



**Universidad Autónoma de San Luis Potosí**  
**Facultad de Ingeniería**  
**Instituto de Metalurgia**

**Evaluación a escala laboratorio de bacterias sulfatorreductoras en la  
estabilización de la fracción bioaccesible de plomo, en un suelo impactado por  
la minería**

Tesis para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencias en Ingeniería de Minerales

Presenta:

I.A. Israel Labastida Núñez

Director de Tesis

Dr. Roberto Briones Gallardo

Tesis financiada por:

Proyecto de investigación SEMARNAT: FOSEMARNAT-2004-C01-123. Diseño de una Barrera Sulfato-Reductora Permeable para la remediación de suelos no saturados impactados por metales tóxicos y arsénico.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Beca de maestría número 198015



**Universidad Autónoma de San Luis Potosí**  
**Facultad de Ingeniería**  
**Instituto de Metalurgia**

**Evaluación a escala laboratorio de bacterias sulfatorreductoras en la  
estabilización de la fracción bioaccesible de plomo, en un suelo impactado por  
la minería**

Tesis para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencias en Ingeniería de Minerales

Presenta:  
I.A. Israel Labastida Núñez

Sinodales:

Dr. Roberto Briones Gallardo

\_\_\_\_\_

Dr. Elías Razo Flores

\_\_\_\_\_

Dra. Ma. Isabel Lázaro Báez

\_\_\_\_\_

Dra. J. Viridiana García Meza

\_\_\_\_\_

Este trabajo de tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Restauración Ambiental del Instituto de Metalurgia de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, dentro del programa del Posgrado (PNPC) de Maestría en Ciencias en Ingeniería de Minerales.

Agradezco la beca para maestría número 198015, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), periodo 2005-2007.

Tesis financiada por el Proyecto:

FOSEMARNAT-2004-C01-123. Diseño de una Barrera Sulfato-Reductora Permeable para la remediación de suelos no saturados impactados por metales tóxicos y arsénico.

Tesis apoyada parcialmente por:

El Programa Integral de Fortalecimiento de la UASLP (PIFI 1.0 a 3.4) mediante el Plan de Desarrollo del Cuerpo Académico de Tecnología Ambiental 2006 - 2008 (convenios P/CA-116 2006-24-36 y P/CA 116-2007-24-42-02).

A mis padres, Elizabeth y Luis Iván quienes me transmitieron amor, apoyo y entusiasmo en todo momento.

Israel

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por permitirme cumplir una de mis metas forjadas, agradezco a mis padres; José Luis y Guadalupe por su paciencia, consejos y su apoyo moral e incondicional durante la realización de este trabajo. A mi sobrino Luis Iván a quien le prometí escribir esta tesis. A mi amor Elizabeth por su amor, apoyo, paciencia y comprensión.

Agradezco también al Dr. Ignacio González Martínez por su apoyo y consejos durante este tiempo y a quien le prometí dar mi máximo esfuerzo y dedicación durante mi estancia en esta Institución. Al Dr. Roberto Briones Gallardo por el apoyo brindado al inicio y al final de mis estudios de maestría, así también le agradezco su amistad, el tiempo, y todo el conocimiento que me aportó para realizar este trabajo de tesis. También le agradezco el haberme permitido representar a nuestra Institución y nuestro trabajo en dos Congresos, uno de ellos internacional. A la QFB Adriana Flores por su contribución en el aislamiento de las bacterias empleadas en este trabajo. A los doctores del Instituto de Metalurgia: Dra. Isabel Lázaro, Dra. Viridiana García, Dr. Israel Rodríguez y Dr. Roel Cruz por el aporte de sus conocimientos a mis dudas y por la convivencia en varios momentos de mi estancia. Así también, agradezco a los Doctores del IPICyT; Dr. Elías Razo y Dra. Berenice Celis por sus contribuciones a esta tesis. Al Dr. Antoni Escalas y Dra. Guadalupe Barajas por permitirme realizar pruebas experimentales en su laboratorio. A los técnicos y amigos Francisco Núñez y Nicolás por su buen trabajo y por la amistad brindada.

Agradezco especialmente a mis amigos por su amistad y por aquellos momentos que pasamos juntos: Imla, Laura, Fanny, Elka, Fabiola Figueroa, Nadia Rocha, Lucy, Ofelia, Raúl, Julio, René, Wembo, David y Roberto. A todos mis compañeros del Instituto, entre ellos: Mariana, Imelda Esparza, Bianca, Karla, Paloma, Tania, Eduardo Terrazas, Cristóbal, Armando, Gerardo y a Claudia Martínez del PMPCA. A todos gracias.

Israel

## RESUMEN

Como parte inicial de este estudio, se realizó la caracterización fisicoquímica de distintas muestras de suelo y jales; provenientes de Matehuala y Villa de la Paz San Luis Potosí, México. Dicha caracterización, permitió identificar dos muestras con elevadas concentraciones bioaccesibles y móviles de arsénico y plomo. La muestra M3 con una bioaccesibilidad de  $3165 \text{ mg As} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{suelo}}$  y la muestra JH con  $3175 \text{ mg Pb} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{suelo}}$ . De las muestras identificadas, JH fue elegida como caso de estudio para pruebas de estabilización de elementos potencialmente tóxicos (plomo predominantemente) con sulfuro de hidrógeno biogénico en columnas de flujo ascendente.

Para poder establecer el sistema de tratamiento, se aislaron consorcios microbianos que presentaron actividad sulfato reductora de dos muestras sólidas (P1 y JH). Dichos consorcios, se evaluaron en base a su producción de biomasa y mediante cinéticas de producción de sulfuro de hidrógeno, con y sin la presencia de plomo soluble en el sistema de reacción. Las concentraciones de plomo a las cuales fueron sometidos los consorcios se establecieron a partir de la concentración móvil máxima de plomo ( $34 \mu\text{M Pb}^{2+}$ ) a la que podrían encontrarse expuestas las bacterias en el sitio de muestreo. En base al empleo de equilibrios termodinámicos, y a la microscopía electrónica de barrido, se identificó la presencia de fases abióticas de clorofosfatos de plomo en los microcosmos. Así mismo, se determinó en que condiciones se favorece su formación y disolución, así como su efecto en la biodisponibilidad del fosfato en solución. El efecto inhibitorio del plomo en la síntesis celular, se determinó con el modelo de decaimiento exponencial de crecimiento y el modelo logístico de dosis respuesta. Los resultados obtenidos permitieron identificar al consorcio aislado de la muestra JH, como el que presentó menor inhibición por la presencia de plomo en el medio, presentando actividad reductora de sulfatos a concentraciones de plomo de  $2530 \mu\text{M Pb}^{2+}$ . Debido a los resultados, dicho consorcio fue seleccionado para las pruebas de estabilización en las columnas de flujo ascendente.

La estabilización de los elementos potencialmente tóxicos se realizó en columnas de flujo ascendente, la cual fue diseñada considerando una relación 1 a 10, con el objetivo de

disminuir la formación de canales preferenciales de flujo. El tiempo de residencia establecido, para la muestra a ser tratada, se determinó en base a la velocidad máxima de producción específica de sulfuro de hidrógeno del consorcio JH ( $2.62 \text{ mmol H}_2\text{S}\cdot\text{g}^{-1} \text{ SSV h}^{-1}$ ), la cual se determinó empleando el modelo de crecimiento poblacional de Gompertz. Además, se realizó el seguimiento de la variación del potencial de óxido-reducción, como parámetro de control, durante la estabilización.

Posteriormente, la estabilización del plomo por sulfuro de hidrógeno biogénico se evaluó en función de la bioaccesibilidad del mismo en la muestra, antes y después de ser tratada, considerando que las fases asociadas a sulfuros metálicos poseen una menor solubilidad y, de esta manera, poseen una mayor estabilidad termodinámica. Los resultados obtenidos mostraron una disminución del 50 % en la bioaccesibilidad de plomo después del tratamiento en las columnas.

## ÍNDICE

RESUMEN	xiii
ÍNDICE	xv
LISTA DE TABLAS	xix
LISTA DE FIGURAS	xxii
LISTA DE FOTOGRAFIAS	xxvi
1. INTRODUCCION	1
1.1 El panorama de la actividad minera en México	1
1.2 Impacto de las actividades mineras en el medio ambiente	2
2. ANTECEDENTES: CONTAMINACIÓN POR INORGÁNICOS Y BIOPROCESOS DE ESTABILIZACIÓN	3
2.1 Fuentes de contaminación por metales pesados	3
2.2 Bioprocesos para la estabilización de inorgánicos	7
2.2.1 Clasificación de las bacterias sulfatorreductoras	9
2.2.2 Bioestabilización de inorgánicos en reactores anaerobios y ensayos en columnas	11
2.3 Estequiometría en las bacterias sulfatorreductoras	13
2.3.1 Reacciones de energía de las bacterias sulfatorreductoras	14
2.3.2 Reacciones de síntesis de las bacterias sulfatorreductoras	15
2.3.4 Fracción de electrones utilizada para energía y síntesis celular	18
2.4 Factores involucrados en la producción de sulfuro de hidrógeno y de biomasa	18
2.5 Inhibición de los EPT en la actividad de las bacterias sulfatorreductoras	20
2.6 Determinación de la tasa máxima de producción de H <sub>2</sub> S (Modelo de Gompertz)	22
3. JUSTIFICACION	25
3.1 Alteración de sulfuros minerales por procesos de oxidación	25



3.2 Biodisponibilidad y bioaccesibilidad de EPT	27
3.3 Impacto de los EPT sobre salud pública	29
3.4 Asociaciones mineralógicas del plomo	30
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS PARA PRUEBAS DE ESTABILIZACIÓN DE INORGÁNICOS	35
5.1 Toma de muestras	35
5.2 Caracterización fisicoquímica	38
5.2.1 Determinación de fases mineralógicas primarias y densidad de las muestras	38
5.2.2 Análisis químicos	38
5.3 Obtención de inóculos de consorcios bacterianos con actividad reductora de sulfatos	39
5.4 Determinación de la estequiometría utilizada en la cinética de producción de sulfuro	40
5.5 Cinéticas de producción de sulfuro	40
5.6 Evaluación de la producción de biomasa de consorcios con actividad reductora de sulfatos	43
5.7 Electrodo para la determinación del potencial de óxido-reducción	44
5.7.1 Electrodo de platino	44
5.7.2 Electrodo de referencia Ag/AgCl	45
5.8 Determinaciones de potencial redox en botellas serológicas	47
5.9 Estabilizaciones en la columna de percolación	47
5.10 Microanálisis, identificación y observación de fases mineralógicas por EDS-MEB	48
6. DISEÑO DE COLUMNA PARA LA ESTABILIZACIÓN DE METALES EN SUELOS	51

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES SOBRE CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA Y ESTABILIZACIÓN BIOLÓGICA DE SUELOS	55
7.1 Resultados sobre la caracterización de muestras de suelo y residuos mineros	55
7.1.1 Concentración total de EPT en las muestras de suelo y residuos mineros	56
7.1.2 Fases primarias de las muestras seleccionadas y su respectiva densidad	57
7.1.3 Concentración bioaccesible de EPT en las muestras seleccionadas	58
7.1.4 Concentración móvil de los EPT en las muestras preseleccionadas	63
7.2 Evaluación de la producción de H <sub>2</sub> S biogénico (PSH) de dos consorcios microbianos aislados del sitio de estudio	68
7.2.1 Cinética de PSH, en presencia de plomo, obtenida con el Consorcio P1	69
7.2.2 Biomasa estimada como sólidos suspendidos volátiles en las cinéticas del consorcio P1	72
7.2.3 Estimación de las velocidades específicas de PSH con el consorcio P1	75
7.2.4 Estequiometría del consorcio JH	78
7.2.5 Formación de clorofosfato de plomo	82
7.2.6 Cinética de PSH, en presencia de plomo, obtenida con el Consorcio JH	85
7.2.7 Transición de fases de clorofosfatos de plomo a sulfuros de plomo	88
7.2.8 Biomasa estimada como sólidos suspendidos volátiles en las cinéticas del consorcio JH	94
7.2.9 Estimación de las velocidades específicas de PSH con el consorcio JH	99
7.2.10 Estequiometría global de los cultivos del consorcio JH	102
7.2.11 EDS-MEB sobre el precipitado en cinéticas de PHS bajo el escenario JHPb6	106
7.2.12 Cinéticas microbianas con déficit de fosfato	108
7.2.13 Biomasa estimada en las cinéticas con déficit de fosfato del consorcio JH	110

7.2.14 Velocidades máximas específicas de producción de sulfuro del consorcio JH con déficit de fosfato	111
7.3 Pruebas de estabilización en columnas	115
7.3.1 Balances de masa para la estimación del sulfuro de hidrógeno biogénico requerido para la estabilización de EPT en la muestra JH	115
7.3.2 Estimación del tiempo de residencia en las columnas de estabilización	116
7.3.3 Bioestabilización de suelo en la columna de flujo ascendente	118
7.3.4 Bioaccesibilidad de los suelos estabilizados	129
8 CONCLUSIONES	135
9 PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	139
ANEXOS	141
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155

## LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1	Secuencia termodinámica para reducción de sustancias inorgánicas con respecto al hidrógeno a pH 7 y 25°C (Modificado de Schlesinger, 1997)	9
Tabla 2.2	Bacterias sulfatorreductoras formadoras de esporas, del género <i>Desulfomatum</i> , con oxidación de sustrato hasta acetato o dióxido de carbono (Modificado de Holt <i>et al.</i> , 1994)	10
Tabla 2.3	Bacterias sulfatorreductoras no formadoras de esporas, con oxidación de sustrato hasta acetato o dióxido de carbono (Modificado de Holt <i>et al.</i> , 1994)	11
Tabla 2.4	Concentración mínima inhibitoria de iones metálicos tóxicos determinada en cultivos de <i>E. coli</i> (Nies, 1999)	21
Tabla 3.1	Asociaciones mineralógicas del plomo y su correspondiente solubilidad teórica	31
Tabla 5.1	Identificación de las muestras recolectadas. Ubicación en coordenadas UTM y su fecha de recolección	35
Tabla 5.2	Ubicación de los puntos de muestreo en coordenadas geográficas	36
Tabla 5.3	Claves de identificación de concentraciones de plomo empleadas en las cinéticas con el consorcio microbiano aislado del sitio P1	42
Tabla 5.4	Claves de identificación de concentraciones de plomo empleadas en las cinéticas con el consorcio microbiano aislado del sitio JH	42
Tabla 5.5	Claves de identificación de concentraciones de fosfato empleadas en las cinéticas con el consorcio microbiano aislado del sitio JH	43
Tabla 7.1	Concentraciones totales de EPT en las muestras recolectadas	56
Tabla 7.2	Densidad de las muestras seleccionadas como potenciales casos de estudio.	58
Tabla 7.3	Concentración bioaccesible de EPT en las muestras M2, M3, J2 y JH, empleando el protocolo SBRC	59
Tabla 7.4	Resultados de la prueba de movilidad de EPT de acuerdo al protocolo ASTM 3987, utilizando agua meteórica como extractante	63
Tabla 7.5	Resultados de la prueba de movilidad de EPT de acuerdo a la prueba de extracción PECT-NOM-53, utilizando una solución de ácido acético como extractante	64
Tabla 7.6	Resultados de la prueba de movilidad con ácido acético de acuerdo al protocolo PECT-NOM-53 modificado	66
Tabla 7.7	Biomasa generada en el estudio cinético del consorcio P1 (en mg SSV•L <sup>-1</sup> )	73
Tabla 7.8	Parámetros de ajuste de la función de decaimiento exponencial de primer orden (a). Valores experimentales y estimados de $\theta$ en función de $[Pb^{2+}]$	75
Tabla 7.9	Efecto de la concentración de plomo sobre la velocidad específica máxima de producción de sulfuro del consorcio P1	76

