

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE INGENIERÍA

INSTITUTO DE METALURGÍA

EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO CON ACTIVIDAD SULFATORREDUCTORA, EMPLEANDO CELULOSA COMO SUSTRATO, PARA LA REMOCIÓN DE ARSÉNICO PRESENTE EN AGUA.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN INGENIERÍA DE MINERALES

PRESENTA:

I.Q. BIANCA BERENICE VALLEJOS RIOS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROBERTO BRIONES GALLARDO

Proyecto financiado parcialmente por el Fondo Mixto del Gobierno del Estado de San Luis Potosí con clave: FMSLP-2005-CO1-32



San Luis Potosí, S. L. P., Mayo 2011



Evaluación de un consorcio microbiano con actividad sulfatorreductora, empleando celulosa como sustrato, para la remoción de arsénico presente en agua by Blanca Berenice Vallejos Rios is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE INGENIERÍA

**EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO CON ACTIVIDAD
SULFATORREDUCTORA, EMPLEANDO CELULOSA COMO SUSTRATO, PARA LA
REMOCIÓN DE ARSÉNICO PRESENTE EN AGUA.**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN INGENIERÍA DE MINERALES

Presentada por:

I. Q. Bianca Berenice Vallejos Ríos

Asesorada por:

Dr. Roberto Briones Gallardo

Sinodales:

Dr. Roberto Briones Gallardo

Dra. María Guadalupe Sánchez Loredo

Dra. Marisol Gallegos García

Dr. Roel Cruz Gaona



San Luis Potosí, S. L. P., Mayo 2011

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Se agradece al Instituto de Metalurgia de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, este trabajo de tesis se realizó en los laboratorios del área de Ingeniería de Minerales, que se encuentra dentro del programa de Posgrado (PNCP) de Maestría en Ciencias en Ingeniería de Minerales.
- ❖ Se agradece el apoyo al CONACyT por la beca número 201865 para Maestría otorgada durante el periodo 2006-2008.
- ❖ Se agradece al Proyecto financiado parcialmente por el Fondo Mixto del Gobierno del Estado de San Luis Potosí con clave: FMSP-2005-CO1-32
- ❖ Al IPICYT por permitirme utilizar sus instalaciones para la determinación de AGV por medio de Electroforesis Capilar y particularmente a la Dra. Ma. De Lourdes Berenice Celis García por su apoyo, recomendaciones, conocimientos y tiempo dedicados durante este trabajo de investigación.
- ❖ A mi asesor, el Dr. Roberto Briones Gallardo, por el apoyo brindado desde el inicio de mi Maestría, por sus enseñanzas, tiempo, paciencia y dedicación, otorgados siempre para concluir este trabajo de tesis. A la Dra. Ma. Guadalupe Sánchez Loreda, a la Dra. Marisol Gallegos García y el Dr. Roel Cruz Gaona, por los conocimientos aportados y su disponibilidad en la revisión de esta tesis.
- ❖ A la M.C. Rosalina Tóvar por apoyo en el análisis de muestras por MEB. Al Sr. Francisco Núñez, el Sr. Nicolás Flores y al Ing. Francisco Galindo por su atención siempre brindada y su excelente trabajo, desarrollado en el Instituto de Metalurgia de la UASLP.
- ❖ A quienes compartieron los buenos y no tan buenos momentos durante las largas horas de Laboratorio: Mariana, Ofelia, Mariano, Adriana Flores, David, Eduardo Oros, Marisol, Fátima, Anibal, Cecilia y Omar, gracias a todos por brindarme su amistad haciendo siempre amena mi estancia en el Instituto y en SLP.
- ❖ A quienes me brindaron las puertas de su casa: La familia Reyes Jiménez, la familia Mitre G. y Doña Teresa y familia, gracias por hacerme sentir en casa.

DEDICATORIA

Esta etapa de mi vida tiene varios matices. Los cuales radican sobre diferentes aspectos en mi desarrollo tanto personal como profesional. Sin entrar en detalles, sólo necesito mencionar que me siento plena en varios de estos objetivos y ello no podría haberse realizado sin la ayuda de nuestro **Señor**. Gracias por bendecirme a mí y a mi familia en cada paso que damos.

Valores tales como el esfuerzo y tenacidad, el amor y la bondad, la lealtad y el honor, son difíciles de cimentar en las personas. Y sin aprender todavía a desarrollarlos del todo, se que en su mayoría los obtuve gracias a una sola persona, gracias a mi mejor amiga, mi guerrera: **María Luisa Ríos Antonio**

A quien me ha considerado siempre su amiga, brindándome siempre su amor y cariño, mi hermana, mi adorada **Nashieli**. A mis niños queridos y mis amuletos **Aldo y Yamil**. Sé que cuento con ustedes, esto también es de ustedes tres.

Por seguir a mi lado brindándome siempre consejos y amor, mis viejitos **Sebastiana** y **Rosalío**. A quienes siempre que los necesito se encuentran ahí sin dudarlo, los quiero, muchas gracias mi **Zoraida** y mi **Pepe**.

Porque en los años juntos, he vivido momentos llenos de felicidad a tu lado, gracias por tu paciencia, comprensión, sentido del humor y por todo el amor que me has brindado, por mantenerme consciente de que no elegí mejor persona para ser mi compañero de vida y por el hermoso regalo que me has dado: $NJ + PC = BC$. Gracias **Eduardo Terrazas**. Este trabajo es nuestro.

ÍNDICE.

| | |
|--|-----|
| ÍNDICE..... | I |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | V |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | VII |
| ACRÓNIMOS..... | IX |
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCION..... | 3 |
| 1. JUSTIFICACIÓN..... | 5 |
| 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS..... | 7 |
| 2.1. HIPÓTESIS..... | 7 |
| 2.2. OBJETIVO GENERAL..... | 7 |
| 2.2.1 <i>Objetivos Específicos</i> | 7 |
| 3.- ANTECEDENTES SOBRE LA PROBLEMÁTICA DE LA PRESENCIA DE ARSÉNICO EN AGUA..... | 9 |
| 3.1.- MINERÍA EN MÉXICO..... | 9 |
| 3.2. IMPACTO AMBIENTAL OCASIONADO POR LA MINERÍA..... | 10 |
| 3.3. PAÍSES AFECTADOS POR CONTAMINACIÓN CON AS..... | 11 |
| 3.4. FUENTES NATURALES DE AS..... | 12 |
| 3.4.1. <i>Arsénico de origen antropogénico</i> | 12 |
| 3.5. FUENTES DE DISPERSIÓN DE ARSÉNICO EN EL AGUA..... | 13 |
| 3.6. CARACTERÍSTICAS Y TOXICIDAD DEL ARSÉNICO..... | 15 |
| 3.7. LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES PARA EL ARSÉNICO..... | 17 |
| 3.8. DISPERSIÓN DE ARSÉNICO Y SULFATOS ASOCIADOS A LA GENERACIÓN DE DRENAJE ÁCIDO DE ROCA (DAR)..... | 17 |
| 3.9. ÁREA DE ESTUDIO..... | 21 |
| 4.- ANTECEDENTES SOBRE ACTIVIDAD BIOLÓGICA SULFATORREDUCTORA Y TIPOS DE SUSTRATO..... | 23 |
| 4.1. TRATAMIENTOS FÍSICOQUÍMICOS..... | 23 |
| 4.1.2.- <i>Tratamientos biológicos anaerobios</i> | 24 |
| 4.2.- BACTERIAS SULFATORREDUCTORAS..... | 25 |
| 4.3. OXIDACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA POR BSR..... | 26 |
| 4.4. CONSORCIO MICROBIANO..... | 28 |
| 4.5. SUSTRATO ORGÁNICO..... | 29 |
| 4.6.- MATERIAL CELULÓSICO COMO FUENTE DE CARBONO..... | 31 |
| 4.6.1. <i>Degradación de celulosa por consorcios de BSR</i> | 32 |
| 4.6.2. <i>Características físicas de la celulosa</i> | 32 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS PARA EVALUAR LA SULFATORREDUCCION Y REMOCION DE ARSENICO EN AGUA..... | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1. OBTENCIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS CON ACTIVIDAD REDUCTORA DE SULFATOS . | 33 |
| 5.1.1. <i>Producción de biomasa con ASR.</i> | 33 |
| 5.2. CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA. | 35 |
| 5.3. ESQUEMA EXPERIMENTAL. | 35 |
| 5.4. CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO ORGÁNICO (CELULOSA). | 37 |
| 5.4.1. <i>Determinación de materia orgánica e inorgánica de la celulosa.</i> | 37 |
| 5.4.2. <i>Pre-tratamiento de la celulosa.</i> | 38 |
| 5.4.3. <i>Relación de carbono en la celulosa.</i> | 38 |
| 5.5. ADSORCIÓN DEL SULFURO DE HIDRÓGENO EN LA CELULOSA. | 39 |
| 5.6. EVALUACIÓN DE LA ASR CON CT Y CST. | 39 |
| 5.7. PERFILES DE CONCENTRACIÓN DE AGV COMO PRODUCTOS DE BIODEGRADACIÓN DE LA CELULOSA. | 40 |
| 5.7.1 <i>Determinación de AGV por EFC.</i> | 41 |
| 5.8. EVOLUCIÓN DE POTENCIAL DE ÓXIDO REDUCCIÓN EN CINÉTICAS MICROBIANAS. | 41 |
| 5.9. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FERMENTACIÓN E HIDRÓLISIS DE JH Y M2. | 42 |
| 5.10. PRODUCCIÓN DE H₂S CON ACETATO COMO FUENTE DE CARBONO. | 43 |
| 5.11. ARS CON CC COMO FUENTE DE CARBONO. | 44 |
| 5.12. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE METALES Y ARSÉNICO EN EL AGUA DE ESTUDIO. | 44 |
| 5.13. ESTABILIZACIÓN DEL AGUA DE CB EN SISTEMAS BATCH. | 44 |
| 5.14. CARACTERIZACIÓN DEL PRECIPITADO FINAL POR MEB. | 44 |
| 6. RESULTADOS SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA SULFATORREDUCTORA | 47 |
| 6.1. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA SULFATORREDUCTORA. | 47 |
| 6.2. CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO ORGÁNICO. | 50 |
| 6.3. CINÉTICA PARA DESCARTAR LA ADSORCIÓN DE H₂S EN LA CELULOSA. | 50 |
| 6.4. ARS CON CT Y CST. | 51 |
| 6.4.1. <i>ARS con CT por explosión térmica.</i> | 51 |
| 6.4.2. <i>ARS CST disgregada en agua.</i> | 52 |
| 6.5. ARS Y EL CONTROL DEL E_H. | 54 |
| 6.6. PERFILES DE CONCENTRACIÓN DE AGV COMO PRODUCTOS DE BIODEGRADACIÓN DE LA CELULOSA. | 56 |
| 6.6.1. <i>Cinética de producción de ácido cítrico.</i> | 58 |
| 6.6.2. <i>Cinéticas de producción de ácido butírico.</i> | 59 |
| 6.6.3. <i>Cinética de producción de ácido láctico.</i> | 60 |
| 6.6.4 <i>Cinética de producción de ácido acético</i> | 62 |
| 6.6.5. <i>Cinética de producción de ácido pirúvico.</i> | 63 |
| 6.6.6. <i>DQO generada en los consorcios JH y M2 por la degradación de celulosa.</i> | 65 |
| 6.7. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE H₂S CON ACETATO COMO FUENTE DE CARBONO. | 67 |
| 6.8. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FERMENTACIÓN E HIDRÓLISIS DE JH Y M2. | 69 |
| 6.9. ARS CON CC COMO FUENTE DE CARBONO. | 72 |
| 7.-RESULTADOS SOBRE LA REMOCION DE ARSENICO EN AGUA. | 74 |
| 7.1. CARACTERIZACIÓN DEL CASO DE ESTUDIO. | 74 |
| 7.2. CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO Y SULFATOS EN EL AGUA DE ESTUDIO. | 75 |
| 7.3. CARACTERIZACIÓN INICIAL Y FINAL DEL AGUA DE CB Y SUSTRATO ORGÁNICO. | 75 |

| | |
|--|-----------|
| 7.4. ARS Y ESTABILIZACIÓN DE AS EN H₂O DE CB CON M2..... | 76 |
| 7.5. CONFIRMACIÓN DEL PRECIPITADO FINAL DE AS POR EDS-MEB..... | 78 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 82 |
| CONCLUSIONES..... | 82 |
| RECOMENDACIONES..... | 83 |
| APÉNDICES..... | 84 |
| APÉNDICE 1.- MODELO SIGMOIDAL DE GOMPERTZ | 84 |
| APÉNDICE 2.- DETERMINACIÓN DE SULFURO..... | 86 |
| APÉNDICE 3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE METALES Y ARSÉNICO EN AGUA... .. | 87 |
| APÉNDICE 4.- E_H VS H₂S | 88 |
| APÉNDICE 5.- DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO)..... | 89 |
| APÉNDICE 6.- DETERMINACIÓN DE SULFATOS..... | 89 |
| APÉNDICE 7.- COMPORTAMIENTO DE H₂S EN EXPERIMENTO DE DQO..... | 91 |
| APÉNDICE 8.- CALIBRACIÓN DE ELECTRODOS..... | 92 |
| REFERENCIAS | 94 |

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Producción Minera Mexicana 2002-2010 (Modificado de SGM 2010)..... 9

Figura 2. Diagrama E_H -pH, a 25°C y una atmósfera de presión. Para concentración total de As igual a 10^{-5} mol L⁻¹ y de azufre igual a 10^{-3} mol L⁻¹ (Ferguson y Gavis 1972). 15

Figura 3. Enfermedad del pie negro (Miliarium, 2007). 17

Figura 4. Distribución de las especies de azufre en función de pH – E_H , a 25°C y una atmósfera de presión, con una concentración total de azufre 1 mol L⁻¹..... 20

Figura 5. Parque Recreativo Cerrito Blanco en el Municipio de Matehuala, S.L.P. México. 22

Figura 6. Biorreactor diseñado para el tratamiento de agua contaminada con As. Método de metilación anaerobia y remoción por adsorción de la arsina con carbón activado (Modificado de Frankenberger y Ashad, 2002)..... 25

Figura 7. Diagrama de la degradación anaerobia de polímeros orgánicos (Modificado de Lens *et al.*, 2000)..... 30

Figura 8. Estructuras de celulosa, hemicelulosa y lignina (Kobayashi *et al.*, 2000)..... 31

Figura 9. Inóculos de BSR en Medio Postgate.C modificado 34

Figura 10. Diagrama de flujo del diseño experimental. Donde A.R.S. se refiere a actividad reductora de sulfatos, JH y M2, se refiere a los consorcios provenientes de esos sitios de muestreo, AGV (ácidos grasos volátiles), EFC (electroforesis capilar); EAA espectroscopia de absorción atómica..... 37

Figura 11. Botellas serológicas de 120 ml con celulosa sólida (CS) como fuente de carbono..... 40

Figura 12. Dispositivo de medición del gas producido por fermentación e hidrólisis. 43

Figura 13. Comportamiento en la producción de H₂S de comunidades JH (■) y M2 (○) en presencia del medio Postgate modificado. Volumen de reacción 120 mL. Modelo Gompertz: JH (· ·) para M2 (····). 48

Figura 14. Comportamiento en la producción de H₂S de comunidades JH (■) y M2 (○) en presencia del medio Postgate modificado en 60 mL. Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (····)..... 49

Figura 15. Perfil de combustión de la celulosa..... 50

Figura 16. Adsorción de H₂S sobre celulosa sólida (CS) a diferentes concentraciones iniciales de H₂S: 0.91 mM (•), 2 mM (+), 4.5 mM (■), 8.1 mM (x), 15.8 mM (*). 51

Figura 17. ARS específicas de JH (■) y M2 (○) con la celulosa tratada (CT). Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (····)..... 52

Figura 18. Cinética de H₂S empleando celulosa disgregada en agua con los consorcios JH (■) y M2 (○). Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (····). 53

Figura 19. Cinética de Potencial de Óxido Reducción (E_H) con los consorcios JH (■) y M2 (○) en presencia de celulosa..... 56

Figura 20. Perfil de concentración total de los ácidos grasos como producto de la degradación de la celulosa en los consorcios JH (■) y M2 (○). Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (····)..... 57

Figura 21. Cinética de producción de ácido cítrico generado por la hidrólisis de celulosa con los consorcios JH (■) y M2 (○), en condiciones sulfato reductoras. Ajuste Gompertz: JH (· ·), M2 (····). 59

Figura 22. Cinética de producción de ácido butírico generado por la hidrólisis de celulosa con los consorcios JH (■) y M2 (○), en condiciones sulfato reductoras. Ajuste Modelo Gompertz: JH (—), M2 (····). 60

| | |
|---|-----------|
| Figura 23. Cinética de producción de ácido láctico generado por la hidrólisis de celulosa con los consorcios JH (■) y M2 (○), en condiciones sulfato reductoras. Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (····). | 61 |
| Figura 24. Cinética de producción de ácido acético generado por la hidrólisis de celulosa con los consorcios JH (■) y M2 (○), en condiciones sulfato reductoras. Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (····). | 63 |
| Figura 25. Cinética de producción de ácido pirúvico generado por la hidrólisis de celulosa con los consorcios JH (■) y M2 (○), en condiciones sulfato reductoras. Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (····). | 64 |
| Figura 26. Concentración específica de DQO para JH (■) y M2 (○) sin ajuste por sulfuro. Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (····). | 66 |
| Figura 27. Comportamiento de la DQO final (DQOF) para las dos comunidades JH (■) y M2 (○). Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (····). | 67 |
| Figura 28. Producción de H₂S en presencia de ácido acético como única fuente de carbono. JH – Act (■), M2 – Act (○). Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (····). | 69 |
| Figura 29. Desplazamiento de líquido empleando el consorcio JH con: glucosa y SO₄²⁻(JH-Glu) (■); celulosa y SO₄²⁻(JH-Cel) (○). | 70 |
| Figura 30. Desplazamiento del líquido empleando el consorcio M2 con: glucosa y SO₄²⁻(M2-Glu) (□); celulosa y SO₄²⁻(M2-Cel) (○). | 70 |
| Figura 31. Desplazamiento del líquido empleando el consorcio M2 con: celulosa con SO₄²⁻(□); celulosa y sin SO₄²⁻ (○). | 71 |
| Figura 32. Desplazamiento del líquido empleando el consorcio M2 con: glucosa y SO₄²⁻(□); glucosa y sin SO₄²⁻(○). | 72 |
| Figura 33. ARS con CC como fuente de carbono: JH CC (■), M2 CC (○). | 73 |
| Figura 34. ARS con consorcio M2, en agua de CB con As, CC como fuente de carbono (As-M2 (•)) Ajuste Modelo Gompertz (····). | 77 |
| Figura 35. Fotomicrografía del precipitado As-M2a | 78 |
| Figura 36. Fotomicrografía del precipitado As-M2b | 79 |
| Figura 37. Fotomicrografía del precipitado As-M2c | 80 |

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reacciones de la degradación de la materia orgánica por BSR (Gallegos *et al.*, 2010). 28

Tabla 2. Concentraciones totales de elementos en los suelos donde se recuperaron los consorcios JH y M2 (Labastida, 2007). 33

Tabla 3. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S con Medio Postgate C en 120 mL.... 48

Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S con Medio Postgate C en 60 mL. 49

Tabla 5. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S con celulosa tratada (CT). 52

Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S con celulosa disgregada (CST). 53

Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de ΣAGV_i con celulosa. 57

Tabla 8. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de ácido cítrico (A.C.) a partir de celulosa. 58

Tabla 9. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de ácido butírico (A.B.) a partir de celulosa. 60

Tabla 10. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de ácido láctico (A.L.) a partir de celulosa. 61

Tabla 11. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de ácido acético (A.A.) a partir de celulosa. 62

Tabla 12. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de ácido acético (A.P.) a partir de celulosa. 64

Tabla 13. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de DQO soluble a partir de celulosa. 65

Tabla 14. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S soluble a partir de ácido acético. 68

Tabla 15. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S soluble a partir de CC como sustrato. 73

Tabla 16. Concentraciones de As y SO₄²⁻ en mg L⁻¹ de CB. 74

Tabla 17. Concentraciones de As total y arsenito en Cerrito Blanco. 74

Tabla 18. Concentraciones de As, Cd, Cu, Pb, Zn y Fe en Cerrito Blanco. 75

Tabla 19. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S soluble para la precipitación de As en el agua de CB. 76

ACRÓNIMOS

| | |
|-------------------------|--|
| A.A. | Ácido acético |
| A.B. | Ácido butírico |
| A.C. | Ácido cítrico |
| AEMM | Anuario estadístico de la minería mexicana |
| AGV | Ácidos grasos volátiles |
| A.L. | Ácido láctico |
| A.P. | Ácido pirúvico |
| ARS | Actividad reductora de sulfatos |
| ASR | Actividad sulfatorreductora |
| As¹⁺ | Arsénico con estado de oxidación +1 |
| As³⁺ | Arsénico con estado de oxidación +3 |
| As⁵⁺ | Arsénico con estado de oxidación +5 |
| ATSDR | Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR por sus siglas en Inglés) |
| BRP | Barrera reactiva remeable |
| BSR | Bacterias sulfatorreductoras |
| C.E. | Conductividad eléctrica |
| CA | Carbonera |
| CB | Cerrito blanco |
| CC | Celulosa cristalina (grado reactivo) |
| Cel | Celulosa |
| CONAGUA | Comisión nacional del agua |
| CS | Celulosa sólida (papel) |
| CST | Celulosa sin tratar |
| CT | Celulosa tratada |
| C2 | Compuestos con 2 moléculas de carbono |
| C4 | Compuestos con 4 moléculas de carbono |
| DAM | Drenaje ácido de mina |
| DAR | Drenaje ácido de roca |
| DMA | Dimetil arsina |
| DQO | Demanda química de oxígeno |
| EAA | Espectroscopia de absorción atómica |
| ΣAGV_i | Sumatoria total de ácidos grasos volátiles |
| EFC | Electroforesis capilar |
| E_H | Potencial óxido reducción referido al ENH |
| ENH | Electrodo normal de hidrógeno |
| EPA | Agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA por sus siglas en Inglés) |

| | |
|-----------------------------|--|
| EPT | Elementos potencialmente tóxicos |
| FIAS | Espectroscopia de absorción atómica con inyección de fluidos (FIAS por sus siglas en Inglés). |
| Glu | Glucosa |
| H | Horas |
| H₂S | sulfuro de hidrógeno |
| HACER | Hidroarsenismo |
| INEGI | Instituto nacional de estadística y geografía |
| IRC | Centro internacional de agua y saneamiento (IRC por sus siglas en Inglés) |
| JH | consorcio sulfatorreductor |
| K | constante cinética de primer orden (h^{-1}) |
| kV | Kilovolts |
| M2 | Consorcio de bacterias sulfatorreductoras |
| MEB | Microscopio electrónico de barrido |
| MMA | Ácido monometilarsénico |
| MO | Materia orgánica |
| mV | Milivolt |
| NIST | Instituto nacional de estándares y pruebas de los Estados Unidos (NIST por sus siglas en Inglés) |
| OMS | Organización mundial de la salud |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| PN | Potencial de neutralización |
| \hat{q} | producción máxima específica (mmol /mg SSV) |
| SGM | Servicio geológico mexicano |
| SSF | Sólidos suspendidos fijos |
| SSV | Sólidos suspendidos volátiles |
| USEPA | Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA por sus siglas en Inglés) |
| UV | Ultravioleta |
| V | Volts |
| V_{max} | Velocidad máxima de producción (mmol/g SSV h) |
| WHO | Organización mundial de la salud (WHO por sus siglas en Inglés) |
| Xc | Fase lag o de aclimatación. |
| [H₂S] | Concentración de H ₂ S (milimolar, mM) |

RESUMEN

La contaminación de metales solubles representa un grave problema de contaminación en aguas y suelos de zonas mineras abandonadas. En este trabajo se presenta una alternativa de tratamiento para agua contaminada con arsénico (As) mediante su precipitación con sulfuro de hidrógeno (H_2S) producido por la reducción biológica del ion sulfato al emplear celulosa como fuente de carbono. Para esto, se estudiaron dos consorcios microbianos denominados JH y M2, aislados previamente del Distrito Minero de Santa María de la Paz, y de un suelo de la Ciudad de Matehuala, San Luis Potosí, que ha recibido el impacto de las escorrentías proveniente del distrito minero anteriormente mencionado.

Se empleó celulosa como sustrato orgánico sólido, en dos formas: celulosa sólida (CS, papel absorbente) y celulosa cristalina (CC, grado reactivo). Se demostró que ambos consorcios microbianos (JH y M2) tienen la capacidad de emplear como donador de electrones la celulosa y generar H_2S , a partir de su actividad sulfatorreductora (ASR). Los consorcios microbianos, presentaron velocidades máximas de producción de 0.2 mmol H_2S/g SSV*h para JH y de 0.32 mmol H_2S/g SSV*h para M2 cuando se empleó la CS.

Una vez comprobada la ASR se dió seguimiento al potencial de óxido reducción (E_H) y se comprobó que ambos consorcios lograron reducir de manera gradual el potencial redox del sistema. Lo anterior, permitió el control del E_H para la precipitación del As en solución, alcanzando valores de -220 mV en un tiempo de 53 días.

Al seguir la degradación biológica de la celulosa, se observó que existe una amplia diferencia metabólica entre los consorcios utilizados. Lo anterior se dedujo a través de los perfiles generados, durante las cinéticas, de ácidos grasos volátiles (AGV) determinados por electroforesis capilar (EFC) (i.e. ácido acético, ácido butírico, ácido cítrico, ácido pirúvico y ácido láctico). Para estos casos se obtuvieron velocidades diferentes en cada uno de los AGV's analizados, lo cual se refleja en la sumatoria de los mismos (ΣAGV_i), donde el consorcio M2 presentó una mayor velocidad de producción de AGV (31.22 mmol $\Sigma AGV/g$ SSV*h) comparada con la de JH (12.8 mmol $\Sigma AGV/g$ SSV*h). Lo anterior, permitió establecer el criterio de que existe un mayor número de bacterias hidrolíticas y

fermentativas en M2 comparado contra JH, que permiten tener una mayor cantidad de sustrato soluble disponible para la actividad microbiana.

Se estudió el comportamiento de producción de H₂S en ambos consorcios, empleando exclusivamente acetato como única fuente de carbono. El resultado definió una mejor respuesta en el consorcio bacteriano M2, con una velocidad máxima de 4.50 mmol H₂S/ g SSV L⁻¹, en comparación con JH que presentó una V_{max} de 0.756 mmol H₂S/ g SSV L⁻¹. Asimismo, se observó que la fase lag (o de aclimatación) fue de 690 h más en JH que en M2, lo cual nos lleva a deducir, que se tiene mayor número de bacterias oxidantes incompletas en el consorcio JH, ya que estos requieren mayor tiempo para empezar a ver en el sistema la producción de H₂S en presencia de acetato.

En base a que las características del consorcio M2 resultaron más idóneas para nuestro sistema, se utilizó este consorcio para establecer un experimento con agua contaminada del Parque recreativo de Cerrito Blanco en el Municipio de Matehuala, S.LP, México, en donde después de un análisis se cuantificaron 8 mg L⁻¹ de As y 1786 mg L⁻¹ de sulfatos (SO₄²⁻) ambas concentraciones se encuentran por encima de la NOM-127 SSA-1-1994. De este experimento se obtuvo una remoción del 99% de As y un 36% de SO₄²⁻. El precipitado formado fue analizado por MEB para confirmar la precipitación de fases de As asociadas a azufre.

Lo anterior demostró la factibilidad técnica del sistema propuesto para tratar aguas que presentan contaminación mixta de As y SO₄²⁻ y permitió establecer las bases y antecedentes técnicas que sirvan para el escalamiento de un bioreactor como tratamiento *ex situ* de agua contaminada por estos compuestos, empleando celulosa como donador de electrones. Debido a la naturaleza sólida de la celulosa, es posible emplearla como material de relleno en una barrera reactiva permeable (BRP) para controlar la contaminación de efluentes o aguas subterráneas que contienen estos contaminantes.

INTRODUCCION.

Generalmente las propuestas de remediación de aguas y suelos contaminados impactados por actividades minero metalúrgicas, se establecen con la finalidad de disminuir la movilidad de elementos potencialmente tóxicos (EPT) hacia cuerpos de aguas superficiales y mantos freáticos. No obstante, algunas propuestas recientes presentan serios inconvenientes tanto a nivel económico como de impacto ambiental. Asociadas a este último se encuentra la remoción y agotamiento de nutrientes en el suelo, que impide la restauración del sitio impactado de manera natural en tiempos cortos. Por lo tanto, es conveniente considerar alternativas tecnológicas que permitan controlar las operaciones de estabilización de metales pesados de efluentes empleando bacterias sulfato reductoras (BSR). Estos microorganismo, se han estudiado en diferentes sistemas como reactores anaerobios de flujo ascendente, reactores de tanque agitado, reactores de lecho fluidizado, reactores empacados, entre otros (Kaksonen *et al.*, 2003, Moller *et al.*, 2004, Kolmert *et al.*, 2001). En estos sistemas, generalmente se emplean como fuente de carbono y energía compuestos orgánicos de bajo peso molecular y de fácil degradación para las BSR tales como: acetato, lactato, glucosa produciendo por reducción desasimilativa de azufre, sulfuro biogénico (Lens *et al.*, 1998; Moller *et al.*, 2004). Sin embargo, existen estudios que demuestran el empleo de otras fuentes de carbono más complejas y de alto peso molecular que pueden servir como fuente de carbono y generar sulfuro de hidrógeno en sistemas anaerobios. Tuttle *et al.* (1968), estudiaron la factibilidad de emplear celulosa de desperdicios de madera como fuente de carbono para tratar los drenajes ácidos de mina (DAM), empleando BSR para la remoción subsecuente de sulfuros de hierro (FeS), utilizando como fuente de carbono, compuestos de la fermentación de la celulosa.

La degradación anaerobia de la celulosa, se presenta por la acción microbiana de consorcios con una amplia diversidad metabólica, los cuales pueden propiciar la hidrólisis de la celulosa y formar compuestos más simples de carbono (C2 a C4) que pueden servir como fuente de carbón para las BSR o para bacterias metanogénicas.

Debido a que los metales no pueden destruirse, una alternativa para el tratamiento de aguas o suelos contaminados, es la formación de precipitados con baja solubilidad, como los sulfuros metálicos. Aunque dicha reacción de estabilización es netamente química, la generación de sulfuros a partir de sulfatos por vía microbiana, resulta de gran relevancia para su aplicación en la remoción de metales en solución. Es frecuente que muchos efluentes contaminados con metales, contengan sulfatos metálicos (drenajes ácidos) y moléculas orgánicas, lo que permite la disponibilidad de los sustratos adecuados para la reacción de reducción. Estos factores, en su conjunto, pueden acoplarse para llevar a cabo la remediación de efluentes con ambos tipos de contaminantes, convirtiéndose en una alternativa competitiva con respecto a otros tratamientos químicos convencionales (White *et al.*, 1998; Eccles, 1999).

1. JUSTIFICACIÓN.

Las técnicas de tratamiento anaerobio de efluentes de aguas industriales, donde las concentraciones de carga orgánica son elevadas, han demostrado que el uso de bacterias sulfato reductoras (BSR) puede ser eficiente para eliminar metales a través de precipitados de sulfuros metálicos (Muyzer y Stams, 2008).

Existen procesos que consideran el uso de la actividad sulfatorreductora (ASR) para la remoción de As en efluentes de agua, sin embargo, aún no son claros los mecanismos que favorecen esta eliminación. En el caso de la estabilización de estos contaminantes en suelo, los procesos relacionados a las actividades minero-metalúrgicas los principales contaminantes inorgánicos asociados son metales pesados, sulfatos y As. En México, algunas regiones mineras estas localizadas en regiones áridas y semiáridas que influyen en la especiación, disponibilidad y dispersión de dichos contaminantes (Razo *et al.*, 2004).

