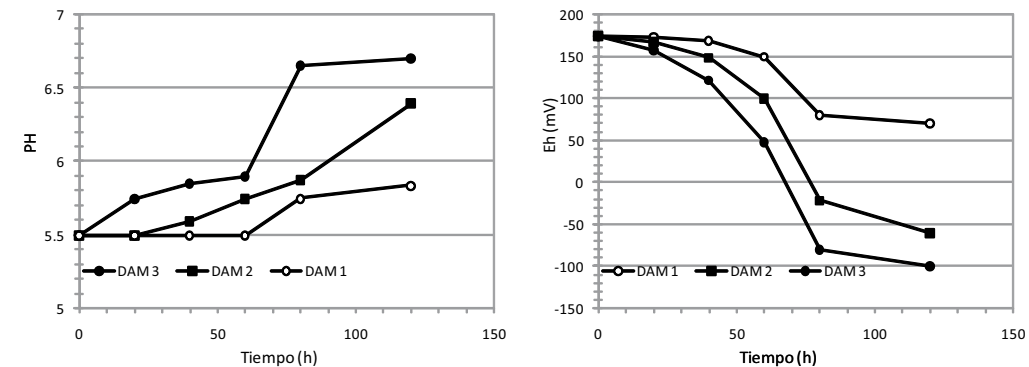


Figura 2. Variación del pH y del potencial de oxidación-reducción (Eh) en función del tiempo de tratamiento de soluciones preparadas de DAM utilizando un cultivo mixto de BSR.

Remoción de metales pesados de una disolución preparada de DAM usando BSR

Teniendo en cuenta que la composición de los DAM es muy variada, se procedió a preparar 3 disoluciones modelos; utilizando los rangos de concentración de los metales encontrados en aguas de minas de carbón. Luego de tratar los DAM durante 120 horas con la mezcla de BSR se determinó la concentración remanente de especies metálicas. En la tabla 5 se reportan los

resultados donde se observa que, a excepción del manganeso, la remoción de todos los metales fue elevada.

En la figura 3 se muestra el cambio de pH y de potencial de oxido-reducción para los experimentos. Los cambios fueron muy rápidos para los DAM que presentaban menor concentración de metales. El valor del Eh indica el cambio de las condiciones de oxidación a reducción de las disoluciones acuosas de DAM durante los ensayos, como resultado de las reacciones de metabolismo que llevan a cabo las BSR.

Tabla 5. Concentración de metales en tres muestras de DAM antes y después de la bioreducción con una mezcla de BSR.

| Metal | DAM preparado | Concentración inicial (ppm) | Concentración final luego del tratamiento con BSR (ppm) | Porcentaje de remoción (%) |
|-------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|
| Fe | 1 | 452,9 | 62,5 | 86,2 |
| | 2 | 269,2 | 1,7 | 99,4 |
| | 3 | 80,6 | 5,26 | 93,5 |
| Mn | 1 | 266,1 | 270,4 | 0 |
| | 2 | 98,8 | 77,8 | 21,3 |
| | 3 | 24,9 | 24,84 | 0,3 |
| Zn | 1 | 20,9 | 0,04 | 99,8 |
| | 2 | 3,47 | 0,017 | 99,5 |
| | 3 | 1,47 | 0,14 | 90,6 |
| Ni | 1 | 19,6 | 0,64 | 96,7 |
| | 2 | 9,42 | 0,35 | 96,2 |
| | 3 | 1,18 | 1,05 | 10,4 |
| Co | 1 | 19,3 | 0,53 | 97,2 |
| | 2 | 9,39 | 0,23 | 97,5 |
| | 3 | 1,27 | 1,05 | 17 |
| Pb | 1 | 3,26 | 0,036 | 98,9 |
| | 2 | 0,98 | 0,006 | 99,4 |
| | 3 | 0,88 | 0,016 | 98,2 |