Tabla 7.10	Parámetros de ajuste de la función de decaimiento exponencial de primer orden, de acuerdo al comportamiento de la velocidad específica máxima de PSH	77
Tabla 7.11	Valores de IAP y del SI encontrados para las diferentes concentraciones de plomo empleadas en este estudio	84
Tabla 7.12	Concentración de fosfatos y cloruros (en mM) requerida para la precipitación como clorofosfato de plomo, y la respectiva concentración soluble disponible después de la precipitación, para cada concentración de plomo	85
Tabla 7.13	Potenciales de óxido-reducción y pH, al inicio y al final, de las pruebas cinéticas del consorcio JH	88
Tabla 7.14	Correlación entre el sulfuro de hidrógeno biogénico y el potencial de óxido-reducción determinado experimentalmente con los electrodos y calculado empleando la ecuación de Nernst	91
Tabla 7.15	Biomasa generada en el estudio cinético del consorcio JH	95
Tabla 7.16	Parámetros de ajuste de la función de decaimiento exponencial de primer orden (a). Valores experimentales y estimados de $\theta$ en función de $[Pb^{2+}]$	97
Tabla 7.17	Parámetros de ajuste de la función logística aplicada a los consorcios P1 y JH	98
Tabla 7.18	Efecto de la concentración de plomo sobre la velocidad específica máxima de producción de sulfuro del consorcio JH	99
Tabla 7.19	Efecto de la concentración de plomo sobre la velocidad específica máxima de producción de sulfuro de los consorcio JH y P1	102
Tabla 7.20	Parámetros estimados de $fe^0$ y $fs^0$ para los cultivos del consorcio JH	103
Tabla 7.21	Valores de sulfuro del consorcio JH determinados experimentalmente y correlacionados teóricamente empleando la reacción global para energía y síntesis celular	105
Tabla 7.22	Valores de biomasa del consorcio JH determinados experimentalmente y correlacionados teóricamente empleando la reacción global para energía y síntesis celular	105
Tabla 7.23	Biomasa generada en el estudio cinético con déficit de fosfato del consorcio JH	110
Tabla 7.24	Parámetros de ajuste de la función logística aplicada a los consorcios P1 y JH	111
Tabla 7.25	Efecto del déficit de fosfato sobre la velocidad específica máxima de producción de sulfuro del consorcio JH	113
Tabla 7.26	Parámetros de ajuste de la función logística aplicada a los consorcios P1 y JH	114
Tabla 7.27	Concentración bioaccesible de EPT en la muestra JH, expresada en $mmol \cdot kg^{-1}$	115

Tabla 7.28	Condiciones de operación estimadas para las pruebas de estabilización en columnas	117
Tabla 7.29	Potenciales de óxido-reducción obtenidos en la zona biológica de la columna, durante la adaptación de las bacterias	118
Tabla 7.30	Valores del potencial de óxido reducción (Eh) y del pH en la columna durante la primera estabilización	121
Tabla 7.31	Valores del potencial de óxido-reducción y del pH en la columna durante la segunda estabilización	126
Tabla 7.32	Concentración bioaccesible de EPT en el suelo antes y después de las pruebas de estabilización con $H_2S_{biog}$	130
Tabla 7.33	Porcentaje de bioaccesibilidad con respecto a la concentración total de EPT de las muestras antes (JHA) y después de estabilizar (JHD1 y JHD2)	131
Tabla 7.34	Concentración total de EPT en las muestras JH antes y después de ser estabilizadas por actividad reductora de sulfatos, en un sistema de flujo ascendente	132
Tabla G.1	Cinéticas de PSH (en mM), del consorcio P1 a diferentes concentraciones de plomo	154
Tabla G.2	Producción específica de sulfuro de hidrógeno del consorcio P1 (en $mmolH_2S \cdot g^{-1} SSV$ )	154
Tabla G.3	Cinéticas de PSH (en mM), del consorcio JH a diferentes concentraciones de plomo	155
Tabla G.4	Producción específica de sulfuro de hidrógeno del consorcio JH (en $mmolH_2S \cdot g^{-1} SSV$ )	155
Tabla G.5	Cinéticas de PSH (en mM), del consorcio JH a diferentes concentraciones iniciales de fosfato y en ausencia de plomo	156
Tabla G.6	Producción específica de sulfuro de hidrógeno del consorcio JH (en $mmolH_2S \cdot g^{-1} SSV$ ), con déficit de fosfatos	156

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Incremento en los empleos generados por la industria minero-metalúrgica desde 1998 hasta el 2008(CGMinería, 2008)	1
Figura 1.2	Lugares que ocupó México en la producción minera mundial en el 2007 (CGMinería, 2008)	1
Figura 1.3	Participación por estado mexicano en la producción minero-metalúrgica en el 2006 (CGMinería, 2008)	2
Figura 2.1	Etapas implicadas en la industria minero-metalúrgica y los respectivos residuos característicos asociados	3
Figura 2.2	Principales procesos y reacciones involucrados en la disolución de metales (McLean y Bledsoe, 1992)	4
Figura 2.3	Representación del comportamiento característico de producción de $H_2S_{biog}$ en un sistema por lote, caracterizada por tres fases: retardo, exponencial y estacionaria	23
Figura 3.1	Representación esquemática de la oxidación directa e indirecta de sulfuros metálicos (Modificado de Blowes <i>et al.</i> , 2005)	26
Figura 3.2	Diferentes etapas involucradas en la disponibilidad de EPT y su trayectoria: Ingestión, disolución, absorción y transformación (Gron y Andersen, 2003)	27
Figura 5.1	Ubicación geográfica de los puntos de recolección de las muestras de suelo y jales: a) JH, J1, J2, M1 en Villa de la Paz; b) M2 entre Matehuala y Villa de la Paz; c) P1 y M3 en Matehuala (Google Earth®, 2008)	37
Figura 5.2	Diagrama simplificado del recubrimiento de los electrodos	46
Figura 6.1	Diseño de columna para la estabilización de metales con cada una de sus secciones, zona de estabilización (suelo), zona biológica (consorcio microbiano), zona de distribución de flujo (aserrín)	52
Figura 6.2	Secciones desmontables de la columna: (a) Distribución de flujo y biológicamente reactiva así como de estabilización química. (b) Secciones de reacción biológica y de distribución de flujo, necesarias para alcanzar las condiciones de potencial redox, que evidencian una actividad microbiana reductora de sulfatos	52
Figura 7.1	Concentraciones totales de arsénico, plomo, zinc y cobre en las muestras M2, M3, J2 y JH	57
Figura 7.2	Concentraciones totales de arsénico, plomo, zinc y su respectiva bioaccesibilidad en las muestras M2, M3, J2 y JH	60
Figura 7.3	Concentración total de cobre y cadmio, así como su respectiva bioaccesibilidad en las muestras M2, M3, J2 y JH	62
Figura 7.4	Concentración total de hierro (FeT) y su respectiva bioaccesibilidad (FeB)	63

Figura 7.5	Resultados de movilidad de EPT, empleando agua meteórica como extractante, según protocolo ASTM 3987	64
Figura 7.6	Resultados de movilidad de EPT, empleando una solución con ácido acético como extractante, según prueba de extracción PECT-NOM 53	64
Figura 7.7	Movilidad de EPT, empleando una solución con ácido acético como extractante, según prueba de extracción PECT-NOM 53 modificada	67
Figura 7.8	Cinética de producción de sulfuro del consorcio P1, para el cultivo sin plomo y para los cultivos con las concentraciones de plomo	71
Figura 7.9	Microfotografía y microanálisis químico de partículas del cultivo P1Pb3	72
Figura 7.10	Producción de biomasa normalizada ( $\theta$ ), del inoculo P1, como una función de la concentración de plomo	74
Figura 7.11	Producción específica de sulfuro de hidrógeno bajo diferentes concentraciones de plomo del consorcio P1	76
Figura 7.12	Velocidad específica máxima de producción de sulfuro de hidrógeno respecto a la concentración de plomo y su ajuste correspondiente a un decaimiento exponencial de primer orden	77
Figura 7.13	PHS experimental por el consorcio JH, considerando una estequiometría de oxidación de lactato completa	79
Figura 7.14	Diagrama de distribución de especies que muestra la formación del clorofosfato de plomo en la concentración de plomo más baja empleada en este estudio	83
Figura 7.15	Diagrama de distribución de especies que muestra la formación del clorofosfato de plomo en la concentración de plomo más alta empleada en este estudio	83
Figura 7.16	Cinética de PSH del consorcio JH para el cultivo sin plomo y para los cultivos con diferentes concentraciones de plomo	87
Figura 7.17	Perspectiva de las caídas en la concentración de sulfuro acumulado en los cultivos JHPb4 y JHPb5	87
Figura 7.18	Diagrama de distribución de especies que muestra el predominio del sulfuro de plomo y el desplazamiento del clorofosfato de plomo a pH cercano a 8 en el cultivo con la menor concentración de plomo empleada en este estudio	89
Figura 7.19	Diagrama de distribución de especies que muestra la formación del sulfuro de plomo y el desplazamiento del clorofosfato de plomo a pH cercano de 8, en el cultivo con una concentración de plomo de JHPb5	89
Figura 7.20	Relación de evolución del potencial de óxido-reducción y la concentración de sulfuro de hidrógeno con respecto al tiempo	92



Figura 7.21	Diagrama de predominio de especies (Eh-pH) considerando una concentración de 0.5 mM de H <sub>2</sub> S, se observa que un potencial de -170 y -200, se encuentra en la frontera de predominio ente H <sub>2</sub> S y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	93
Figura 7.22	Microfotografía y microanálisis químico de precipitados recuperados al final de las cinéticas, efectuadas en las botellas serológicas del cultivo JHPb5	94
Figura 7.23	Producción de biomasa normalizada ( $\theta$ ), del inoculo JH, como una función de la concentración de plomo	96
Figura 7.24	Comportamiento de la biomasa producida por cada cultivo de los consorcios P1, JH y su respectivo ajuste a modelo de decaimiento logístico	97
Figura 7.25	Comportamiento de la biomasa de los cultivos en presencia de plomo del consorcio JH su ajuste polinomial de tercer orden	98
Figura 7.26	Producción específica de sulfuro de hidrógeno del consorcio JH y su ajuste con el modelo de Gompertz	100
Figura 7.27	Comparación entre la dependencia de la velocidad específica máxima de PSH en función de la concentración de plomo en: (●) Consorcio P1 y (▽) Consorcio JH	101
Figura 7.28	Microfotografía y microanálisis de los precipitados recuperados al final de las cinéticas efectuadas en las botellas serológicas de la cinética JHPb6	107
Figura 7.29	Cinéticas de producción de sulfuro del consorcio JH, en ausencia de plomo y con déficit de fosfatos:	109
Figura 7.30	Biomasa producida por los cultivos con déficit de fosfatos y su respectivo ajuste a un crecimiento logístico	110
Figura 7.31	Producción específica de sulfuro de hidrógeno y ajuste con el modelo de Gompertz de los cultivos con déficit de fosfato	112
Figura 7.32	Velocidad específica máxima de producción de sulfuro de hidrógeno con respecto a la concentración de fosfatos y su respectivo ajuste a un decaimiento logístico	114
Figura 7.33	Perfil de potencial de óxido-reducción en la zona biológica de la columna durante el periodo de adaptación de las BSR	119
Figura 7.34	Comportamiento del potencial de óxido-reducción durante la primera estabilización de EPT en la muestra JH	121
Figura 7.35	Microfotografía y microanálisis químico de partículas del suelo posteriormente a la estabilización con H <sub>2</sub> S <sub>biog</sub>	124
Figura 7.36	Microfotografía del suelo estabilizado, donde se aprecian aglomeraciones atribuidas a H <sub>2</sub> S <sub>biog</sub> sobre la superficie de partículas de suelo	124

Figura 7.37	Microfotografía y microanálisis químico de una partícula, con morfología definida, de JH	125
Figura 7.38	Comportamiento del potencial de óxido-reducción durante la segunda prueba de estabilización de EPT en la muestra JH	126
Figura 7.39	Microfotografía y microanálisis de partículas de la muestra JH posteriormente a la segunda estabilización	129
Figura 7.40	Concentraciones bioaccesibles de EPT en las muestras de JH antes y después de la estabilización por $H_2S_{biog}$	131
Figura A.1	Representación gráfica del modelo de Gompertz	144
Figura D.1	Curvas de calibración empleadas en las cinéticas de producción de sulfuro de hidrógeno de ambos consorcio P1 y JH	150
Figura F.1	Difractogramas de las muestras seleccionadas como potenciales casos de estudio: a) M2, b) M3, c) J2 y d) JH	153

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

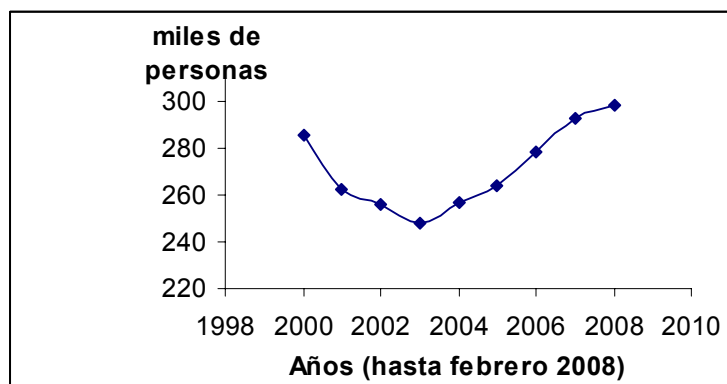
Fotografía 2.1	Vista panorámica de los suelos impactados por transporte fluvial y eólico de EPT, desde la presa de jales, en el distrito minero de Santa María de la Paz, S.L.P. México (Briones, 2005)	5
Fotografía 2.2	Evidencias de erosión por escorrentías a los costados de las presas de jales, en el distrito minero de Santa María de la Paz, S.L.P. México (Briones, 2005)	6
Fotografía 2.3	Evidencias y aspectos de los residuos mineros localizados en el Cerro de San Pedro, S.L.P. México (a) Dimensiones relativas de los pasivos ambientales. (b) Evidencias de su alteración por intemperización (Briones, 2003)	7
Fotografía 5.1	Electrodo de trabajo colocado dentro de su cuerpo de electrodo (plástico heat shrink tubing). En el extremo izquierdo se observa el conector hembra y en el extremo derecho la punta de platino	44
Fotografía 5.2	Electrodo de referencia Ag/AgCl, colocado dentro del cuerpo de electrodo conteniendo el Vycor® en el extremo izquierdo	47
Fotografía 7.1	Color presentado por los cultivos en las cinéticas con el consorcio P1	69
Fotografía 7.2	Sistema de agitación orbital para evaluar las cinéticas microbianas con el consorcio P1	70
Fotografía 7.3	Zona de reacción biológica para la adaptación de las BSR	118
Fotografía 7.4	Zona biológica de la columna, asentamiento de la biomasa principalmente en la zona media y baja, ocasionando que el potencial es más bajo que en la zona superior de esta sección	120
Fotografía 7.5	Ensamble de la columna con cada una de sus secciones, zona de estabilización (suelo), zona biológica (bacterias), zona de distribución de flujo (aserrín), multímetro, bomba y depósito para recuperar la solución al final de la estabilización	120
Fotografía 7.6	Caminos preferenciales de flujo en el suelo JH, durante el transcurso de la primer prueba de estabilización de EPT	122
Fotografía 7.7	Tonalidad oscura en la zona de distribución de flujo, al comienzo y al final de la primera prueba de estabilización de EPT en la muestra JH	123
Fotografía 7.8	Coloración oscura adquirida por la muestra JH al final de la segunda prueba de estabilización de EPT b) Coloración idéntica en las zonas de distribución de flujo y biológica	128



# 1. INTRODUCCION

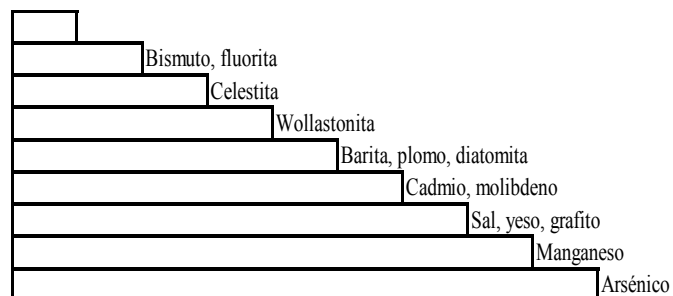
## 1.1 El panorama de la actividad minera en México

Mundialmente los recursos naturales han sido explotados por el hombre debido a su potencial riqueza económica, como ejemplos se pueden citar: la madera, el petróleo, así como los minerales. En México, el sector minero metalúrgico ha sido importante para el desarrollo económico del país presentando una tendencia creciente en la generación de empleos en los últimos ocho años (Figura 1.1) (CGMinería, 2008).