Por lo general, en estas regiones el contenido de materia orgánica es pobre, razón por la cual la implementación de métodos biológicos requiere el suministro de un sustrato orgánico para que ciertas comunidades microbianas puedan promover la estabilización de los contaminantes inorgánicos. Con la intención de disminuir el lavado del sustrato orgánico en los suelos, es necesario conocer las velocidades de degradación de sustratos orgánicos sólidos. Algunos de estos sustratos sólidos que han sido propuestos en la literatura están relacionados principalmente con material lignocelulósico (Matshusa *et al.*, 2009).

Considerando que los desechos de papel son abundantes en nuestra sociedad y que contienen una elevada proporción de material celulósico, en este trabajo se decidió emplearlo como fuente de carbono para comunidades microbianas con actividad sulfatorreductora. Con el objetivo de estudiar su cinética de degradación y su capacidad de producción de sulfuro de hidrógeno bajo las condiciones anaerobias, se evaluaron las cinéticas microbianas con celulosa cristalina grado reactivo para establecer las diferencias con respecto a celulosa presente en los desechos de papel.

Se puede decir que los beneficios de los procesos biológicos sulfatorreductores comparados con los tratamientos fisicoquímicos tradicionales, en la remoción de contaminantes inorgánicos con características mixtas, es decir, que presentan concentraciones elevadas de SO_4^{2-} , As y metales pesados en solución, es la producción de menores cantidades de lodos y precipitados inorgánicos de bajo producto de solubilidad (Gangagni *et al.*, 2003).

Algunos de los aspectos importantes a considerar para la aplicación de tecnologías basadas en el uso de BSR, con el objetivo de remover As, son: el control de la reducción de sulfatos, la oxidación de los sustratos orgánicos y el control del potencial necesario para sostener en solución especies de As^{3+} y la incorporación de materia orgánica para llevar a cabo el tratamiento anaerobio.

En esta tesis, se estudiará la factibilidad técnica de remoción de oxianiones, tanto SO_4^{2-} como especies de As solubles, en un sistema que emplea BSR y celulosa como materia orgánica. Analizando las cinéticas de consumo de este sustrato orgánico y se evaluará la remoción por precipitación de As, empleando como muestra problema el agua del Centro Recreativo Cerrito Blanco, ubicado en Matehuala, San Luis Potosí. Este sitio fue caracterizado por contener entre otros elementos, concentraciones de As en agua superiores a los 5 mg L^{-1} (Razo *et al.*, 2004).

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Es posible eliminar el As presente como contaminante de aguas naturales, mediante la generación de condiciones reductoras en sistemas biológicos que emplean celulosa como sustrato orgánico, a través de su precipitación como sulfuro de As.

2.2. Objetivo General.

Establecer las cinéticas de degradación de celulosa en un sistema anaerobio cerrado con dos consorcios microbianos que presentan actividad sulfatorreductora (ASR) y que pueden ser empleados en la remoción de As soluble en un agua contaminada con este elemento.

2.2.1 Objetivos Específicos.

- ❖ Comparar la capacidad de fermentación e hidrólisis de dos comunidades reductoras de SO_4^{2-} , en función de los perfiles de ácidos grasos volátiles generados durante la descomposición de celulosa, en un sistema cerrado.
- ❖ Establecer las cinéticas de producción de H_2S asociado a la degradación de celulosa.
- ❖ Correlacionar los perfiles de ácidos grasos volátiles, producidos por la degradación de celulosa, con el H_2S presente en solución.
- ❖ Evaluar el porcentaje de remoción de As presente en un agua problema, con un sistema anaerobio que emplea celulosa como sustrato.
- ❖ Confirmar la presencia de As en los precipitados del sistema empleando microscopia electrónica de barrido MEB.

3.- ANTECEDENTES SOBRE LA PROBLEMÁTICA DE LA PRESENCIA DE ARSÉNICO EN AGUA.

3.1.- Minería en México.

En Latinoamérica, México es uno de los países que se encuentra localizado en una región volcánica rica en minerales. La tradición minera en el país se remonta a la época prehispánica, con la explotación de yacimientos ubicados principalmente en las zonas de Taxco, Pachuca, Guanajuato y Querétaro. La minería ha estado presente en el desarrollo del país como un factor importante de modernización y avance al suministrar insumos prácticamente a todas las industrias, entre las que destacan las de construcción, metalúrgica, siderúrgica, química y electrónica, al formar parte de la fabricación de artículos de uso cotidiano, hasta la manufactura de una gran variedad de maquinaria y equipo (INEGI, 2007).

Como se muestra en la Figura 1, el valor de la producción de la minería mexicana en el 2010 alcanzó un monto total de 139.9 mil millones de pesos, significando un incremento de 16.8% con relación al 2009 (SGM, 2010).

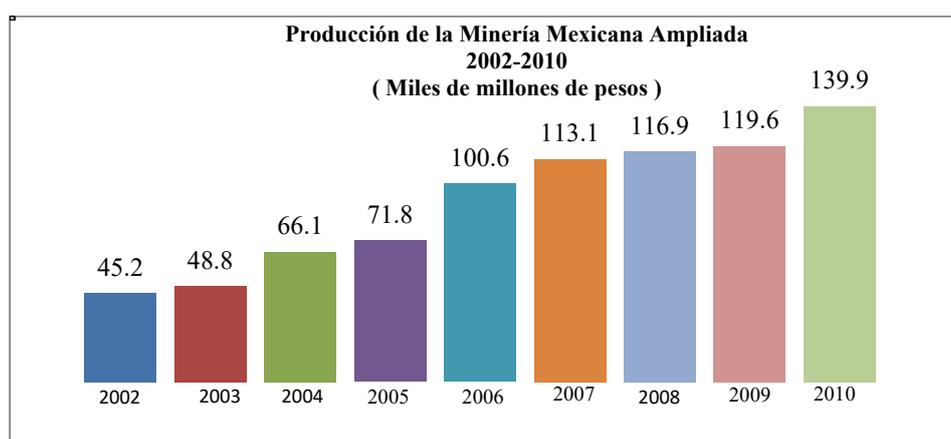


Figura 1. Producción Minera Mexicana 2002-2010 (Modificado de SGM 2010).

El desarrollo y modernización de este sector, así como el de la mayor parte de la industria, lleva implícitas perturbaciones en la ecología, que no deben ser esquivadas en el diseño y ejecución de sus políticas actuales y en desarrollo.

3.2. Impacto ambiental ocasionado por la minería.

Como consecuencia de varios siglos de actividad minera en México, se han producido grandes cantidades de residuos peligrosos difíciles de cuantificar. Debido al desarrollo y modernización en los procesos de extracción y procesamiento de los recursos minerales, así como a la generación de grandes cantidades de residuos provenientes de sus procesos y la disposición clandestina e incontrolada de residuos, la minería ha contribuido en gran medida a la contaminación de suelos y aguas (Mejía, *et al.*, 1999).

El impacto de la minería sobre el ambiente y la salud se relaciona con la composición del mineral, el tipo de explotación, el proceso de beneficio, la escala de las operaciones y las características del entorno. La composición de los residuos puede variar de acuerdo con las condiciones particulares de cada mina, puede ser muy diversa en su naturaleza química y mineralógica (Fishbein, 1981; Rhine *et al.*, 2005).

La excavación de minas, la remoción de minerales y la extracción de metales han causado daños ambientales en tierras de cultivo, favoreciendo la erosión y contaminación de cuerpos de agua con sales solubles de EPT, entre los que se encuentran el As, Se, Pb, Cd, entre otros (Gutiérrez *et al.*, 2007). En este sentido, la especiación de un elemento influye directamente en su solubilidad, movilidad y toxicidad en el suelo; y depende de la fuente de contaminación y de la química del suelo en el sitio contaminado (Nies, 1999).

Los desechos mineros (colas o jales) históricos contienen residuos minerales que eventualmente pueden ser recuperados a futuro. Sin embargo, era común que muchas empresas desecharan sus residuos en ríos o los dispusieran en grandes pilas sobre suelos aledaños (Nies, 1999). Es importante mencionar que este tipo de residuos contienen elementos potencialmente tóxicos (EPT), los cuales pueden encontrarse biodisponibles y/o movilizarse hacia poblaciones cercanas donde pueden ocasionar problemas de salud pública.

Por otro lado, las industrias especializadas en el proceso de metales (e.g. siderúrgica y metalúrgicas) emiten partículas de dimensiones micrométricas, que son fácilmente transportables por el viento a grandes distancias y éstas también causan problemas en la salud de las poblaciones cercanas (Huisman *et al.*, 2006). De esta manera, para poder

evaluar la utilización de una alternativa de remediación para un sitio en particular, es indispensable llevar a cabo la caracterización del sitio con el objeto de determinar el tipo y concentración del contaminante presente.

3.3. Países afectados por contaminación con As.

En muchos países como: Argentina, Bangladesh, Chile, China, India, México, Tailandia y los Estados Unidos, se han encontrado aguas subterráneas contaminadas con As (OMS, 2004).

En Asia Meridional, particularmente en Bangladesh, se han reportado serios problemas ocasionados por el As presente en los sedimentos subterráneos. Más del 25 por ciento de los 4 millones de pozos entubados, los cuales son fuente principal de agua de suministro para consumo humano en esta región, contiene concentraciones de As por encima del límite máximo permisible establecido por la organización mundial de la salud (OMS, 1993) es de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, por lo que este mismo organismo establece que casi 75 millones de personas son vulnerables al envenenamiento por As en dicha región (OMS, 2006).

Por otra parte, la EPA ha reportado grandes cantidades de As en el suelo del barranco del Chaparral en Arizona, Estados Unidos, donde este elemento se encuentra de manera natural en los sedimentos, la cantidad reportada en este lugar se ha ido incrementado a través de las actividades de la minería y actividades de fundición (EPA, 2009).

En Argentina los habitantes de las provincias de San Luis, Córdoba, Santiago del Estero, Chaco y La Pampa padecen una enfermedad conocida como HACRE (Hidroarsenicismo crónico regional endémico), donde probablemente la causa esté relacionada con la ingestión permanente de agua contaminada por As que produce lesiones dermatológicas. Se ha documentado que el As de estas aguas es de origen natural (EPA, 2002).

En México, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA por sus siglas en inglés) identificó este problema en diferentes regiones que incluyen a los estados de Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo y Morelos, donde se rebasa el límite máximo permisible de $0.030 \text{ mg As L}^{-1}$ establecido en la Norma

Oficial Mexicana NOM-127 SSA-1-1994 para el año 2004, lo que representa problemas de moderados a graves para la salud pública (OMS, 2006).

La USEPA también estimó el riesgo de contraer cáncer de piel a partir de un importante estudio epidemiológico realizado en Taiwán donde se observaron más de 40 000 personas que consumían agua proveniente de pozos artesanales con altos contenidos de As, en un rango de 0.010 a 1.8 mg L⁻¹ y valores entre 0.400 a 0.600 mg L⁻¹(WHO, 2001 a).

3.4. Fuentes naturales de As.

El As es un elemento que se encuentra en el ambiente, suelos, rocas, aguas naturales y diversos organismos vivos (Smedley y Kinniburgh, 2002). El origen del As está relacionado con minerales sulfurosos de hierro, así como otros metales como Au, Ag, Cu, Sb, Ni y Co en particular. La presencia de As en ambientes hidrotermales es debida a antiguas actividades volcánicas. Los niveles de As presentes en la atmósfera son atribuidos principalmente al arrastre eólico durante los procesos naturales de erosiones de suelo contaminado, emisiones volcánicas, rocío de mar, incendios forestales, así como a procesos de metilación/volatilización que pueden presentarse en climas cálidos, asociados a diversos procesos biológicos. El As puede encontrarse en niveles altos en algunas plantas donde el contenido de As está relacionado directamente con la concentración que existe de este elemento en el suelo (Lièvremonet *et al.*, 2009).

3.4.1. Arsénico de origen antropogénico.

El As es generado por un gran número de actividades humanas, tales como la minería, manufactura farmacéutica, transformación de madera, industria vidriera, industria electrónica, armas químicas y agricultura. En esta última, hasta antes del 2001, se empleaba arsenito de sodio (Na₃AsO₃) como fungicida para proteger sembradíos (Matschullat 2000). Lo anterior puede explicar la presencia de As en aguas subterráneas por migración desde el suelo agrícola que sufrió este tipo de aplicaciones.

Otra fuente importante generada por el hombre es la disposición de minerales que contienen este elemento y que son dispuestos como residuos en los suelos aledaños de las operaciones de beneficio de minerales de valor. La trituration y molienda que han sufrido

estos materiales, origina la alteración de estos elementos y en consecuencia la liberación de As contenido en los mismos se dispersa los suelos circunvecinos alcanzando incluso los recursos hídricos del lugar (e.g. ríos, escorrentías intermitentes, cuerpos de agua superficial e inclusive agua subterránea) (EPA, 2002).

3.5. Fuentes de dispersión de arsénico en el agua.

Todas las fuentes mencionadas anteriormente han contribuido a la dispersión del As en el ambiente, el cual puede presentarse en cuatro estados de oxidación (-3, 0, +3, +5). El arsenito (H_3AsO_3) y el arsenato (H_3AsO_4) son las principales especies que predominan en sistemas acuáticos (Lièvremon *et al.*, 2009), y su proporción está relacionada con procesos de óxido-reducción, precipitación-disolución, adsorción-desorción, metilación orgánica y procesos biogeoquímicos (Álvarez *et al.*, 2005). Sin embargo, es necesario considerar el potencial de óxido reducción (E_H) y el potencial de hidrógeno (pH) como variables maestras que controlan la solubilidad y biodisponibilidad del As (Ver Figura 2).

Dentro de los principales procesos naturales de dispersión de As se asocian las contribuciones de las erupciones volcánicas (Francesconi y Kuehnelt, 2002) y los procesos de disolución de roca madre que contienen altas concentraciones de As dentro de su composición geológica (WHO, 2001a).

Las actividades antropogénicas de dispersión de As, están relacionadas a las descargas de efluentes industriales con elevados contenidos de As, como los productos para control agroindustrial. Anteriormente, diversos pesticidas arsenicales fueron ampliamente empleados en suelos agrícolas, registrándose concentraciones de As del orden de 200 a 2500 $mg.kg^{-1}$ de suelo (WHO, 2001b). A pesar de que desde 1960, se incremento el uso de compuestos orgánicos de As (MMA y DMA) en lugar de los compuestos inorgánicos del mismo (arseniato de plomo, calcio ó cobre y trióxido de arsénico), el uso extensivo de estos compuestos ha afectado las aguas subterráneas de varios países que los adoptaron como medida de biocontrol (Jong y Parry, 2005).

Una de las fuentes de contaminación que combina procesos naturales y antropogénicos, está relacionada con el impacto de las actividades mineras en diferentes receptores

ambientales, donde los residuos, por procesos de intemperismo, favorecen la dispersión de metales y As, como se describe en la siguiente sección.

En aguas naturales con pH de 5 a 9, predominan las especies H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} , H_3AsO_3 , H_2AsO_3^- . Las condiciones que favorecen la oxidación química y biológica inducen el cambio a especies pentavalentes, y aquellas que favorecen la reducción cambian el equilibrio al estado trivalente que es la forma más tóxica de este elemento (Martin P. y Donadl J, 1985; Lièvreumont *et al.*, 2009).

Las especies de As^{3+} están involucradas en procesos biológicos de metilación, generando ácido mono metil arsénico (MMA) y en condiciones más reductoras, el As^{3+} es reducido a As^{1+} en un potencial -500 mV, formando especies de ácido dimetil arsénico (DMA). Si las condiciones de oxido-reducción son extremadamente reductoras, es posible generar compuestos volátiles de As, tales como las mono y dimetilarsinas, las cuales son altamente tóxicas (Frankerberger y Arshad, 2002).

En condiciones oxidantes, el As predomina como As^{5+} , el cual tiene una mayor capacidad de ionización que el As^{3+} , lo que le permite combinarse más fácilmente con otros compuestos y superficies minerales que expresen cargas positivas, favoreciendo su remoción por procesos fisicoquímicos, que son más eficientes en comparación con la remoción del As^{3+} . De ahí la importancia, en algunos casos, de oxidar el arsenito antes de someter el agua a un tratamiento fisicoquímico (Clifford y Ghurye, 2002; EPA, 2002).

En la Figura 2, se presenta el diagrama de Pourbaix (E_H vs pH) de As y azufre, reportado por Ferguson y Gavis (1972), para una concentración de 10^{-5} mol L^{-1} y 10^{-3} mol L^{-1} respectivamente.

Como se muestra en este diagrama, con frecuencia es posible identificar el As como sulfuro mineral, por la fuerte afinidad que éste tiene con el azufre, siendo el rejalgar (AsS), oropimente (As_2S_3) las principales fases primarias de este elemento. Sin embargo, en México, la principal fase primaria que contiene As es la arsenopirita, y no se tiene reportados yacimientos de rejalgar u oropimente.

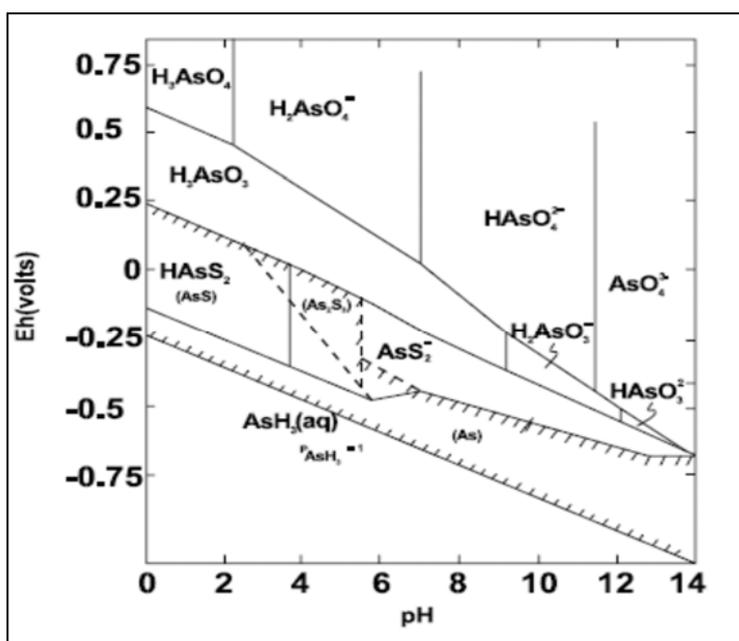


Figura 2. Diagrama E_H -pH, a 25°C y una atmósfera de presión. Para concentración total de As igual a 10^{-5} mol L^{-1} y de azufre igual a 10^{-3} mol L^{-1} (Ferguson y Gavis 1972).

En condiciones oxidantes, es posible encontrar el As asociado a óxidos del mismo (arsenolita As_2O_3), y este elemento puede ser inestable en condiciones oxidantes cuando es dispuesto en suelos gípsicos y calcáreos.

3.6. Características y toxicidad del arsénico.

La exposición a As es natural pero puede ser agravada debido a diversas actividades humanas, su toxicidad y disponibilidad están relacionadas con el estado de oxidación en el que se presente, el tiempo de exposición y la concentración, tanto en el agua como en los materiales geológicos y especies secundarias sólidas. El As también puede presentarse en compuestos orgánicos y pueden encontrarse en diversas cantidades en animales, plantas, moluscos, artrópodos, peces y mariscos (Masscheleyn *et al.*, 1991).

La toxicidad por As puede presentarse en forma aguda o crónica. En el primer caso, ésta es consecuencia de la ingesta de alto contenido de As en un tiempo corto. En el segundo caso, es el resultado de la ingesta de pequeñas cantidades de As en periodo relativamente largo de tiempo. La toxicidad aguda de compuestos de As en el ser humano es función de la capacidad de asimilación del cuerpo humano (ATSDR, 2007).

Exposiciones crónicas provocan daños cardíacos, por ingestión causa dolor abdominal, vómito, disminución del apetito, debilidad, diarrea y estreñimiento alternados, neuritis, caída de pelo, hipertensión arterial y disminución del desarrollo intelectual de los niños. La intoxicación por As (arsenicismo) se manifiesta de forma característica a lo largo de un periodo de 5 a 20 años (OMS, 2006).

En el organismo humano el As elemental ingerido se absorbe lentamente pero luego es eliminado por vía urinaria, heces, sudor y epitelio de la piel (descamación). El riñón elimina rápida y completamente el As^{5+} y el As orgánico. En cambio el tracto intestinal absorbe rápidamente los compuestos solubles de As. El tiempo de vida media del As inorgánico en el ser humano es de 2 a 40 días (OMS, 2006).

Se ha reportado que la escala de toxicidad del As decrece en el siguiente orden:

Arsina (H_3As) > As^{3+} inorgánico (arsenito) > As^{3+} orgánico > As^{5+} inorgánico (arseniato) > As^{5+} orgánico > compuestos arsenicales y As elemental (WHO, 2001b).

La dosis letal para adultos se encuentra en el rango de 1 - 4 mg/kg del peso corporal (trióxido de diarsénico). La toxicidad del arsenito es 10 veces superior a la del arseniato (ATSDR, 2007; Oremland y Stolz, 2003).

Entre los efectos tóxicos por consumo de agua con altos contenidos de As pueden mencionarse: hiperpigmentación, hiperqueratosis, enfermedad del pie negro (escoriaciones oscuras en los pies, Figura 3), gangrena, cáncer de piel y órganos visuales, cirrosis, problemas de adsorción renal, inhibición de la síntesis de la porfirina, afectación a los glóbulos blancos, abortos espontáneos, neuropatía periférica, parálisis, pérdida de la audición, inhibición de algunas enzimas, inhibición de la fosforilación oxidativa y de la reparación del ADN, daños al intestino (WHO, 2003).



Figura 3. Enfermedad del pie negro (Miliarium, 2007).

3.7. Límites máximos permisibles para el arsénico.

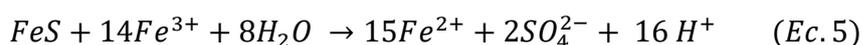
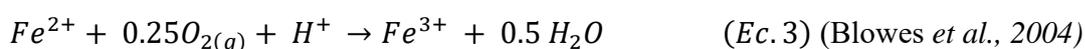
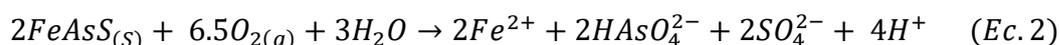
En las Guías de Calidad para el Agua Potable, la OMS (1993) redujo el valor guía de As en agua desde 0.050 mg L^{-1} a un valor provisional de 0.010 mg L^{-1} , basándose en un estudio realizado por el Foro de Evaluación de Riesgo de la USEPA en 1986 sobre evaluación de riesgo. Sin embargo, el valor de 0.010 mg L^{-1} está superado por muchos países del mundo, como Estados Unidos o Australia. Entre los países más afectados se encuentran Perú, Argentina, México y Chile en América; Tailandia, India, Taiwán, Bangladesh y China en Asia y en Europa, Hungría. Se tiene documentado que las poblaciones de mayor riesgo son aquellas que se encuentran en Bangladesh y en la India (WHO, 2003; Mohan y Pittman, 2007).

La norma mexicana para el As NOM-127-SSA1-1994, ha sido más estricta cada año desde el 2000 cuyo límite era de 0.05 mg L^{-1} , en el 2004 fue de 0.030 mg L^{-1} , y en su modificación del 2005 se estableció un valor de 0.025 mg L^{-1} valor actual. Esta misma norma establece, los tratamientos específicos para la remoción de As de plantas potabilizadoras de agua las secuencias de coagulación-floculación-sedimentación-filtración, o la aplicación de intercambio iónico u osmosis inversa a fin de alcanzar los valores de la norma (OMS, 2006).

3.8. Dispersión de arsénico y sulfatos asociados a la generación de drenaje ácido de roca (DAR)

El drenaje ácido de roca (DAR) es el resultado de la alteración por oxidación atmosférica de minerales sulfurosos; principalmente piritita, pirrotita, galena, otros sulfuros metálicos

asociados y sulfuros de As; que es evidenciado cuando los potenciales de neutralización (PN) de los suelos son insuficientes para neutralizar las soluciones ácidas producidas por estas reacciones. Por ejemplo, algunas de las reacciones que intervienen en la oxidación de la pirita y de la arsenopirita son las siguientes (Blowes *et al.*, 2004):



En la reacción de oxidación de la pirita y de la arsenopirita (Ec. 1 y 2), se produce Fe^{2+} , SO_4^{2-} y H^+ en presencia de oxígeno y agua. En estas reacciones, el agente oxidante (O_2) es consumido progresivamente y su concentración en solución puede estar limitada por transferencia de masa desde la fase aérea hacia la solución o por procesos de difusión desde la fase acuosa y hasta la superficie de reacción.

Las ecuaciones 1 y 2 producen un incremento en la acidez que puede ser amortiguada en función del potencial de neutralización (PN) que tenga el cuerpo receptor. Si el ambiente circundante es lo suficientemente oxidante, el ion ferroso (Fe^{2+}) se oxidará a ion férrico (Ec. 3). El ión férrico precipita mediante hidrólisis como hidróxido férrico (Ec. 4) contribuyendo también a la disminución del pH (Blowes *et al.*, 2004).

Cuando las reacciones de oxidación de sulfuros agotan el PN, el pH cae a valores menores de 4, la concentración de iones férrico se incrementa en la solución generando un segundo agente oxidante (Fe^{3+}) que no se ve limitado por procesos de difusión en la interfase de reacción sólido-agua (Ec. 5). Se ha reportado además que, a valores de pH ácidos, algunas bacterias (e.g. *Acidithiobacillus ferrooxidans*) catalizan y aceleran, la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} (Ec. 3) (Blowes *et al.*, 2004).

El conjunto de reacciones anteriormente descritas (Ec. 1-5) generan una disminución considerable de pH en los microambientes de los minerales, estabilizándose en valores típicos de 2.5 a 3.0.

En suelos con bajo PN, el DAR es evidenciado como resultado de las soluciones fuertemente ácidas que lixivian e incorporan metales pesados desde la roca madre a la solución acuosa, así como la generación de precipitados de oxihidróxidos férricos que dan una coloración rojiza característica a los suelos impactados (Blowes *et al.*, 2004).

El vertido de estas soluciones ácidas afecta la química de las aguas superficiales y subterráneas, planteando problemas ambientales de diversa índole, como son:

- Contaminación de los cuerpos de agua cercanos y acuíferos.
- Degradación de los ecosistemas acuáticos.
- Impacto sobre la flora y fauna del lugar.
- Imposibilidad para su uso agrícola y consumo humano.
- Daño a estructuras metálicas y de hormigón.
- Problemas en la restauración de suelos al cierre de las operaciones mineras.

No obstante, en suelos calcáreos, los PN son tan elevados que los procesos de alteración de la oxidación de los sulfuros y los impactos sobre los diferentes receptores ambientales (agua, suelo y biota) no pueden ser evidenciados por la presencia de DAR (Razo *et al.*, 2004). Por lo cual es difícil establecer la fuente de contaminación de los mismos y en consecuencia establecer responsabilidades para promover las medidas de control, depuración y remediación necesarias.

El DAR genera otro problema de contaminación del agua, que es el incremento de SO_4^{2-} en las mismas (Ec. 1, 2 y 5) (Kaksonen A, 2004; Amos *et al.*, 2004). Además del DAR, otras fuentes de contaminación por SO_4^{2-} son la lluvia ácida e inclusive las mismas plantas de tratamiento de aguas residuales que emplean SO_4^{2-} de aluminio como coagulante en el tratamiento de potabilización del agua. Lo anterior hace que se puedan detectar intervalos de concentración entre 20 y 50 mg L^{-1} de SO_4^{2-} , en el agua ya tratada (CONAGUA 2002). Para que el agua de consumo no tenga un sabor amargo o medicinal, ésta debe de tener

límites entre 200-500 mg L⁻¹ de SO₄²⁻ de sodio, 250-900 mg L⁻¹ de SO₄²⁻ de calcio y 400-600 mg L⁻¹ de SO₄²⁻ de magnesio (OMS, 1984).

El diagrama de Pourbaix que se muestra en la Figura 4 para azufre a una concentración de 1 M (96 g L⁻¹ SO₄²⁻), muestra que la reducción de iones sulfato hacia H₂S, sin pasar por azufre elemental, se lleva a cabo a partir de potenciales menores a -0.220 V y pH de 7. El sulfuro de hidrógeno puede reaccionar con iones metálicos en solución formando sulfuros metálicos de baja solubilidad, por lo que para cumplir con los objetivos del presente proyecto es recomendable trabajar bajo estas condiciones de potencial, favoreciendo la formación de dichos precipitados.

En esta tesis se estudió la factibilidad de un sistema para la eliminación de contaminación mixta de As y SO₄²⁻, y se consideró al SO₄²⁻ disuelto en agua como el aceptor de electrones que puede ser reducido a sulfuro a través de la actividad microbiana. El sulfuro de hidrógeno puede ser empleado para precipitar el As en solución.

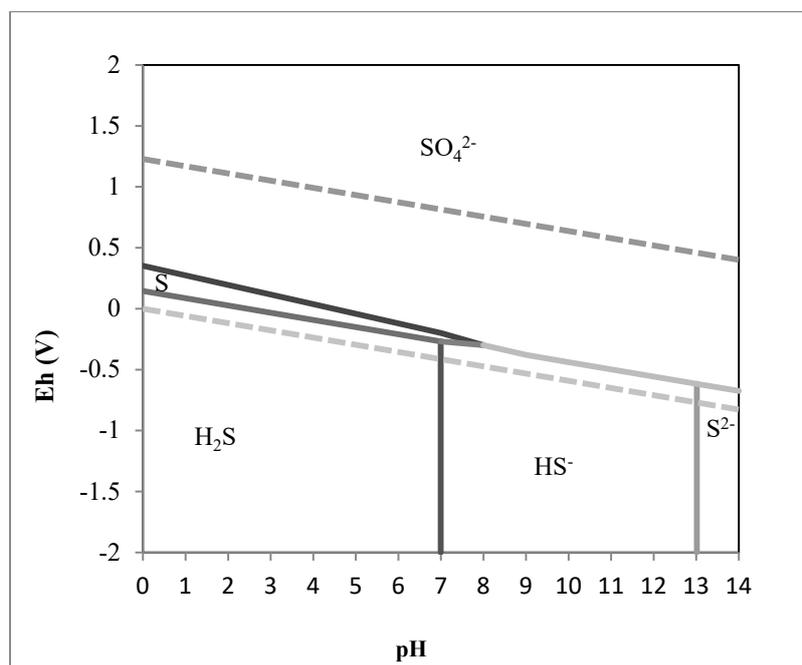


Figura 4. Distribución de las especies de azufre en función de pH – E_H, a 25°C y una atmósfera de presión, con una concentración total de azufre 1 mol L⁻¹.

3.9. Área de estudio.

La explotación y beneficio de los recursos minerales, históricamente no controlados, en el distrito minero de Santa María de la Paz, ha provocado que se presente una extensa contaminación de suelos y sedimentos por As y metales pesados (Pb, Zn, Cu, entre otros) en el área de Villa de la Paz Matehuala, S.L.P (Razo *et al.*, 2004).

Análisis químicos reportados por Razo *et al.*, (2004), muestran concentraciones de 19-17384 mg kg⁻¹ As, 15-7200 mg kg⁻¹ Cu, 31-3450 mg kg⁻¹ Pb y 26-6270 mg kg⁻¹ Zn en suelo.

De acuerdo a la información proporcionada por la CONAGUA (2002), existen concentraciones de SO₄²⁻ en agua del orden de 600 a 1700 mg L⁻¹ en los pozos y norias del acuífero Cedral – Matehuala del estado de San Luis Potosí. Aún cuando, durante el tiempo de ejecución de esta tesis, algunos pozos se reportan fuera de operación por las elevadas concentraciones de SO₄²⁻, otro problema asociado a estos reservorios de agua son las elevadas concentraciones de As. La CONAGUA (2002) reporta que las concentraciones de As, en estos pozos, varía de 0.069 a 22.2 mg L⁻¹, dichos valores se encuentran por arriba del límite máximo permisible.