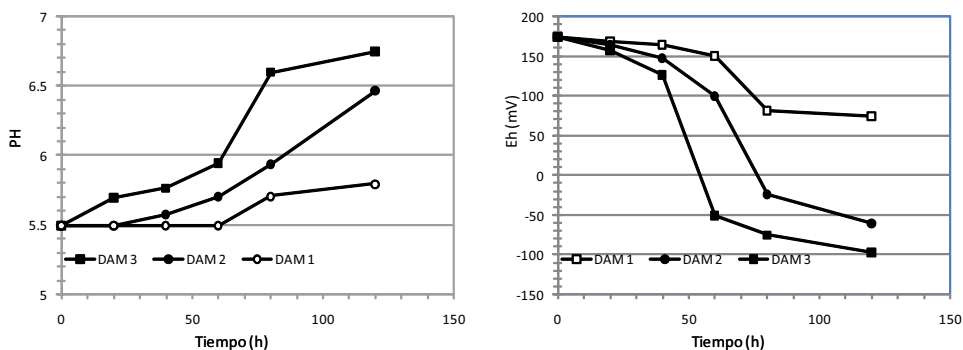


Figura 3. Variación de pH y de potencial de oxido reducción en función del tiempo para el tratamiento de DAM mediante un cultivo mixto de BSR.

CONCLUSIONES

A partir del lodo de los reactores anaerobios de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Bucaramanga, se aislaron e identificaron tres cepas de microorganismos pertenecientes al genero de las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR): *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfomonas pigra* y *Desulfobacter spp.* Se demostró la elevada resistencia de las BSR al contacto con disoluciones que contienen altas concentraciones de hierro, manganeso, zinc, níquel, cobalto y plomo. Se encontró que las colonias de BSR aisladas pueden sobrevivir y facilitar el tratamiento de Drenajes Ácidos de Minas (DAM) en ambientes con pH entre 4,7 y 5,0. Al realizar el biotratamiento de los DAM con cada uno de los cultivos aislados de las BSR se obtuvieron remociones superiores al 95% para Fe, Ni, Co, Zn y Pb; mientras que al utilizar un cultivo mixto de las bacterias la remoción de metales se incremento al 99%.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] KLEINMANN R. L., HEIDIN R. S. (1993). *Treat Mine Water Using Pasive Methods*. Pollution Engineering. Agosto, 20-21.
- [2] GUSEK J. J. (1995). *Passive treatment of acid rock drainage: GAT is the potential bottom Line?*. Mining Engineerin. Mar., 250-253.
- [3] HEIDIN R. S., WATZLAF G. R., NAIRN R. W. (1994). *Passive treatment of Acid Mine Drainage with Limestone*. Journal of Environmental Quality. 23, 1338-1345.
- [4] SINGH K. (1992). *Treating Acid Mine Drainage with SRB*. Pollution Engineering. Junio 1, 66-67.
- [5] DVORAK D.H., HEIDIN R. S., EDENBORN E., MCLNTIRE P., (1992). *Treatment of metal-contaminated water using bacterial sulfate reduction: Results from Pilot-Scale reactors*. Biotechnology and Bioengineering. 40, 609-616.
- [6] EGER P., WAGNER J., (1995). *Sulfate Reduction for the Treatment of Acid Mine Drainage: Long term Solution on Short Term Fix*. Conference Proceedings of Sudbury'95. Mayo 28 a Junio 1. Sudbary, Notario Canada. 515-524.
- [7] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1998). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Edited by Clesceri L., Greemberg A. and Eaton A., 20th edición. APHA-AWWA-WPCF, Washington D.C.
- [8] MIDIGAN M., MARTINKO M. y PARKER J. (1997). *Biología de los microorganismos Brock*. Prentice may, Inc. 8^a ed.
- [9] MACHEMER S., REYNOLDS J., LAUDON L., WILDEMAN T. (1993). *Balance of S in a constructed wetland built to treat acid mine drainage. Idaho Springs Colorado, USA*. Applied Geochemistry, 8, 587-603.
- [10] REYNOLDS J. (1991) *Determination of the rate of sulfide production in a constructed wetland receiving acid mine drainage*. National Meeting of the American Society for Surface Mining and reclamation. Durango, Colorado USA, Mayo 14-17.
- [11] REYNOLDS J. (1997) *Potentiometric titration meted for determineing rates of sulfate reduction in a constructed wetland*. Geomicrobiology Journal, 14, 65-79.