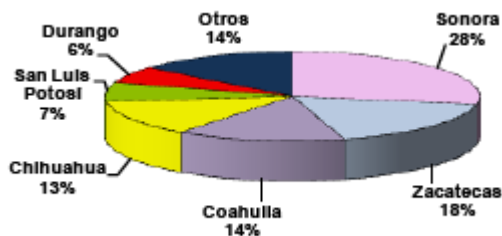
**Figura 1.1** Incremento en los empleos generados por la industria minero-metalúrgica desde 1998 hasta el 2008 (CGMinería, 2008).

En el año 2007, México se encontró dentro de los primeros nueve lugares de prestigio en la producción minera mundial, siendo el segundo lugar mundial en producción de plata, el quinto en producción de plomo y el noveno en producción de arsénico (Figura 1.2).



**Figura 1.2** Lugares que ocupó México en la producción minera mundial en el 2007 (CGMinería, 2008).

Los principales estados productores de minerales y metales del país son Sonora, Zacatecas, Chihuahua, Durango, San Luis Potosí y Coahuila (Figura 1.3) (CGMinería, 2008).



**Figura 1.3** Participación por estado mexicano en la producción minero-metalúrgica nacional en el 2006 (CGMinería, 2008).

Sin embargo, la industria minera no sólo se caracteriza por su aporte a la economía nacional, sino también por el deterioro ambiental que causan sus actividades. En México, este tipo de industria ha traído consecuencias desfavorables en el medio ambiente, repercutiendo tanto en contaminación visual, por el alto volumen de desechos generados, como en la contaminación del suelo, agua y aire, ocasionando problemas en la salud de los seres vivos y en la destrucción de sus hábitats.

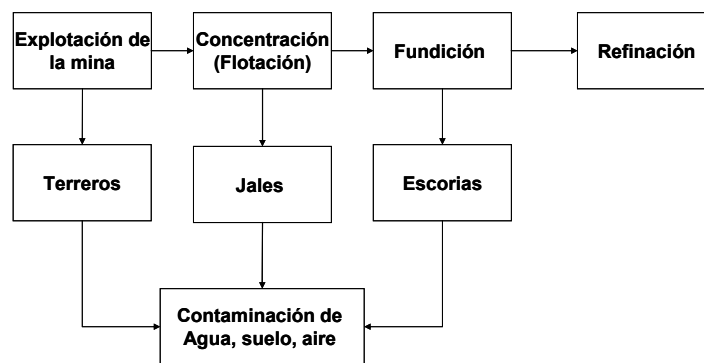
## 1.2 Impacto de las actividades mineras en el medio ambiente

Existen numerosos problemas ambientales que son atribuidos a las actividades minero-metalúrgicas. Dentro de los impactos potenciales en el ambiente se encuentran (modificado de UNEP, 2000; Razo, 2002): Destrucción de los hábitats naturales en los sitios de operación y disposición de gran cantidad de residuos (como terreros, jales, y escorias), sobreexplotación de los acuíferos, peligro de derrumbes de estructuras de contención de residuos o fallas en las presas de jales, generación de drenaje ácido de mina (DAM) con elevadas cargas de metales pesados y diversos oxianiones, contaminación de cauces de agua superficial y acuíferos, emisiones atmosféricas de polvos hacia áreas urbanas o rurales. Además se tienen los impactos en la salud debido al contacto con sustancias químicas, residuos y productos, inhalación de polvos, riesgo físico en la mina.

## 2. ANTECEDENTES: CONTAMINACIÓN POR INORGÁNICOS Y BIOPROCESOS DE ESTABILIZACIÓN

### 2.1 Fuentes de contaminación por metales pesados

Como se mencionó anteriormente, las descargas con alto volumen de residuos sólidos (*e.g.* terreros, jales y escorias), provenientes de las distintas etapas productivas minero-metalúrgicas (Figura 2.1), constituyen el principal problema ambiental de esta industria.



**Figura 2.1** Etapas implicadas en la industria minero-metalúrgica y los respectivos residuos característicos asociados.

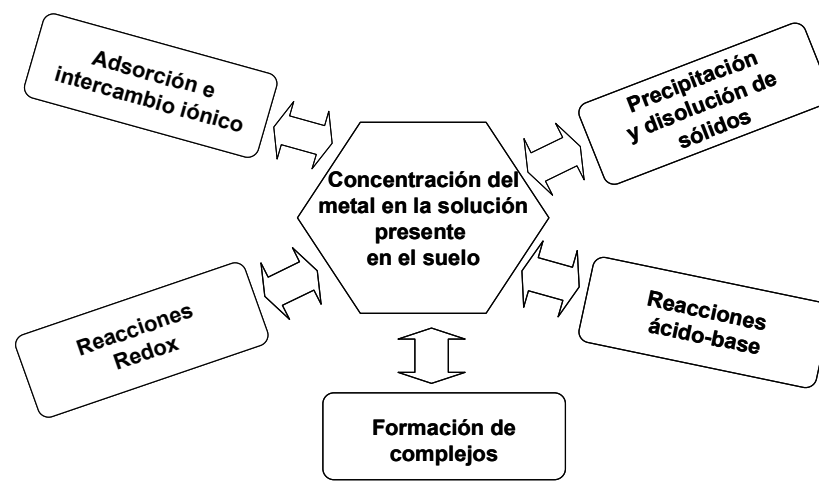
Dichos residuos frecuentemente están constituidos por partículas finas de sulfuros y óxidos metálicos. Éstos contienen, además del azufre (en sus diferentes estados de oxidación), una gran variedad de fases mineralógicas. Las fases de mayor importancia ambiental son aquellas que contienen metales pesados y metaloides (*e.g.* PbS, CdS, CuFeS, FeAsS). Los elementos, tales como, As, Pb y Cd se denominan generalmente elementos potencialmente tóxicos, EPT (WHO, 2005).

Las partículas minerales pueden transportarse, fluvial y eólicamente, alcanzando diferentes receptores ambientales (*e.g.* suelo, sedimento, agua); una vez en éstos interactúan con el cuerpo receptor, sufriendo diferentes procesos de alteración (químicos o biológicos). Estos procesos modifican las características fisicoquímicas iniciales del receptor (condiciones

## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización

redox y pH), así como las concentraciones naturales de los elementos en el mismo. La solubilidad de los EPT contenidos en las diversas fases mineralógicas de estos residuos, así como su transporte, pueden ser modificados debido a la actividad microbiana local mediante reacciones de óxido-reducción, ácido-base, disolución, precipitación-precipitación, entre otras (McLean y Bledsoe, 1992). El cambio en las características fisicoquímicas de la mezcla residuo-suelo, puede originar una mayor disponibilidad de metales hacia la fase acuosa promoviendo la contaminación de suelos y aguas adyacentes (Figura 2.2).

Mundialmente se estima que la contaminación anual por EPT es mayor que la contaminación combinada de desechos radioactivos y orgánicos (Nriagu y Pacyna, 1988).



**Figura 2.2** Principales procesos, y reacciones, involucrados en la disolución de metales (McLean y Bledsoe, 1992).

En México se han detectado algunas zonas contaminadas por residuos provenientes de actividades mineras, por lo que es indispensable contar con alternativas de remediación y/o prevención de la contaminación. Como ejemplo puede citarse el municipio de Zimapán, Hgo., donde ha sido explotado desde 1576 un yacimiento minero tipo skarn, cuyas menas están constituidas por plomo, zinc y plata. Sin embargo, en dichas menas se han reportado cantidades hasta del 16 % en peso de arsénico, el cual se encuentra principalmente asociado a arsenopirita, aunque también puede encontrarse en fases secundarias como la escorodita. En este sitio se han reportado concentraciones de arsénico en la superficie que van desde 4



## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización

a  $14,700 \text{ mg As} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{suelo}}$ . El rango de concentraciones sugiere que el arsénico se ha redistribuido debido a las actividades mineras que se realizan en este sitio (Ongley *et al.*, 2007). Otro sitio impactado por la actividad minera, es el distrito minero de Santa María de la Paz, ubicado en los municipios de Villa de la Paz y Matehuala, en San Luis Potosí. En este sitio, Castro-Larragoitia *et al.* (1997) reportaron la ubicación de un yacimiento minero tipo skarn de Pb-Zn-Ag(Cu-Au) que ha sido explotado por 200 años aproximadamente. En esta zona se encuentran dos mineralizaciones, la primera está formada por una mena de Pb-Zn-Ag constituida principalmente por galena (PbS), esfalerita (ZnS), arsenopirita (FeAsS), y pirita (FeS<sub>2</sub>). La segunda está formada por una mena de Cu-Au(Zn) constituida principalmente por calcopirita (FeCuS<sub>2</sub>) y bornita (Cu<sub>5</sub>FeS<sub>4</sub>). Esta última mineralización es la que se encuentra actualmente en operación. La intensa explotación minera ha originado la construcción de cinco presas de jales, distribuidas a cielo abierto en los terrenos aledaños de las plantas de beneficio de mineral. Sin embargo, con el transcurso de los años, los residuos han sido transportados y depositados hacia canales, arroyos y suelos circunvecinos (Fotografías 2.1 y 2.2).



**Fotografía 2.1** Vista panorámica de los suelos impactados por transporte fluvial y eólico de EPT, desde la presa de jales, en el distrito minero de Santa María de la Paz, S.L.P. México (Briones, 2005).

## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización



**Fotografía 2.2** Evidencias de erosión por escorrentías a los costados de las presas de jales, en el distrito minero de Santa María de la Paz, S.L.P. México (Briones 2005).

Debido al deterioro ambiental que ha sufrido el país por actividades minero-metalúrgicas, han surgido en los últimos años algunas Normas Oficiales Mexicanas, como la NOM-141-SEMARNAT-2003 publicada en el 2004 y la NOM-147-SEMARNAT-2004 publicada en el 2007. La primera establece distintos procedimientos relacionados a la operación de las presas de jales y la caracterización de los mismos y, la segunda establece los criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por EPT. No obstante, el deterioro ambiental causado por la minería en tantos años de operación se encuentra vigente en los pasivos ambientales de los diversos sitios mineros históricos (Fotografía 2.3.a). En éstos es común observar los procesos de alteración de los residuos por procesos de intemperización (Fotografía 2.3.b), caracterizados por color ocre asociados a precipitaciones de oxihidróxidos de hierro, amarillo a azufre elemental y coloraciones blancas a sulfatos.

## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización



(a)

(b)

**Fotografía 2.3** Evidencias y aspectos de los residuos mineros localizados en el Cerro de San Pedro, S.L.P. México (a) Dimensiones relativas de los pasivos ambientales (b) Evidencias de su alteración por intemperización (Briones 2003).

Con el objetivo de minimizar los impactos en la contaminación que la industria minera ocasiona, es necesario contar con diferentes alternativas de remediación, entre las que se encuentran aquellas relacionadas con la biotecnología ambiental.

### 2.2 Bioprocesos para la estabilización de inorgánicos

Anteriormente los microorganismos sólo habían sido considerados como intermediarios en los ciclos biogeoquímicos de los elementos, sin embargo, los problemas ambientales de la actualidad han ocasionado que los microorganismos jueguen un papel trascendente en la mitigación de la contaminación ambiental (Atlas y Bartha, 2002). Al desarrollo tecnológico que considera la utilización de los principios de microbiología para la solución de problemas ambientales se le denomina biotecnología ambiental.

Las aplicaciones biotecnológicas incluyen (extraído de Rittman y McCarty, 2001):

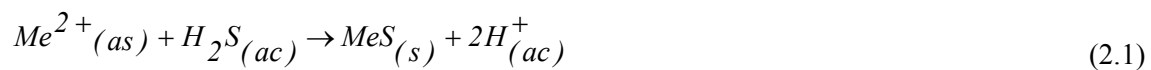
- Tratamiento de aguas residuales industriales y municipales
- Remediación de sitios contaminados con materiales peligrosos
- Prevención y control de la contaminación de acuíferos

## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización

Por ejemplo, White *et al.* (1997) reportan la existencia de bacterias capaces de reducir selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) a selenio elemental ( $\text{Se}^0$ ) y sugieren la utilización de las mismas para remediar sitios contaminados con este oxianión. Además mencionan que existen bacterias capaces de sintetizar y secretar exopolímeros que estabilizan los metales, en su microambiente, disminuyendo la movilidad de los mismos hacia otros receptores.

En los últimos años se ha incrementado el uso de las bacterias sulfatorreductoras (BSR) para la remoción de iones metálicos presentes en los efluentes generados por la industria minera. Holt *et al.* (1994) y White *et al.* (1997) han descrito que las BSR son células procariotas con diámetros entre 0.4 y 3  $\mu\text{m}$  y que se encuentran en sistemas anóxicos con potenciales redox cercanos a -200 mV/SHE. Estas BSR generalmente emplean nitrógeno amoniacal como fuente de nitrógeno. Las BSR reducen los iones sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) hasta sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) de manera no asimilativa, es decir, liberando  $\text{H}_2\text{S}$  al ambiente (Gottschalk, 1986).

El  $\text{H}_2\text{S}$  producido por las bacterias ( $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ ) puede emplearse para estabilizar iones metálicos ( $\text{Me}^{2+}$ ) formando sulfuros metálicos de baja solubilidad, como lo indica la Ecuación 2.1 (Waybrant *et al.*, 1998):



Lo cual permite considerar la producción de  $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$  como una alternativa para el control de la dispersión de iones metálicos hacia los diferentes receptores ambientales.