En base a lo anterior, se seleccionó un sitio de estudio en dicha área. El sitio de estudio seleccionado corresponde al parque recreativo de la comunidad de Cerrito Blanco (CB) (Latitud N 23°42'5.6", Longitud W 100°35'33.9", Figura 5), ubicado en el altiplano potosino y próximo al Distrito Minero de Villa de la Paz y al este de Matehuala (CONAGUA, 2002). En este sitio se analizaron las concentraciones totales de SO₄²⁻ y metales pesados, así como las concentraciones de As total y las concentraciones de As³⁺. Los resultados y análisis de estas determinaciones se presentan en la sección 7.1.

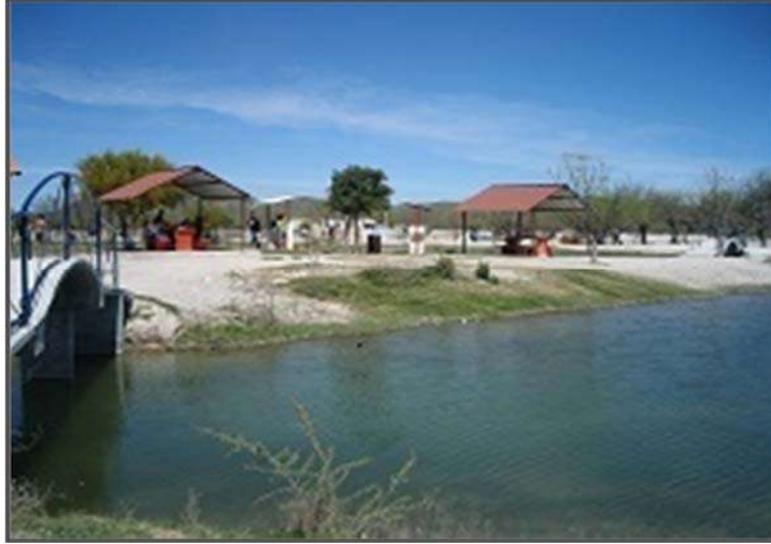


Figura 5. Parque Recreativo Cerrito Blanco en el Municipio de Matehuala, S.L.P. México.

4.-ANTECEDENTES SOBRE ACTIVIDAD BIOLÓGICA SULFATORREDUCTORA Y TIPOS DE SUSTRATO.

Entre los tratamientos fisicoquímicos convencionales para el tratamiento de las aguas superficiales, subterráneas, residuales, potables y/o lixiviados que se han encontrado contaminados con As se pueden mencionar la coagulación-floculación-sedimentación, precipitación/co-precipitación, adsorción, intercambio iónico, filtración con membranas, entre otros (EPA, 2002). Además, existen otras tecnologías emergentes que se encuentran en etapa de investigación o de reciente aplicación como son las paredes reactivas permeables, tratamientos electroquímicos y/o biológicos. Algunas de estas tecnologías, tanto convencionales como emergentes se describen brevemente en las siguientes secciones.

4.1. Tratamientos Fisicoquímicos.

El método de precipitación/co-precipitación es un tratamiento que ha sido usado para tratar aguas subterráneas, aguas superficiales, lixiviados, drenajes de mina, agua potable y aguas residuales, reduciendo en algunos casos las concentraciones de As hasta 0.010 mg L^{-1} . Para incrementar la efectividad de este proceso es preferible una etapa preliminar de oxidación del As^{3+} a As^{5+} . Entre los procesos de oxidación empleados se encuentran: la ozonación, la foto-oxidación o la oxidación química (e.g. KMnO_4 , H_2O_2 , etc.) o biológica (EPA, 2002). Las especies solubles de As oxidadas pueden ser separadas de la fase líquida induciendo una co-precipitación posterior a un proceso de coagulación-floculación. En principio, cuando un coagulante es adicionado se forman flóculos sobre los cuales las especies disueltas de As son retenidas o encapsuladas en la fase sólida. Los sólidos formados son removidos por sedimentación o filtración (Johnston, 2001).

El As disuelto oxidado puede formar parte de los flóculos por un proceso de adsorción, sin embargo estos procesos de adsorción son preferentemente llevados a cabo en columnas empacadas que contienen un material adsorbente de alta afinidad. Para la remoción de As se emplea normalmente alúmina activada, carbón activado, gránulos de Cu-Zn, hidróxido férrico granular y/o zeolitas, siendo la alúmina activada el sorbente más comúnmente utilizado para remover As del agua potable y subterránea (EPA 2002).

El intercambio iónico es un proceso fisicoquímico donde los iones son retenidos electrostáticamente sobre la superficie de un sólido intercambiando iones de carga similar. El medio comúnmente usado para intercambio, es una resina polimérica sintética que contiene diversos grupos funcionales con los que se lleva a cabo el intercambio de los mismos. Diversos grupos funcionales han sido empleados para este propósito y se clasifican como ácidos fuertes y débiles para el intercambio catiónico y, bases fuertes y débiles para el intercambio aniónico. La regeneración de las resinas se lleva a cabo en tres pasos: un retrolavado, una regeneración con una solución de iones y por último un enjuague para remover la solución de regeneración (Frankenberger y Ashad 2002, EPA 2002).

Los procesos que emplean membranas de filtración se clasifican en: osmosis inversa, nanofiltración, microfiltración y ultrafiltración dependiendo del ión que se pretende remover y de las características de resistencia mecánica de la membrana (EPA 2002). Este proceso consiste fundamentalmente en hacer pasar un fluido contaminado a través de una barrera semipermeable, o membrana, que permite el paso de algunos constituyentes mientras que bloquea el de otros iones.

En cuanto a los tratamientos electroquímicos desarrollados para depuración de agua contaminada por As, Kumar (2004) reportó un procedimiento de electrocoagulación a escala laboratorio con tres diferentes materiales de electrodo (hierro, aluminio y titanio). En dicho estudio, se evaluó la variación de la densidad de corriente desde 0.65 hasta 1.53 mA cm⁻², encontrando que las eficiencias de remoción de As son proporcionales a la misma.

4.1.2.- Tratamientos biológicos anaerobios.

Los procesos de digestión anaerobia constituyen en la actualidad una de las tecnologías de tratamientos biológicos más convenientes para la eliminación de materia orgánica (MO), y son conocidos por sus múltiples beneficios, como son: altas velocidades de carga orgánica, baja producción de lodos, generación de biogás como fuente de energía. Sin embargo, como en todos los procesos, tienen algunos inconvenientes en su utilización, entre los que destacan cinéticas con largos periodos de arranque, que van de 1 día, con sustratos de fácil digestión, hasta 30 días con sustratos complejos (Zagury *et al.*, 2006; Elliott *et al.*, 1998).

Frankenberger y Ashad (2002) reportaron la eliminación de As inorgánico por volatilización de este elemento como metilarsina o dimetil arsina, a través de su metilación microbiana anaeróbica. El proceso consiste en la oxidación anaeróbica de la materia orgánica que conlleva la reducción del potencial redox del efluente que promueve la reducción de las especies de As^{5+} hasta As^{3+} y la formación de dimetil arsina $[(CH_3)_2AsH]$, un compuesto altamente volátil. Los productos volátiles deben de ser adsorbidos en un sistema de venteo para su posterior disposición, ya que éstos son más tóxicos y necesitan ser dispuestos adecuadamente. La Figura 6, muestra el esquema de un biorreactor que utiliza este proceso. Es importante mencionar que las bacterias reportadas por Frankenberger y Ashad (2002) son metanogénicas, y que la biomasa de estos microorganismos es inmovilizada sobre la superficie de una matriz inerte.

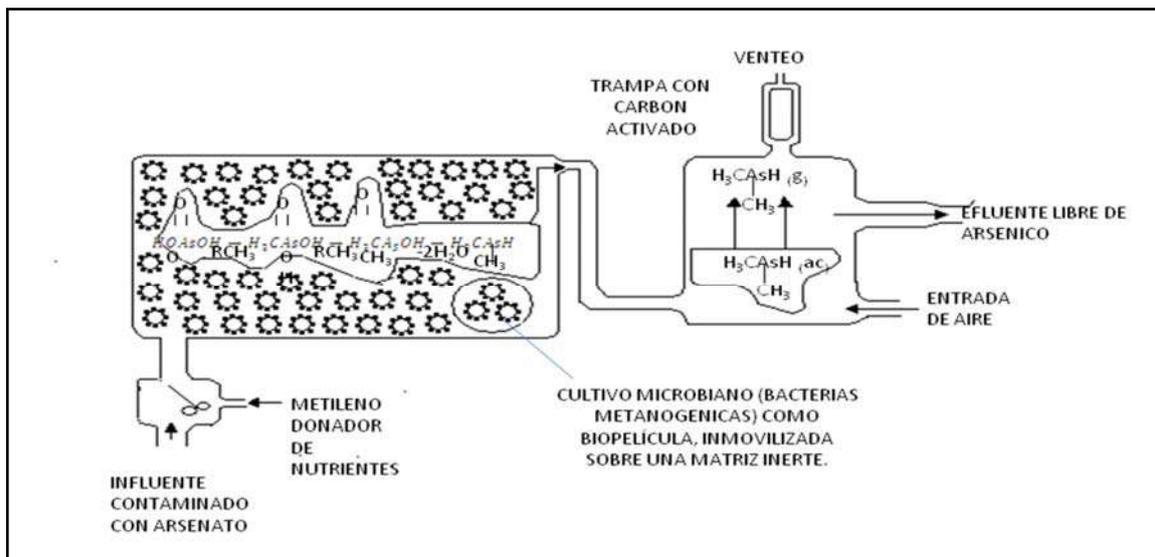


Figura 6. Biorreactor diseñado para el tratamiento de agua contaminada con As. Método de metilación anaeróbica y remoción por adsorción de la arsina con carbón activado (Modificado de Frankenberger y Ashad, 2002).

4.2.- Bacterias sulfatorreductoras

Las BSR son microorganismos procariontes que pueden usar el SO_4^{2-} como aceptor final de electrones dentro de su metabolismo. Sin embargo, las BSR son versátiles ya que pueden utilizar otros aceptores de electrones para su respiración anaerobia, tales como el S elemental, NO_3^- , dimetilsulfóxido, MnO_2 (Mn^{4+}), Fe_2O_3 (Fe^{3+}) y $H_2AsO_4^-$ (Oremland y

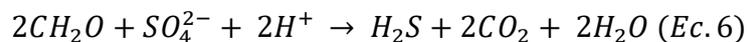
Stolz, 2003). Además, las BSR son consideradas microorganismos estrictamente anaerobios y se hallan en hábitats anóxicos y ricos en SO_4^{2-} . Estas condiciones aplican también a sedimentos marinos de aguas oceánicas ricas en SO_4^{2-} donde las concentraciones reportadas pueden alcanzar los 2800 mg L^{-1} (Barton y Hamilton, 2007).

Sin embargo, a pesar de la versatilidad de las BSR, éstas requieren condiciones ambientales específicas entre las que destacan las siguientes:

- Ausencia de oxígeno, ya que este tipo de bacterias son anaerobias, y aunque resisten bajas concentraciones de oxígeno disuelto, su actividad en estas condiciones decrece significativamente.
- Valores de pH entre 5.5 y 9 (Fauque, 1955).
- Potencial de oxido-reducción entre 0 a -240 mV (Thomas, 1999).
- Presencia de algún sustrato orgánico como fuente de energía y iones SO_4^{2-} como aceptores de electrones.
- Un soporte físico donde las bacterias puedan quedar inmovilizadas.
- Suficiente carga de materia orgánica
- La relación carbono-nitrógeno-fósforo (C:N:P) debe ser considerada como referencia entre 100:5:1 (Phifer, 2001).

4.3. Oxidación de la materia orgánica por BSR

La reacción de oxidación de materia orgánica por BSR que involucra la reducción de sulfatos hasta sulfuro de hidrógeno puede representarse por la siguiente expresión general:

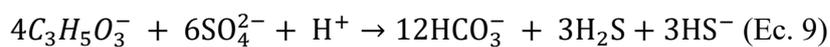
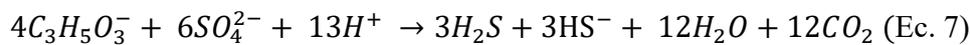


Esta expresión considera la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos (esquemático en la ecuación 6 como CH_2O) como donadores de electrones (e^-) a la reducción de SO_4^{2-} , y comprenden un amplio grupo de bacterias anaerobias, morfológica y fisiológicamente diversas. Algunas de ellas pertenecen a los géneros de: *Desulfobulbus*, *Desulfomonas*, *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Desulfotomaculum*, entre otras (Celis, 2004).

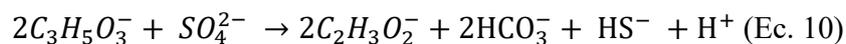
Los principales donadores de electrones, para las BSR, son productos de la hidrólisis de material lignocelulósico y biosólidos no estabilizados de plantas de tratamientos aeróbicos de aguas residuales, que generan como subproductos diversos compuestos orgánicos de cadena corta conocidos como ácidos grasos volátiles, entre los que se destacan el acetato, piruvato, lactato, etc. (Zagury *et al.*, 2006). Consecuentemente estos compuestos son degradados por bacterias que a su vez forman productos que sirven de sustratos para comunidades metanogénicas. Típicamente estas conversiones son llevadas a cabo por comunidades sintrópicas de bacterias acetogénicas y arqueas metanogénicas (Muyzer y Stams, 2008)

Dependiendo de la especie de BSR, éstas oxidan completamente los compuestos orgánicos hasta CO₂ (Ec. 7), el cual establece el equilibrio con el ión bicarbonato en solución acuosa (Ec. 8 y 9); o en su defecto llevan a cabo una oxidación incompleta de materia orgánica hacia HCO₃⁻ y acetato (Ec. 10):

Oxidación completa (Widdel, 1998):



Oxidación incompleta (Celis, 2004)



Por lo tanto, en función del metabolismo, las BSR fueron clasificadas por Gottschalk (1986) en dos grupos: oxidantes incompletas (Grupo I) y oxidantes completas (Grupo II). Las bacterias del grupo I, son generalmente de rápido crecimiento e incluyen aquellas del género *Desulfovibrio*, *Desulfomonas* y *Desulfotomaculum* entre otras. Las del grupo II son de lento crecimiento e incluyen bacterias del género *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter* y *Desulfococcus* entre otras.

En la Tabla 1, se muestran las reacciones involucradas en la degradación de la materia orgánica por BSR (Modificado de Gallegos M. *et al.*, 2010).

Tabla 1. Reacciones de la degradación de la materia orgánica por BSR (Gallegos *et al.*, 2010).

| REACCIÓN | ΔG° (kJ/mol) |
|---|---------------------------|
| $CH_3COO^- + SO_4^{2-} \rightarrow 2HCO_3^- + HS^-$ | -47.6 |
| $CH_3CH_2COO^- + 0.75 SO_4^{2-} \rightarrow CH_3COO^- + 0.75HS^- + 0.25H^+$ | -37.7 |
| $CH_3CH_2CH_2COO^- + 0.5 SO_4^{2-} \rightarrow 2CH_3COO^- + 0.5HS^- + 0.5H^+$ | -27.8 |
| $CH_3CHOHCOO^- + 0.5 SO_4^{2-} \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + 0.5HS^- + 0.5H^+$ | -80.0 |
| $CH_3COO^- = \text{Acetato}; CH_3CH_2COO^- = \text{Propionato}; CH_3CH_2CH_2COO^- = \text{Butirato};$ $CH_3CHOHCOO^- = \text{Lactato}$ | |

4.4. Consorcio microbiano

Un consorcio microbiano es un grupo conformado por diferentes especies de microorganismos que actúan juntas, como una comunidad. Se pueden encontrar en los lodos activados de plantas de tratamiento de aguas residuales, las biopelículas de los filtros percoladores y en varios ecosistemas del suelo (E-bac, 2000).

En un consorcio los organismos trabajan juntos en un sistema complejo en el que todos se benefician de las actividades de otros en la comunidad. Desde hace tiempo se sabe que los consorcios microbianos son mucho más eficientes en la degradación de residuos orgánicos complejos que las cepas de organismos individuales, o incluso que las mezclas combinadas de microorganismos con diversidad de capacidades metabólicas. Estos podrían incluir organismos que son proteolíticos (son capaces de degradar las proteínas y aminoácidos), organísmos que son sacarolíticos (capaces de degradar los azúcares diversos), lipolíticos (capaces de digerir los lípidos o grasas), y celulósicos (capaces de degradar la celulosa o la materia vegetal). La diversidad metabólica permite que el consorcio pueda trabajar de manera conjunta degradando una variedad de complejos orgánicos sólidos (E-bac, 2000).

La competencia por la fuente de carbono y energía es también una parte de la ecología de las BSR. Ellas compiten por el sustrato y los micronutrientes con las bacterias aerobias y otras bacterias anaerobias que pueden utilizar otros aceptores finales de electrones a parte del sulfato. Los mayores competidores anaerobios utilizan los siguientes aceptores de electrones tales como: NO_3^- (reductores de nitrato), Mn (IV) (reductores de manganeso), Fe (III) (reductores de hierro) and CO_2 (metanógenas) (Weijma *et al.*, 2000).

La termodinámica estudiada por Phifer (2001) predice que las bacterias tienen el siguiente orden con respecto al uso del aceptor de electrones: Bacterias aerobias ($\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$), desnitrificantes ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), reductoras de manganeso ($\text{MnO}_2 \rightarrow \text{MnCO}_3$), reductoras de hierro ($\text{FeOOH} \rightarrow \text{FeCO}_3$), sulfato reductoras ($\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HS}^-$) y metanogénicas ($\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4$).

4.5. Sustrato Orgánico

Los sustratos de carbono orgánico de diversos materiales lignocelulósicos, tales como aserrín, trozos de madera, mezcla de paja y hojas, han demostrado ser útiles como fuente de carbono para las BSR en sistemas pasivos (de lenta degradación). Dado que no todas las fuentes de carbono son degradadas a la misma velocidad es importante determinar la velocidad y grado de degradación para su posterior uso, como podría ser el de material de relleno en barreras reactivas permeables (BRP). La velocidad de degradación depende frecuentemente de la concentración, diversidad y tipo de biomasa empleada, así como de las características del reactor empleado (Phifer *et al.*, 2001).

De hecho, la actividad y eficiencia de las BSR depende de la habilidad de otros microorganismos del consorcio microbiano para descomponer los compuestos de alto peso molecular en compuestos de estructuras más sencillas y de fácil asimilación para las BSR.

Waybrant *et al.* (1998), evaluó varios compuestos orgánicos para el tratamiento de un drenaje ácido de mina. Los sustratos de carbono incluían lodo de aguas residuales, estiércol de borrego, trozos de madera, aserrín, paja, hojas y celulosa. Las hojas y la paja que contenían un 27% en peso de carbono orgánico, del cual 19% era de celulosa, tuvieron una mayor actividad sulfatorreductora y el sustrato permaneció disponible durante 60 días.

La finalidad de considerar la construcción de una barrera de biotratamiento pasivo es la liberación gradual de la fuente de carbono con el transcurso del tiempo, así como de estimular y mantener activas las poblaciones microbianas hidrolíticas, así como los consorcios de BSR, de acuerdo al diagrama de degradación anaerobia de la materia orgánica esquematizado en la Figura 7.

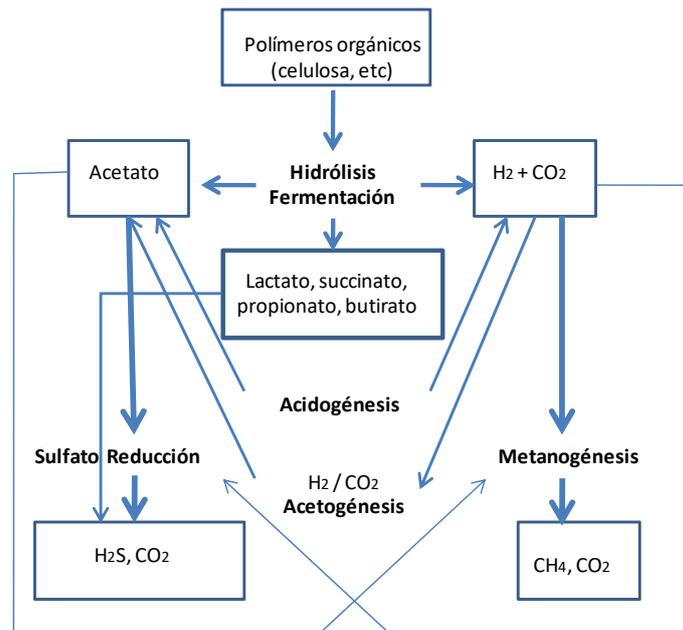


Figura 7. Diagrama de la degradación anaerobia de polímeros orgánicos (Modificado de Lens *et al.*, 2000).

En la Figura 7, se muestra el tipo de descomposición y de microorganismos que intervienen en la degradación de la materia orgánica para que se lleve a cabo la sulfatorreducción. Como se observa en dicha figura, las etapas que intervienen, son las siguientes:

- **Hidrólisis:** Desintegración de la materia orgánica compleja e insoluble, en este paso los carbohidratos, proteínas y lípidos son hidrolizados a azúcares monoméricos, aminoácidos y ácidos grasos de estructuras complejas, es decir, de cadena larga.
- **Acidogénesis:** En esta etapa las bacterias acidogénicas toman las moléculas orgánicas de la etapa anterior para convertirlas en ácidos grasos volátiles (AGV) tales como butírico, propiónico y acético entre otros.
- **Acetogénesis:** Consiste en la conversión de AGV a acetato e hidrógeno.

- **Metanogénesis:** Es la formación de metano por la descarboxilación de acetato por microorganismos metanogénicos acetotróficos y por la hidrogenación de dióxido de carbono por microorganismos hidrogenotróficos.

Lawrence y McCarty (1969) fueron los primeros autores que presentaron un modelo cinético unificado para la eliminación anaerobia de sustratos y crecimiento microbiano. Ellos emplearon el modelo de Monod para describir el consumo de ácido acético, propiónico y butírico. Estos ácidos orgánicos volátiles son los intermediarios más comunes en la degradación anaerobia.

4.6.- Material celulósico como fuente de carbono.

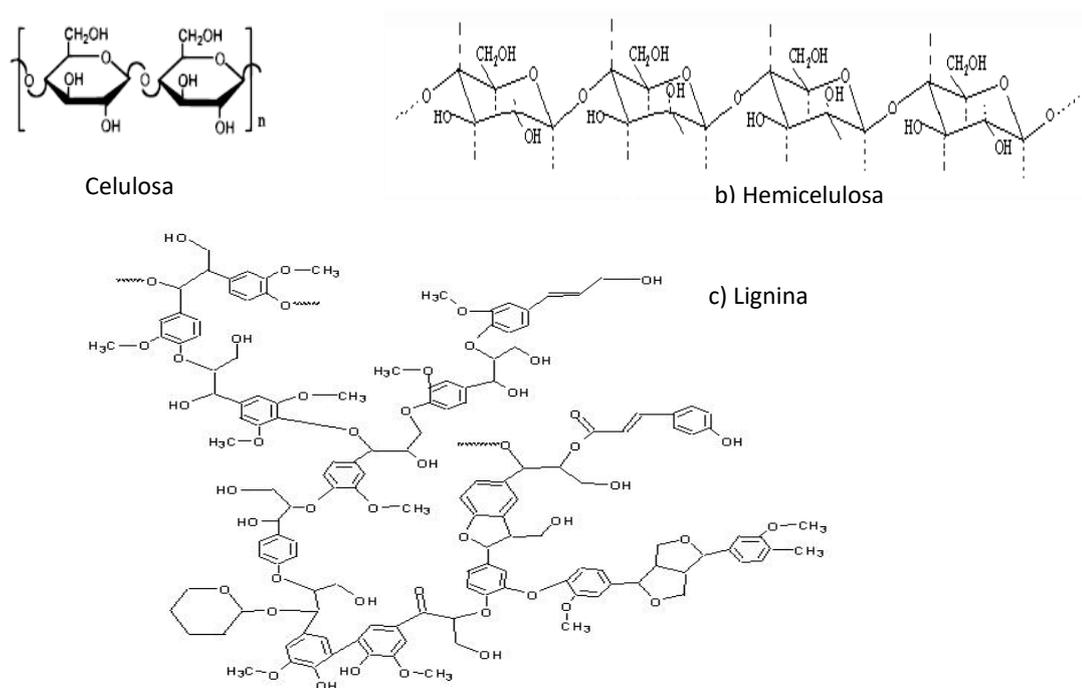


Figura 8. Estructuras de celulosa, hemicelulosa y lignina (Kobayashi *et al.*, 2000).

Debido a la baja biodegradabilidad de compuestos lignocelulósicos, diversos autores han sugerido el pretratamiento de estos materiales para incrementar su biodegradabilidad. Uno de los procesos que se recomiendan es el de explosión de vapor. El objetivo de la explosión de vapor como pre-tratamiento, es incrementar el contenido de celulosa comparado con

otros constituyentes del biosólido, como son la hemicelulosa y la lignina. La diferencia principal entre estos componentes radica en el contenido polisacárido de las unidades que los constituyen y la proporción de grupos fenólicos de menor biodegradabilidad que se encuentren presentes, como es el caso de la lignina (Figura 8). Por lo que, uno de los objetivos del pre-tratamiento es disminuir la presencia de grupos aromáticos presentes en el material empleado como sustrato sólido orgánico.

4.6.1. Degradación de celulosa por consorcios de BSR

La degradación anaerobia de la celulosa, se presenta por la acción microbiana de una comunidad heterogénea de microorganismos, los cuales llegan a formar compuestos intermediarios más sencillos (Figura 7), que pueden servir como fuente de carbón para las BSR o para bacterias metanogénicas.

Las ventajas de usar celulosa son: su disponibilidad en el mercado, bajo costo, compuesto no volátil que requiere menor frecuencia de aplicación y control de E_H por dosificación del sustrato orgánico. Algunas de sus desventajas son: cinéticas lentas, insoluble en agua, aunque algunos productos de la degradación son solubles, los sistemas requieren de largos tiempos de arranque, desde 11 días hasta 30 días (Phifer *et al.*, 2001; Greben *et al.*, 2006).

4.6.2. Características físicas de la celulosa.

La celulosa es un polisacárido lineal formado por residuos de glucosa unidos por enlaces beta 1-4 de peso molecular variable, con fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$. Estas cadenas lineales de celulosa interactúan entre sí por puentes de hidrógeno dando lugar a la formación de microfibras con regiones altamente ordenadas que le dan las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático y que se conocen como regiones cristalinas. Cuando se rompen los puentes de hidrógeno se forman regiones denominadas amorfas, que permiten su hidratación y mejor accesibilidad al ataque enzimático (Mejía *et al.*, 1999).

5. MATERIALES Y MÉTODOS PARA EVALUAR LA SULFATORREDUCCION Y REMOCION DE ARSENICO EN AGUA.

5.1. Obtención de consorcios microbianos con actividad reductora de sulfatos

Los consorcios microbianos que se emplearon en el presente trabajo fueron aislados de dos suelos impactados por la actividad minero metalúrgica identificados por Razo (2006).

La muestra de suelo identificada como JH pertenece a la presa de jales histórica, recolectada de Villa de La Paz, (longitud: 100°42'51.768"; latitud: 23°40'27".192) y la concentración total de algunos elementos fueron reportados por Labastida (2007), al igual que la muestra denominada M2 (longitud: 100°39'27.684"; latitud: 23°40'19".956) que fue aislada de una zona entre los municipios de Villa de La Paz y Matehuala. Ambas muestras de suelo, se obtuvieron dentro de un perfil de profundidad entre 0 a 40 cm (Labastida, 2007). Como referencia se presentan las concentraciones totales de estos elementos cuantificados en dichos suelos (Tabla 1):

Tabla 2. Concentraciones totales de elementos en los suelos donde se recuperaron los consorcios JH y M2 (Labastida, 2007).

| Elemento | Concentración de EPT | | | |
|-----------|-----------------------|------------------------|-------------------|--------|
| | M2 | JH | NIST 2710 | % Rec. |
| As | 4719 ± 31 | 4.5± 1.3 ^b | 556 | 90 |
| Pb | 758 ± 108 | 19.3± 4.6 ^b | 4344 | 80 |
| Cd | 50 ± 2 | 64± 3 | 18 | 83 |
| Zn | 2540 ± 285 | 4331± 106 | 5000 | 72 |
| Cu | 871± 11 | 451± 24 | 2025 | 70 |
| Fe | 53 ± 1.2 ^b | 8.2 ± 7.7 ^b | 25.5 ^b | 80 |

Las unidades de concentración se refieren en mg•kg⁻¹ ± su desviación estándar, excepto donde se indica con b, las cuales están referidas en g•kg⁻¹. % Rec indica el porcentaje de recuperación obtenido para cada elemento con el NIST 2710.

5.1.1. Producción de biomasa con ASR.

Los consorcios microbianos obtenidos de los suelos anteriormente mencionados presentaron actividad biológica reductora de sulfatos. Ambos consorcios microbianos (JH y M2) se mantuvieron en crecimiento en sistemas batch para incrementar su biomasa. La

producción de biomasa consistió en la adición periódica de un medio líquido denominado Postgate C Modificado, a partir de los siguientes compuestos (mg L^{-1}): NH_4Cl (1000), KH_2PO_4 (500), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (40), ácido ascórbico (100), tioglicolato de sodio (100), rezasurina (1) y como fuentes de carbono: piruvato (1100), citrato de sodio dihidratado (600), CH_3COONa (2500), extracto de levadura (1000) y lactato (2.3 ml). El ion SO_4^{2-} fue adicionado como (mg.L^{-1}): Na_2SO_4 (4500), MgSO_4 (60) and FeSO_4 (4) (Postgate, 1984).

Lo anterior se llevó a cabo en botellas de vidrio de 120 ml con septa de neopreno y sello de aluminio. Los medios líquidos utilizados en todos los experimentos fueron esterilizados en una autoclave modelo 25X-1 por 15 min a 121°C y 15 psig de presión. Antes de esterilizar los medios de cultivo, el pH se ajustó a 7 ± 0.25 con NaOH 1 M, utilizando para esto un potenciómetro Orion 420A+.

La adición y cambio de medio nutritivo a las comunidades sulfatorreductoras se realizó bajo una campana de extracción esterilizada, para evitar la posible contaminación de los medios de cultivo y de los sistemas experimentales. El espacio de trabajo se desinfectó con solución comercial de hipoclorito de sodio y etanol (grado industrial). El manejo de los frascos con inóculos se llevó a cabo por transvase de medios de cultivo cerca de la flama de un mechero Bunsen. Las botellas se llenaron completamente evitando dejar cabeza de aire como lo muestra la Figura 9. Todos los experimentos de la presente tesis se realizaron usando un agitador orbital Max^Q modelo 2000.



Figura 9. Inóculos de BSR en Medio Postgate.C modificado

Cada tercer día se cuantificó la cantidad de H_2S producido en los sistemas batch, cuando la producción había alcanzado el estado estacionario, lo cual varió entre 7 y 15 días, la

suspensión se centrifugaba y se retiraba el sobrenadante, dejando en el fondo la biomasa producida. Este biosólido era acumulado periódicamente dentro del mismo sistema y era mantenido con Medio Postgate C Modificado hasta su uso en las cinéticas microbianas o en las pruebas de remoción de EPT en agua.

5.2. Cuantificación de biomasa.

En cada uno de los experimentos realizados con los consorcios microbianos, se llevó el control de la cantidad de biomasa presente en los sistemas al inicio y al final de cada experimento.

Los inóculos se obtuvieron de los sistemas batch de producción de biomasa descritos anteriormente (Sección 5.1). La biomasa se cuantificó indirectamente relacionándola con el valor de sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el sistema. Para la determinación de los SSV se siguió el método 2540 G descrito en el Métodos Estándar (Eaton, *et al.*, 2005). En este método se establece que los SSV se establecen por diferencia de pesos entre la muestra seca a 105°C y la muestra calcinada a 550°C en una mufla (VULCAN 3-550PD NEY) obteniendo el equivalente de la fracción orgánica contenida en la muestra que es referida como sólidos suspendidos volátiles (SSV).

$$SSV = \frac{(A - B) * 1000}{Volumen\ de\ muestra\ (ml)} \quad (Ec. 11)$$

Donde:

A=Peso de la muestra seca

B= Peso de la muestra calcinada

5.3. Esquema experimental.

En el primer bloque de la Figura 10 se representa la primera etapa que tuvo como objetivo confirmar la actividad sulfatorreductora (ASR) para cada uno de los consorcios microbianos empleados (JH o M2). Lo anterior se evaluó siguiendo la concentración de H₂S con respecto al tiempo. Previo a estas pruebas se realizó la caracterización de la celulosa (C₆H₁₀O₅)_n propuesta como fuente de carbono, evaluándose además su capacidad para adsorber H₂S.

Dentro del segundo bloque del diseño experimental, se consideró la evaluación de las cinéticas microbianas de degradación de celulosa sólida (CS), evaluando este material con y sin pre-tratamiento (Sección 5.6). El objetivo de estas comparaciones fue determinar cuál de los dos procedimientos facilitaba la digestión de la celulosa por las BSR. Se estableció la cinética de descomposición de celulosa mediante la cuantificación de AGV. Estos perfiles de AGV se determinaron por electroforesis capilar (EFC), siguiendo en experimentos análogos la evolución del potencial de óxido reducción.

Se consideró necesario comparar la capacidad de fermentación e hidrólisis de ambas comunidades con respecto a la celulosa, estableciendo un método de desplazamiento de líquido como medida de la producción de gas por degradación de la celulosa. Este resultado se comparó con la degradación de glucosa (ambas grado reactivo) (Sección 5.9).

Continuando con la comparación del metabolismo de ambos consorcios, se siguió el comportamiento de manera simultánea de estos, empleando acetato como única fuente de carbono y midiendo la concentración de H_2S con respecto al tiempo. De este modo fue posible establecer el tipo de metabolismo dominante para cada uno de los consorcios microbianos empleados en este estudio (Sección 5.10).

Por otro lado, se estableció la ARS con ambas comunidades utilizando la celulosa cristalina grado reactivo (JT Baker) como sustrato (CC), tomando en cuenta que según el incremento del área superficial se favorece el contacto de las BSR. La ASR se evaluó siguiendo la producción de H_2S para observar la diferencia entre la CS y la CC.

Finalmente, después de evaluar y analizar los resultados de las etapas anteriores, se caracterizó el agua del caso de estudio seleccionado para esta tesis, y se estableció la cinética para precipitar el As presente en esta agua, empleando la CC como sustrato y M2 como biomasa sulfatorreductora.

Una vez terminada la cinética se procedió a analizar el As en solución por espectroscopia de absorción atómica (EAA) (Sección 5.13) y el precipitado formado se observó con un microscopio electrónico de barrido (MEB) (Sección 5.15).

A manera de resumen se presenta el esquema metodológico del presente trabajo de tesis en la Figura 10.

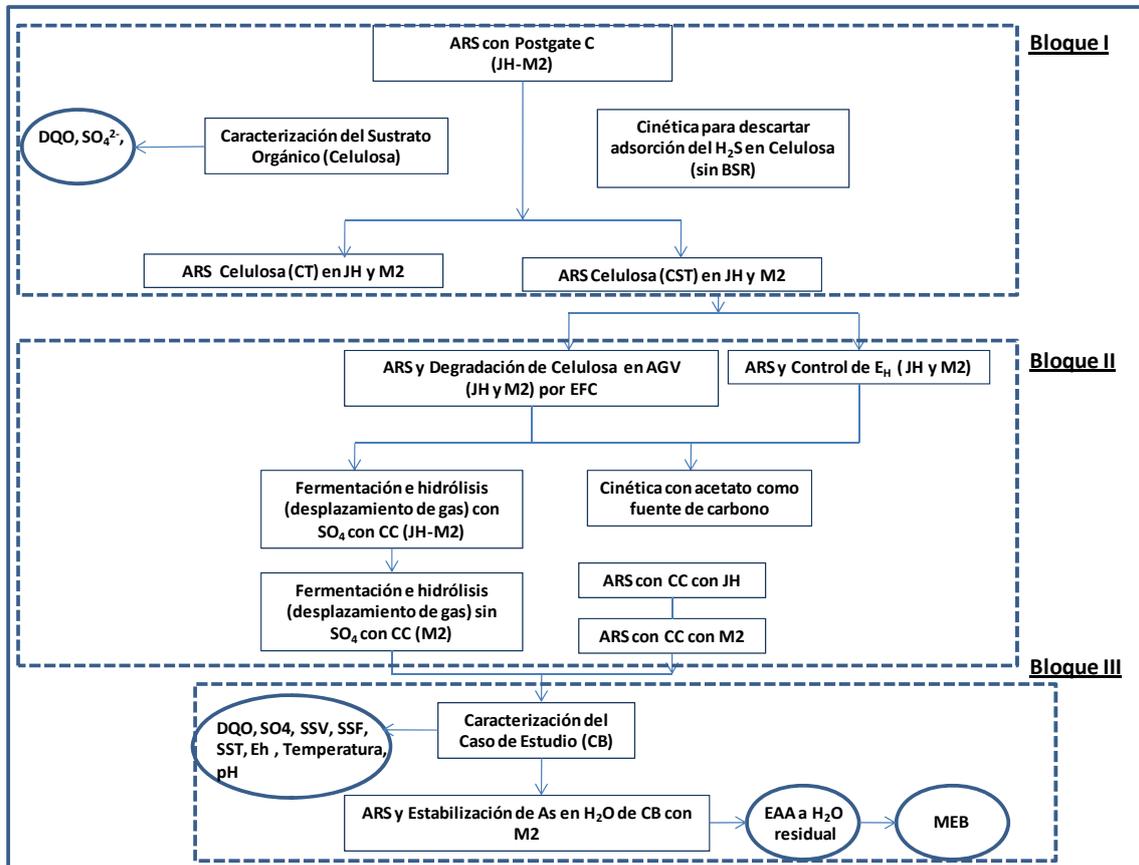


Figura 10. Diagrama de flujo del diseño experimental. Donde A.R.S. se refiere a actividad reductora de sulfatos, JH y M2, se refiere a los consorcios provenientes de esos sitios de muestreo, AGV (ácidos grasos volátiles), EFC (electroforesis capilar); EAA espectroscopia de absorción atómica.

A continuación se describen con detalle los métodos analíticos empleados en la presente tesis.

5.4. Caracterización del sustrato orgánico (Celulosa).

5.4.1. Determinación de materia orgánica e inorgánica de la celulosa.

Se adaptó el método 2540 E (Eaton *et al.*, 2005) para cuantificar sólidos suspendidos volátiles, utilizándose 0.15 g de celulosa por crisol. La prueba se llevó a cabo por triplicado. Para determinar las proporciones de componentes orgánicos e inorgánicos en la celulosa, la muestra de celulosa se llevó a incineración comenzando con una temperatura de

105°C. Una vez que la muestra se mantuvo a peso constante, se incrementó la temperatura en 50°C hasta llegar a 800°C, posteriormente se elevó a 900°C, finalizando con su calcinación a 1000°C (Sección 6.2).

5.4.2. Pre-tratamiento de la celulosa.

El material empleando como fuente de celulosa sólida (CS) $(C_6H_{10}O_5)_n$ fue papel adsorbente Kimberly Clark, se determinó el aporte de carbono total medido de manera indirecta como DQO con el método 5220 C a reflujó cerrado del Métodos Estándar (Eaton *et al.*, 2005), así como el contenido de SO_4^{2-} por el método turbidimétrico 4500-E del Métodos Estándar (Eaton *et al.*, 2005). Se establecieron dos condiciones de uso de la celulosa como fuente de carbono, la primera fue un tratamiento térmico, y la otra opción fue humedecerla y secarla. Lo anterior se planteó como una posibilidad de que el tratamiento térmico hiciera más disponible la fuente de carbono para las BSR.

De acuerdo a la literatura (Sun y Cheng, 2001), la explosión térmica permite incrementar la tasa de degradación de materiales lignocelulósicos. Este tratamiento consiste en la exposición de la celulosa con vapor saturado a 121°C y 15 psig durante 30 min. La celulosa que pasó por este proceso se le denominó celulosa tratada (CT). Los resultados obtenidos en la degradación de este tipo de celulosa y los consorcios microbianos empleados se presentan en la sección 6.4.1.

La celulosa sin tratar (CST) correspondió a aquella que sólo fue humedecida, disgregada y secada a 100°C durante 18 horas, tiempo en el cual se llevó a cabo la remoción total de agua. Para el secado se empleó una estufa de convección Modelo HEC-41 (Mca. Lumistell).

Con estos experimentos se determinó cual de las dos formas de celulosa favorecía la biodegradación por ambos consorcios y en base a dichos resultados se seleccionó el tipo de celulosa a aplicar al resto de los experimentos de la presente tesis.

5.4.3. Relación de carbono en la celulosa.

Para establecer la cantidad de celulosa que se adicionaría por experimento, se hizo un balance del contenido de carbono (C) proporcionado por el medio líquido Postgate C

(sección 5.1.1), siendo este equivalente a 2700 mg de C L⁻¹ y considerando un porcentaje teórico de carbono que aporta el monómero de la celulosa (C₆H₁₀O₅)_n equivalente a 444 mg se obtuvo la cantidad de mg L⁻¹ que se tienen que utilizar de (C₆H₁₀O₅)_n en el medio nutritivo, la operación realizada se muestra en la ecuación 12:

$$mg.(C_6H_{10}O_5)_n L^{-1} = \frac{1 mg(C_6H_{10}O_5)_n \times 2700 mg C L^{-1}}{444 mg C L^{-1}} \quad \text{Ec.12}$$

De donde se obtuvo un valor de 6080 mg (C₆H₁₀O₅)_n L⁻¹, por lo que, en experimentos realizados en botellas serológicas de 260 mL se adicionaron 1580 mg de celulosa, en los experimentos de 120 mL el requerimiento de celulosa fue de 730 mg, en los experimentos a un volumen de reacción de 60 mL el equivalente de celulosa fue de 356 mg y en los experimentos correspondientes a volúmenes de reacción de 30 mL se utilizaron 182.5 mg.

5. 5. Adsorción del sulfuro de hidrógeno en la celulosa.

Para comprobar que el sulfuro de hidrógeno (H₂S), producido por los consorcios JH y M2, no se adsorbía en la celulosa, lo cual podría subestimar la producción del mismo, se realizó una cinética de 28 días, en botellas serológicas de 120 mL. Estas botellas contenían medio mineral nutritivo sin SO₄²⁻, 730 mg de celulosa y sulfuro de sodio (Na₂S•9H₂O). Este último, se utilizó en 5 diferentes concentraciones (0.91, 2, 4.4, 8, y 15.8 mM) a un pH de 7. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado. Los resultados se presentan y discuten en la sección 6.3.

5.6. Evaluación de la ASR con CT y CST.

La evaluación de la degradación de celulosa tratada (CT) y sin tratar (CST) se llevó a cabo en botellas serológicas cerradas con un volumen de reacción de 120 mL. El modo de operación para cada tratamiento fue el siguiente:

- CT: Para exponer a la celulosa a la explosión térmica se adicionaron los 0.73 g a cada una de las botellas serológicas y se colocaron en la autoclave, las botellas se dejaron enfriar a temperatura ambiente para adicionar la biomasa sulfato reductora de los consorcios JH y M2 y el medio mineral nutritivo esterilizado previamente.

- CST: Se disgregó la celulosa como se describe en la sección 5.4.3. y se colocaron 0.73 g de la misma en cada botella serológica previamente esterilizadas junto con el medio mineral nutritivo y los biomasa sulfato reductora de los consorcios JH y M2.

La CS se adicionó como papel absorbente siendo la única fuente de carbono. El medio mineral nutritivo contenía: (mg L⁻¹): NH₄Cl (1000), KH₂PO₄ (500), CaCl₂•2H₂O (40), ácido ascórbico (100), tioglicolato (100), y el SO₄²⁻ (mg L⁻¹) fue adicionado únicamente como Na₂SO₄ (4536) para evitar que el sulfuro producido se precipitará por la adición de metales en la solución nutritiva. Los compuestos utilizados fueron grado reactivo (JT Baker y Bioxon). Todas las cinéticas de producción de sulfuro de hidrógeno se realizaron por duplicado. La Figura 11 muestra la apariencia de la celulosa al inicio de los experimentos con CS.



Figura 11. Botellas serológicas de 120 ml con celulosa sólida (CS) como fuente de carbono.

5.7. Perfiles de concentración de AGV como productos de biodegradación de la celulosa.

Para obtener el análisis de la biodegradación de la celulosa en ambos consorcios, se utilizaron botellas de vidrio de 260 mL con septas de neopreno. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado. Para análisis de AGV por electroforesis capilar (EFC) se tomó 1 mL cada 24 horas y se congelaron hasta su determinación. Para la determinación de DQO soluble, se tomó 1 mL cada 48 horas (filtración a 0.2 µm) y se empleó el método colorimétrico a reflujo cerrado 5220 D (Eaton, 2005). Para la determinación de H₂S se tomó una alícuota de 0.1 mL cada 24 horas y se empleó el método colorimétrico de Cord-Ruwisch (1985). En este experimento se adicionaron 1580 mg de CS al medio mineral

nutritivo y la biomasa sulfatorreductora de ambos consorcios (JH y M2.). En todos los casos se consideraron duplicados.

5.7.1 Determinación de AGV por EFC.

Los ácidos grasos volátiles AGV considerados para su cuantificación fueron: acetato, butirato, citrato, lactato y piruvato mediante EFC (Agilent 1600[®]) y se empleó una columna de sílica combinada. La columna era de 72 cm de longitud efectiva y 50 μm de diámetro interno. Previo a la EFC, las soluciones fueron centrifugadas, diluidas 1:10 y filtradas a 0.1 μm para evitar taponamiento en la columna.

El electrólito soporte de la columna contenía 5 mM de 2,6- ácido dicarboxil piridina y 0.5 mM de bromuro de acetiltrimetilamonio como modificador del flujo electrosmótico, el pH del electrólito fue ajustado a 5.6 con 1M de NaOH.

Antes de cada inyección, a la columna de EFC, el capilar fue pre-acondicionado durante 4 minutos mediante enjuague con la solución electrólito. Las muestras fueron inyectadas a una presión de 50 mbar por 6 segundos. El voltaje que se aplicó fue de 25 kV y la temperatura del capilar fue de 20°C. La detección se llevó a cabo con un detector UV a una longitud de onda de 350 nm empleando una referencia a 200 nm.

Todos los compuestos químicos utilizados para la curva de calibración fueron grado reactivo. Se utilizó agua desionizada de 18 $\mu\text{S cm}^{-1}$ para preparar los estándares, las diluciones de las muestras y los electrólitos. El control del sistema, la recopilación de datos y el análisis fueron hechos a través del software ChemStation B.01.03. Estos análisis se llevaron a cabo en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica dentro del marco de colaboración del Proyecto FMSLP-2005-C01-32.

5.8. Evolución de potencial de óxido reducción en cinéticas microbianas.

La cinética del potencial de óxido reducción se siguió en botellas serológicas de 120 ml por duplicado para cada una de las comunidades.

El potencial redox se determinó en una alícuota de cada una de las botellas de 0.5 ml colocada en viales ámbar esterilizados, de 4 ml, y la lectura se obtuvo con un multímetro

digital Protek 506 conectado a un electrodo de platino (Pt) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (Labastida, 2007).

El método de calibración del electrodo Ag/AgCl se realizó mediante soluciones estándar saturadas del par redox quinona /hidroquinona (Ver anexo A.8). El error relativo obtenido fue de ± 5 mV con respecto al electrodo de Ag/AgCl, este error sirvió de ajuste para obtener todos los potenciales referidos en este trabajo con respecto al electrodo normal de hidrógeno (ENH).

5.9. Determinación de la capacidad de fermentación e hidrólisis de JH y M2.

Para determinar la capacidad de fermentación e hidrólisis en ambos consorcios, se trabajó en botellas serológicas de 60 mL., estableciéndose un dispositivo de desplazamiento de gas como el que se muestra en la Figura 12. En éste, se requiere el uso de una solución salina ácida saturada donde se recupera el gas generado por la oxidación de la materia orgánica. Esta solución se preparó con cloruro de sodio comercial (NaCl) y se ajustó el pH a 2 con HCl (Modificado de Visser, 1995).

La manguera transportadora de gas, conectada a la cabeza de aire del sistema biológico fue adaptada en sus extremos con puntas de jeringa y sus respectivas agujas. Se conectó una punta a la septa de la botella serológica de 60 mL, y después el otro extremo a la que contenía la solución salina – ácida; el líquido desplazado se recogió en una probeta graduada para cuantificarlo.

El volumen ocupado por el líquido en las botellas de 60 mL del sistema biológico se estableció a un 50% de su capacidad máxima, por lo que se utilizaron 30 ml de medio mineral nutritivo con 4536 mgL^{-1} de Na_2SO_4 , biomasa de cada consorcio (72 mgL^{-1}) y el sustrato correspondiente, celulosa cristalina para la hidrólisis y glucosa para la fermentación. Lo anterior se estableció con una relación de DQO/SSV=0.5 (Celis, 2004).

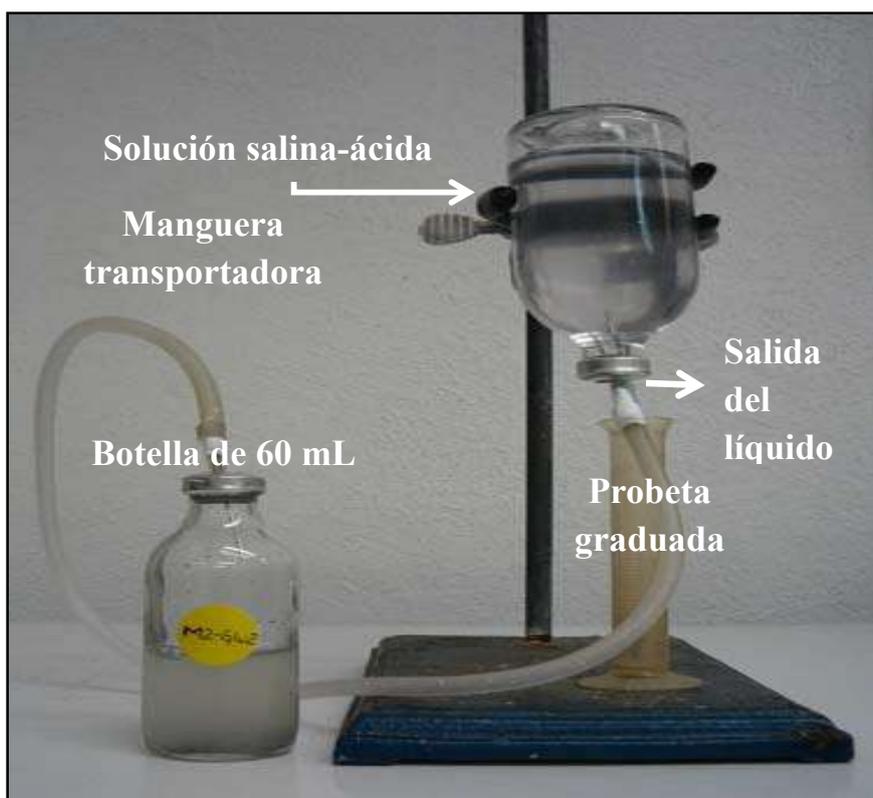


Figura 12. Dispositivo de medición del gas producido por fermentación e hidrólisis.

Con el fin de comprobar que el desplazamiento del líquido obtenido no era por la reducción de SO_4^{2-} a H_2S , se estableció como blanco el mismo sistema pero sin adicionar SO_4^{2-} .

5.10. Producción de H_2S con acetato como fuente de carbono.

En estos experimentos se utilizó acetato de sodio (CH_3COONa) como única fuente de carbono junto con el medio mineral nutritivo, para analizar el comportamiento en cuanto a la velocidad de producción de sulfuro de ambos consorcios con respecto al sustrato orgánico. De esta forma se pudo establecer la complejidad de la comunidad microbiana que está conformada por los diferentes consorcios de bacterias existentes y se obtuvo un parámetro de análisis para describir el tipo de oxidación del sustrato. Estos experimentos se realizaron en botellas serológicas de 120 ml por duplicado.

5.11. ARS con CC como fuente de carbono.

Para tener la comparación del comportamiento de producción del H₂S utilizando la CS y la CC, se estableció un experimento en botellas de 120 mL con ambas comunidades (JH y M2), igual que en la sección 5.7, la única variante fue la adición de celulosa grado reactivo.

5.12. Determinación de la concentración de metales y arsénico en el agua de estudio.

La determinación de metales (Cu, Cd, Fe, Pb y Zn) en el agua de CB, se llevó a cabo por espectroscopia de absorción atómica (EAA) empleando un espectrofotómetro de absorción atómica PERKIN ELMER 3110. Los límites de detección para estos metales, fueron de (mg L⁻¹): 0.07, 0.03, 0.10, 0.19, 0.02 respectivamente.

La determinación de As se realizó en dos equipos diferentes: el Spectra 220 Varian se utilizó para concentraciones de As mayores a 3 mg L⁻¹; el Perkin Elmer A Analyst 200 acoplado a un generador de hidruros modelo FIAS 100 se utilizó para concentraciones inferiores a 3 mg L⁻¹, y para determinación de As³⁺ se modificó el protocolo de análisis de As total eliminando la etapa de preliminar de reducción del método de generación de hidruros.

5.13. Estabilización del agua de CB en sistemas batch.

Después de haber realizado la caracterización de las cinéticas de degradación de celulosa por los consorcios JH y M2, se estableció un sistema de remoción de As con el consorcio que resultó ser más adecuado, adicionando celulosa cristalina y el agua con As (CB) como medio mineral líquido. Estos sistemas se implementaron en botellas serológicas de 120 mL, siguiendo la producción de sulfuro diariamente durante 28 días, este último experimento se realizó por triplicado. Al término de la cinética se tomaron 10 ml de solución nutritiva de cada una de las botellas serológicas, se ajustó el pH a 2 con HNO₃ 2M y se filtraron con acrodiscos de fibra de vidrio de 0.2 µm. Se analizó la concentración de As en solución por EAA. Los resultados se discuten en la sección 7.4.

5.14. Caracterización del precipitado final por MEB.

El análisis del precipitado formado, se inició haciendo precipitar el H₂S residual en las 3 botellas, precipitándolo con Cu(NO₃)₂•2.5H₂O. Una vez eliminado el H₂S en solución, se filtraron 10 mL de cada botella analizar el SO₄²⁻ y la DQO.

El precipitado de As formado fue puesto a secar a 100°C hasta retirar la humedad por 2 horas, el residuo se pulverizó y se colocó en soportes metálicos para su análisis microscópico. Los precipitados formados se analizaron utilizando espectroscopia de energía dispersa (EDS; EDAX, Mod. DX4) acoplado a un microscopio electrónico de barrido (MEB; Philips, modelo XL30). Los resultados obtenidos se presentan en la sección 7.5.

6. RESULTADOS SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA SULFATORREDUCTORA

Considerando que para una remediación biológica de agua es necesario conocer la caracterización de los microorganismos que la llevan a cabo y el conocimiento de la termodinámica del sistema, se llevaron a cabo los siguientes experimentos con las comunidades de bacterias sulfatorreductoras, JH y M2.

La ecuación de Gompertz (ver apéndice A.1), representada en lo sucesivo en cada gráfica por líneas continuas (JH) y punteadas (M2), fue empleada para modelar el comportamiento de la producción de sulfuro y los AGV generados por degradación de la celulosa.

6.1. Cinética de producción de biomasa sulfatorreductora.

Como primer paso se verificó la velocidad de producción de H₂S biogénico específico para los dos consorcios microbianos que se evaluaron en el presente trabajo, este valor proporcionó la velocidad máxima de producción de sulfuro biogénico en mmol de H₂S/mg SSV.

El ajuste de los datos experimentales de todas las cinéticas evaluadas en el presente trabajo se ajustaron con el Modelo de Gompertz (Apéndice 1). Este modelo permitió establecer: la constante cinética de primer orden (k), la máxima producción específica (\hat{q}) y la velocidad máxima de producción de sulfuro (V_{max}), así como el tiempo de la fase lag (X_c).

En las Figuras 13 y 14 se presentan dos cinéticas con el medio mineral nutritivo Postgate modificado, con acetato, citrato, lactato, piruvato y extracto de levadura, como fuentes de carbono. Esta cinética se realizó para mantener activas a las comunidades de trabajo, antes de ser evaluadas con la celulosa como fuente de carbono.

En la Tabla 3, se presentan los parámetros cinéticos obtenidos del modelo de ajuste aplicado a los datos experimentales de la producción de H₂S con medio Postgate C para un volumen de reacción de 120 ml (Figura 13). De estos resultados se observa que existe una diferencia de 4.1 mmol H₂S/g SSV*h con respecto a la V_{max} de producción de sulfuro entre el consorcio M2, que es el que presenta una mayor velocidad, con respecto a JH. Caso

contrario se presenta con la producción de H₂S, donde JH logra producir 2.5 mM más con respecto a M2.

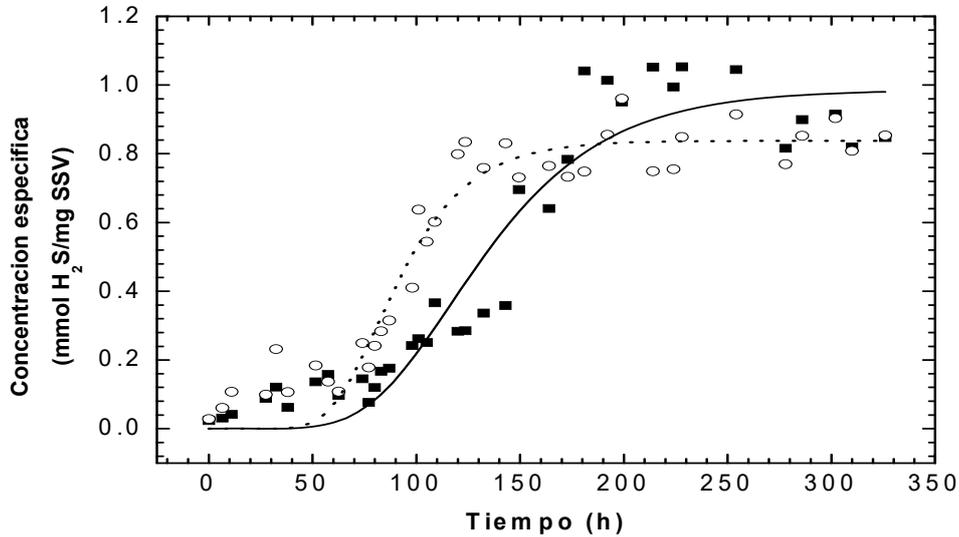


Figura 13. Comportamiento en la producción de H₂S de comunidades JH (■) y M2 (○) en presencia del medio Postgate modificado. Volumen de reacción 120 mL. Modelo Gompertz: JH (· ·) para M2 (· · · ·).

Tabla 3. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S con Medio Postgate C en 120 mL.

| mg SSV L ⁻¹ | Consorcio | V _{max} (mmol H ₂ S/ g SSV·h) | $\hat{q}(H_2S)$ (mmol/mg SSV) | [H ₂ S] (mM) | Fase lag (h) | K (h ⁻¹) |
|------------------------|-----------|---|----------------------------------|----------------------------|-----------------|-------------------------|
| 12 | JH | 7.2 | 0.9383 | 11.3 | 77.35 | 0.0208 |
| 10 | M2 | 11.3 | 0.8759 | 8.8 | 60 | 0.0349 |

Se realizó una cinética con mayor cantidad de biomasa, tomando en cuenta la biomasa disponible de cada uno de los consorcios, en ese momento, se decidió trabajar con un volumen de 60 mL.

En la Tabla 4 se puede observar que al tener una mayor cantidad de biomasa y un menor volumen de reacción las BSR, en ambos consorcios, presentaron una fase de aclimatación relativamente corta (entre 14 y 19 s) como se puede observar en la Figura 14.

Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S con Medio Postgate C en 60 mL.

| mgSSV L ⁻¹ | Consortio | V _{max} (mmol H ₂ S/ g SSV*h) | $\hat{q}(H_2S)$ (mmol/mg SSV) | [H ₂ S] (mM) | Fase lag (h) | K (h ⁻¹) |
|-----------------------|-----------|---|----------------------------------|----------------------------|-----------------|-------------------------|
| 207 | JH | 0.4 | 0.0314 | 6.5 | 0.0054 | 0.0347 |
| 234 | M2 | 0.08 | 0.0430 | 10.1 | 0.0035 | 0.0026 |

En esta misma Figura 14, se puede observar una respuesta unimodal para JH y bimodal para M2. Lo anterior podría ser atribuido, como fue sugerido por Márquez (2008), que estos consorcios son significativamente diferentes con respecto a su biodiversidad, y que en el consorcio JH prevalecen comunidades sulfatorreductoras y en M2 existen comunidades hidrolíticas y sulfatorreductoras.

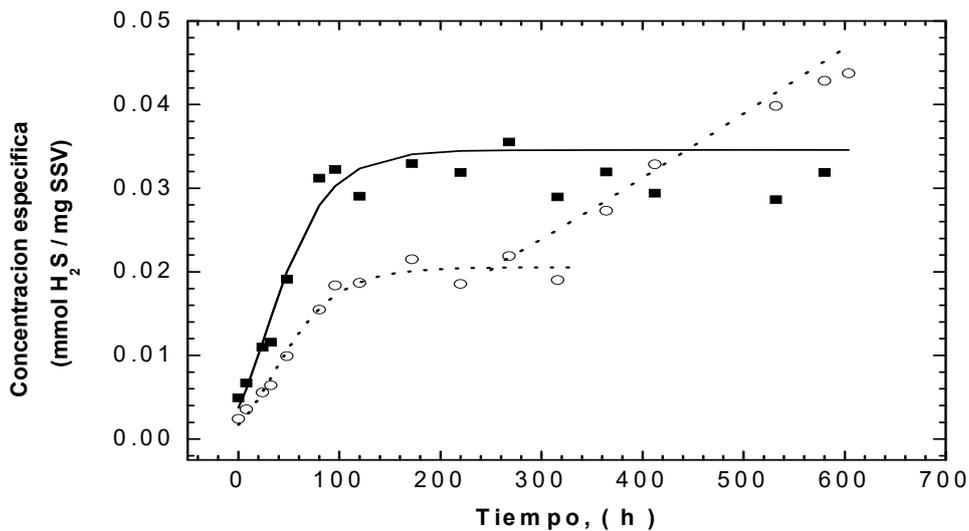


Figura 14. Comportamiento en la producción de H₂S de comunidades JH (■) y M2 (○) en presencia del medio Postgate modificado en 60 mL. Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (····).

Los sistemas de producción de biomasa (SSV) con el medio Postgate presentaron una gran variabilidad en el contenido total de la biomasa, por lo que el análisis de las cinéticas realizadas, para poder ser comparadas, se refiere a la tasa específica de producción del H₂S. Todos los inóculos recuperados de los sistemas de producción de biomasa se tomaron en la fase estacionaria de la producción máxima de sulfuro biogénico

6.2. Caracterización del sustrato orgánico.

Los análisis de DQO como medida del contenido de carbono de la celulosa y SO_4^{2-} indicaron un contenido de 1 g de celulosa contiene una DQO de $1325.07 \pm 31.46 \text{ mg L}^{-1}$ y un valor no detectable de sulfatos. Dentro de esta caracterización se obtuvo un valor de $0.9494 \pm 0.0014 \text{ mg L}^{-1}$ de SSV y $0.026 \pm 0.0016 \text{ mg L}^{-1}$ de SSF.