De acuerdo a la secuencia termodinámica propuesta por Schlesinger (1997), la reducción de sustancias inorgánicas como el  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{H}_2\text{S}$ , a pH de 7 y 25 °C, se presenta a -207 mV. Esta secuencia permite observar que conforme el potencial redox disminuye, otros compuestos, tales como nitratos, óxidos de manganeso y hierro, pueden participar previamente como aceptores de electrones durante la oxidación biológica de materia orgánica antes de que los sulfatos sean reducidos (Tabla 2.1).

## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización

**Tabla 2.1** Secuencia termodinámica para reducción de sustancias inorgánicas con respecto al hidrógeno, a pH 7 y 25°C (Modificado de Schlesinger, 1997)

Reacción	Eh (V/SHE)
Reducción de O <sub>2</sub> $O_2 + 4H^+ + 4e^- \Leftrightarrow 2H_2O$	0.812
Reducción de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> $2NO_3^- + 12H^+ + 10e^- \Leftrightarrow N_2 + 6H_2O$	0.747
Reducción de Mn <sup>4+</sup> $MnO_2 + 4H^+ + 2e^- \Leftrightarrow Mn^{2+} + 2H_2O$	0.526
Reducción de Fe <sup>3+</sup> a Fe <sup>2+</sup> $Fe(OH)_3 + 3H^+ + e^- \Leftrightarrow Fe^{2+} + 3H_2O$	-0.047
Reducción de SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> a H <sub>2</sub> S $SO_4^{2-} + 10H^+ + 8e^- \Leftrightarrow H_2S + 4H_2O$	-0.207
Reducción de CO <sub>2</sub> a CH <sub>4</sub> $CO_2 + 8H^+ + 8e^- \Leftrightarrow CH_4 + 2H_2O$	-0.244

### 2.2.1 Clasificación de las bacterias sulfatorreductoras

La BSR son clasificadas en dos grupos: las formadoras de esporas, dentro de las cuales se encuentra el género *Desulfotomaculum* (Tabla 2.2), y las no formadoras de esporas, tal como las del genero *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfomonas*, *Desulfovibrio* entre otras (Tabla 2.3).

Sin embargo, como lo describe Gottschalk (1986), las BSR también pueden clasificarse en dos grupos dependiendo de sus capacidades oxidativas del sustrato orgánico. En el Grupo I, se encuentran aquellas que oxidan el sustrato orgánico incompletamente hasta acetato (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y en el Grupo II aquellas que oxidan la materia orgánica hasta su mineralización (CO<sub>2</sub>).

De acuerdo a Holt *et al.* (1994), casi todas las BSR utilizan como donadores de electrones H<sub>2</sub>, ácidos monocarboxílicos (lactato, acetato, malato), alcoholes (etanol) y pocas especies utilizan azúcares (fructosa, glucosa). Takii (2003) menciona que estas bacterias son capaces de utilizar inclusive aminoácidos como fuentes de carbono (*e.g.* glicina, glutamato,

2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización

alanina), y que el rango óptimo de pH y temperatura, para su crecimiento, se encuentra entre 6.6 a 7.4 y de 25 a 65 °C.

**Tabla 2.2** Bacterias sulfatorreductoras formadoras de esporas, del género *Desulfomatum*, con oxidación de sustrato hasta acetato o dióxido de carbono (Modificado de Holt *et al.*, 1994)

<b>Especies</b>	<b>Aceptor de electrones</b>	<b>Donador de electrones</b>	<b>Producto final de oxidación</b>	<b>Temperatura óptima °C</b>
<i>D. acetoxidans</i>	Sulfato	Acetato, butirato	CO <sub>2</sub>	25-40
<i>D. kuznetsovi</i>	Sulfato	Acetato, butirato	CO <sub>2</sub>	50-65
<i>D. antarcticum</i>	Sulfato	Lactato	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	25-40
<i>D. geothermicum</i>	Sulfato	Lactato, butirato,	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	50-60
<i>D. guttoideum</i>	Sulfato	Lactato	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	25-40
<i>D. nigrificans</i>	Sulfato	Lactato	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	50-60

## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización

**Tabla 2.3** Bacterias sulfatorreductoras no formadoras de esporas, con oxidación de sustrato hasta acetato o dióxido de carbono (Modificado de Holt *et al.*, 1994)

Género	Aceptor de electrones	Donador de electrones	Producto final de oxidación	pH óptimo	T. óptima (°C)	Especies
<i>Desulfobulbus</i>	Sulfato, sulfito o tiosulfato	Propionato, H <sub>2</sub> , lactato, etanol	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	6.6-7.5	25-40	<i>D. elongatus</i> <i>D. propionicus</i>
<i>Desulfomicrobium</i>	Sulfato, sulfito, tiosulfato y en ocasiones azufre.	H <sub>2</sub> , lactato, malato	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	6.6-7.5	25-40	<i>D. baculatum</i>
<i>Desulfomonas</i>	Sulfato	H <sub>2</sub> , lactato, etanol	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	6.6-7.5	30-40	<i>D. pigra</i>
<i>Desulfovibrio</i>	Sulfato, sulfito, tiosulfato, en ocasiones azufre	H <sub>2</sub> , lactato, etanol, malato o fumarato, algunos azúcares, glicerol ó aminoácidos	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	6.6-7.5	25-40	<i>D. desulfuricans</i>
<i>Thermodesulfobacterium</i>	Sulfato	H <sub>2</sub> , lactato	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	6.6-7.5	65-70	<i>D. commune</i> , <i>mobile</i>
<i>Desulfobacter</i>	Sulfato, sulfito o tiosulfato	Acetato, etanol y pocas veces H <sub>2</sub> o lactato	CO <sub>2</sub>	6.6-7.4	20-33	<i>D. postgatei</i>
<i>Desulfobacterium</i>	Sulfato, sulfito, tiosulfato	H <sub>2</sub> , formato lactato, etanol,	CO <sub>2</sub>	6.6-7.6	20-30	<i>D. autotrophicum</i>
<i>Desulfoococcus</i>	Sulfato, sulfito y tiosulfato	Formato, lactato, etanol	CO <sub>2</sub>	6.7-7.6	28-35	<i>D. multivorans</i>
<i>Desulfomonile</i>	Sulfato, sulfito, tiosulfato,	Piruvato, H <sub>2</sub> , formato, benzoato	CO <sub>2</sub>	6.8-7	37	<i>D. tiedjei</i>
<i>Desulfonema</i>	Sulfato	Acetato, fumarato, succionato.	CO <sub>2</sub>	7.0-7.6	28-32	<i>D. limicola</i> , <i>D. magnum</i>
<i>Desulfosarcina</i>	Sulfato, sulfito, tiosulfato	H <sub>2</sub> , formato, lactato, etanol, fumarato, benzoato	CO <sub>2</sub>	7.2-7.6	33	<i>D. variabilis</i>

### 2.2.2 Bioestabilización de inorgánicos en reactores anaerobios y ensayos en columnas

El tratamiento del DAM, e incluso de efluentes industriales con altas cargas de metales pesados, puede llevarse a cabo mediante el uso de bioreactores. Principalmente existen dos

## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización

configuraciones de reactores que han sido implementadas para probar las eficiencias de remoción de metales por precipitación con  $H_2S_{biog}$ , que son el reactor de lecho fluidizado (FBR por sus siglas en inglés) y el reactor anaerobio de flujo ascendente de lodo granular (UASB por sus siglas en inglés) (Rittman y McCarty, 2001).

El reactor tipo FBR contiene un medio de soporte donde las bacterias se adhieren, como puede ser arena o carbón activado. Como ejemplo de esta configuración puede citarse el trabajo realizado por Kaksonen *et al.* (2006), en el cual se propone el uso de reactores de lecho fluidizado conteniendo diferentes géneros de BSR para el tratamiento del DAM. En dicho estudio, se utilizan silicatos como soporte de las BSR y, como donador de electrones, una mezcla de lactato-etanol. Los autores emplearon, también, una solución sintética de zinc y hierro en la alimentación, con tasas de  $600 \text{ mg Zn} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  y  $300 \text{ mg Fe} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , logrando eficiencias totales de remoción del 99%.

Por su parte, el reactor UASB tiene en la zona superior un sedimentador cuya función es separar los biosólidos del efluente. Una vez que los biosólidos son sedimentados regresan al compartimiento de digestión. Como ejemplo de esta configuración se encuentra el trabajo realizado por Velasco *et al.* (2008), en donde se tratan afluentes con concentraciones de plomo entre  $20\text{-}200 \text{ mg Pb}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$ . En este estudio se menciona que cuando se utiliza una relación molar  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  de 1.5, siendo etanol el donador de electrones, se logran eficiencias de remoción de plomo del 99 %.

La evaluación de las BSR considera, además de la eficiencia de la remoción de metales en bioreactores, estudios sobre la afinidad de estas bacterias a diferentes sustratos orgánicos, sólidos ó líquidos, realizados en columnas. En dichos estudios se evalúa la presencia de comunidades fermentativas, asociadas a comunidades de BSR, a través de la conversión de cadenas de carbono largas a cadenas cortas. Waybrant *et al.* (1998) recolectaron y aislaron un consorcio bacteriano de una zona anaerobia, el cual fue inoculado en columnas de percolación, para evaluar el consumo de sulfato empleando diferentes mezclas de sustratos orgánicos. El sulfato fue consumido más rápidamente cuando se emplearon mezclas que contenían 15 % lodo activado, 60 % hojas vegetales, 15 % trozos pequeños de madera y 10 % aserrín, así también como: 20 % lodo activado, 10 % hojas vegetales, 25 % trozos



## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización

pequeños de madera, 20 % abono y 25 % aserrín. En dicho estudio se menciona que el proceso de sulfato-reducción fue más lento, cuando el consorcio bacteriano se inoculó en columnas conteniendo únicamente celulosa como fuente de carbono.

Otra prueba fue realizada por Gibert *et al.* (2003), quienes evaluaron el uso de la composta como fuente de materia orgánica para las BSR. En dicho estudio, se utilizaron columnas de flujo ascendente en las cuales el potencial redox y el pH son registrados a la entrada y a la salida de la columna. Los autores concluyen que la composta mezclada con hierro elemental, a un pH de 7, favorece la formación de oxihidróxidos de hierro, los cuales contribuyen a una estabilización secundaria de los metales en solución por adsorción de éstos sobre su superficie. Sin embargo, aunque hacen mención de registro de lecturas de potencial, éstas no son reportadas.

Así mismo, el estudio realizado por Costa y Duarte (2005) reporta el uso de columnas, de 35 cm de largo por 5.5 cm de ancho, para tratar efluentes de aguas contaminadas por metales pesados ( $250 \text{ mg Fe}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $40 \text{ mg Cu}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \text{ mg Zn}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y sulfatos ( $4.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), utilizando lodo de agua residual como fuente de materia orgánica. En dicho estudio, los autores reportan incrementos de pH en la solución, con valores cercanos a 2 al inicio de la prueba y neutro en el efluente de las columnas, con una concentración de metales a la salida inferior a  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En los estudios mencionados anteriormente no se considera la lectura del potencial de óxido-reducción *in situ*, el cual proporciona información del momento en el cual las bacterias se encuentran acondicionadas para llevar a cabo la actividad reductora de sulfatos. Con dicha lectura sería posible establecer eficientes tiempos de residencia para los compuestos orgánicos y los iones metálicos a tratar.

### **2.3 Estequiometría en las bacterias sulfatorreductoras**

Los microorganismos obtienen energía para su crecimiento y mantenimiento celular por medio de dos procesos metabólicos denominados catabolismo y anabolismo. El catabolismo consiste en la producción de la energía necesaria para el mantenimiento

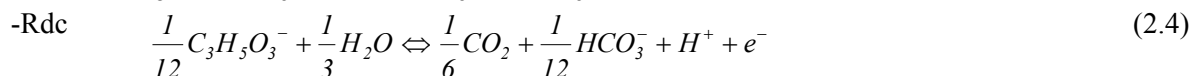
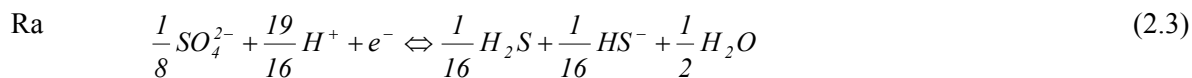
celular, el cual implica la degradación de cadenas largas de sustratos orgánicos a compuestos más simples. El anabolismo consiste en las reacciones de síntesis celular, a partir de una fuente de sustrato orgánico. Dichas reacciones son representadas como reacciones de óxido-reducción, las cuales son aditivas y se obtienen a partir de las reacciones de media celda del donador y el aceptor de electrones (Rittman y McCarty, 2001).

### 2.3.1 Reacciones de energía de las bacterias sulfatorreductoras

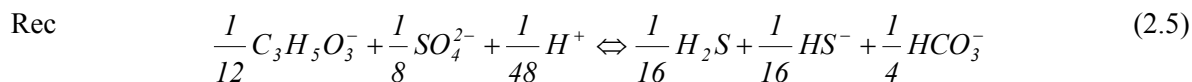
En el caso de la reacción que representa la obtención de energía (Re), Ecuación 2.2, se involucra la oxidación del donador de electrones (Rd) y la reducción del aceptor de electrones (Ra).

$$R_e = R_a - R_d \quad (2.2)$$

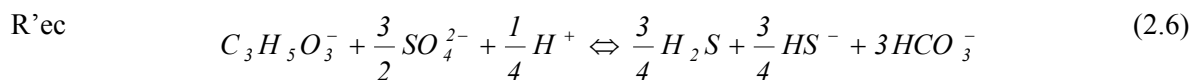
Por ejemplo, el sistema de ecuaciones que representa la reacción de reducción del sulfato (Ra), considerando la oxidación completa de lactato (Rdc, donde c representa oxidación completa) por equivalente de electrón, a pH de 7, es expresado de acuerdo a Rittman y McCarty (2001) como:



La reacción de energía durante la oxidación completa del sustrato (Rec), considerando las reacciones de ionización de carbonato-bicarbonato y dióxido de carbono a pH 7, se expresa como:



La reacción anterior se expresa por mol de sustrato orgánico como:

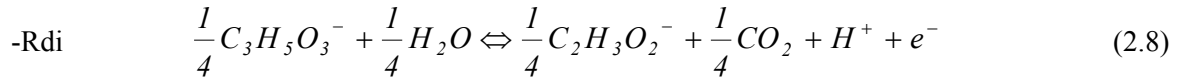


## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización

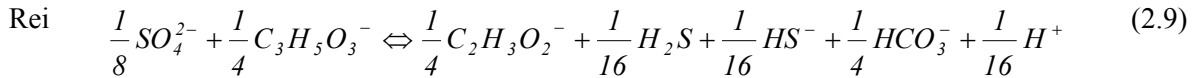
De estas ecuaciones de energía (2.5 y 2.6), se obtiene que la relación molar estequiométrica, entre la cantidad de lactato y sulfatos, es  $\sim 0.67$  (Ecuación 2.7):

$$\frac{\eta_{C_3H_5O_3^-}}{\eta_{SO_4^{2-}}} \approx 0.67 \quad (2.7)$$

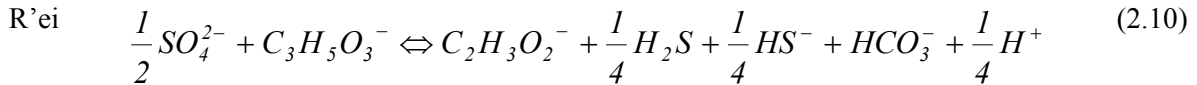
En el caso de reacciones de oxidación incompleta, la reacción de energía (Rei, donde i representa la oxidación incompleta) por equivalente de electrón, se obtiene considerando la Ecuación 2.3 y la reacción de media celda de la oxidación de lactato hacia acetato y CO<sub>2</sub>, Ecuación 2.8:



Con la suma de las reacciones de media celda, entre el donador y el aceptor de electrones y considerando los equilibrios de CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O a pH 7, la reacción Rei se expresa como:



La ecuación anterior expresada por mol de sustrato orgánico es:



Lo anterior permite establecer una relación molar de 2, entre la cantidad de lactato y sulfato, en un proceso de oxidación incompleta, Ecuación 2.11:

$$\frac{\eta_{C_3H_5O_3^-}}{\eta_{SO_4^{2-}}} = 2 \quad (2.11)$$

### 2.3.2 Reacciones de síntesis de las bacterias sulfatorreductoras

Debido a que las ecuaciones para obtención de energía (*cf.* Sección 2.3.1) no toman en cuenta el uso del sustrato para la síntesis celular, en esta sección se establecen las

## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización

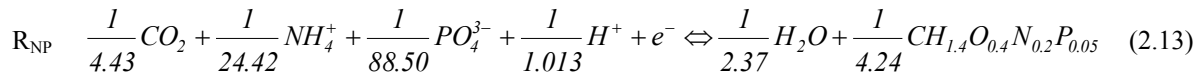
reacciones correspondientes para ajustar las relaciones estequiométricas anteriormente establecidas. En este caso, además del balance de carbono del sustrato, es necesario incluir los balances de nitrógeno (Atlas y Bartha, 1998) y fósforo (Rittman y McCarty, 2001) requeridos para el mantenimiento celular y síntesis de proteínas, entre otras funciones metabólicas como la generación de: ATP, fosfolípidos de la membrana celular y ácidos nucleicos.