En la determinación de la parte orgánica e inorgánica de la celulosa se encontró que el $96.4 \pm 0.0019\%$ es materia orgánica, lo cual quiere decir que se tiene un contenido de materia orgánica medida como DQO, de aproximadamente $1277.4 \pm 31.46 \text{ mg L}^{-1}$ y el $3.5 \pm 0.0016\%$ restante lo conforma la fracción inorgánica. La pérdida de peso de la muestra con incremento gradual de la temperatura, de 105°C a 1000°C , permite diferenciar la fracción orgánica e inorgánica de la muestra (Figura 15).

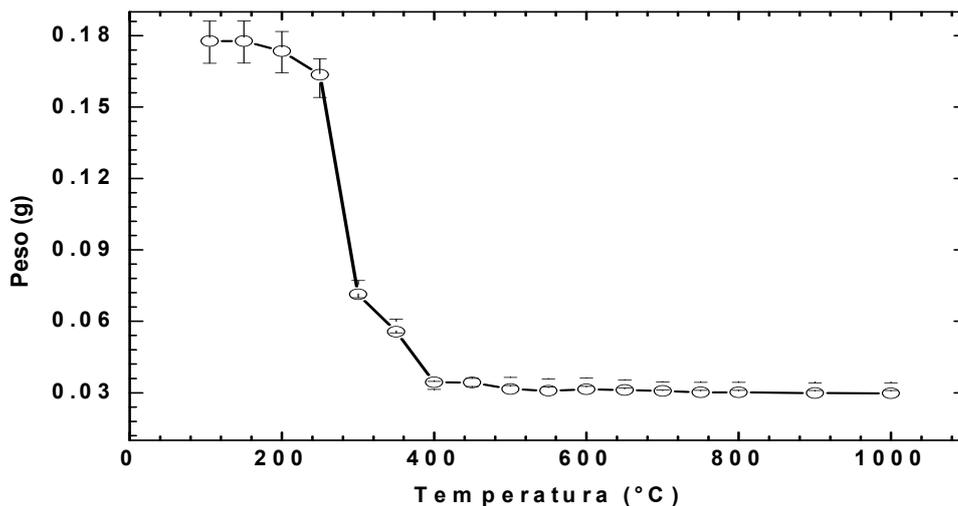


Figura 15. Perfil de combustión de la celulosa

6.3. Cinética para descartar la adsorción de H_2S en la celulosa.

Previo a las cinéticas, se evaluó el comportamiento del sulfuro en presencia de la celulosa para descartar pérdidas de H_2S por adsorción en el sustrato.

Se utilizó Na_2S en las siguientes concentraciones 0.91, 2, 4.4, 8, y 15.8 mM a un pH de 7 por un periodo de 27 días, en las cinco concentraciones monitoreadas existió un fenómeno

de adsorción-desorción en las primeras 200 h como muestra la Figura 16, con una adsorción inducida por la adherencia del Na_2S a la celulosa al momento de la preparación para dar inicio a la cinética.

Este experimento se mantuvo sin agitación las primeras 150 h, y como se observa en la Figura 16, la desorción del Na_2S se vio beneficiada al iniciarse la agitación constante a 100 rpm a las 180 horas. Hecho por el cual se decidió poner todos los experimentos siguientes en agitación.

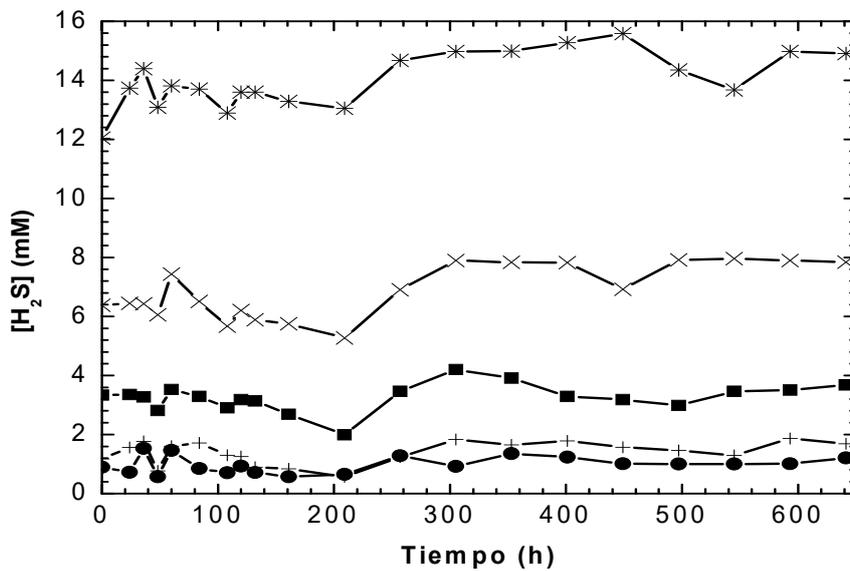


Figura 16. Adsorción de H_2S sobre celulosa sólida (CS) a diferentes concentraciones iniciales de H_2S : 0.91 mM (●), 2 mM (+), 4.5 mM (■), 8.1 mM (x), 15.8 mM (*).

6.4. ARS con CT y CST.

Se utilizaron dos métodos de pretratamiento buscando facilitar la degradación de celulosa para ambos consorcios de BSR, el primero que consistió en una explosión térmica (CT) y la segunda en disgregación en agua de la celulosa (CST). A continuación se analizan los resultados obtenidos en ambos.

6.4.1. ARS con CT por explosión térmica.

En este experimento la celulosa fue pretratada con el método conocido como explosión térmica (sección 5.6). La ARS de estos inóculos se puede observar en la Figura 17. La cinética de producción del H₂S tiene un comportamiento cíclico, que es más evidente en el caso de JH debido a las concentraciones tan bajas alcanzadas con este consorcio con una concentración máxima de 1.2 mmol H₂S L⁻¹ con una fase de aclimatación de 40 h más que M2 como se observa en la Tabla 5. El consorcio M2 alcanza 3.1 mmol H₂S L⁻¹ a una mayor velocidad que el consorcio JH. Las fluctuaciones se observan en tiempos cortos y posteriormente se observan zonas en estado cuasi-estacionario para este último consorcio. El comportamiento de M2 sobre la producción de H₂S podría relacionarse a la capacidad hidrolítica de este consorcio, capacidad con la que no cuenta el consorcio JH y que explicaría su comportamiento errático de producción de H₂S en el sistema.

Tabla 5. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S con celulosa tratada (CT).

| mg SSV L ⁻¹ | Consorcio | V _{max} (mmol H ₂ S/ g SSV*h) | $\hat{q}(H_2S)$ (mmol/mg SSV) | [H ₂ S] (mmol L ⁻¹) | Fase lag (h) | K (h ⁻¹) |
|------------------------|-----------|---|----------------------------------|---|-----------------|-------------------------|
| 22.5 | JH | 2.2 | 0.0514 | 1.2 | 120 | 0.0203 |
| 30 | M2 | 3.07 | 0.1024 | 3.1 | 80 | 0.0301 |

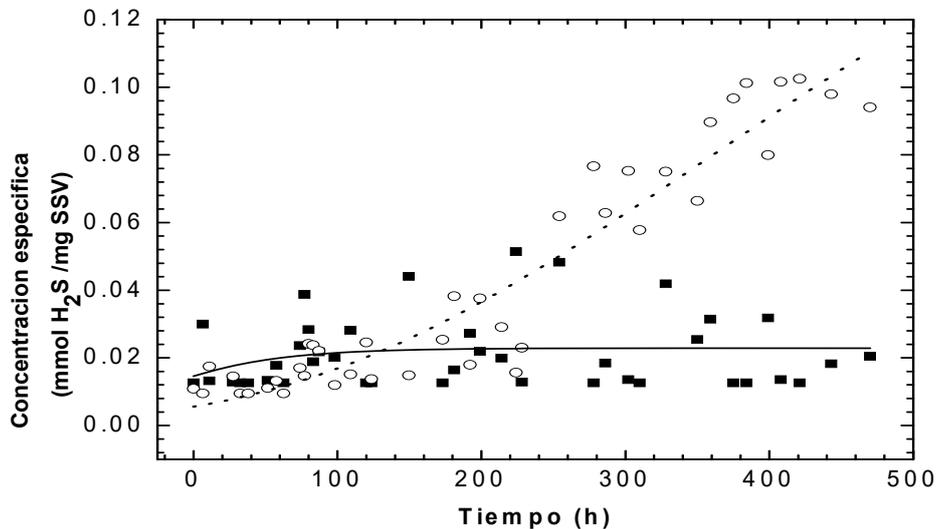


Figura 17. ARS específicas de JH (■) y M2 (○) con la celulosa tratada (CT). Ajuste Modelo Gompertz: JH (· · ·), M2 (·····).

6.4.2. ARS CST disgregada en agua.

En la figura 18, se observa la cinética de degradación de CST siguiendo la concentración acumulada de H₂S. Se realizó una disgregación de la celulosa en agua, esperando que este experimento no estuviese limitado por el área de reacción que podría ser otra variable a considerar en el análisis de resultados.

La concentración de H₂S en las botellas serológicas, alcanzó un valor de 10.9 mmol L⁻¹ para JH y para M2 fue de 8.8 mmol.

Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S con celulosa disgregada (CST).

| mg SSV L ⁻¹ | Consorcio | V _{max} (mmol H ₂ S/ g SSV*h) | $\hat{q}(H_2S)$ (mmol/mg SSV) | [H ₂ S] (mmol L ⁻¹) | Fase lag (h) | K (h ⁻¹) |
|------------------------|-----------|---|----------------------------------|---|-----------------|-------------------------|
| 35 | JH | 0.2 | 0.3001 | 10.5 | 127 | 0.0017 |
| 27.5 | M2 | 0.32 | 0.3195 | 8.8 | 95 | 0.0027 |

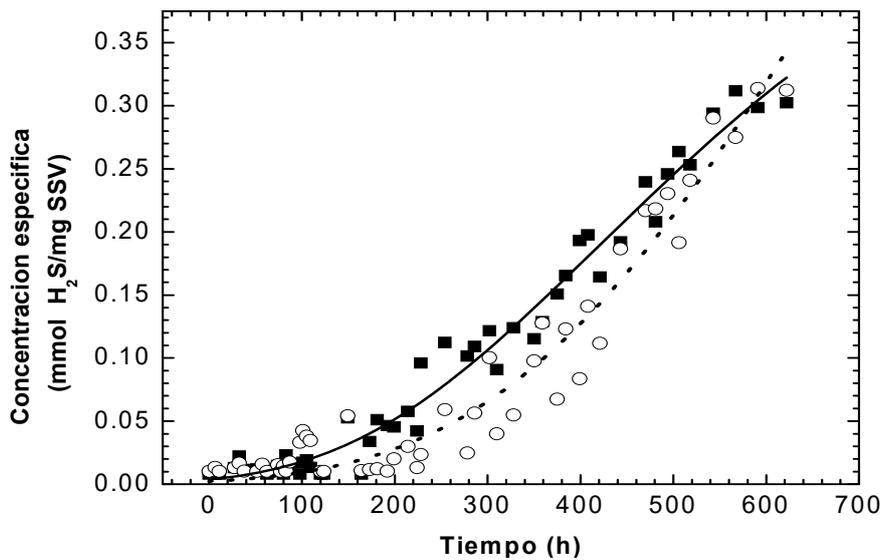


Figura 18. Cinética de H₂S empleando celulosa disgregada en agua con los consorcios JH (■) y M2 (○). Ajuste Modelo Gompertz: JH (· · ·), M2 (·····).

La concentración de H₂S alcanzada en este caso fue mayor en ambos consorcios que la alcanzada con el pretratamiento de explosión térmica. Con los valores de velocidad de producción de H₂S y la concentración de H₂S en ambos consorcios, la CST resultó ser de más fácil degradación ya que con la CT se disminuyó en ambos consorcios la producción de H₂S, el cual es el producto de interés en este caso, para poder lograr la remediación

biológica anaerobia. La disminución podría ser atribuida a una pérdida del material orgánico inicial soluble en la celulosa que está disponible al inicio para los consorcios microbianos, por lo que estos resultados sugirieron trabajar posteriormente con papel sin tratamiento térmico.

6.5. ARS y el control del E_H .

Una vez evidenciado, por la lectura del H_2S en solución, que las bacterias podían llevar a cabo la degradación de celulosa, se siguió el potencial redox de los sistemas como una función del tiempo durante la degradación de la celulosa sin tratar.

La degradación de la fuente de carbono depende del tipo de BSR presente en los sistemas biológicos, y la diversidad metabólica permite establecer diferencias en la evolución del potencial redox. La Figura 19 muestra la variación del E_H con respecto al tiempo para los dos consorcios de BSR y empleando CST como sustrato. De acuerdo a la literatura (Thauer *et al.*, 1989; Rittman, 2001), la actividad microbiana sulfatorreductora puede presentarse a potenciales de -220 mV. Sin embargo, los valores pueden fluctuar en función de la diversidad microbiana y de la cantidad total de especies oxidadas y reducidas en el medio. En este caso, se observa que el comportamiento del potencial redox para ambos consorcios es similar, alcanzando un estado cuasi-estacionario entre 0 y -100 mV entre las 200 y 900 horas, con un decaimiento posterior hasta -220 mV para tiempos mayores.

Se observan en todos los casos fluctuaciones, que pueden ser atribuidas a variaciones en las concentraciones de las especies oxidadas y reducidas por otros procesos como pueden ser la absorción temporal del H_2S por la biomasa de los consorcios o inclusive sobre el sustrato sólido como fue descrito anteriormente (Figura 16). Las variaciones de la concentración de sulfuro de hidrógeno, pueden explicar las fluctuaciones del potencial redox, provocadas por la presencia de otros agentes oxidantes presentes inicialmente o que fueron formados como intermediarios de la degradación de la celulosa (e.g. ácidos grasos volátiles) (Boltes *et al.*, 2008; Muyzer y Stams, 2008).

En la Figura 19 se observa que utilizando celulosa como donador de electrones, la disminución del E_H es más lenta debido a la complejidad del sustrato, lo cual era una hipótesis por demostrar para confirmar la finalidad de su uso que es el control de la

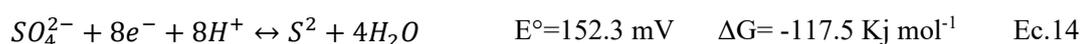
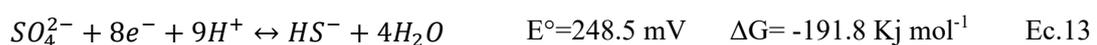
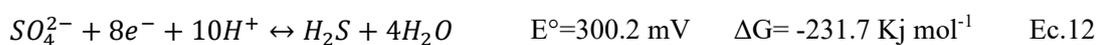
reducción del medio de manera gradual a fin de evitar la reducción del As hasta arsina. Ambos consorcios empiezan rápidamente a consumir la materia orgánica que se encuentra soluble en el medio líquido y comenzando la reducción del medio por la presencia de otro tipo de bacterias que utilizan el oxígeno como aceptor de electrones, las cuales se asume que pueden ser hidrolíticas o acidogénicas (Visser *et al.*, 1996).

La Figura 19 presenta la cinética variación del E_H en el consorcio JH y M2, con respecto a JH se puede ver que en un tiempo de 218 h alcanza un potencial negativo de -5.9 mV llegando a su potencial más bajo en esta cinética a las 1085 horas, con un valor de -199.2 mV. En contraste, el consorcio M2, alcanza un potencial negativo a las 312 h con un valor de -43.4 mV y su valor más bajo de potencial a las 1013 h con un valor de -214 mV, muy cercano al potencial redox reportado para aguas naturales cuando se emplea sulfatos como aceptor de electrones y se obtiene como producto sulfuro biogénico (Stum y Morgan, 1996).

Para comprobar que se estaba llevando a cabo la ARS de manera conjunta con el descenso del E_H , se siguió de manera simultánea la producción del H_2S (ver Apéndice 4).

Tanto JH como M2, presentan un estado cuasi estacionario a partir de las 200 a las 800 h, en un valor de potencial alrededor de -50 mV, lo cual hace suponer que interactúa otro aceptor de electrones que no es exclusivamente el sulfato, o bien que se trata del equilibrio de sulfatos con otra especie intermediaria dentro del ciclo del azufre, entre las que podrían mencionarse el tiosulfato o el azufre elemental.

Las reacciones de media celda (Bard *et al.*, 1985) que se presentan de la Ec.12 a la Ec.16, corresponden a las reacciones del sulfato y sus intermediarios:





En base a los resultados obtenidos de la evolución del E_H se puede concluir que ambas comunidades logran conseguir el ambiente anaerobio utilizando la celulosa como donador de electrones y propician un medio adecuado para desarrollar la actividad biológica de las BSR, pudiendo alcanzar de manera progresiva un potencial reducido suficiente para precipitar el As presente en solución.

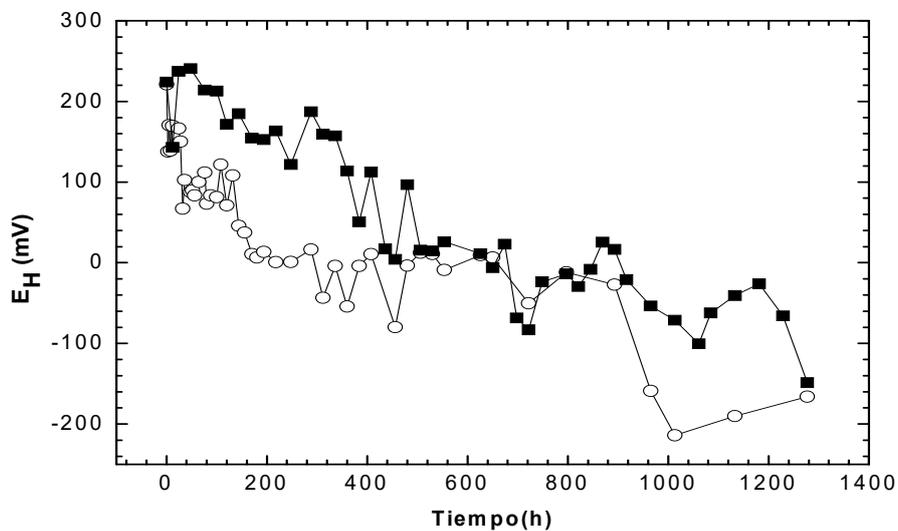


Figura 19. Cinética de Potencial de Óxido Reducción (E_H) con los consorcios JH (■) y M2 (○) en presencia de celulosa.

6.6. Perfiles de concentración de AGV como productos de biodegradación de la celulosa.

La biodegradación anaerobia de celulosa a AGV es un proceso que involucra muchas bacterias fermentadoras, incluyendo las BSR. Las BSR participan en la degradación de polímeros y monómeros que producen AGV (Greiben *et al.*, 2006).

Por lo tanto la dinámica de biodegradación de la celulosa involucra la generación de perfiles de AGV que se modifican conforme avanza las reacciones que van interviniendo (Tabla 1, Sección 4.3).

Los resultados de los análisis de AGV totales expresados como la ΣAGV_i , en mmol AGV_i/mg SSV, de los sistemas de degradación de celulosa se presentan en la Figura 20. Estos incluyen las determinaciones analíticas de: ácido acético, ácido butírico, ácido cítrico, ácido láctico y ácido pirúvico, generados por los consorcios microbianos JH y M2. La biomasa de cada inóculo, medida como SSV, empleada en estos experimentos fue de 5.2 mg L⁻¹ y 4.6 mg L⁻¹ respectivamente, los parámetros cinéticos obtenidos del modelo de Gompertz se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de ΣAGV_i con celulosa.

| mg SSV L ⁻¹ | Consortio | V_{max} (mmol AGV _i / g SSV*h) | $\hat{q}(\Sigma AGV_i)$ (mmol/mg SSV) | $[\Sigma AGV_i]$ (mmol L ⁻¹) | Fase lag (h) | K (h ⁻¹) |
|------------------------|-----------|---|--|---|--------------|-------------------------|
| 5.2 | JH | 12.8 | 4.5012 | 23.4 | 132.7 | 0.0077 |
| 4.6 | M2 | 31.22 | 6.1484 | 28.3 | 37.5 | 0.0138 |

Del análisis de la Tabla 7 se observa que es mayor la concentración de ΣAGV en el consorcio bacteriano M2, que tiene una velocidad máxima de producción de los mismos de 2.43 mmol AGV_i/g SSV*h mayor que JH, este a su vez tiene una fase lag 3.5 veces más larga que el consorcio M2.

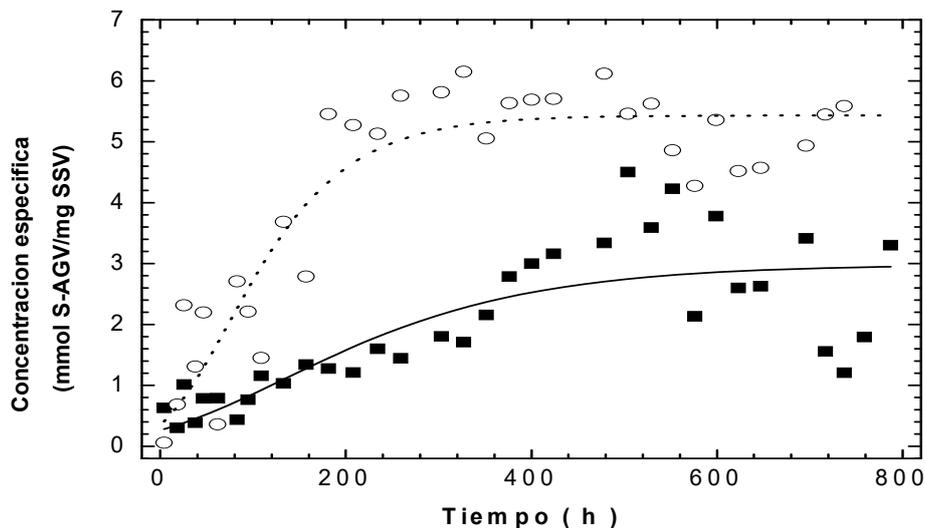


Figura 20. Perfil de concentración total de los ácidos grasos como producto de la degradación de la celulosa en los consorcios JH (■) y M2 (○). Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (· · · ·).

A continuación se analiza el comportamiento de ambos consorcios en la producción de cada uno de los cinco ácidos grasos volátiles cuantificados en el presente trabajo.

6.6.1. Cinética de producción de ácido cítrico.

El ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) no es un donador de electrones común para las BSR. Estudios realizados por industrias PAQUES han demostrado que la fermentación de citrato conlleva a la generación de acetato y formiato, los cuales si suelen ser utilizados como donadores de electrones para las BSR.

En la Figura 21, se puede observar que el ácido cítrico se encuentra soluble después de 24 horas de iniciado el experimento con el consorcio M2, no así con el JH. Lo anterior puede ser considerado como una evidencia de las diferencias metabólicas que existen en ambos consorcios. Este resultado sugiere que el número de bacterias hidrolíticas de celulosa es mayor en M2 que en JH. Dentro del análisis de los parámetros cinéticos que se muestra en la Tabla 8 se puede observar que la V_{max} para este compuesto en el consorcio JH puede considerarse despreciable en comparación con M2, lo cual hace suponer que el mecanismo de hidrólisis de la celulosa en JH es por una vía diferente a la generación de ácido cítrico como intermediario. También se observa una producción de cítrico de 4.1 mmol L^{-1} concentración 68 veces mayor en M2 que en el consorcio JH.

Tabla 8. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de ácido cítrico (A.C.) a partir de celulosa.

| mg SSV L^{-1} | Consorcio | V_{max} (mmol A.C./ g SSV*h) | \hat{q} (A. C.) (mmol/mg SSV) | [A. C.] (mmol L^{-1}) | Fase lag (h) | K (h^{-1}) |
|-----------------|-----------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------|
| 5.2 | JH | 0.044 | 0.12 | 0.6 | 469 | 0.0010 |
| 4.6 | M2 | 29.42 | 0.89 | 4.1 | 19.82 | 0.0899 |

En M2 existe una máxima acumulación de este compuesto a las 50 h igual a 0.89 mmol/mg SSV . Una vez acumulado, y después de aproximadamente 150 horas este compuesto cae dando lugar probablemente a la formación de otros AGV, que empiezan a aparecer después de este tiempo, sin embargo, se mantiene un remanente igual al 50% del máximo acumulado. De hecho, Khan y Trottier (1978) realizaron estudios donde adicionaban citrato

como amortiguador de pH y E_H y observaron que existía una acumulación de AGV la cual fue atribuida a la descomposición de este compuesto.

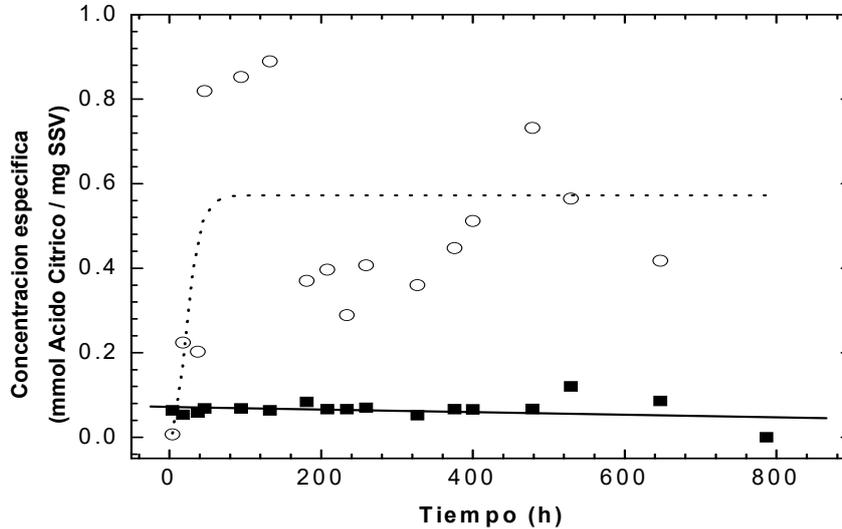


Figura 21. Cinética de producción de ácido cítrico generado por la hidrólisis de celulosa con los consorcios JH (■) y M2 (○), en condiciones sulfato reductoras. Ajuste Gompertz: JH (· · ·), M2 (·····).

6.6.2. Cinéticas de producción de ácido butírico.

Dentro de la hidrólisis de celulosa uno de los ácidos grasos volátiles formados es el ácido butírico ($C_4H_8O_2$). La fermentación del ácido butírico $C_4H_8O_2$ fue descubierta por Luis Pasteur en 1854, al convertirse glúcidos presentes en ácido butírico, por acción de las bacterias anaerobias *Clostridium butyricum*. El $C_4H_8O_2$ es un sustrato común utilizado por las BSR (Muyzer y Stams, 2008).

En la Tabla 9 se resumen los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste Gompertz realizado a la Figura 22, donde se puede observar que en la generación de $C_4H_8O_2$ el consorcio M2 resulta tener una velocidad de producción 8 veces mayor que JH, la máxima producción específica de H_2S es 0.35 mmol/mg SSV mayor en M2 que en JH al igual que en la concentración máxima alcanzada de A.B. en solución, M2 logra producir 2.5 mmol L^{-1} que JH.

Tabla 9. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de ácido butírico (A.B.) a partir de celulosa.

| mg SSV L ⁻¹ | Consortio | V _{max} (mmol A.B./ g SSV*h) | q̂(A.B.) (mmol/mg SSV) | [A.B.] (mmol L ⁻¹) | Fase lag (h) | K (h ⁻¹) |
|------------------------|-----------|--|---------------------------|-----------------------------------|--------------|-------------------------|
| 5.2 | JH | 1.950 | 0.4077 | 2.1 | 96.9 | 0.0130 |
| 4.6 | M2 | 15.24 | 1.1483 | 5.3 | 55.6 | 0.0361 |

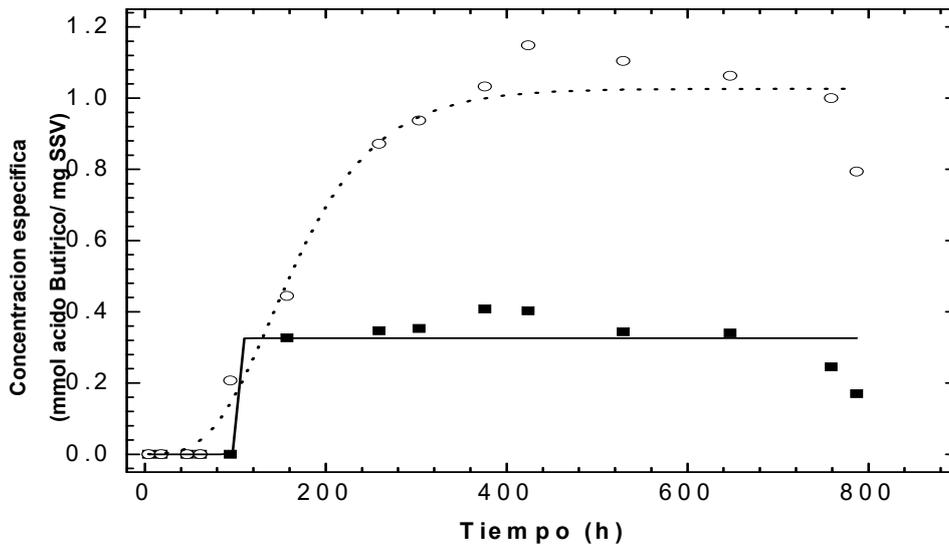


Figura 22. Cinética de producción de ácido butírico generado por la hidrólisis de celulosa con los consorcios JH (■) y M2 (○), en condiciones sulfato reductoras. Ajuste Modelo Gompertz: JH (—), M2 (····).

6.6.3. Cinética de producción de ácido láctico.

El ácido láctico (C₃H₆O₃) es uno de los AGV de más fácil degradación para las BSR. Especies como *Desulfovibrio* utilizan fuentes de carbono de bajo peso molecular tales como el etanol, ácido acético y el ácido láctico (White *et al.*, 1997).

En este estudio, a diferencia de lo observado con el consorcio M2, el consorcio microbiano JH presentó una mayor producción de láctico dentro de las primeras 50 y 100 horas. Lo anterior podría ser atribuido a que en este consorcio tiene mayor cantidad de microorganismos que producen a partir de la hidrólisis de celulosa ácido láctico, y este último es el sustrato de mayor afinidad para las BSR.

Tabla 10. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de ácido láctico (A.L.) a partir de celulosa.

| mg SSV L ⁻¹ | Consortio | V _{max} (mmol A.L./ g SSV*h) | \hat{q} (A.L.) (mmol/mg SSV) | [A.L.] (mmol L ⁻¹) | Fase lag (h) | K (h ⁻¹) |
|------------------------|-----------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------|-------------------------|
| 5.2 | JH | 152.81 | 0.9504 | 4.9 | 11.95 | 0.4369 |
| 4.6 | M2 | 27.26 | 0.5973 | 2.7 | 455.22 | 0.1240 |

De la misma forma la velocidad máxima de producción de este sustrato en solución es de 152.81 mmol A.L./g SSV *h 5.6 veces más rápida que la V_{max} en M2, como se observa en la Tabla 10 que resume los parámetros cinéticos para este sustrato. Con el consorcio M2 se presentan dos etapas de producción de lactato, como se observa en la Figura 23, la primera se observa lineal y la segunda con tendencia exponencial se presentó después de su fase de aclimatación a partir de 455 h.

En el caso del consorcio JH, también es posible observar dos etapas de producción de ácido láctico, la primera se observa desde los primeros tiempos de muestreo 12 h alcanzando un estado pseudo estacionario a las 100 h, y posteriormente un estado cíclico de producción y consumo, con una tendencia de decaimiento exponencial después de 350 h, alcanzando un mínimo a las 800 h.