Considerando la fórmula empírica que describe la biomasa de BSR,  $CH_{1.64}O_{0.33}N_{0.23}P_{0.048}$  (Okabe y Characklis, 1992), así como la presencia de lactato, amonio y fosfatos como sustrato orgánico, fuente de nitrógeno y fósforo respectivamente, la reacción de síntesis celular ( $R_s$ ) se expresa como:

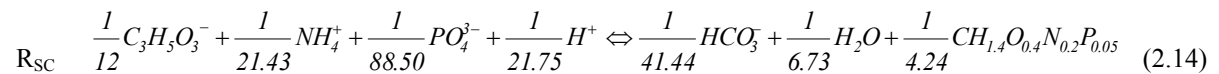
$$R_s = R_{NP} - R_d \quad (2.12)$$

Donde  $R_{NP}$  representa la reacción global de asimilación de nitrógeno y,  $R_d$  la reacción de oxidación de materia orgánica que puede ser completa (cf. Ecuación 2.4) o incompleta (cf. Ecuación 2.8).

Siguiendo lo propuesto por Rittman y McCarty (2001) y Okabe y Characklis (1992), la reacción global de asimilación de nitrógeno y fosforo, se representa como:

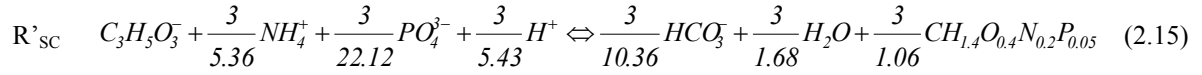


Por lo tanto, considerando la Ecuación 2.13, el equilibrio  $CO_2$ - $H_2O$  a pH 7, así como, una oxidación completa del sustrato, Ecuación 2.4, la reacción de síntesis celular ( $R_{sc}$ ) se expresa como:



La ecuación anterior expresada por mol de lactato es:

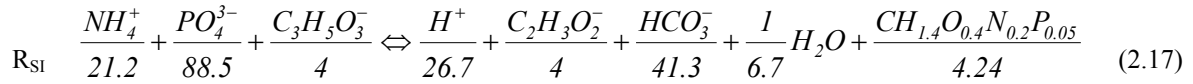
2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización



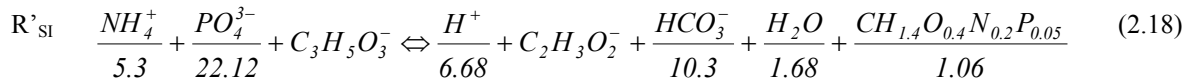
Lo anterior permite establecer una relación molar de  $\sim 0.35$ , para un proceso de oxidación completa, entre la cantidad de lactato y la cantidad biomasa de BSR sintetizada, Ecuación 2.16:

$$\frac{\eta_{C_3H_5O_3^-}}{\eta_{CH_{1.4}O_{0.4}N_{0.2}P_{0.05}}} \Leftrightarrow 0.35 \quad (2.16)$$

Finalmente, si se consideran la Ecuación 2.13, el equilibrio  $CO_2$ - $H_2O$  a pH 7, y para una oxidación incompleta del sustrato, Ecuación 2.8, la reacción de síntesis celular ( $R_{SI}$ ) se expresa como:



La Ecuación anterior expresada por mol de lactato es:



Por lo que finalmente, se puede concluir que la relación molar entre la cantidad de lactato y la cantidad biomasa de BSR sintetizada a través de un proceso de oxidación incompleta es  $\sim 0.94$ , Ecuación 2.19:

$$\frac{\eta_{C_3H_5O_3^-}}{\eta_{CH_{1.4}O_{0.4}N_{0.2}P_{0.05}}} \approx 0.94 \quad (2.19)$$

### 2.3.4 Fracción de electrones utilizada para energía y síntesis celular

Rittman y McCarty (2001) reportaron que durante el proceso de oxidación del sustrato orgánico, una fracción de electrones es utilizada para el mantenimiento celular ( $f_e^0$ ), mientras que otra es utilizada para su síntesis ( $f_s^0$ ). Siendo, la suma de las fracciones de electrones igual a 1 (Ecuación 2.20).

$$f_e^0 + f_s^0 = 1 \quad (2.20)$$

La reacción global para energía y síntesis celular ( $R_G$ ), Ecuación 2.21, puede obtenerse si las reacciones  $R_e$  y  $R_s$  son multiplicadas por las fracciones de electrones correspondientes (Ecuación 2.19). Valores para  $f_s^0$  en condiciones aerobias varían entre 0.6-0.7 y, en cultivos con crecimiento anaerobio,  $f_s^0$  es menor que  $f_e^0$  (Rittman y McCarty, 2001; Hatzikioseyan y Tsezos, 2006).

$$R_G = f_e^0 R_e + f_s^0 R_s \quad (2.21)$$

Las expresiones anteriores serán empleadas en este trabajo de tesis, para estimar la biomasa teórica con la producción de  $H_2S_{biog}$  obtenido experimentalmente y correlacionado con las desviaciones observadas en la biomasa medida experimentalmente.

## 2.4 Factores involucrados en la producción de sulfuro de hidrógeno y de biomasa

Los microorganismos requieren de nutrientes para producir energía y para llevar a cabo la síntesis celular. Dentro de los nutrientes esenciales se encuentra el agua, ya que constituye del 70 al 90 % del peso de la célula, otros elementos esenciales son hidrógeno, oxígeno, carbono, nitrógeno, fósforo y azufre. Estos elementos constituyen y desempeñan funciones específicas celulares, por ejemplo (Atlas y Bartha, 2005):

- Carbono: Constituyente de todos los componentes celulares orgánicos

## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización

- Oxígeno: Constituyente del agua, y de la mayoría de los componentes celulares orgánicos, que actúa como aceptor final de electrones en la respiración aeróbica
- Nitrógeno: Constituyente de las proteínas, ácidos nucleicos y coenzimas
- Hidrógeno: Constituyente del agua y de los componentes celulares orgánicos
- Fósforo: Constituyente de ácidos nucleicos, fosfolípidos y enzimas, importante en el transporte de electrones y en la transferencia de energía
- Azufre: Constituyente de algunos aminoácidos en las proteínas y de algunas coenzimas

Algunos otros nutrientes también son esenciales, aunque en cantidades menores, debido a que intervienen en el metabolismo estimulando la actividad enzimática; como el potasio, magnesio, calcio, hierro, manganeso, cobre y zinc. En ocasiones, ante déficit de nutrientes pueden requerir vitaminas para un adecuado crecimiento. Es importante que los microorganismos cuenten con una cantidad adecuada de nutrientes para su desarrollo, de lo contrario la cantidad de biomasa estará limitada por su carencia del nutriente, lo que es conocido como Ley de Liebig (Atlas y Bartha, 2005).

Además de los requerimientos nutritivos, existen algunos factores fisicoquímicos que influyen en el desarrollo y crecimiento de los organismos, incluyendo temperatura, potencial redox, pH e incluso la concentración de tóxicos en el ambiente. La Ley de tolerancia de Shelford establece que las variables abióticas mencionadas deben encontrarse dentro del umbral de tolerancia de los organismos, de lo contrario el organismo no sobrevivirá. Por lo tanto, en el caso de microorganismos, el éxito en su desarrollo dependerá tanto de sus necesidades nutritivas como de la tolerancia ambiental a las diversas variables abióticas (Atlas y Bartha, 2005).

Otro factor involucrado en las necesidades nutritivas es la disponibilidad de los nutrientes, ya que los elementos esenciales pueden estar presentes en el medio donde se desarrolla el microorganismo, pero en una forma no disponible para la célula, siendo esto un factor

limitante para el desarrollo del mismo. En la vida natural, las bacterias pueden estar expuestas a falta de nutrientes, por lo que deben desarrollar estrategias de supervivencia. Algunas de las estrategias que han sido observadas en diferentes estudios son (Atlas y Bartha, 2005):

1. Disminución de la necesidad del nutriente que escasea, por lo cual limitan sus componentes celulares que lo contienen
2. Inducción de sistemas de transporte con elevada afinidad del elemento que escasea
3. Disminución de la velocidad de crecimiento celular

### **2.5 Inhibición de los EPT en la actividad de las bacterias sulfatorreductoras**

Para la aplicación biotecnológica de las BSR es necesario conocer la inhibición de los EPT en la actividad de las bacterias, así como, la interacción entre especies químicas formadas biótica y abióticamente. Se han llevado a cabo diversos estudios para mostrar la inhibición de los EPT en los microorganismos (Båått 1989; Nies 1999; Rajapaksha *et al.*, 2004; Ålmås *et al.*, 2005). Båått (1989) propone que la inhibición de los metales pesados sobre los microorganismos del suelo decrece en el siguiente orden:  $Cd^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Pb^{2+}$ . Nies (1999) también reportó un orden similar de inhibición de cationes (denominada como concentración mínima inhibitoria) para cultivos de *Escherichia coli*, siendo paradójicamente el  $Pb^{2+}$  uno de los cationes con menor inhibición para las bacterias (Tabla 2.4). Sin embargo, bajo las condiciones experimentales indicadas (pH 7, 30°C), probablemente el plomo no se encontró disponible debido a la precipitación abiótica en solución.



## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización

**Tabla 2.4** Concentración mínima inhibitoria de iones metálicos tóxicos determinada en cultivos de *E. coli* (Nies, 1999).

Catión Metálico	CMI (mM)
Hg <sup>2+</sup>	0.01
Ag <sup>+</sup> , Au <sup>3+</sup>	0.02
CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Pd <sup>2+</sup>	0.2
Pt <sup>4+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	0.5
Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	1.0
Pb <sup>2+</sup>	5.0
Mn <sup>2+</sup>	20.0

Dentro de los impactos de las actividades mineras, sobre la actividad biológica de suelos agrícolas, Ålmås *et al.* (2005) estudiaron la actividad de las bacterias en suelos contaminados con Zn y Cd. En este estudio, se reportó que los microporos del suelo sirven de protección, a las comunidades bacterianas, contra el estrés químico ocasionado por elevadas concentraciones de estos elementos. Rajapaksha *et al.* (2004) reportaron que las bacterias son más sensibles, a concentraciones elevadas de Zn y Cu, en comparación con los hongos presentes en el suelo. Estos autores aseveran que existe una mayor relación antagónica entre las bacterias y los hongos, con respecto al Cu, es decir, el incremento en la concentración de Cu disminuye la actividad bacteriana y aumenta la actividad de los hongos.

En ambos estudios anteriormente citados, se evalúa la actividad biológica global del suelo y no el efecto de los metales con consorcios microbianos de actividad específica, como sería el caso de un consorcio de bacterias sulfatorreductoras. Con respecto a éstas, Cabrera *et al.* (2006) realizaron un estudio para evaluar la inhibición de dos cultivos de BSR (*Desulfovibrio sp.* y *Desulfovibrio vulgaris*) a concentraciones entre 1 y 20 ppm de Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>. En un cultivo constituido por *Desulfovibrio sp.* se obtuvo una mayor precipitación de los iones metálicos (71 % Cu<sup>2+</sup>, 66.2 % Mn<sup>2+</sup>, 96.1 % Ni<sup>2+</sup>, 93 % Zn) en comparación con el cultivo de *Desulfovibrio vulgaris*, en el cual la precipitación de los iones metálicos fue menor (45% Cu<sup>2+</sup>, 60% Mn<sup>2+</sup>, 96% Ni<sup>2+</sup>, 9% Zn<sup>2+</sup>). Debido a los resultados anteriores se concluyó que la actividad de la bacteria *Desulfovibrio sp.* es menos

inhibida, por la presencia de iones metálicos, que *Desulfovibrio vulgaris*. Sin embargo, la precipitación química no es una medida directa de la inhibición que pueda presentar algún microorganismo, ya que ésta se encuentra relacionada con la constante de afinidad al sustrato, así como a la cinética de consumo del mismo. Cinéticas altas de consumos de sustrato, asociadas a una generación más rápida de productos en el sistema, podrían disminuir el tiempo de contacto entre los microorganismos y el tóxico correspondiente.

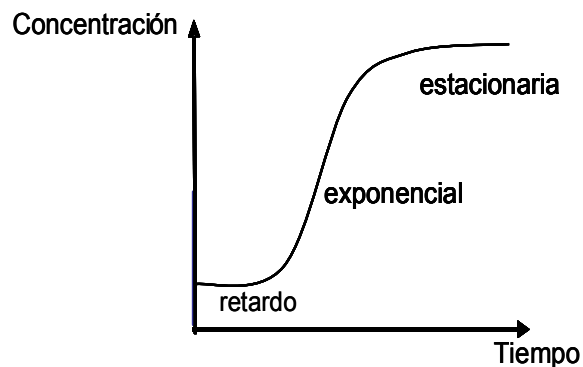
Sin embargo, en base a las concentraciones de los diferentes iones en solución del estudio de Cabrera *et al.* (2006), y empleando el programa de especiación HYDRA® (Puigdomenech, 2004), se evaluó que el cobre y el manganeso podrían precipitar abióticamente en forma de  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  y  $\text{Mn}(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ , cuando se tiene una fuente de fósforo como fosfato de potasio. De lo anterior, se presupone que los porcentajes de remoción biótica, reportada por dichos autores, podrían estar sobreestimados.

Por lo tanto, en los estudios de toxicidad es necesario considerar la fracción biodisponible de los elementos, al inicio de la experimentación, con la inhibición a factores abióticos de las comunidades microbianas. Así también, es necesario tomar en cuenta la dinámica de transición de los metales entre las diversas fases minerales del suelo como una función de la variación del potencial redox, el cual puede favorecer o no, la disponibilidad de los mismos.

## **2.6 Determinación de la tasa máxima de producción de $\text{H}_2\text{S}$ (Modelo de Gompertz)**

Las cinéticas producción de  $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$  de las BSR, en sistemas por lote, siguen una curva característica similar a la del crecimiento microbiano. Esta curva está constituida por tres diferentes fases: una fase de retardo, otra exponencial y una fase estacionaria. Dichas curvas caracterizadas por forma de “S” (Figura 2.3), permiten establecer la máxima tasa de cambio, ó velocidad específica de producción de  $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ , entre la fase de retardo y el punto donde se alcanza el estado estacionario.

## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización



**Figura 2.3** Representación del comportamiento característico de producción de  $H_2S_{biog}$  en un sistema por lote, caracterizada por tres fases: retardo, exponencial y estacionaria.

Para calcular la tasa de cambio, en esta tesis, los datos experimentales se ajustaron con un modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz, el cual ha sido ampliamente utilizado para crecimiento poblacional debido a sus menores desviaciones observadas, que cuando se emplean otros modelos. La mejor aproximación, obtenida con este modelo, radica en que éste considera las tres fases de crecimiento permitiendo disminuir el error y la incertidumbre de cálculo que cuando se emplean otros modelos (Piantanelli, 1986). Aunque el modelo de Gompertz es un modelo empírico, basado en el crecimiento poblacional de comunidades, es posible asociar los valores de los parámetros de ajuste a las tasas de producción de  $H_2S_{biog}$  observadas experimentalmente (Ortiz, 2004).

Los parámetros cinéticos obtenidos del modelo de Gompertz han sido utilizados en estudios biológicos para la estimación del máximo tiempo de vida celular. Este modelo también ha sido usado para describir el crecimiento microbiano en procesos de fermentación (Piantanelli, 1986) y en la industria alimenticia (Koutsoumanis *et al.*, 1998; Juárez Tomás *et al.*, 2002). En biotecnología ambiental, el modelo de Gompertz ha sido empleado para describir los procesos de bioaumentación de bacterias inoculadas en suelo (Vandepitte *et al.*, 1995), predecir el consumo de contaminantes (Ortiz, 2004) y modelar la producción de metano en un bioreactor donde se procesan desechos municipales sólidos (Lay *et al.*, 1998).

## 2. Antecedentes: Contaminación por inorgánicos y bioprocesos de estabilización

En esta tesis, tomando como referencia lo propuesto por Ortiz (2004), el modelo de Gompertz que representa la producción de  $H_2S_{biog}$ , PHS, en función del tiempo, puede ser representado por la siguiente expresión:

$$PHS = A \cdot \exp[-B \exp(-kt)] \quad (2.22)$$

Donde PHS es la concentración de  $H_2S_{biog}$  producido (en mM), K es la velocidad de producción de  $H_2S_{biog}$  (en  $h^{-1}$ ); A es la máxima concentración de  $H_2S_{biog}$  producido (en mM); t es el tiempo (en h), B es un parámetro adimensional definido por  $B = \exp(Kt_C)$  y  $t_C$  es el punto de inflexión que determina el punto de la máxima velocidad de PHS,  $V_{max,PHS}$ . La  $V_{max,PHS}$  esta expresada en  $mmol H_2S_{biog} g^{-1} SSV h^{-1}$  y puede ser calculada con los parámetros del modelo con la siguiente expresión (cf. Anexo A):

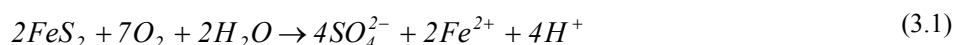
$$V_{max,PHS} = 0.386 Ak \quad (2.23)$$

### 3. JUSTIFICACION

#### 3.1 Alteración de sulfuros minerales por procesos de oxidación

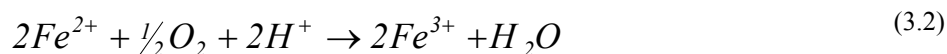
El transporte vía eólica y fluvial de los residuos mineros constituye un problema potencial de contaminación inorgánica. Como ejemplo puede mencionarse el transporte de los sulfuros hacia los suelos. Una vez depositados ahí y bajo condiciones óxicas, los sulfuros sufren procesos de oxidación, dando origen al denominado drenaje ácido de mina con liberación de metales pesados asociados a ellos (DAM-LM). El proceso oxidativo de los sulfuros no sólo ocasiona la contaminación de suelos, sino que además favorece la contaminación de aguas superficiales y subterráneas.

Uno de los principales minerales generadores de DAM-LM es la pirita, cuya oxidación química genera iones en solución como pueden ser sulfatos, iones ferrosos y protones (Blowes *et al.*, 2005):



Sin embargo, algunas bacterias como *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* utilizan sulfuros minerales como fuente de energía, lo que acelera el proceso oxidativo de los sulfuros. Al proceso anterior, donde la bacteria se adsorbe sobre la superficie del mineral, se le denomina mecanismo de oxidación directa.

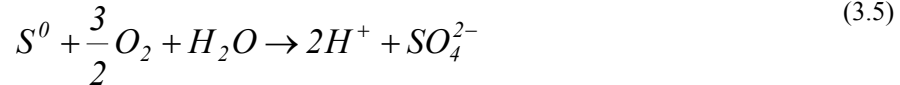
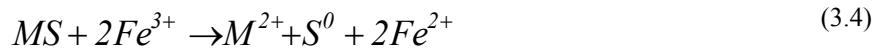
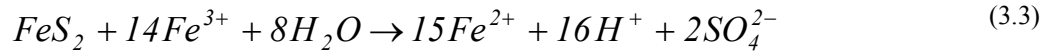
Una vez que el ion ferroso se encuentra en solución es susceptible de oxidarse al contacto con el oxígeno disuelto, formando ion férrico:



La reacción anterior también puede ser catalizada por algunas bacterias, entre las que se encuentran *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Leptospirillum thermoferrooxidans*, entre otras. Una vez que el ion férrico es formado, es capaz de actuar

### 3. Justificación

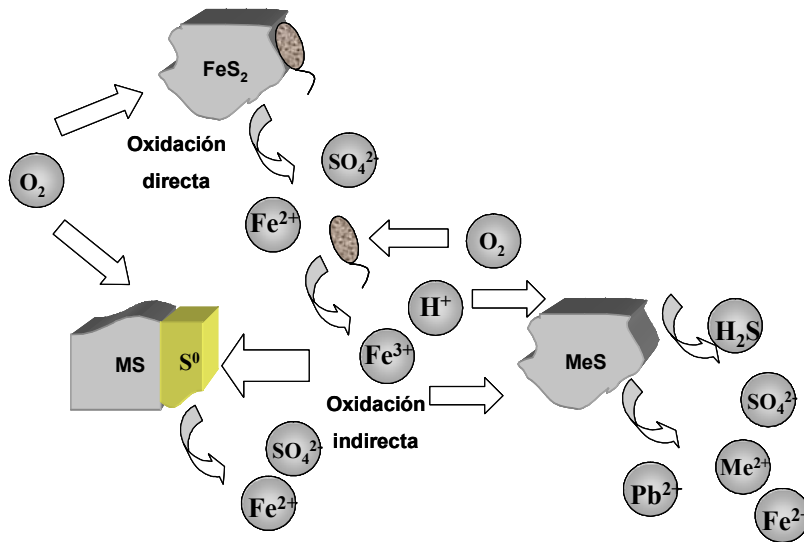
sobre la superficie de otros sulfuros (Ecuación 3.3), oxidando inclusive el azufre del mineral hasta azufre elemental (Ecuación 3.4), o completamente hasta sulfato (Ecuación 3.5) respectivamente. En caso de una oxidación parcial, el azufre elemental puede funcionar como una capa pasivante en la oxidación de otros sulfuros (Blowes *et al.*, 2005). Los procesos oxidativos donde el ion férrico es el agente oxidante se denominan mecanismos de oxidación indirecta (Blowes *et al.*, 2005).



Además de los mecanismos de oxidación anteriormente mencionados, la acidez generada en las reacciones anteriores, puede inducir condiciones de disolución ácida de los sulfuros (Ecuación 3.6).



La Figura 3.1 ilustra los diferentes mecanismos de oxidación anteriormente descritos:



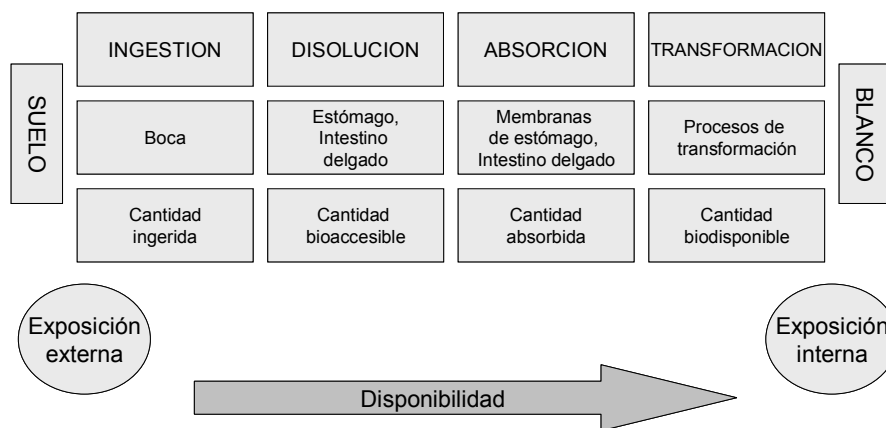
**Figura 3.1** Representación esquemática de la oxidación directa e indirecta de sulfuros metálicos (Modificado de Blowes *et al.*, 2005).

### 3. Justificación

La solubilidad de los sulfuros aumenta conforme el proceso de oxidación se lleva a cabo, originando la movilidad y disponibilidad de los elementos asociados a estas fases. Existen diferentes formas de estimar la alteración de los sulfuros, que van desde una simple inspección visual en campo (Fotografía 2.3.b) hasta pruebas en laboratorio. Estas últimas, incluyen la determinación de la concentración total, así como, las movilidades relativas en función de diversos agentes lixiviantes. Estas soluciones lixiviantes permiten estimar la fracción móvil, bioaccesible, o bien discernir entre las diferentes fases a las cuales se encuentran asociados los diferentes EPT (Extracción secuencial selectiva, ESS).

### 3.2 Biodisponibilidad y bioaccesibilidad de EPT

La ingesta de partículas que contienen EPT, conlleva a la disolución de éstos en el tracto digestivo debido a pH cercanos a 1. Esta condición aumenta el proceso de disolución y parte de los EPT disueltos pueden ser absorbidos, a través de la membrana del epitelio intestinal, incorporándose finalmente al torrente sanguíneo (fracción biodisponible). Durante las diferentes etapas de transporte el elemento libre puede sufrir transformaciones químicas, e incluso ser desechado antes de pasar al sistema circulatorio (Gron y Andersen, 2003). La Figura 3.2 ilustra las diferentes etapas involucradas en la disponibilidad del EPT, desde la ingesta hasta su transformación (Gron y Andersen, 2003).



**Figura 3.2** Diferentes etapas involucradas en la disponibilidad de EPT y su trayectoria: Ingestión, disolución, absorción y transformación (Gron y Andersen, 2003).

### 3. Justificación

La determinación de la biodisponibilidad de un EPT se puede llevar a cabo mediante pruebas *in vivo* o *in vitro*. Las pruebas *in vivo* se llevan a cabo en modelos animales y pueden incluir la intrusión del tóxico en una sección de intestino de un animal, cuantificación del tóxico en la excreción, cinética sanguínea y mediciones en el órgano blanco. Las pruebas *in vitro* de biodisponibilidad diferencian la fracción bioaccesible de aquella que puede ser absorbida (fracción biodisponible). En general la fracción bioaccesible en humanos, es referida a los procesos de disolución del contaminante que ocurren en el estómago durante la etapa de digestión. (Gron y Andersen, 2003).

Ruby *et al.* (1993) implementaron el método *in vitro* llamado PBET (por sus siglas en inglés: physiologically based extraction test) para determinar la bioaccesibilidad. Este procedimiento involucra las dos etapas de disolución, la fase gástrica y la intestinal. La extracción química se realiza utilizando pepsina, citrato, malato, ácido láctico y ácido acético como extractantes, a partir de los cuales se determina la cantidad de un metal que podría ser absorbido. Posteriormente, Ruby *et al.* (1996) compararon los resultados de la fracción bioaccesible de plomo y arsénico obtenidos en pruebas *in vivo* con los obtenidos utilizando el método PBET, encontrando que para el plomo existe un factor de correlación de 0.93, pero para el arsénico existió una sobreestimación entre un 2 y un 11 %.

Actualmente existe otro método, más simple, para la determinar la bioaccesibilidad de EPT en muestras sólidas, el cual se denomina SBRC (por sus siglas en inglés: solubility/bioavailability research consortium). Este método simula únicamente el proceso de disolución gástrica, y se realiza en una hora poniendo en contacto la muestra con una solución de glicina a pH de 1.5 a 37 °C (NAVFAC 2000; Razo 2006). Este método es el establecido en la NOM-147-SEMARNAT-2004 para la evaluación de las concentraciones bioaccesibles de EPT en suelos contaminados.

Cabe mencionar que una alta concentración de los elementos químicos en el suelo no necesariamente representa que exista un problema de contaminación. Un suelo puede poseer altas concentraciones de algún elemento en específico, pero puede ser que dicho



### 3. Justificación

elemento se encuentre en una forma no accesible para el ser humano. En cambio, un suelo puede contener una concentración moderada de algún elemento pero con un elevado porcentaje de bioaccesibilidad, lo que representaría un problema de mayor riesgo para la salud humana.

#### **3.3 Impacto de los EPT sobre salud pública**

Existen numerosos daños a la salud causados por los EPT, algunos de ellos se mencionan a continuación:

El cadmio (Cd) interactúa con las membranas biológicas desplazando al calcio (Ca) y al sodio (Na). Además interactúa con grupos tiol (-SH) de proteínas y otras biomoléculas. En humanos y animales la exposición crónica al Cd causa daños renales. Se ha observado también, que tanto en el riñón, como en el hígado y en el cerebro fetal, se da la mayor acumulación corporal de este elemento (Webb, 1972; Cervantes y Moreno, 1999).

El zinc ha sido poco estudiado desde el punto de vista toxicológico. Aunque es uno de los componentes principales de enzimas y proteínas, a concentraciones elevadas las células sufren inhibición debido a la competencia del Zn con nutrientes como el magnesio (Nies, 1999). También se ha encontrado que este elemento causa irritación del tracto intestinal (Gron y Andersen, 2003).

Aunque el cobre es un elemento esencial para algunas proteínas, en concentraciones elevadas resulta tóxico para las células. La toxicidad es atribuida a la capacidad del cobre para generar radicales libres, afectando ácidos nucleicos y sitios activos de enzimas.