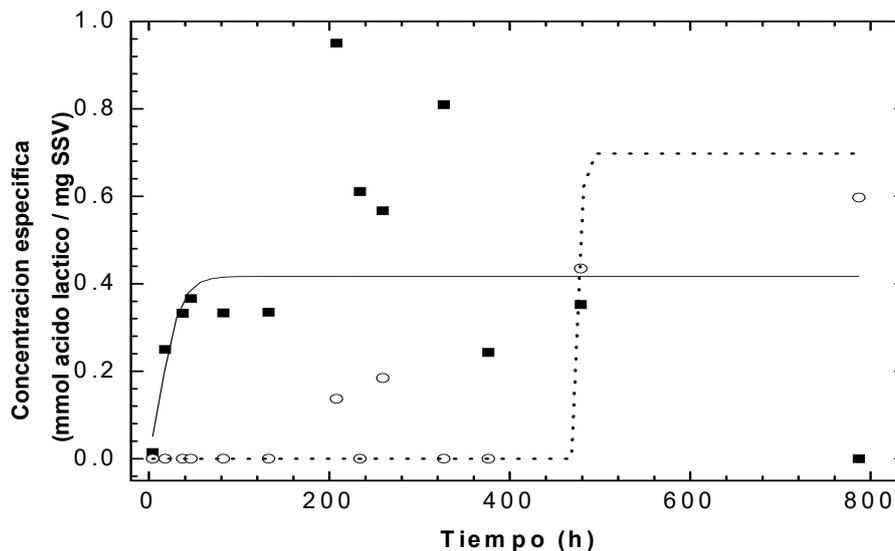


Figura 23. Cinética de producción de ácido láctico generado por la hidrólisis de celulosa con los consorcios JH (■) y M2 (○), en condiciones sulfato reductoras. Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (· · · ·).

6.6.4 Cinética de producción de ácido acético

La acumulación de ácido acético en los sistemas en lote anaeróbicos es consecuencia de mecanismos de oxidación incompleta de la materia orgánica. La celulosa es hidrolizada y fermentada hasta ácido acético por comunidades anaeróbicas (Boltes *et al.* 2008; Muyzer y Stams, 2008).

Las fibras de celulosa están formadas por cadenas lineales de 100 a 1400 unidades de glucosa unidas por enlaces B-1-4 glucosídicos. Las fibras están embebidas en una matriz de hemicelulosas, pectina o lignina. La hemicelulosa consiste principalmente de xilanos o glucomanosas, las cuales son cadenas laterales de unidades acetilos, glucoronilos o arabinofuranosilos. Para hacer que las fibras de celulosa queden accesibles a los microorganismos, la matriz de hemicelulosa, pectina o lignina debe ser degradada microbiológicamente o solubilizada químicamente. En la ecuación 17, se puede observar que la glucosa (C₆H₁₂O₆), monómero de la celulosa, es convertida por bacterias acetogénicas a 3 moles de acetato (C₂H₄O₂) por mol de glucosa (Gottschalk, 1986):

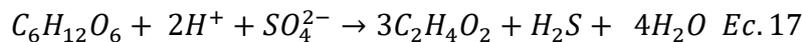


Tabla 11. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de ácido acético (A.A.) a partir de celulosa.

| mg SSV L ⁻¹ | Consorcio | V _{max} (mmol A.A./ g SSV*h) | q̂(A.A.) (mmol/mg SSV) | [A.A.] (mmol L ⁻¹) | Fase lag (h) | K (h ⁻¹) |
|------------------------|-----------|---|---------------------------|-----------------------------------|-----------------|-------------------------|
| 5.2 | JH | 21.99 | 3.92 | 20.4 | 234 | 0.0153 |
| 4.6 | M2 | 38.13 | 4.14 | 19.1 | 94.5 | 0.0250 |

Como lo muestra la Tabla 11, la velocidad máxima de producción específica de ácido acético para el consorcio microbiano JH fue de 21.99 mmol A.A. /g SSV*h siendo la del consorcio M2 mayor en 1.73 mmol A.A. /g SSV*h. En la Figura 24 se puede observar que existe una mayor acumulación de A.A. en M2, lo cual nos hace presuponer que se cuenta con un consorcio que cuenta mayormente con BSR oxidantes incompletas ya que están son las que generan acetato como producto de su degradación.

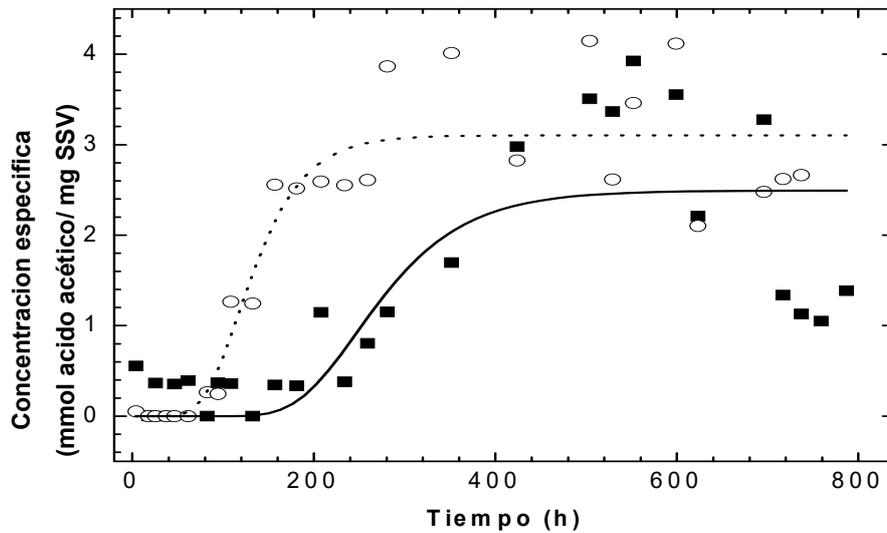


Figura 24. Cinética de producción de ácido acético generado por la hidrólisis de celulosa con los consorcios JH (■) y M2 (○), en condiciones sulfato reductoras. Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (····).

6.6.5. Cinética de producción de ácido pirúvico.

Al parecer el producto inicial de la hidrólisis de la celulosa efectuado por el consorcio M2 conlleva a la formación de ácido pirúvico ($C_3H_4O_3$). Sin embargo, este compuesto de cadena corta no es una fuente de carbono que haya sido reportada frecuentemente como sustrato para comunidades de BSR.

El comportamiento de su concentración en las cinéticas de celulosa con los consorcios sulfatorreductores JH y M2 se muestra en la Figura 25. Al igual, de lo que se observó con los perfiles de los AGV anteriores, el pirúvico, presenta diferencias muy marcadas en ambos consorcios.

En la Tabla 12 se observa que JH tiene una V_{max} 48.8 veces menor que la de M2 y en cuanto a la concentración máxima alcanzada de este ácido, se tiene una concentración de 6.8 mmol L^{-1} para M2, cantidad 2.6 veces más grande que la que se consigue con el consorcio JH, quien presenta una fase de aclimatación de 534 h más que el consorcio M2.

Tabla 12. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de ácido acético (A.P.) a partir de celulosa.

| mg SSV L ⁻¹ | Consortio | V _{max} (mmol A.P./ g SSV*h) | \hat{q} (A.P.) (mmol/mg SSV) | [A.P.] (mmol L ⁻¹) | Fase lag (h) | K (h ⁻¹) |
|------------------------|-----------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------|-------------------------|
| 5.2 | JH | 14.15 | 0.5085 | 2.6 | 534 | 0.0756 |
| 4.6 | M2 | 691.60 | 1.4764 | 6.8 | 17.77 | 1.2729 |

Con respecto al consorcio M2, se puede ver en la Figura 25, la acumulación de ácido pirúvico que se presenta desde los primeros tiempos de muestreo (18 horas) contrario a lo que se observa con JH donde la acumulación de este compuesto es observable sólo después de las 500 horas.

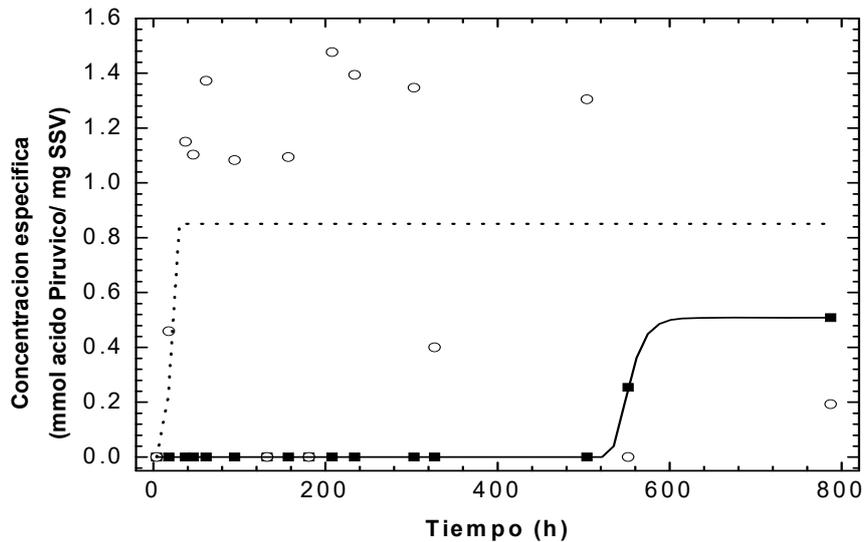


Figura 25. Cinética de producción de ácido pirúvico generado por la hidrólisis de celulosa con los consorcios JH (■) y M2 (○), en condiciones sulfato reductoras. Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (····).

Además, se observa una fluctuación de producción y consumo de ácido pirúvico en la cinética de M2, similar a la observada durante la acumulación de ácido cítrico con este mismo consorcio, sin embargo, para tiempos largos (> 500 h) la presencia de ácido pirúvico llega a ser despreciable.

De los cinco ácidos grasos cuantificados en ambos consorcios, se puede observar que JH solo presentó una mayor producción de ácido láctico con respecto a M2, es por eso que al

hacer la sumatoria de los cinco, como se mostró en la Figura 20, M2 presenta una mayor producción de AGV y de igual manera una mayor concentración de los mismos.

En los perfiles de ácidos grasos determinados durante la hidrólisis de celulosa con los dos consorcios evaluados en este estudio, se puede concluir que presentan una diversidad de microorganismos que se manifiesta observando que el comportamiento en la producción de cada AGV, es diferente.

Aunque en ambos consorcios deben de existir ASR, la diversidad de sus microorganismos es diversa entre sí, siendo una evidencia los intermediarios de AGV detectados para cada uno de los consorcios. De manera paralela al seguimiento de la producción de AGV, se hizo el seguimiento de la acumulación de H₂S biogénico (como trazador de la ASR) en las mismas botellas (ver apéndice A.7), así como la determinación de la concentración de DQO soluble que a continuación se describe.

6.6.6. DQO generada en los consorcios JH y M2 por la degradación de celulosa.

La Figura 26 muestra el comportamiento de la DQO cuantificada sin aplicar el ajuste por la contribución del sulfuro de hidrógeno en el valor de DQO en ambos consorcios. La velocidad de generación de materia orgánica soluble en el sistema medido como DQO presentó una velocidad máxima de 23.82 mmol DQO/ g SSV para el consorcio JH, y para el consorcio M2 es de 34.82 mmol DQO/ g SSV. La DQO soluble cuantificada en las cinéticas se aseguró filtrando las muestras a 0.2 μm para evitar interferencias por la biomasa o por fibras de celulosa.

Tabla 13. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de DQO soluble a partir de celulosa.

| mg SSV L ⁻¹ | Consorcio | V _{max} (mmol DQO/ g SSV*h) | q̂(DQO) (mmol/mg SSV) | [DQO] (mmol L ⁻¹) | Fase lag (h) | K (h ⁻¹) |
|------------------------|-----------|--|--------------------------|----------------------------------|-----------------|-------------------------|
| 5.2 | JH | 23.824 | 24.90 | 129.5 | 35.65 | 0.0026 |
| 4.6 | M2 | 34.82 | 33.91 | 156.0 | 25.5 | 0.0028 |

La alícuota tomada para la cuantificación de DQO fue de 1 ml, cantidad que complicaba la aplicación de un pretratamiento de eliminación del H₂S en solución. Por lo anterior se optó

por establecer la reacción de oxidación del H₂S en presencia de dicromato (Cr₂O₇²⁻). En base a la Ec.18, se obtuvo que por cada 3 moles de H₂S se consumían 4 moles de Cr₂O₇²⁻, con esta relación estequiométrica se determinó la concentración de DQO soluble en el medio, restando la cantidad de Cr₂O₇²⁻ consumida por la presencia de sulfuro de hidrógeno en cada punto (ver Anexo 7).

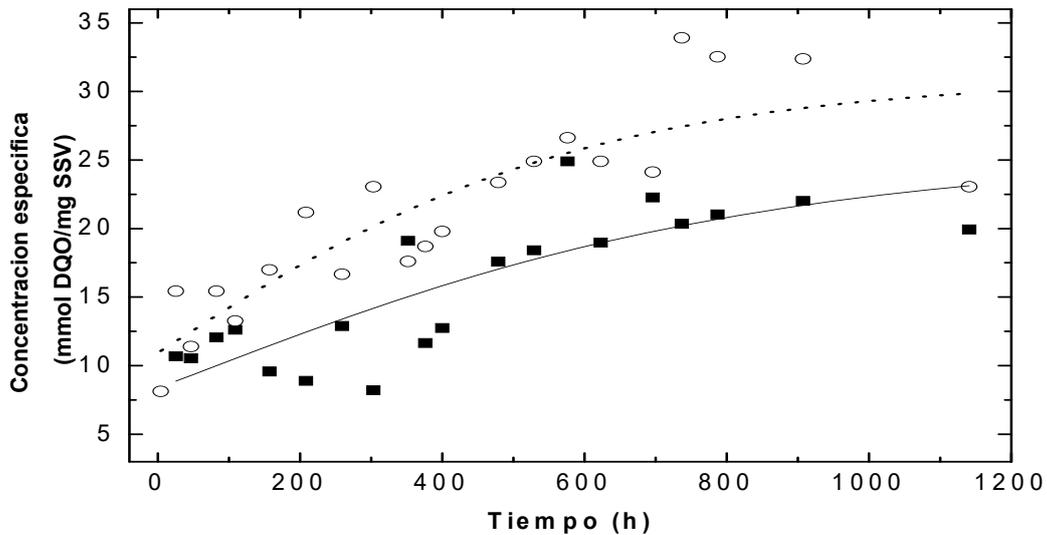
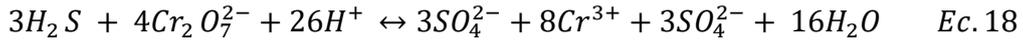


Figura 26. Concentración específica de DQO para JH (■) y M2 (○) sin ajuste por sulfuro. Ajuste Modelo Gompertz: JH (· · ·), M2 (·····).

En la Figura 27 se representa el comportamiento de la DQO final (DQO_F) para las dos comunidades, donde se observa que el consorcio M2 presenta una mayor concentración en mmol DQO/mg SSV, lo que nos confirma que es mayor la degradación de la celulosa en esta comunidad, originada por su diversidad microbiana.

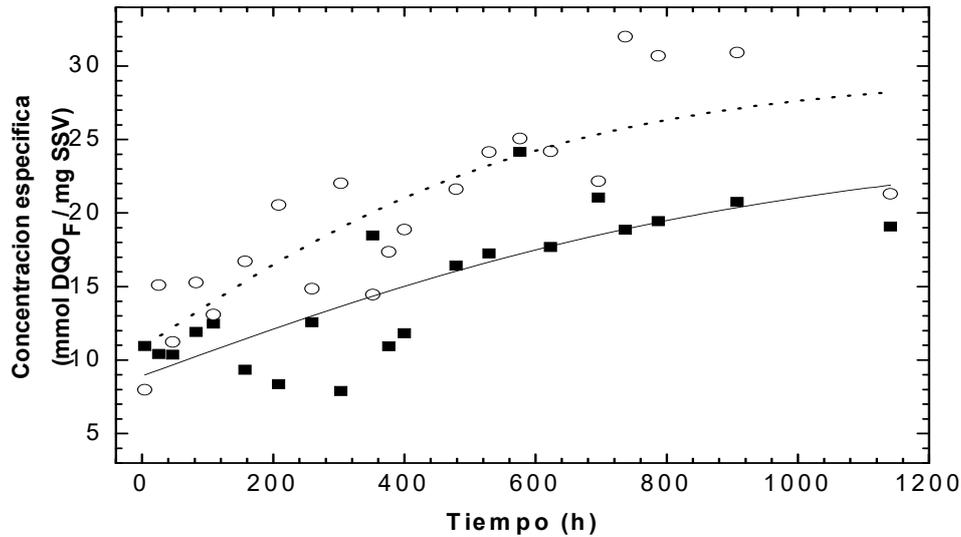


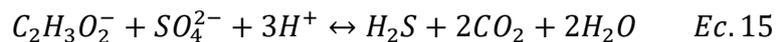
Figura 27. Comportamiento de la DQO final (DQOF) para las dos comunidades JH (■) y M2 (○). Ajuste Modelo Gompertz: JH (· · ·), M2 (·····).

6.7. Análisis de la producción de H₂S con acetato como fuente de carbono.

Como se ha mencionado, existen bacterias que oxidan la materia orgánica completamente hasta CO₂ así como bacterias que llevan la materia orgánica a acetato.

Con la finalidad de tener un parámetro que permitiera identificar el tipo de oxidación de la materia orgánica que realizaban los consorcios de estudio JH y M2, se realizó una cinética utilizando el ácido acético como única fuente de carbono, 4000 h.

Como se observa en la Figura 28, ambos consorcios presentaron una fase lag bastante prolongada, el consorcio M2 duró 2011 h antes de iniciar su fase exponencial y alcanzar 0.5 mmol de H₂S/mg SSV, en comparación con JH que presentó una fase lag de 2624 h y logró alcanzar un valor máximo de concentración de 0.1 mmol de H₂S / mg SSV. En la ecuación 15 se puede observar que la relación H₂S con C₂H₃O₂⁻, es 1:1.



Lo cual nos permite decir, que por cada mol que se produzca de H₂S podremos tener un mol de A.A. en solución. Tomando en cuenta la Tabla 14 donde se resumen los parámetros cinéticos se puede confirmar la presencia de bacterias de degradación completa en ambos

consorcios ya que en ambos consorcios se logra la producción de H₂S a partir del acetato como única fuente de carbono, y son las BSR de oxidación completa las que pueden utilizar acetato como sustrato. Se observa que el consorcio M2 presenta bacterias con mejores cualidades para degradar el acetato, ya que este consorcio manifiesta una mayor V_{max} con un valor de 4.50 mmol H₂S/ g SSV*h y una concentración máxima alcanzada de 8 mmol H₂S L⁻¹, con una fase lag de 80.5 días, siendo que JH tiene una fase lag de 109.35 días con menor concentración de H₂S alcanzada.

Tabla 14. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S soluble a partir de ácido acético.

| mg SSV L ⁻¹ | Consorcio | V _{max} (mmol H ₂ S/ g SSV*h) | $\hat{q}(\text{H}_2\text{S})$ (mmol/mg SSV) | [H ₂ S] (mmol L ⁻¹) | Fase lag (h) | K (h ⁻¹) |
|------------------------|-----------|--|--|---|--------------|-------------------------|
| 10.7 | JH | 0.756 | 0.14 | 1.5 | 2624.6 | 0.0145 |
| 17.5 | M2 | 4.50 | 0.46 | 8.0 | 1933.9 | 0.0268 |

La acetogénesis es la segunda fase de la degradación de la materia orgánica compleja, en donde se encuentran las bacterias acetogénicas, transformando las nuevas moléculas para producir ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono (Bohinski, 1991). JH ha demostrado tener un consorcio mayormente sulfatorreductor, en la Figura 28, se puede ver que solo hasta los 125 días logra incrementar su producción de H₂S y solo en un 50% de su concentración inicial.

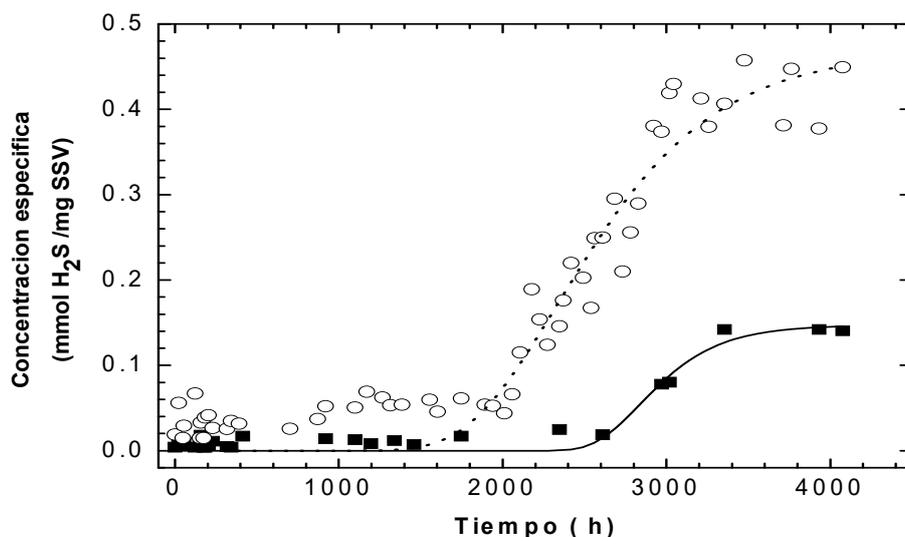


Figura 28. Producción de H₂S en presencia de ácido acético como única fuente de carbono. JH – Act (■), M2 – Act (○). Ajuste Modelo Gompertz: JH (· ·), M2 (····).

6.8. Determinación de la capacidad de fermentación e hidrólisis de JH y M2.

Considerando que en los experimentos anteriores, ambos consorcios manifiestan que se tiene una diversidad de bacterias dentro de cada uno de los consorcios de este trabajo de tesis, se realizó un último experimento que permitió tener un parámetro más de comparación entre ambos considerando las etapas de hidrólisis (con celulosa) y fermentación (con glucosa) ambos son sustratos de difícil degradación para las BSR, quienes necesitan, como ya se mencionó, de otro tipo de microorganismos que simplifiquen la disponibilidad de su sustrato orgánico en solución. Esto se llevó a cabo siguiendo los mililitros de líquido desplazado en función a la producción de gas en las botellas serológicas (H₂S o CO₂).

En la Figura 29 se tiene al consorcio JH en ambas etapas de degradación, actuando en presencia de SO₄²⁻, estos experimentos se siguieron de manera simultánea, con respecto a la glucosa por 800 h y con respecto a la celulosa por 1000 h. En la etapa de hidrólisis se obtuvo un desplazamiento de solución salina de 11.4 ml y en la etapa de fermentación se obtuvo un desplazamiento total de 3.3 ml.

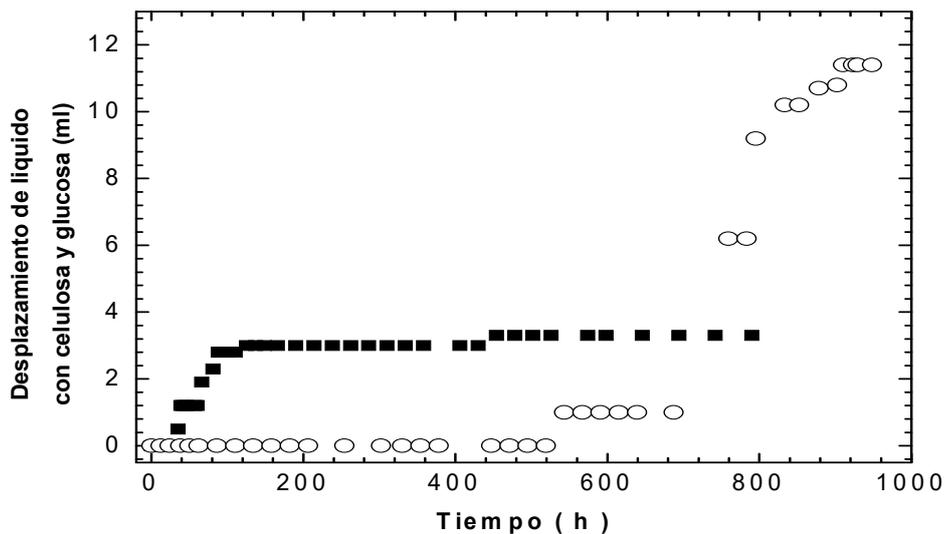
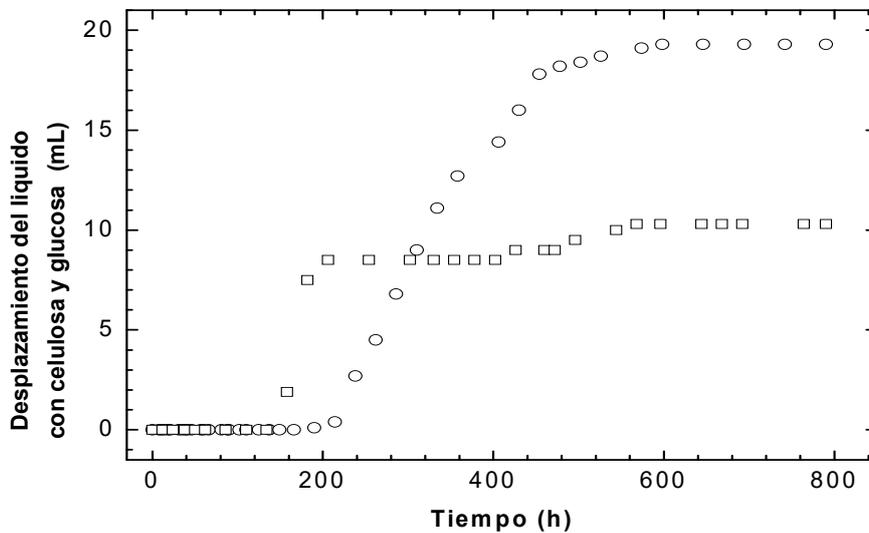


Figura 29. Desplazamiento de líquido empleando el consorcio JH con: glucosa y SO_4^{2-} (JH-Glu) (■); celulosa y SO_4^{2-} (JH-Cel) (o).

En la Figura 30, se puede observar el comportamiento del consorcio M2 bajo las mismas condiciones, obteniéndose un desplazamiento total de 19.3 ml con respecto a la celulosa y de 10.3 ml con la glucosa, lo cual indica una mayor producción de gas en las botellas serológicas de este consorcio. Comprobándose la existencia de una mayor diversidad de bacterias, así como un mayor número de bacterias hidrolíticas y fermentativas que ayudan a las BSR digerir a la celulosa en el consorcio M2.



Se puede observar el mismo comportamiento con la glucosa, como lo muestra la Figura 32. Considerando al CO₂ como un gas ideal, y a la glucosa como fuente de carbono para la fermentación, se estableció la Ec. 16, donde se puede observar que por cada mol de glucosa se obtienen 6 moles de CO₂, tomando en cuenta condiciones normales de presión y temperatura, se tendría que desplazar 29.32 ml de la solución salina.

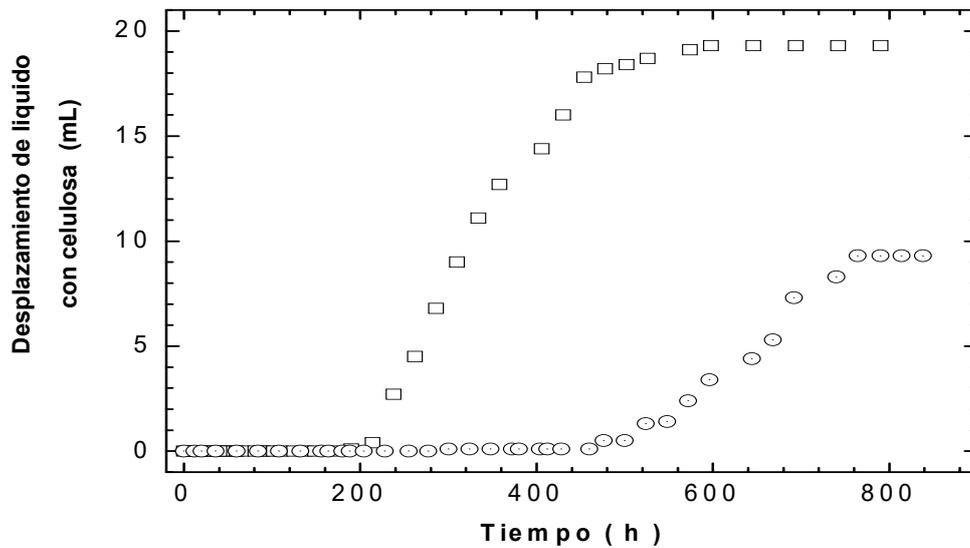


Figura 31. Desplazamiento del líquido empleando el consorcio M2 con: celulosa con SO₄²⁻ (□); celulosa y sin SO₄²⁻ (○).

Sin embargo, solamente se obtuvieron desplazamientos máximos de 10.3 ml para la glucosa con SO₄²⁻ y 6.6 ml para la glucosa sin SO₄²⁻ que equivalen a un déficit de ~ 65% y ~77.5%, del teórico esperado, respectivamente.



Por otro lado, con respecto a las diferencias observadas en el desplazamiento del líquido, con y sin sulfatos, empleando celulosa o glucosa (Figuras 30 y 31), éstas podrían explicarse por dos situaciones: la presencia de otro gas diferente al CO₂ como es el caso del H₂S o la inhibición en el consumo del sustrato orgánico por déficit de aceptor de electrones. La presencia de otro gas, como sería el H₂S, no pudo ser verificado por análisis químico. Por lo anterior, dado que estos resultados no son contundentes, se sugiere que en experimentos

futuros se pueda discernir las diferencias observadas, ya sea por eliminación previa del H₂S (mediante reacciones de precipitación) o por análisis químico de la corriente gaseosa.

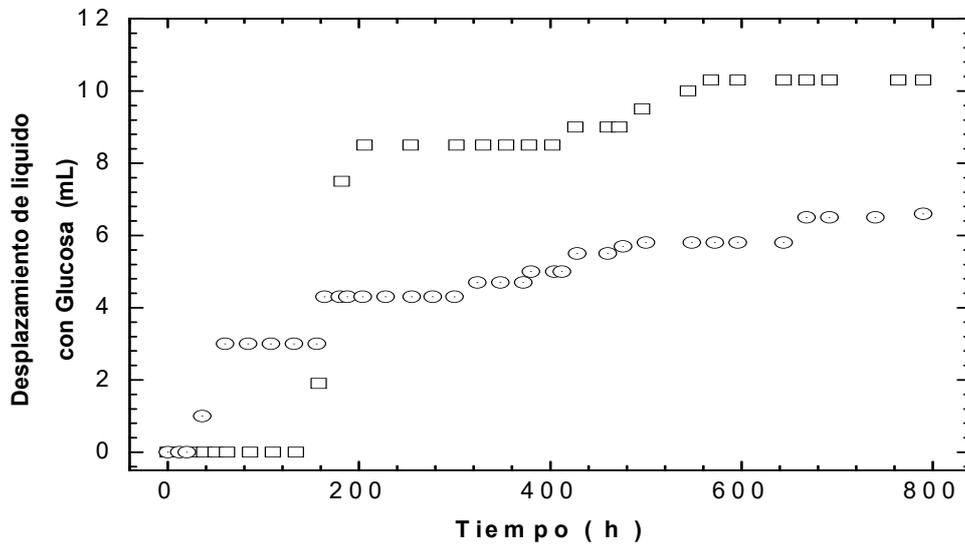


Figura 32. Desplazamiento del líquido empleando el consorcio M2 con: glucosa y SO_4^{2-} (□); glucosa y sin SO_4^{2-} (○).

6.9. ARS con CC como fuente de carbono.

El utilizar CC se llevó a cabo para tener una evidencia de la factibilidad de su uso como sustrato en ambos consorcios, este experimento se pudo realizar con una cantidad de biomasa de 234 mg L⁻¹ para ambos consorcios.

La ASR para cada consorcio se muestra en la Figura 33, donde se puede observar que el consorcio JH tuvo una actividad que duró 600 h antes de decaer, con una concentración de H₂S de 4.3 mmol L⁻¹, a diferencia del consorcio M2 con una cinética de producción de H₂S con celulosa cristalina de 1300 h y una concentración de sulfuro 3 veces mayor 13.3 mmol L⁻¹, manifestando nuevamente su diversidad microbológica, la cual le permite solubilizar el complejo sustrato, como lo es la celulosa, y tener carbono soluble para que las BSR lleven a cabo su digestión. Los parámetros cinéticos para este experimento se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S soluble a partir de CC como sustrato.

| mg SSV L ⁻¹ | Consortio | V _{max} (mmol H ₂ S/ g SSV*h) | $\hat{q}(\text{H}_2\text{S})$ (mmol/mg SSV) | [H ₂ S] (mmol L ⁻¹) | Fase lag (h) | K (h ⁻¹) |
|------------------------|-----------|--|--|---|--------------|-------------------------|
| 234 | JH | 0.612 | 0.02 | 4.3 | 6.5 | 0.0914 |
| 234 | M2 | 0.04 | 0.06 | 13.3 | 520.7 | 0.0020 |

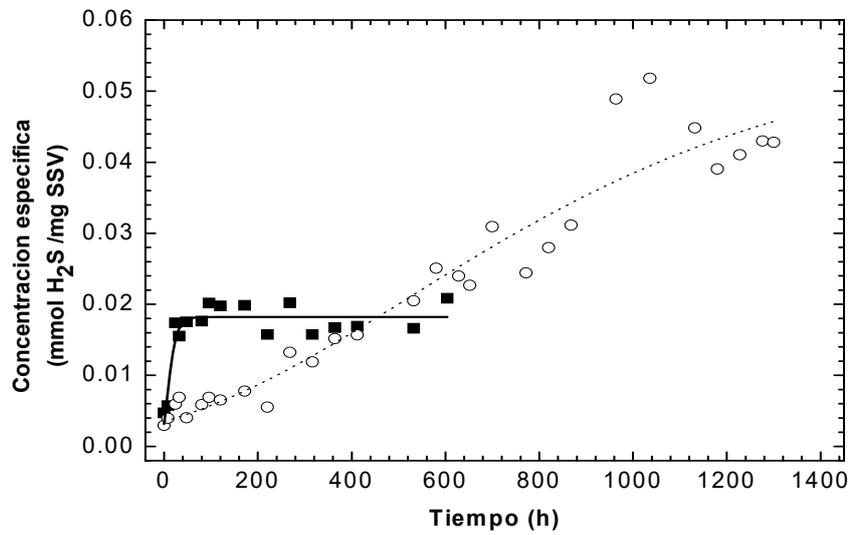


Figura 33. ARS con CC como fuente de carbono: JH CC (■), M2 CC (○)

7.-RESULTADOS SOBRE LA REMOCION DE ARSENICO EN AGUA.

7.1. Caracterización del caso de estudio.

Las concentraciones registradas en el muestreo realizado en CB se muestran en la Tabla 16, el As se encontró en un orden de magnitud de doscientas veces mayor que el límite máximo permisible de 0.025 mg L^{-1} de As y el SO_4^{2-} en un rango cuatro veces mayor a los 400 mg L^{-1} de los límites máximos permisibles que marca la NOM-127-SSA1-1994, para cada contaminante.

Tabla 16. Concentraciones de As y SO_4^{2-} en mg L^{-1} de CB.

| MUESTRA | As (mg L^{-1}) | SO_4^{2-} (mg L^{-1}) |
|---------|---------------------------|---|
| CB | 5.5 ± 0.08 | 1720 ± 80 |

En la Tabla 17 se tienen los resultados obtenidos con la etapa sin reducción del generador de hidruros, concentración correspondiente a la concentración de As^{3+} y la etapa de As sin reducción correspondiente al As^{5+} .

Tabla 17. Concentraciones de As total y arsenito en Cerrito Blanco.

| MUESTRA | As Total (mg L^{-1}) | Arsenito (mg L^{-1}) |
|---------|---------------------------------|---------------------------------|
| CB 1 | 7.4 ± 1.41 | 5.15 (69.59%) |
| CB 2 | 5.25 ± 1.06 | 1.5 (28.57%) |

También se cuantificaron en estos puntos las concentraciones de Cd, Cu, Pb, Zn, Fe. Las concentraciones se presentan en la Tabla 18 en mg L^{-1} .

Tabla 18. Concentraciones de As, Cd, Cu, Pb, Zn y Fe en Cerrito Blanco.

| Muestra | As | Cd | Cu | Pb | Zn | Fe |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CB | 5.5 | n.d. | n.d. | n.d | 0.12 | 0.6 |
| Todas las concentraciones en mg L ⁻¹ . n.d. concentración por debajo del límite de detección. | | | | | | |

7.2. Concentración de arsénico y sulfatos en el agua de estudio.

El agua de CB utilizada para probar la remediación *ex situ* con BSR utilizando CC como, se muestreó nuevamente al cabo de 6 meses para realizar el experimento con el agua del centro recreativo, presentó una concentración de 8 ppm de As y con respecto al otro contaminante, la concentración inicial de SO₄²⁻ del agua de CB antes de iniciar la precipitación de As fue de 1786.33 mg L⁻¹.

7.3. Caracterización inicial y final del agua de CB y sustrato orgánico.

De acuerdo a lo analizado en el capítulo 6, se decidió trabajar con el consorcio bacteriano M2 por demostrar ser una comunidad más diversa de microorganismos. Para llevar a cabo el último experimento del presente trabajo donde se precipitó el As presente en solución, se realizó una última caracterización del agua de CB, determinando los SSV y SST, como medida de su aportación de materia orgánica al experimento, obteniéndose lo siguiente: 16.76 ± 0.25mg L⁻¹ SSV y 4.61± 0.019 mg L⁻¹ de SSF, de igual manera se cuantificó la DQO con un valor de 77.5 ± 0.00063 mg L⁻¹. El agua registró un E_H = 202.8 mV referido al ENH con un pH igual a 8.

Para la celulosa cristalina, fuente de carbono para la estabilización de As, se reportó un valor de 0.9414 ± 0.033 mg L⁻¹ de SSV con un valor de 0.0002 ± 0.033 mg L⁻¹ de SSF. Lo anterior, sirvió para tener un parámetro de partida de la cantidad de materia orgánica presente en nuestro sistema, con un valor de inicial de DQO de 1325.06 ± 31.5 mg L⁻¹.

7.4. ARS y estabilización de As en H₂O de CB con M2.

En la Figura 34, se presenta el comportamiento de la concentración de H₂S, utilizando el agua de CB como medio mineral nutritivo y portador de SO₄²⁻, y la CC como fuente de materia orgánica, el H₂S fue el único parámetro monitoreado durante los 40 días de duración del estudio, para evitar ocasionar alteraciones en el sistema.

En la Tabla 19 se resumen los parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S. Obteniéndose una velocidad máxima de producción de sulfuro de 0.16 mmol de H₂S / g SSV*h, con una concentración máxima del mismo igual a 10.2 mmol L⁻¹. Esta cinética se realizó por triplicado, permitiendo observar las 4 etapas del crecimiento bacteriano claramente: la fase lag las primeras 200 h. La fase exponencial de las 200 a las 400 h. De las 400 h a las 800 h, la fase estacionario y por último el inicio de la fase de decaimiento o lisis celular a partir de las 800 h.

Tabla 19. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de H₂S soluble para la precipitación de As en el agua de CB.

| mg SSV L ⁻¹ | Consortio | V _{max} (mmol H ₂ S/ g SSV*h) | $\hat{q}(\text{H}_2\text{S})$ (mmol/mg SSV) | [H ₂ S] (mmol L ⁻¹) | Fase lag (h) | K (h ⁻¹) |
|------------------------|-----------|---|--|--|-----------------|-------------------------|
| 233 | M2 | 0.16 | 0.044 | 10.2 | 246.49 | 0.0096 |

Una vez obtenida la cinética, se procedió a medir el E_H final, registrando un valor de -125 mV con respecto al ENH, con un pH igual a 5.8, el cual fue reducido a un pH de 2 con HNO₃, para asegurar la permanencia del As en solución y realizar la lectura posterior de concentración final por EAA.

Se tomó una alícuota de 1 mL para realizar la lectura final de la concentración de sulfatos y DQO respectivamente.

La concentración final de SO₄²⁻ fue de 1142.7 mg L⁻¹ obteniendo una remoción del 36%. La concentración inicial de DQO en la solución nutritiva fue de 1460.56 ± 0.013 mg L⁻¹ sin tomar en cuenta la biomasa, al finalizar en la solución se obtuvo un valor de 945.80 ± 56.07 mg L⁻¹, lo cual indica una remoción de DQO de 35.2%.

La lectura del As en solución, se cuantificó con el EAA acoplado con el generador de hidruros, con una concentración 4.9 ppb (partes por billón). La cantidad de biomasa utilizada fue de 233 mg L⁻¹ de SSV del consorcio M2, quien consiguió realizar una remoción de 99.93 % de la concentración inicial de 8 ppm de As.

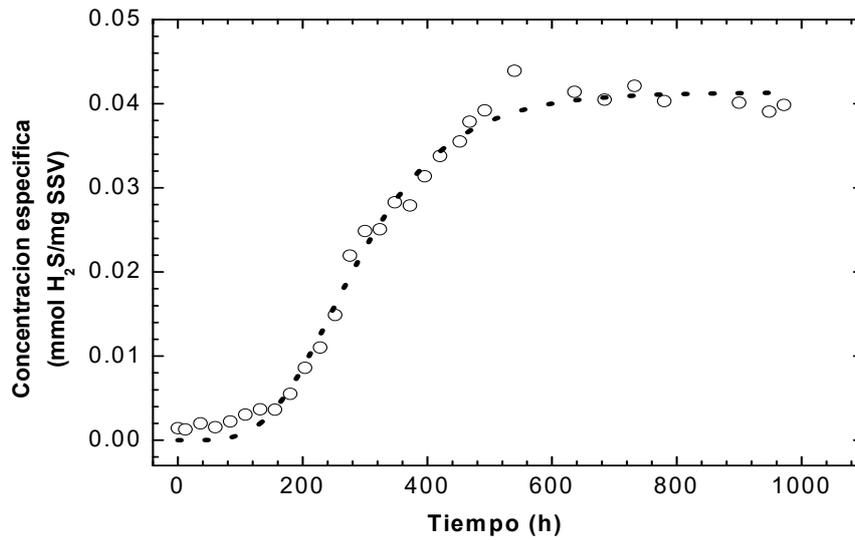


Figura 34. ARS con consorcio M2, en agua de CB con As, CC como fuente de carbono (As-M2 (•)) Ajuste Modelo Gompertz (·····).

7.5. Confirmación del precipitado final de As por EDS-MEB.

La confirmación de la presencia de As en el precipitado formado por el consorcio M2, al igual que las fases en las que se encontró, se confirmaron por los análisis hechos con EDS-MEB.

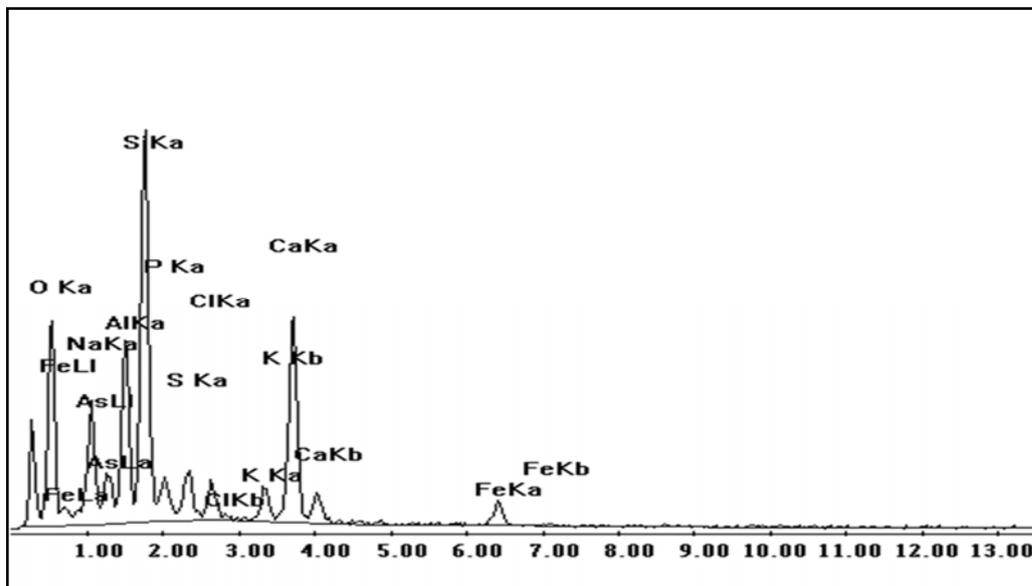
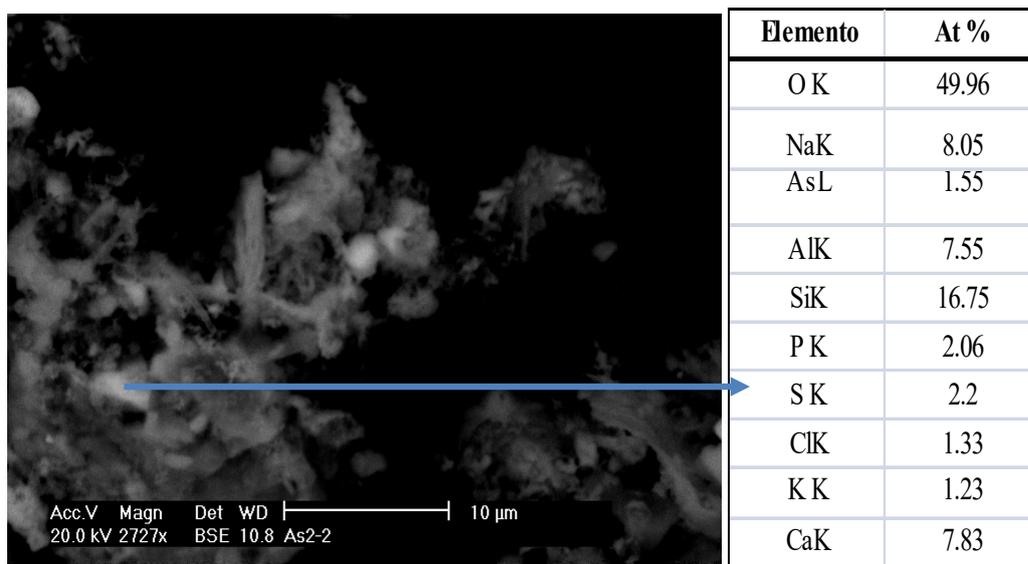


Figura 35. Fotomicrografía del precipitado As-M2a

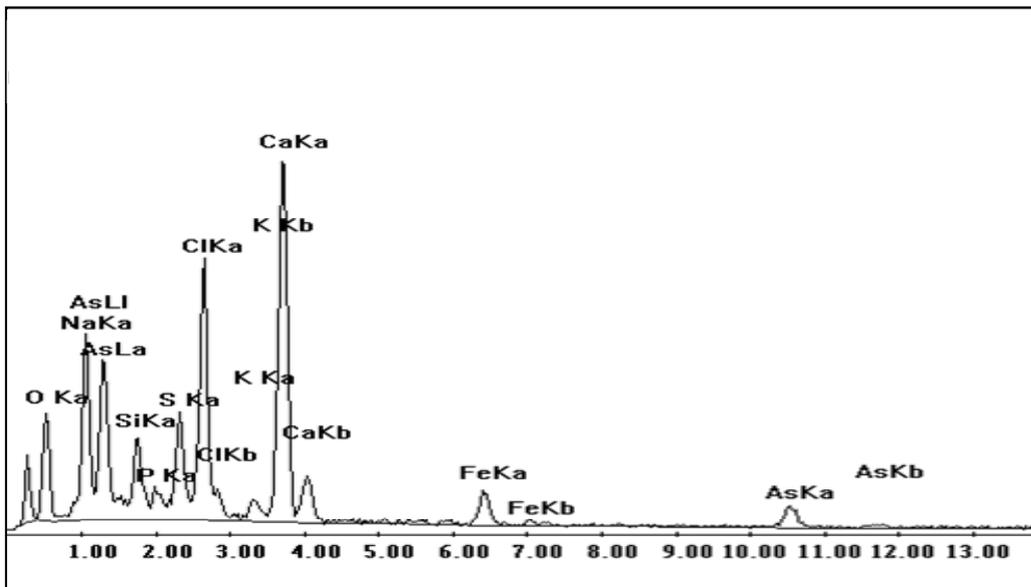
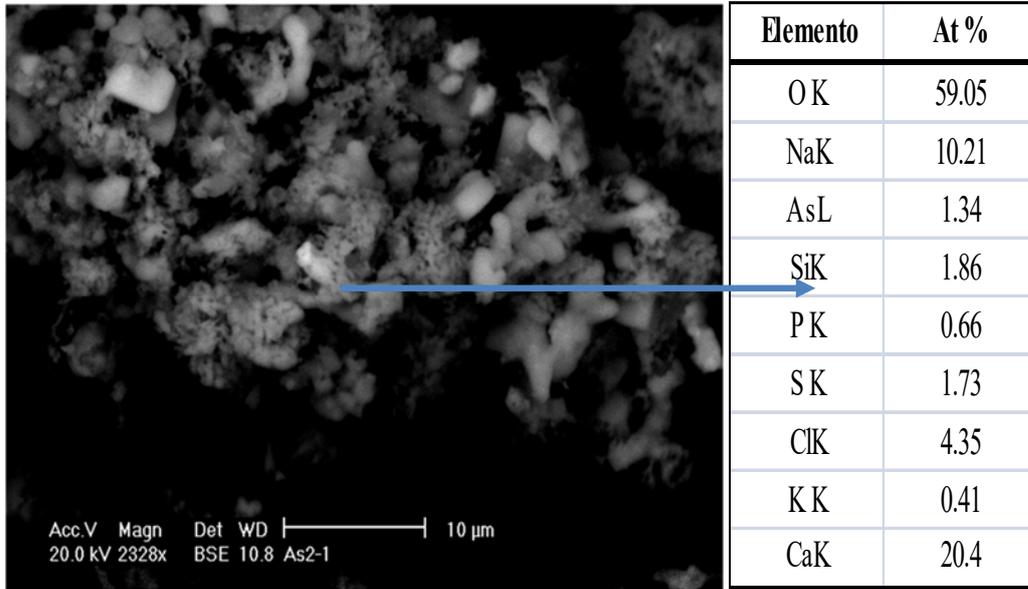


Figura 36. Fotomicrografía del precipitado As-M2b

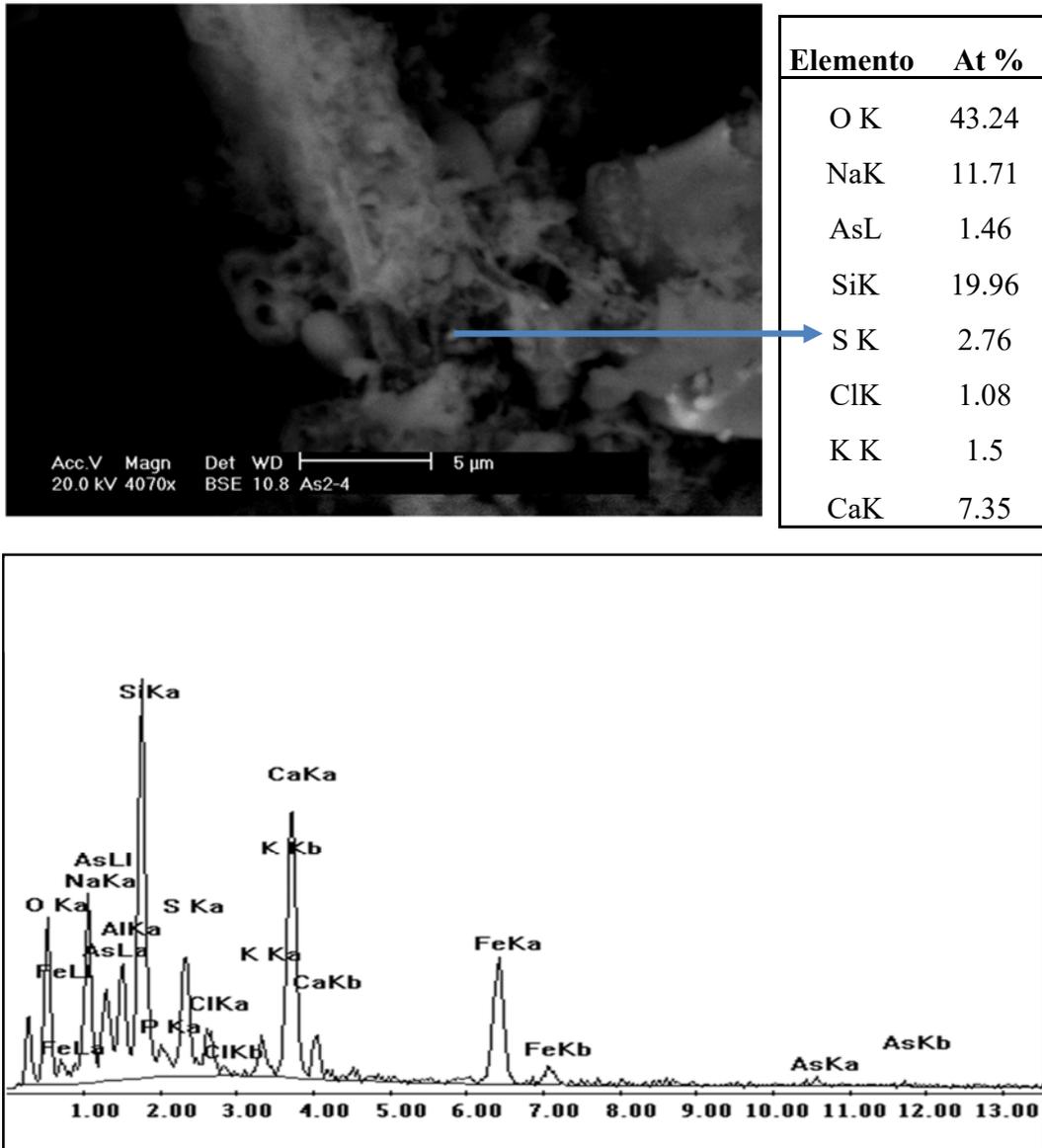


Figura 37. Fotomicrografía del precipitado As-M2c

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Conclusiones.

- Los consorcios de bacterias sulfatorreductoras JH y M2, que fueron aislados de suelos con elevadas concentraciones de As, presentaron actividad reductora de sulfatos en sistemas cerrados utilizando como medio líquido el agua contaminada con As de Cerrito Blanco y celulosa como fuente de carbono. Esto último permitió confirmar que es factible utilizar celulosa para BSR.
- Se puede concluir, de acuerdo a los perfiles de AGV determinados en la biodegradación de la celulosa, que existen diferencias metabólicas entre los consorcios JH y M2.
- M2 mostró mayor actividad hidrolíticas y o acidogénicas que JH lo cual se concluye de los experimentos donde la celulosa se introdujo como única fuente de carbono.
- De igual manera en M2 se observa una mayor acumulación de AGV, lo cual significa que al contar con un mayor número de bacterias hidrolíticas, logran desdoblar con mayor facilidad la celulosa, manifestándose esto con una mayor velocidad de producción de sulfuro.
- Se comprobó que es factible la aplicación de un sistema anaerobio sulfatorreductor *ex situ*, para aguas contaminadas con sulfatos y As, consiguiendo una remoción de 36% y 99%, respectivamente.
- Se concluyó que al utilizar una mayor cantidad de SSV en los experimentos, se obtenían velocidades de producción de H₂S mayores y tiempo cortos de la fase Lag.
- El comportamiento de degradación de la celulosa con los consorcios JH y M2 permiten concluir que comunidades con mayor diversidad de microorganismos, permiten que las BSR tenga mejores condiciones para realizar la biodegradación de

sustratos sólidos complejos, como la celulosa, es por eso que es importante realizar el estudio del comportamiento de degradación de la celulosa considerando la sinergia entre ambos consorcios para favorecer la actividad sulfatorreductora.

Recomendaciones

- Es necesario conocer la diversidad filogenética de ambos consorcios, haciendo la identificación específica de las especies de BSR presentes, así como de los otros microorganismos que intervienen en la degradación de la celulosa para poder establecer los mecanismos de degradación asociando las rutas metabólicas.
- El comportamiento de degradación de la celulosa con los consorcios JH y M2 nos hace concluir que comunidades con mayor diversidad de microorganismos, permiten que las BSR tenga mejores condiciones para realizar su digestión en presencia de sustratos complejos, como la celulosa, es por eso que es importante realizar el estudio del comportamiento de degradación de la celulosa considerando a ambos consorcios trabajando juntos, para que probablemente se vea favorecida la ARS con tiempos más cortos de degradación y producción.
- Se debe de establecer un sistema que permita tener disponible siempre, suficiente cantidad de inóculo de cada uno de los consorcios, para que no sea ese el factor limitante en los siguientes experimentos.

APÉNDICES

Apéndice 1.- Modelo sigmoidal de Gompertz

El modelo de Gompertz está representado por la siguiente ecuación:

$$PHS = a \cdot \exp[-B \exp(-kt)] \quad \text{Ec. A.1}$$

Si $B = e^{(kx_c)}$, considerando t como x, A1 se escribe como:

$$y = a \cdot e^{-e^{-k(x-x_c)}} \quad \text{Ec. A.2}$$

Donde a, k son parámetros del modelo, en tanto que y, x son las variables, siendo x_c el tiempo en el que se alcanza el punto de inflexión. La tasa de cambio se obtiene al derivar la Ecuación A.1.

$$\frac{dy}{dx} = a \cdot e^{-e^{-k(x-x_c)}} \cdot e^{-k(x-x_c)} \cdot k \quad \text{Ec. A.3}$$

La Ecuación 2.37, puede escribirse en términos de y como:

$$\frac{dy}{dx} = k \cdot y \cdot e^{-k(x-x_c)} \quad \text{Ec. A.4}$$

La segunda derivada de la Ecuación A.2, representa la velocidad de la tasa de cambio de la función y, siendo expresada como:

$$\frac{d^2y}{dx^2} = k \cdot a \cdot e^{-e^{-k(x-x_c)}} \cdot e^{-k(x-x_c)} \cdot e^{-k(x-x_c)} - k \cdot a \cdot e^{-e^{-k(x-x_c)}} \cdot e^{-k(x-x_c)} \quad \text{Ec. A.5}$$

Sustituyendo y (A.2) en la Ecuación A.5 se tiene:

$$\frac{d^2y}{dx^2} = k \cdot y \cdot e^{-k(x-x_c)} \cdot e^{-k(x-x_c)} - k \cdot y \cdot e^{-k(x-x_c)} \quad \text{Ec. A.6}$$

El término $e^{-k(x-x_c)}$ puede escribirse en términos de y siguiendo la igualdad proveniente de la Ecuación 2.36:

$$e^{-k(x-x_c)} = \ln\left(\frac{a}{y}\right) \quad \text{Ec. A.7}$$

Entonces la tasa de cambio (A.3), puede representarse como:

$$\frac{dy}{dx} = k \cdot y \cdot \ln\left(\frac{a}{y}\right) \quad \text{Ec. A.8}$$

Sustituyendo las ecuaciones A.7 y A.8 en la Ecuación A.6, se obtiene:

$$\frac{d^2y}{dx^2} = \frac{dy}{dx} \cdot \left(\ln\left(\frac{a}{y}\right) - 1 \right) \quad \text{Ec. A.9}$$

Por lo tanto, la tasa de cambio se escribe como:

$$\frac{dy}{dx} = \left(\ln\left(\frac{a}{y}\right) - 1 \right) \quad \text{Ec. A.10}$$

La tasa máxima se encuentra en el punto de inflexión donde la función dy/dx es máxima, por lo que $dy/dx = 0$, por lo tanto, la Ecuación a.10 se convierte en:

$$\ln\frac{a}{y} = 1 \quad \text{Ec. A.11}$$

Por lo tanto:

$$y = \frac{a}{e} \quad \text{Ec. A.12}$$

Si la tasa de cambio (A.8) es evaluada en el punto $y = a/e$, se obtiene la tasa máxima de cambio (Ortiz 2004):

$$V_{max} = \left. \frac{dy}{dx} \right|_{y=a/e} = k \left(\frac{a}{e} \right) \ln \left(\frac{a}{a/e} \right) = k \frac{a}{e} = 0.368a \cdot k \quad \text{Ec. A.13}$$

Donde

k = a la constante cinética de primer orden;

$a = \hat{q}$ = máxima producción específica;

V_{max} = Velocidad máxima de producción.

Por lo que el punto de inflexión tiene las coordenadas $(x_c, a/e)$. La representación gráfica del modelo de Gompertz se observa en la Figura A.1.

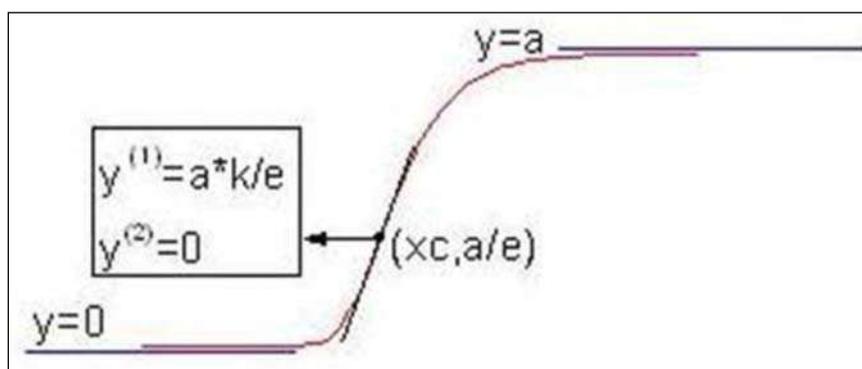


Figura A.1. Representación gráfica del modelo de Gompertz; se observa la ecuación de la velocidad máxima (y^1), cuando es evaluada en el punto de inflexión (Extraída del software Origin®, 2002).

Apéndice 2.- Determinación de sulfuro.

La determinación de sulfuro de hidrógeno (H_2S) se llevó a cabo por el método turbidimétrico de Cord - Ruwish (1985), para lo cual se realizó una curva de calibración de 0 a 30 mM de sulfuro de hidrógeno (H_2S). Se adicionó 0.1 ml de la muestra a 4 ml de una solución ácida de sulfato de cobre ($CuSO_4$, 0.005 M) a pH 1.3, acidificada con ácido clorhídrico (HCl , 0.05M).

Las mezclas se agitaban en un vortex por 5 segundos obteniéndose el valor de la absorbancia en un espectrofotómetro de UV/Vis a 480 nm.

La absorbancia es correlacionada a la concentración de H₂S con la curva de calibración que se muestra en la Figura A.2 con una correlación de $R^2 \geq 0.999$.

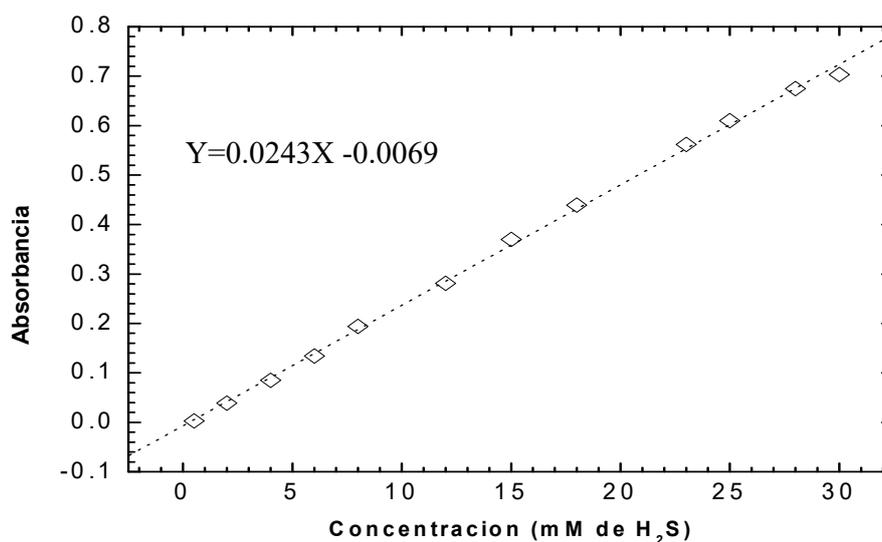


Figura A.2. Curva de calibración de H₂S empleada en la presente tesis.