La toxicidad del arsénico depende de su estado de oxidación. Se estima que el arsenito ( $\text{AsO}_3^{3-}$ ) es cien veces más tóxico que el arseniato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ). La toxicidad del  $\text{As}^{3+}$  es debida principalmente a la unión con los grupos tiol de las proteínas. La toxicidad del  $\text{As}^{5+}$  está asociada a su comportamiento análogo con el fosfato, por lo que su presencia impide la síntesis de ATP (Cervantes y Moreno 1999). Los síntomas por intoxicación con arsénico

### 3. Justificación

son dificultad para deglutir, dolor muscular, debilidad y boca seca, así como náuseas, vómito y dolor abdominal seguido de diarrea. Una exposición prolongada al arsénico generará daños en la piel consistente con la aparición de pigmentos y malformaciones en la piel, lo que se conoce como melano-queratosis o dermatosis arsenical. El arsénico, también tiene efectos en el sistema cardiovascular, inclusive puede causar cirrosis hepática y cáncer en los seres humanos (WHO, 2000; Davis *et al.*, 2001).

Con respecto al plomo, este es un metal de alta toxicidad para el ser humano. Su toxicidad también está relacionada con su interacción con grupos tiol, a concentraciones  $\mu\text{M}$ , inhibe ciertas enzimas ATPasas, el transporte de electrones y la actividad de otras enzimas (Cervantes y Moreno, 1999). La toxicidad crónica de plomo produce síndrome neuromuscular que involucra parálisis del sistema nervioso, incluso causa anemia debido a que inhibe las enzimas necesarias para la producción del grupo hemo. Este elemento, también es causante de esterilidad en ambos sexos, así como de malformaciones congénitas y hasta desarrollo neurológico anormal. El plomo también causa efectos adversos en el sistema cardiovascular. Estos efectos pueden ser miocarditis, alteraciones en la tasa de actividad del corazón e hipertensión. Estudios realizados en ratas han demostrado que el acetato de plomo tiene efectos adversos en las habilidades motoras, además de producir arritmias cardíacas (Jonhson, 1998). También disminuye el sistema inmune haciendo al organismo más susceptible a infecciones bacterianas y virales. La toxicidad de plomo se ve favorecida a bajas concentraciones de hierro y calcio. El efecto adverso de este metal también puede repercutir en la habilidad del aprendizaje, en la impulsividad, hiperactividad, e incluso ha sido asociado a comportamiento criminal (Jonhson, 1998). Existen dos compuestos inorgánicos de plomo que han sido listados como posibles causantes de cáncer por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer, estos son el acetato de plomo y el fosfato de plomo (Jonhson, 1998).

#### **3.4 Asociaciones mineralógicas del plomo**

El plomo puede encontrarse de diferentes formas en el medioambiente, sin embargo, la más estable de ellas es el clorofosfato de plomo. Estos compuestos, en condiciones óxicas

### 3. Justificación

poseen una menor solubilidad en comparación con óxidos, hidróxidos, carbonatos y sulfatos. La Tabla 3.1 muestra las diferentes constantes de solubilidad estimadas para algunas asociaciones mineralógicas de plomo (Ruby *et al.*, 1994). Como se puede observar en la Tabla 3.1, todas las piromorfitas poseen una menor solubilidad en comparación con la anglesita ( $\text{PbSO}_4$ ), cerusita ( $\text{PbCO}_3$ ), galena ( $\text{PbS}$ ) y litargirio ( $\text{PbO}$ ) y esta solubilidad está relacionada con el grupo halogenado sustituido (X).

La secuencia de productos de solubilidad de las piromorfitas es la siguiente:

Cloropiromorfita ( $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ ) > bromopiromorfita ( $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Br}$ ) > hidroxipiromorfita ( $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) > fluoropiromorfita ( $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ )

**Tabla 3.1** Asociaciones mineralógicas del plomo y su correspondiente solubilidad teórica

Fase de Plomo	Estequiometría	Log kps
Litargirio	$\text{PbO}$	12.9
Anglesita	$\text{PbSO}_4$	-7.7
Cerusita	$\text{PbCO}_3$	-12.8
Galena	$\text{PbS}$	-27.5
Cloropiromorfita	$\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$	-84.4
Hidroxipiromorfita	$\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	-76.8
Fluoropiromorfita	$\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	-71.6
Bromopiromorfita	$\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Br}$	-78.1

Sin embargo, Nriagu (1974) menciona que los fosfatos de plomo pueden ser disociados bajo condiciones anóxicas ( $E_h \sim -270$  mV,  $\text{pH}=9$ ) formando sulfuros de plomo.

La concentración basal de plomo en el suelo oscila entre 10 y 70  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Sin embargo en zonas de intensa actividad minera se han reportado concentraciones de 21500  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . En el suelo, el plomo se encuentra asociado a arcillas, óxidos y oxihidroxidos de hierro y manganeso, así como, a materia orgánica y sulfuros (Kabata-Pendias y Pendias, 2000).



## 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### **Hipótesis.**

Comunidades de bacterias sulfatorreductoras aisladas de sitios con altas concentraciones bioaccesibles de plomo, presentan menor inhibición en su actividad biológica ante la presencia de este elemento. El sulfuro de hidrógeno producido por estas comunidades puede ser empleado para la estabilización de EPT, debido a la formación de sulfuros metálicos de baja solubilidad. Con la formación de fases con menores productos de solubilidad se pretende disminuir la fracción bioaccesible de EPT, y por ende, riesgo de suelos impactados por la industria minero-metalúrgica.

### **Objetivo**

Evaluar la disminución de la fracción bioaccesible de plomo, a través de un tratamiento *ex situ* de producción de sulfuro de hidrógeno, empleando bacterias que presentan actividad reductora de sulfatos; aisladas de suelos impactados por actividad minero-metalúrgica.

#### **Objetivos específicos:**

- Aislar comunidades microbianas con actividad sulfato-reductora de suelos impactados por las actividades minero-metalúrgicas.
- Determinar la máxima concentración de plomo a la cual pueden ser expuestos los consorcios bacterianos, aislados de los suelos de estudio.
- Determinar los parámetros de operación-control de una columna de estabilización de suelos.
- Evaluar la disminución de la fracción bioaccesible de plomo estabilizado en un sistema con actividad reductora de sulfatos.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS PARA PRUEBAS DE ESTABILIZACIÓN DE INORGÁNICOS

### 5.1 Toma de muestras

La toma de muestras de suelo se llevó a cabo en los municipios de Villa de la Paz y Matehuala en San Luis Potosí, México, lugar en el cual se han reportado problemas de contaminación por EPT en agua y suelo (Razo 2004; 2006). Se realizaron 3 muestreos para la recolección de muestras sólidas, las cuales fueron determinadas en función de los mapas de isoconcentración EPT elaborados por Razo (2002) y por los elevados porcentajes de bioaccesibilidad determinados en estudios preliminares de Razo (2006). Las muestras fueron identificadas y las fechas de muestreo y posición geográfica (UTM: Universal Transversal de Mercator) se indican en la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1** Identificación de las muestras, su ubicación en coordenadas UTM y su fecha de recolección

Identificación de Muestra	Coordenadas en Proyección UTM (metros)		Fecha de muestreo dd/mm/año
	X	Y	
P1	332723	2617499	07/10/2005
M1	328038	2619190	22/01/2006
M2	330951	2618767	22/01/2006
M3	332424	2618054	22/01/2006
J1	327697	2619237	22/01/2006
J2	326763	2619185	22/01/2006
JH	325175	2619209	6/04/2006

Las coordenadas anteriores fueron convertidas a coordenadas geográficas (Tabla 5.2) utilizando el programa TRANINV WEB para la zona 14, a la cual pertenece el área de estudio (INEGI 2007), de esta manera fue posible ubicar los puntos de muestreo en imágenes geográficas obtenidas con Google Earth (Google, 2008).

## 5. Materiales y métodos para pruebas de estabilización de inorgánicos

**Tabla 5.2** Ubicación de los puntos de muestreo en coordenadas geográficas

Muestra	Coordenadas Geográficas					
	Longitud			latitud		
	grados	minutos	segundos	grados	minutos	segundos
P1	100	38	24.288	23	39	384
M1	100	41	10.715	23	40	32.591
M2	100	39	27.684	23	40	19.956
M3	100	38	36.573	23	39	58.994
J1	100	41	23.906	23	40	35.678
J2	100	41	55.716	23	40	27.012
JH	100	42	51.768	23	40	27.192

Las muestras denominadas M1, J1, J2 y JH se recolectaron en Villa de la Paz (Figura 5.1a), de las cuales J1 y M1 pertenecen a muestras de suelo, J2 pertenece a la presa de jales que se encuentra actualmente en operación y JH pertenece a la presa de jales histórica. La muestra de suelo M2 fue recolectada en una zona que se encuentra entre ambos municipios (Figura 5.1b), mientras que las muestras de suelo P1 y M3 fueron recolectadas cerca de la antigua planta de fundición en el municipio de Matehuala (Figura 5.1c).

Todas las muestras pertenecen al perfil de 0-40 cm de profundidad, con excepción de P1, la cual fue tomada en el perfil de 0-10 cm de profundidad. Posterior a su recolección, éstas fueron introducidas en bolsas de nylon conteniendo sobres generadores de ambientes anaerobios Gaspac<sup>TM</sup>.



## 5. Materiales y métodos para pruebas de estabilización de inorgánicos



**Figura 5.1** Ubicación geográfica de los puntos de recolección de las muestras de suelo y jales: a) JH, J1, J2, M1 en Villa de la Paz; b) M2 entre Matchuala y Villa de la Paz; c) P1 y M3 en Matchuala (Google Earth®, 2008).

## 5.2 Caracterización fisicoquímica

Previo a las caracterizaciones fisicoquímicas que se mencionan a continuación, todas las muestras fueron secadas a 40 ° C en una estufa (LUMISTELL, Mod. HEC-41).

### 5.2.1 Determinación de fases mineralógicas primarias y densidad de las muestras

Como etapa inicial de la caracterización de las muestras recolectadas se identificaron las fases mineralógicas presentes mediante difracción de rayos X, para ello se empleó un difractómetro de rayos X (Rigaku, Mod. DMAX 2200). La densidad de las muestras fue determinada utilizando el método del picnómetro (Blake y Hartge, 1986).

### 5.2.2 Análisis químicos

La extracción total de EPT contenido en los suelos, y jales, se determinó mediante digestión total con una mezcla ácida (HNO<sub>3</sub>:HCl; 25%:10% V/V) en un horno de microondas (CEM, Mod. MDS-2000) a 1200 W, 350 PSI y 170 °C. Como estándar de referencia, para estimar los porcentajes de recuperación del método de digestión, se utilizó el NIST 2710.

Como criterio de estabilización de metales y de acuerdo a lo establecido en la norma oficial mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, en esta tesis, se emplea la prueba de bioaccesibilidad *in vitro* SBRC (Solubility/Bioavailability Research Consortium), la cual se describe en el Anexo B (NAVFAC, 2000).

Se emplearon dos protocolos para la determinación de la movilidad de EPT los cuales fueron el método ASTM D 3987-85 y el método de extracción con ácido acético descrito en la norma NOM-053-ECOL/1993 (*cf.* Anexo C).

Las concentraciones de los metales y del arsénico en las soluciones obtenidas, con los diferentes métodos de extracción, fueron analizadas mediante espectrometría de absorción

atómica (EAA) con un espectrómetro (Varian Spectra, Mod. AA 220). Para concentraciones de arsénico inferiores a 3 ppm, se utilizó un espectrómetro de absorción atómica (Perkin Elmer, Mod Analyst 200) equipado con un sistema FIAS 100, acoplado a un generador de hidruros (Perkin Elmer).

### **5.3 Obtención de inóculos de consorcios bacterianos con actividad reductora de sulfatos**

Con el objetivo de obtener consorcios microbianos, de bacterias sulfatorreductoras (BSR), se realizaron aislamientos de las muestras recolectadas. Todos los aislamientos se realizaron a una temperatura de 30°C y bajo el siguiente protocolo: un gramo de la muestra (e.g. P1) fue colocado en tubos de ensaye conteniendo medio líquido Postgate C modificado (Postgate, 1984), cuya composición fue (en mg•L<sup>-1</sup>): NH<sub>4</sub>Cl (1000), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (500), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4500), CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O (40), MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (60), FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (4), tioglicolato de sodio (100), ácido ascórbico (100), piruvato de sodio (1100), lactato de sodio (2.3 mL). Después un mes de incubación y para los tubos de ensaye que presentaron coloraciones oscuras (indicativo de la presencia de sulfuros de hierro), una alícuota fue trasladada a cajas Petri conteniendo medio sólido Postgate C. La composición para el medio sólido enriquecido no varió en comparación con la del líquido, excepto por la adición de 10 g•L<sup>-1</sup> de agar-agar que no es consumido por los microorganismos y le da una consistencia sólida al medio.

Durante la inoculación se aplicó la técnica de resiembra por estría, posteriormente las cajas Petri inoculadas fueron trasladadas a una jarra de anaerobiosis. Después de un mes de incubación, las colonias que presentaron coloración oscura en el medio sólido fueron trasladadas a botellas serológicas de 125 mL con la misma composición del medio mencionada anteriormente. Este tipo de aislamiento final fue el punto de partida para las cinéticas de producción de sulfuro que se describen en la Sección 7.2. Todos los medios de cultivo, antes de ser inoculados, fueron esterilizados en autoclave en dos intervalos de 15 minutos cada uno a 120 °C y 15 psig. El pH fue ajustado a 7 con NaOH utilizando un potenciómetro Thermo Orion 420A+.

#### 5.4 Determinación de la estequiometría utilizada en la cinética de producción de sulfuro

Únicamente con el propósito de determinar la cantidad de sustrato orgánico a utilizarse en este estudio se empleó la relación entre la demanda química de oxígeno (DQO) y el sustrato orgánico, para ello se estableció la reacción de oxidación del lactato hasta su mineralización ( $\text{CO}_2$ ) y agua (Ecuación 5.1).



Si la ecuación anterior es representada en gramos, entonces la relación en masa entre el lactato y el oxígeno es:

$$\frac{\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3^-}{356} = \frac{\text{DQO}}{384} \quad (5.2)$$

En este trabajo inicialmente se utilizó un gramo de DQO equivalente a  $0.93 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactato ( $1.04 \times 10^{-2} \text{ M}$ ), Ecuación 5.2 y, de acuerdo a la relación estequiométrica molar lactato-sulfatos de la Ecuación 2.7,  $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3^-/\text{SO}_4^{2-} = 0.67$ , se requirieron  $0.0156 \text{ M}$  ( $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de sulfatos.

Posteriormente, de acuerdo a lo expuesto por Celis (2004) para la evaluación de toxicidad de sulfuro en BSR, se agregó un segundo pulso de lactato de  $0.93 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  con una DQO total utilizada de  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Celis, 2004).

#### 5.5 Cinéticas de producción de sulfuro

Todas las cinéticas de producción de sulfuro se realizaron por duplicado, en botellas serológicas de 125 mL, a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  y con una agitación de 100 rpm en un agitador orbital (Max<sup>Q</sup>, Mod. 2000). Todos los reactivos empleados en los medios de cultivo fueron de alta pureza (JT Baker), exceptuando el tioglicolato de sodio (Bioxon). La determinación del

## 5. Materiales y métodos para pruebas de estabilización de inorgánicos

$H_2S_{\text{biog}}$  acumulado se llevó a cabo utilizando el método turbidimétrico de Cord-Ruwisch (1985) con un espectrofotómetro UV-Vis (Beckman, D.U. 650).