Apéndice 3. Determinación de la concentración de metales y arsénico en agua.

La determinación de metales en agua residual se llevó a cabo en tres equipos: el Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer 3110, analizando las concentraciones de cobre (Cu), cadmio (Cd), hierro (Fe), plomo (Pb) y zinc (Zn).

La determinación de As se realizó en 2 equipos: el Spectraa 220 Varian, utilizado para concentraciones de As mayores a 3 mg L⁻¹ analizándose a una longitud de onda de 193.7 nm. El segundo equipo es el Perkin Elmer A. Analyst 200 acoplado a un generador de hidruros modelo FIAS 100, el cual cuenta con un sistema de inyección de flujos (EAA-GH). En este último, fue posible determinar las fracciones de las especies de As³⁺ y As total, del caso de estudio, considerando o no la etapa preliminar de oxidación del método de generación de hidruros. El agua se analizó al inicio de los experimentos y al término.

Apéndice 4.- E_H vs H₂S

Las Figuras A.3 y A.4 muestran el comportamiento del H₂S cuando se siguió el E_H. La cinética de producción de sulfuro, empleando celulosa sólida (CS) como sustrato, corroboró que el sistema se estuviera realizando la ARS.

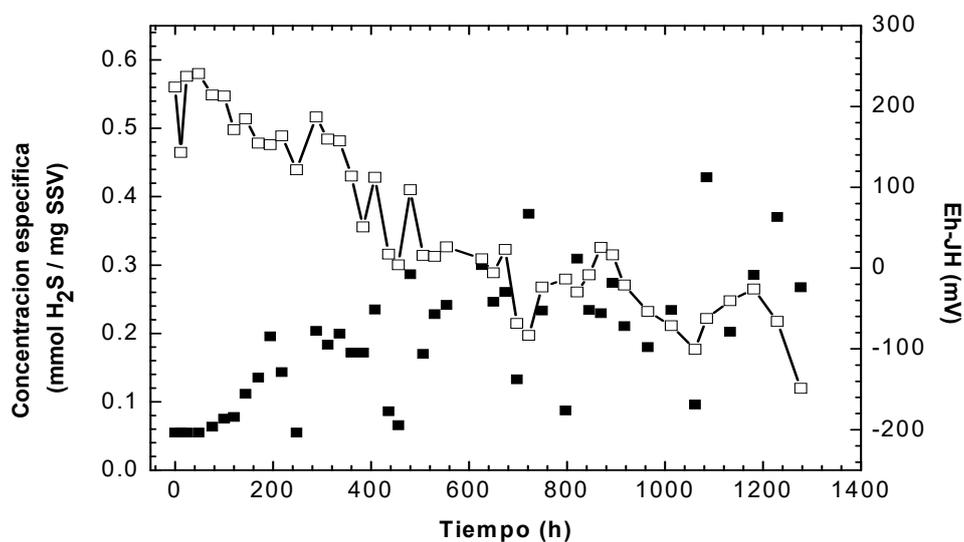


Figura A.3. Comportamiento del H₂S (■) siguiendo el E_H (□) con el consorcio JH.

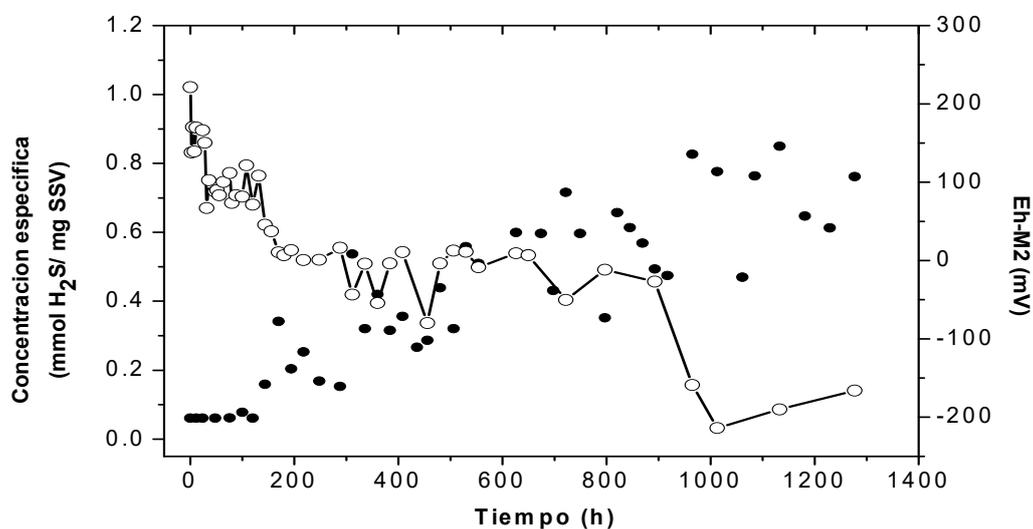


Figura A4. Comportamiento del H₂S (•) siguiendo el E_H (o) con el consorcio M2

Apéndice 5.- Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO).

La DQO del sustrato orgánico y el incremento de la misma en los sistemas en batch, se determinó mediante el método de reflujó cerrado utilizando 2.5 mL de muestra (Eaton, *et al.*, 2005). La muestra se oxidó adicionando 3.5 mL de ácido sulfúrico y 1.5 mL de solución de digestión que contenía 10.216 g de dicromato de potasio más 167 ml ácido sulfúrico concentrado, se mantuvieron a 150°C por 2 horas en tubos de vidrio HACH cerrados. La concentración se determinó colorimétricamente a partir de la absorbancia obtenida a 600 nm con la correspondiente curva estándar de 5 a 1000 mg L⁻¹ de DQO ($R^2 \geq 0.996$) que se muestra en la Figura A.5. Solo se empleó la curva de alto rango para este trabajo.

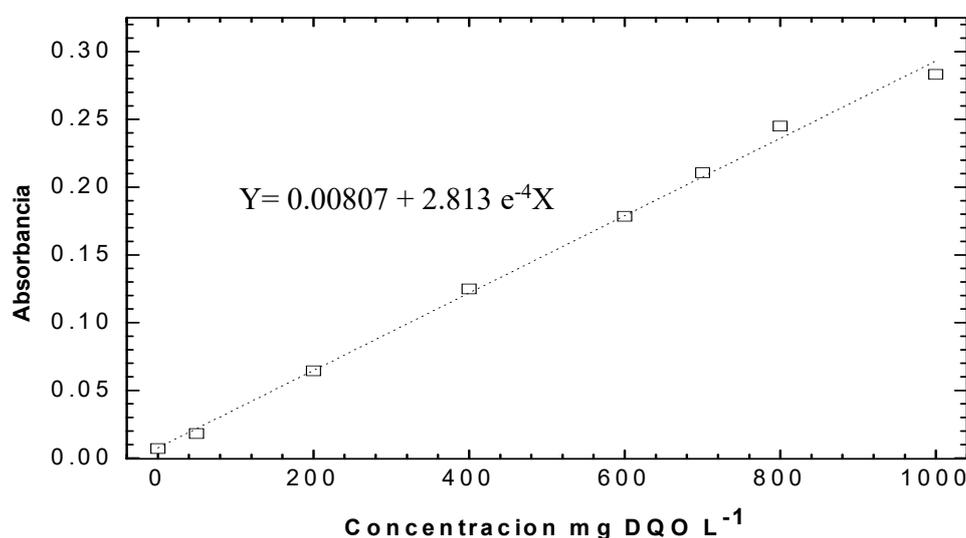


Figura A.5. Curva de calibración de DQO empleada en la presente tesis.

Apéndice 6.- Determinación de sulfatos.

La determinación de sulfatos se efectuó por método turbidimétrico, el cual se fundamenta en hacer precipitar el ión sulfato (SO₄²⁻) en medio acético con cloruro de bario, formando cristales de sulfato de bario de tamaño uniforme. Se midió la absorbancia de luz de la suspensión formada de BaSO₄ con un espectrofotómetro UV/Vis marca BECKMAN modelo DU 650, determinándose la concentración de SO₄²⁻ comparando la lectura con una curva patrón. El límite de detección fue de 1mg SO₄²⁻ L⁻¹ y el máximo de 40 mg SO₄²⁻ L⁻¹

ya que por arriba de esta concentración las suspensiones formadas de BaSO₄ eran inestables (Eaton *et al.*, 2005).

Para llevar a cabo la determinación de sulfatos por este método se preparó una curva de 5 a 40 mg L⁻¹ de SO₄²⁻ con un intervalo de 5 unidades. La solución buffer que se preparó fue para concentraciones de SO₄²⁻ mayores a 10 mg L⁻¹, disolviendo 30 g de cloruro de magnesio hidratado (MgCl₂.6H₂O), 3.01 g de acetato de sodio (CH₃COONa), 1 g de nitrato de potasio (KNO₃) y 20 mL de ácido acético (CH₃COOH) aforando a 1L de agua desionizada. Para analizar las muestras se utilizaban 100 mL de muestra a los cuales se añadía 20 mL de solución buffer, una pizca de BaCl₂, homogenizando la mezcla con agitación por 60 segundos, y finalmente se leía la absorbancia a 420 nm.

La curva de calibración que se obtuvo se muestra en la Figura A.6.1, con una correlación lineal de 0.997. Cada una de las muestras problemas analizadas se analizaron haciendo una dilución de 1:50, ya que por datos proporcionados por la CONAGUA se sabía que las concentraciones se encontrarían por encima de 40 mg L⁻¹ de SO₄²⁻. La absorbancia leída fue interpolada a la curva de calibración obteniéndose las concentraciones de SO₄²⁻ presentadas en este trabajo de tesis.

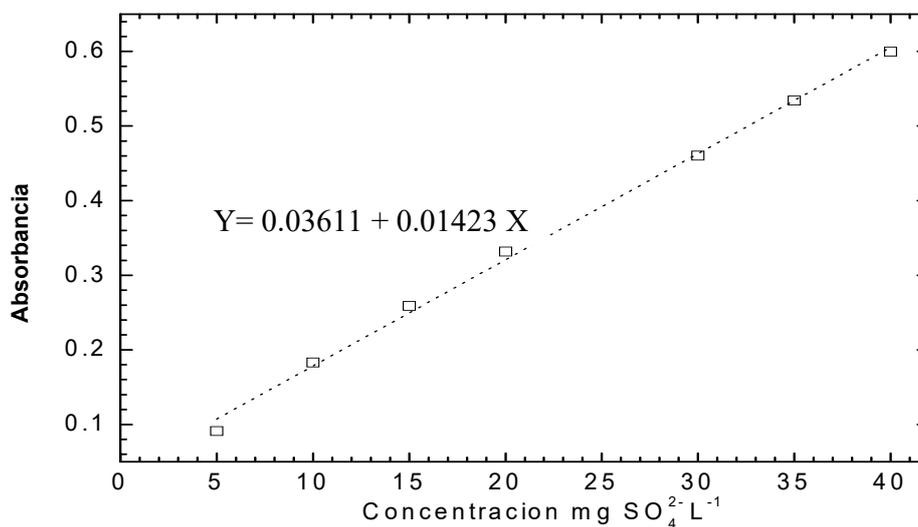


Figura A.6. Curva de calibración de SO₄²⁻ empleada en la presente tesis.

Apéndice 7.- Comportamiento de H₂S en experimento de DQO.

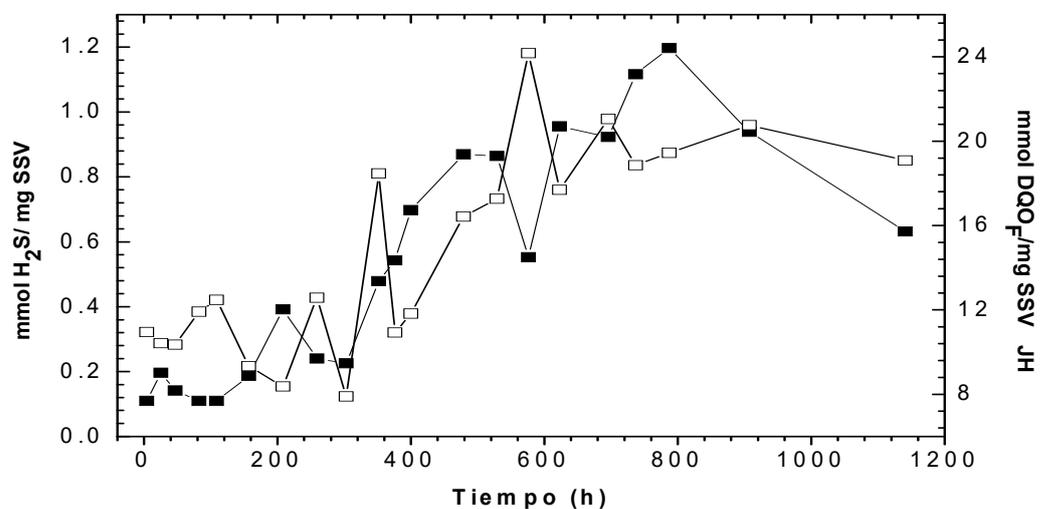


Figura A.7. Comportamiento de H₂S (■) y DQO_F (□) en consorcio JH.

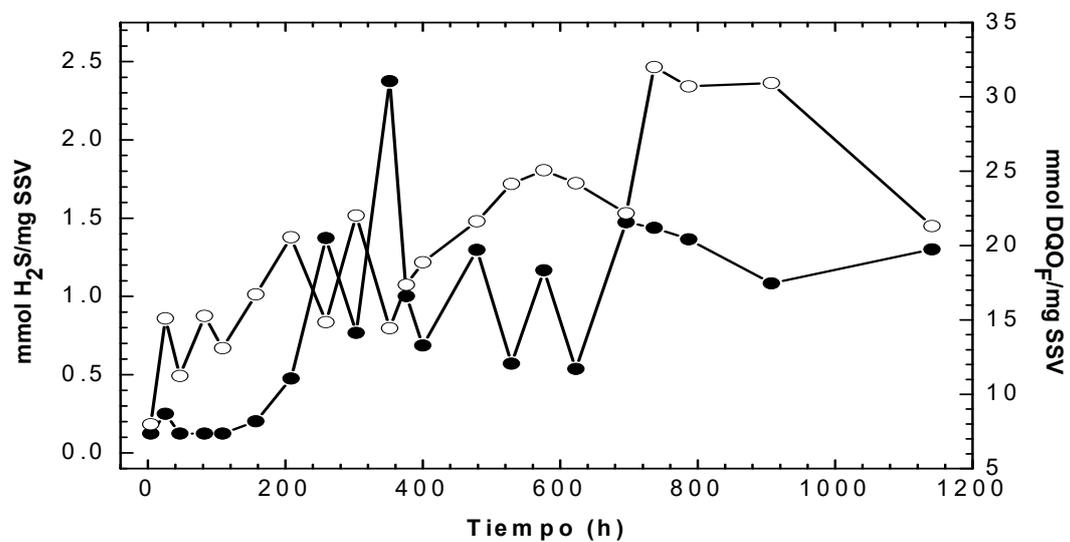


Figura A.8. Comportamiento de H₂S (●) y DQO_F (○) en consorcio M2

Apéndice 8.- Calibración de electrodos.

Los electrodos de referencia mencionados anteriormente se calibraron utilizando una solución buffer con partes iguales del par redox hidroquinona/quinona a 25°C y cuyo potencial esta descrito por la Ecuación 12, considerando concentraciones iguales en el reactivo de quinihidrona, se utilizó la siguiente ecuación:

$$E_H = 699.2 - 59.1231 * pH \quad (Ec. 14)$$

Para la preparación de esta solución, se saturaron dos soluciones buffer una a pH=4 y la otra pH=7, del reactivo quinihidrona. Los valores esperados de acuerdo al electrodo de referencia deben ser de 86 y 66 (± 5) mV respectivamente para confiar en la lectura obtenida.

REFERENCIAS

AEMM (2009) Anuario Estadístico de la Minería Mexicana versión.

Amos R., Ulrich K, Blowes D., Ptacek C. (2004). Reactive transport modeling of column experiments for the remediation of acid mine drainage. *Environmental Science and Technology*. Vol 38, pp: 3131-3138.

ATSDR (2007) Agency for toxic substances and disease registry. Página: <http://www.atsdr.cdc.gov/> (Fecha de acceso: 2 de Agosto del 2007).

Barton L. y Hamilton (2007) Sulphate-reducing Bacteria Environmental and Engineered Systems University of New Mexico. University of Aberdeen.

Blake G. y Hartge K (1986). Physical and Mineralogical Methods Klute A. Ed. In *Methods of soil analysis, Part I, USA*, pp 378.

Blowes W.D, Ptacek J.C., Jambor L.J, Weisener G.C. (2004). The Geochemistry of Acid Mine Drainage *Environmental Geochemistry*. Vol. 9.

Bohinski R. (1991). *Bioquímica 5ª Edición*, Pearson Educación, México.

Boltes K., Leton P., Garca E. (2008). Volatile fatty acid anaerobic degradation: Kinetic modeling with an inoculum under controlled conditions. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. Vol. 47, pp: 5337-5345.

Celis G. (2004). Bioeliminación de óxidos de azufre de efluentes. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana. UAM- Iztapalapa, México.

Chang M., Chou T. y Tsao G. (1981). Structure, pretreatment and hydrolysis of cellulose. *Advances in Biochemical Engineering*. Vol. 20, pp: 15-40.

Clifford D.A. y Ghurye G.L. (2002). Metal-oxide adsorption, Ion exchange, and Coagulation-Microfiltración for Arsenic Removal from Water. *Environmental and chemistry of arsenic*. Ed. Frankenberger W.T. Marcel Dekker Inc. N.Y. pp: 217-245, New York.

CONAGUA (2002). Comisión nacional del agua. Evaluación de la calidad del agua subterránea de fuentes de abastecimiento en acuíferos prioritarios de la región cuencas centrales del norte. México.

Cord-Ruwisch R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulphate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 4, pp: 33-36.

Díaz F. (1993). Arsenic and cadmium exposure in children living near a smelter complex in San Luis Potosi, Mexico. *Environmental research*, Vol. 62, pp: 242–250.

E-bac 2000. The Environmental Company. Wastewater Treatment Solutions. Página: <http://www.ebac2000.com/ebac.htm> (Fecha de acceso: 21 de Enero del 2010).

Eaton D., Clesceri L., Rice E., Greenberg A. (2005). APHA. In *Standard Methods for the examination of water & wastewater*, 21 st Edition, Washington DC.

Eccles, H. (1999). Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process?. *Trends Biotechnol.* Vol. 17, pp: 462-465.

Elliott P., Ragusa S. y Catcheside D.(1998). Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. *Water Research.* Vol. 32, N° 12. pp: 3724-3730.

EPA (2002): Environmental Protection Agency. *Proven Alternatives for Aboveground Treatment of Arsenic in Groundwater.* USA.

EPA (2009): Environmental Protection Agency. *Iron King Mine and Humboldt Smelter Site.* San Francisco. USA.

Fauque G. (1995). Ecology of sulfate reducing bacteria. In. *Sulfate-reducing bacteria.* Ed. L. L .Barton. Plenum Press. pp. 217-235. N.Y, N.Y.

Ferguson JF & Gavis J. (1972). A review of the arsenic cycle in natural waters. *Water Research.* Vol. 6, pp: 1259–1274.

Fishbein L. (1981). Source, transport and alterations metal compounds: An overview arsenic, beryllium, cadmium, chromium, and nickel. *Environmental Health Perspectives.* Vol. 40, pp: 43-64.

Francesconi A.K. y Kuehnelt D. (2002.). Arsenic compounds in the environment. In *Environmental chemistry of arsenic.* Ed. Frankenberger, W.T. Marcel Dekker Inc., pp.51-94, New York.

Frankenberger W.T. y Arshad M. (2002). Volatilization of arsenic. En: *Environmental chemistry of arsenic.* Ed. Frankenberger W.T. Marcel Dekker Inc., pp: 363-380, New York.

Gallegos M., Celis L.y Razo E. (2010). Competencia por sustrato durante el desarrollo de biomasa sulfatorreductora a partir de un lodo metanogénico en un reactor UASB. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* Vol. 26, N° 2, pp: 109-117.

Gangagni R., Prasad K., Venkata N, Chandrashekar R., Sarma P. (2003). Removal of sulfide in integrated anaerobic–aerobic wastewater treatment system. *Clean Technology Environmental Policy.* Vol. 6, pp: 66–71.

- Gottschalk G. (1986). *Bacterial Metabolism*. 2nd Ed. Springer - Verlag, New York, pp. 210-262.
- Greben H., Baloyi L., Eisberg R., Joubert L., Botha A y Venter S (2006). Volatile fatty acid formation and utilization in anaerobic sulphidogenic batch reactors. Division of natural resources and the environment. South Africa.
- Gutiérrez R. , Romero F., González H. (2007). Soils and sediments affected by the dispersion of metal sulfide from inactive tailings in the Santa Barbara mining area, Chihuahua, Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. Vol. 24, pp: 170-184, México.
- Guo X. y Chen F. (2005). Removal of Arsenic by bead cellulose loaded with iron oxyhydroxide from groundwater. *Environmental Science & Technology*. Vol. 39 pp: 6808-6818.China.
- Huisman J.L., Schouten G., Schultz C. (2006). Biologically produced sulphide for purification of process streams, effluent treatment and recovery of metals in the metal and mining industry. *Hydrometallurgy*. Vol. 83, pp: 106-113.
- INEGI (2007). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. La minería en México.
- IRC (2007). International Water and Sanitation Centre. Arsenic in drinking water. Petrusovski B., Sharma S., Schippers J.C., Shordt K., Ed. Peter McIntyre, Oxford, UK.
- Johnston R. y Heijnen H. (2001). *Safe Water Technology for Arsenic Removal*. Bangladesh.
- Jong T. y Parry L. (2003). Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Environmental Analytical Chemistry Unit, Faculty of Science*. Vol. 37, pp: 3379-3389.
- Jong T. y Parry L. (2005). Evaluation of the stability of arsenic immobilized by microbial sulfate reduction using TCLP extractions and long-term leaching techniques. *Environmental Analytical Chemistry Unit, School of Science and Primary Industries, Faculty of Education, Health and Science, Charles Darwin University, Darwin, 0909, Australia*.
- Kaksonen A, Riekkola V., Puhakka L. (2003). Optimization of Metal Sulphide Precipitation in Fluidized-Bed Treatment of Acidic Wastewater. *Water Research*. Vol. 37, pp: 255-266.
- Kaksonen A. (2004). Thesis for the degree of Doctor Technology: "The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed reactors treating acidic metal and sulphate containing wastewater" Tampere University of Technology, Tampere.

- Kobayashi S., Hobson L., Sakamoto J., Kimura S., Sugiyama J., Imai T., Itoh T. (2000). Formation and Structure of Artificial Cellulose Spherulites via Enzymatic Polymerization. Biomacromolecules, Japan.
- Kolmert, A; y Johnson, D. B. (2001). Remediation of Acidic Wastewaters Using Immobilized, Acidophilic Sulfate-reducing Bacteria. Journal of Chemical Technology and Bio-technology. Vol. 76, pp: 836-843.
- Krishnakumar B., Majumdar S., Manilal V., Ajit H. (2004). Treatment of sulphide containing wastewater with sulphur recovery in a novel reverse fluidized loop reactor (RFLR). Environmental Technology Programme, Regional Research Laboratory (CSIR), Industrial Estate (PO), India.
- Kumar P.R., Chaudhari S., Khilar K.C. (2004). Removal of arsenic from water by electrocoagulation Chemosphere. Vol. 55 (9) pp: 1245-1252.
- Labastida I., Flores A., Briones R. (2007). Selecting samples in treatability test from metallic stabilization. International Conference on Water Pollution in natural Porous media at different scales. Assessment of fate, impact and indicators. WAPO2. Barcelona.
- Lens P., Visser A., Janssen A., Hulshoff P. y Lettinga G. (1998). Biotechnological Treatment of Sulfate-Rich Wastewaters. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. Vol. 28, pp: 41-88.
- Lens P., Omil F., Lema J.M. y Hulshoff P. (2000). Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters. Environmental Technologies to treat sulfur pollution-principles and Engineering. Edited by Lens P.N.L. y Hulshoff Pol L. IWA, pp. 153-168.
- Lièvreumont D., Bertin P., Lett M. (2009). Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. Biochimie. Vol. 91, pp: 1229-1237.
- Márquez J. (2008). Modificación de la bioaccesibilidad de residuos mineros en presencia de material orgánico empleando bacterias reductoras de sulfatos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P., 2008.
- Martin P. y Donald J. (1985). The solubility and stability of scorodite, $\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. American Mineralogist. Vol. 70, pp: 838-844.
- Masscheleyn P, Delaune R, Patrick W. (1991). Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. Environmental Science and Technology. Vol. 25, N° 8. Louisiana.
- Matschullat J. (2000.). Arsenic in the geosphere. A review. The Science of Total Environment. Vol. 249, pp: 297-312. Germany.

- Matshusa M., JS Ogola y Chimuka L. (2009). Use of compost bacteria to degrade cellulose from grass cuttings in biological removal of sulphate from acid mine drainage. Water Research Commission. South Africa.
- Mejía J, Carrizales L, Rodríguez V, Jiménez C., Díaz. F. (1999). Un Método para la evaluación de riesgos para la salud en zonas mineras. Salud pública de México. Instituto Nacional de Salud Pública. Vol. 41, N°2, pp: 132-140.
- Méndez M. y Armienta M. (2002). Arsenic phase distribution in Zimapán mine tailings, Mexico.
- Miliarium (2007). Ingeniería Civil y Medio Ambiente. Página: <http://www.miliarium.com/monografias/arsenico/Toxicidad/Toxicidad.asp>. (Fecha de acceso: 29 de Julio del 2007).
- Mohan D. y Pittman C. (2007). Arsenic removal from water/wastewater using adsorbent: A critical review. Journal of Hazardous Materials. Vol. 142, pp: 1-53. Estados Unidos.
- Moller A., Grahn A., Welander U. (2004). Precipitation of Heavy Metal from Landfill Leachates by Microbially-Produced Sulphide. Environmental Technology. Vol. 25, pp: 69-77.
- Morjanoff, P., Gray P. (1987). Optimization of steam explosion as method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. Biotechnology. Bioengineering. Vol. 29, pp: 733-741.
- Muyzer G. y Stams J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria (Ecology SBR). Nature Reviews Microbiology.
- Nies, D., (1999). Microbial heavy-metal resistance. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 51, pp: 730-750.
- Phifer M., Turick C. y Millings M. (2001). D-Area Coal Pile Basin Sulfate Reduction. Literature Review and Feasibility Report. <http://sti.srs.gov/fulltext/tr2001371/tr2001371.pdf>.
- OMS (1984): Organización Mundial de la Salud. Guidelines for drinking-water quality. Vol. 2, pp: 335. Ginebra.
- OMS (2004): Organización Mundial de la Salud. Relación del agua, el saneamiento y la higiene con la salud. HECHOS Y CIFRAS actualización de noviembre de 2004.
- OMS (2006): Organización Mundial de la Salud. Consejo ejecutivo: EB118/14 Mitigación de los efectos del arsénico presente en las aguas subterráneas. 118ª reunión mayo de 2006.
- Oremland R y Stolz J. (2003). The Ecology of arsenic. Science. Vol. 300, pp: 939. New York.

- Postgate J.R. (1984). The sulphate reducing bacteria, Cambridge University Press, England pp 31-32.
- Razo I. (2002). Evaluación de la contaminación por metales y del riesgo en salud en un sitio minero de sulfuros polimetálicos: Caso de Villa de la Paz-Matehuala. Tesis de Maestría Universidad Autónoma de San Luis Potosí. pp. 4, 8-10, 31. México.
- Razo I., Carrizales L., Castro J., Díaz F. y Monroy M. (2004). Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water, air and soil pollution*. Vol. 152, pp: 129-152.
- Razo I. (2006). Identificación de áreas prioritarias de restauración de suelos contaminados por As y metales pesados en el sitio minero y metalúrgico de Villa de la Paz-Matehuala, S.L.P., Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, pp.72-74. México.
- Rhine E., García E., Phelps C y Young L. (2005). Environmental microbes can speciate and cycle arsenic. *Environmental Science and Technology*. Vol. 39, pp: 9569-9573.
- Rittmann B., McCarty P. (2001). *Environmental Biotechnology: principles and applications*. Mc Graw Hill. New York.
- SGM (2010). Servicio Geológico Mexicano. Anuario estadístico de la minería Mexicana.
- Smedley P., Kinniburgh D. (2002) A review of the source behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Apply. Geochemistry*. Vol. 17, pp: 517-568.
- SSSA (1986): Soil Science Society of America. *Methods of soil analysis. Parte 1-Physical and Mineralogical Methods*, pp. 378-379. Madison Wisconsin.
- Srivastava S., Mishra S., Tripathi R. (2007). Phytochelatins and antioxidant systems respond differentially during arsenite and arsenate stress in *Hydrilla verticillata* (L.f) Royle. *Environmental Science & Technology*. Vol. 41, pp: 2930-2936.
- Stum W.y Morgan J. (1996). *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and rates in natural waters*. 3^o Ed. Wiley Interscience publication, USA.
- Sun Y., Cheng J. (2001). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. Vol. 83, pp: 1-11.
- Thauer R., Möller D. y Spormann A. (1989). Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. *Annual Reviews Microbiology*. Vol. 43, pp: 43-67. Alemania.
- Thomas R., Romanek C., Coughlin D., y Crowe D. (1999). "Treatment of Acid Mine Drainage Using Anaerobic Constructed Wetlands: Predicting Longevity with Substrate

Neutralization Potential,” Proceedings of Sudbury '99 Mining and Environmental II Conference, Sudbury, Ontario, Canada, pp: 449-458.

Vidal P y Molinier J. (1988). Ozonolysis of lignin – improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. BIOMASS. Vol. 16, pp: 1-17.

Visser A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Tesis doctoral. Wageningen Agriculturall University, Wageningen, Holanda.

Visser A., Hulshoff P., Lettinga G. (1996). Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. Water Science Technologic. Vol. 33, pp: 99-110.

Weijma J., Hulshoff P., Stams A., Lettinga G. (2000). Performance o thermophilic sulfate and sulfite reducing high rate anaerobic reactor fed with methanol. Biodegradation Vol. 11, pp 429-439, Holanda.

White C., Sayer J. y Gadd G. (1997). Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. FEMS Microbiology Reviews. Vol. 20, pp 503-516.

White C., Sharman A. y Gadd G. (1998). An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. Natura. Biotechnology. Vol. 16, pp: 572-575.

WHO (1981): World Health Organization, Arsenic. Geneva, World Health Organization, En: Environmental Health Criteria, No. 18, Geneve, Germany.

WHO (2001a.): World Health Organization, Arsenic contamination in groundwater affecting some countries in South East Asia region. In: SEA/RC54/8, Yangon, Myanmar.

WHO (2001b): World Health Organization, Arsenic and arsenic compounds. In: Environmental Health Criteria 224. Geneve, Germany.

WHO (2003): World Health Organization, Arsenic, Drinking-water and Health Risks Substitution in Arsenic Mitigation: a Discussion Paper.

Wright J. (1988). Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. Chemical Engineering Process. Vol. 84 (8), pp: 62–74. USA.

Zagury G., Kulnieks V., Neculita C. (2006). Characterization and reactivity assessment of organic susbtrates for sulphate reducing bacteria in acid mine drainage. Chemosphere. Vol. 64, pp: 944-954. Canada.