Los estudios de cinética consistieron básicamente en determinar la velocidad de producción de sulfuro ( $V_{\text{max, PSH}}$ ) con y sin la presencia de plomo en los cultivos. El propósito de la presencia de plomo en los cultivos fue conocer la máxima concentración de este elemento a la cual las bacterias pueden ser expuestas y muestran actividad reductora de sulfatos.

La composición del medio de cultivo para los estudios de las cinéticas microbianas, considerando únicamente al lactato como fuente de materia orgánica, fue ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1000),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (500),  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (40), tioglicolato de sodio (100), ácido ascórbico (100), lactato de sodio ( $2.9 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Como se mencionó en la sección anterior, el lactato de sodio fue agregado en dos pulsos, el primero al momento de la preparación del medio y el segundo después de un tiempo de adaptación de aproximadamente 70 h. Con el objetivo de que todas las cinéticas microbianas partieran teóricamente sin sulfuro de hidrógeno en el medio, se adiciono una cantidad inicial de sulfato ferroso para la precipitación del sulfuro presente con el hierro (II). Por lo tanto, las diferentes fuentes de sulfatos empleados en las cinéticas, variaron en función de la cantidad de ion ferroso necesario para precipitar el sulfuro biogénico contenido en el inóculo. Sin embargo, la concentración total de sulfatos adicionados inicialmente fue de  $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

De esta forma, las cinéticas de producción de  $H_2S_{\text{biog}}$  evaluadas con el consorcio P1, se realizaron en botellas serológicas de 125 ml, empleando 5 mL de inóculo del consorcio P1 aislado y obtenido inicialmente (*cf.* Sección 5.3). En todos los cultivos, la composición total de de sulfatos en el medio fue de  $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a partir de las siguientes sales:  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (2.183),  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.06) y  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.0118) (Labastida *et al.*, 2007).

En este estudio el segundo pulso de lactato se agregó a las 72 horas, de acuerdo a las pruebas de inhibición evaluadas por Celis (2004). El plomo fue agregado como  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (Fisher) y se estudiaron las siguientes concentraciones (en  $\mu\text{M Pb}^{2+}$ ): 34.1, 169, 337, 1687 y 3380. Los sistemas de reacción se realizaron por duplicado y fueron identificados en orden creciente de concentración como: P1Pb1, P1Pb2, P1Pb3, P1Pb4, P1Pb5. Las

## 5. Materiales y métodos para pruebas de estabilización de inorgánicos

concentraciones de exposición a plomo fueron especificadas, como múltiplos y submúltiplos logarítmicos, a partir de la concentración móvil de plomo determinada experimentalmente (*cf.* Sección 5.2.2). Los resultados de estas cinéticas se presentan en la Sección 7.1.4. A un sistema de reacción sin presencia de plomo, se le considero el cultivo de control y se identificó como P1Pb0. La identificación de cada una de las cinéticas, en función de las concentraciones de plomo, se presenta en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3** Claves para la identificación de concentraciones de plomo empleadas en las cinéticas con el consorcio microbiano aislado del sitio P1.

Clave de identificación	P1Pb0	P1Pb1	P1Pb2	P1Pb3	P1Pb4	P1Pb5
Concentración de plomo ( $\mu\text{M}$ ):	0	34.1	169	337	1687	3380

La evaluación de las cinéticas para el segundo consorcio microbiano, evaluado en esta tesis, e identificado como consorcio JH, se realizó agregando el segundo pulso de lactato en un tiempo de 66 h. Además, la composición de sulfatos en este caso fue de ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , (28),  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (154),  $\text{NaSO}_4$  (2104). En este caso, a diferencia del consorcio P1, se consideró una concentración más de plomo de 2530  $\mu\text{M}$ . Los cultivos fueron denominados ( $\mu\text{M Pb}^{2+}$ ): JHPb1 (34.1), JHPb2 (169), JHPb3 (337), JHPb4 (1687), JHPb5 (2530), JHPb6 (3380). Análogamente al consorcio P1, se observó la producción de sulfuro en un cultivo control sin la presencia de plomo denominado JHPb0. La identificación de cada una de las cinéticas, con el consorcio JH, en función de las concentraciones se plomo se presentan en la Tabla 5.4.

**Tabla 5.4** Claves para la identificación de concentraciones de plomo empleadas en las cinéticas con el consorcio microbiano aislado del sitio JH.

Clave de identificación	JHPb0	JHPb1	JHPb2	JHPb3	JHPb4	JHPb5	JHPb6
Concentración de plomo ( $\mu\text{M}$ )	0	34.1	169	337	1687	2530	3380

Además en ambos consorcios, P1y JH, para saber si existió producción de  $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$  por respiración endógena, se preparó un cultivo (RE) con la misma composición del medio mineral pero sin la adición de lactato. Todos los cultivos fueron preparados por duplicado.

Por último, con respecto a la generación de las cinéticas microbianas, se realizaron experimentos de producción de sulfuros con déficit de fosfato con el consorcio JH. En estas cinéticas, la composición de sulfatos fue de  $1500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  que se introdujeron al sistema en las siguientes concentraciones ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (56),  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (199),  $\text{NaSO}_4$  (2063). El protocolo de implementación de estas cinéticas fue similar a lo descrito anteriormente, pero se varió la concentración de fosfatos en el sistema. Las concentraciones de fosfato evaluadas fueron seleccionadas considerando el remanente, después de su probable precipitación abiótica con el plomo, en el sistema (*cf.* Sección 7.2.5). Por lo tanto, este estudio se llevó a cabo para las correspondientes concentraciones biodisponibles de fosfato de los cultivos JHPb3, JHPb4, JHPb5 y JHPb6, donde el efecto del déficit de fosfato y/o la inhibición por plomo es más evidente, este hecho se discute en la sección de resultados (*cf.* Sección 7.2.13). Las concentraciones de fosfatos evaluadas bajo el criterio anteriormente descrito fueron (en  $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ ): 3470, 2660, 2150, 1640. Con el objetivo de observar crecimiento microbiano aun a menores concentraciones de fosfato biodisponible, se consideró una concentración de fosfato menor e igual a  $820 \mu\text{M}$ . Estos cultivos fueron identificados como F3, F4, F5, F6 y F7 respectivamente, y comparados con un cultivo conteniendo la concentración de fosfato recomendada para el medio Postgate ( $3670 \mu\text{M PO}_4^{3-}$ ), el cual fue identificado como F0 (Tabla 5.5).

**Tabla 5.5** Claves para la identificación de concentraciones de fosfato empleadas en las cinéticas con el consorcio microbiano aislado del sitio JH.

Clave de identificación	F0	F3	F4	F5	F6	F7
Concentración de fosfato (en $\mu\text{M}$ )	3670	3470	2660	2150	1640	820

### 5.6 Evaluación de la producción de biomasa de consorcios con actividad reductora de sulfatos

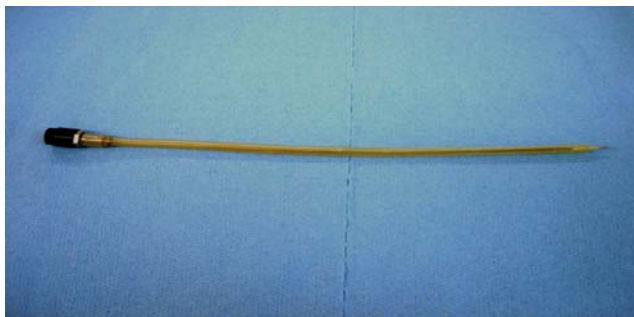
La biomasa de los consorcios de BSR, obtenida al término de cada estudio cinético, fue cuantificada como sólidos suspendidos volátiles (SSV), de acuerdo al método estándar 2540 E descrito en el Anexo E (APHA, 2005).

## 5.7 Electrodo para la determinación del potencial de óxido-reducción

Los electrodos empleados en este trabajo de tesis, fueron construidos *ex profeso* para adecuarse a las características del sistema experimental empleado. Las medidas de diferencia de potencial fueron obtenidas con un electrodo de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Detalles de la construcción se describen a continuación.

### 5.7.1 Electrodo de Platino

Se construyeron electrodos de una longitud entre 15 y 18 cm, diseñados específicamente para este estudio (Lázaro, 2006). Así entonces se utilizó alambre de platino de 2mm de diámetro, de cual se cortaron piezas de 30 mm de longitud, que fueron unidas a alambre de cobre empleado como conector; la unión entre el alambre de platino y el alambre de cobre se realizó con soldadura de plata. Como cuerpo del electrodo se utilizó tubo de Teflón® especial “heat shrink tubing”, denominado así ya que reduce su diámetro por calentamiento y además le proporciona rigidez. La longitud del tubo era tal que, permitiera que al introducir el ensamble de platino-cobre en uno de sus extremos, el alambre de platino sobresaliera 2 cm. En el otro extremo la punta de cobre se sueldó a un conector tipo hembra para conexión externa. Una vez realizado esto, el cuerpo del electrodo (conteniendo el ensamble), fue sometido a una temperatura de 200 °C por cinco minutos en una estufa LUMISTELL, Mod. HEC-41, con esto se aseguró que el ensamble platino-cobre y el conector quedarán sellados y además se tuviera un electrodo rígido. Posterior al calentamiento se retiró de la estufa, y dejó enfriar a temperatura ambiente.



**Fotografía 5.1** Electrodo de trabajo colocado dentro de su cuerpo de electrodo (plástico heat shrink tubing).

En el extremo izquierdo se observa el conector hembra y en el extremo derecho el platino.



### 5.7.1 Electrodo de referencia Ag/AgCl

Para la preparación de estos electrodos se empleó alambre de plata de 2 mm de diámetro. Se cortaron piezas de 15 cm de longitud, y en una primera etapa se recubrieron electrolíticamente con un depósito de AgCl. Para llevar a cabo esto, se emplearon 2 piezas de alambre de plata, las cuales se introdujeron en un tubo de ensaye conteniendo solución de KCl 3M, este arreglo funcionó como una celda de electrólisis. Los alambres fueron conectados a una fuente de poder Marca GW, Modelo GPR-3060D, con la cual se aplicó el voltaje necesario para alcanzar una corriente de ~5 mA por cinco minutos, el alambre en la posición de ánodo (polo positivo) fue entonces oxidado, con lo cual se produce una capa de AgCl sobre la superficie del alambre de plata. Dado que la conexión al la fuente de poder se hizo directamente sobre el alambre de plata, cada alambre así preparado, tenía un extremo (2 cm) sin recubrimiento. El cuerpo del electrodo fue preparado con el mismo material arriba mencionado, solo que en este caso el calentamiento se realizo antes de introducir el alambre de Ag/AgCl. Asimismo, para este electrodo se colocó en un extremo del tubo de Teflón® una punta cilíndrica de Vycor® de 3.175 mm de diámetro y de espesor. El tubo con la punta se introdujeron en una estufa a una temperatura de 200 °C, por cinco minutos, teniendo cuidado de que asome al menos 1 mm de la punta de Vycor®. Posterior al enfriamiento y ya con el tubo rígido, cada extremo conteniendo el Vycor® fue colocado por 24 horas en una solución 0.1 N de HCl para limpiar impurezas. Una vez realizado ésto, se enjuagó con agua desionizada, se llenó con solución de KCl 3M y se introdujo el alambre de Ag/AgCl, dejando una distancia de 1 cm con respecto a la punta de Vycor® (parte interna). Para evitar contaminación de la solución, el extremo abierto se selló con silicón y se recubrió con cinta Teflón®. Cabe mencionar que en dicho extremo abierto se dejó un segmento de alambre de plata libre, de aproximadamente 1 cm, para realizar conexiones y tomar las lecturas correspondientes.

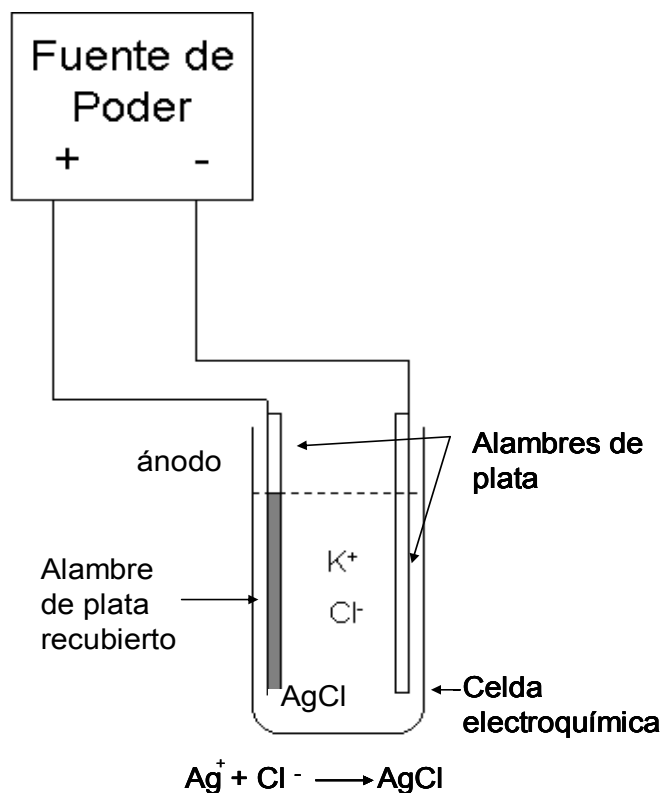
Con el propósito de comprobar la funcionalidad de los electrodos, éstos se midieron contra un electrodo comercial de Ag/AgCl (Bass Analytical). La diferencia de potencial entre ambos electrodos era cercana cero, comprobando así que tienen un potencial muy similar (197 mV/SHE). Las lecturas obtenidas mostraron una incertidumbre máxima de  $\pm 5.4$  mV.

## 5. Materiales y métodos para pruebas de estabilización de inorgánicos

Una vez verificada la funcionalidad de cada electrodo construido, las lecturas del potencial de óxido-reducción se realizaron conectando ambos electrodos (platino y referencia) a un multímetro digital (Protek, Mod. 506).

Una característica sobresaliente de estos electrodos es que pueden construirse de una manera relativamente sencilla, además de que pueden ser calibrados las veces que sean necesarias. Basta con retirar la capa de silicón, recubrir la superficie del alambre de plata y colocarlo nuevamente en el cuerpo del electrodo, con la respectiva solución de KCl.

En este estudio, todas las lecturas de potencial de óxido-reducción son reportadas con respecto al electrodo estándar de hidrógeno (SHE).



**Figura 5.2** Diagrama simplificado del recubrimiento de los electrodos.

## 5. Materiales y métodos para pruebas de estabilización de inorgánicos



**Fotografía 5.2** Electrodo de referencia Ag/AgCl, colocado dentro del cuerpo de electrodo conteniendo el Vycor® en el extremo izquierdo.

### 5.8 Determinaciones de potencial redox en botellas serológicas

Con el objetivo de establecer la equivalencia entre el potencial de óxido-reducción y la concentración de  $H_2S_{biog}$ , se realizaron lecturas de potencial de óxido-reducción en botellas serológicas durante las cinéticas de producción de sulfuro. Las determinaciones del potencial redox se realizaron introduciendo dos electrodos, uno de trabajo y uno de referencia, como los descritos anteriormente. Por cada determinación de  $H_2S_{biog}$ , se realizó una lectura de potencial redox conectando los electrodos correspondientes a un multímetro Protek, Mod. 506.

### 5.9 Estabilizaciones en la columna de percolación

Para las pruebas de estabilizaciones de plomo, contenido en la muestra JH, en columna de percolación, la zona inferior de distribución de flujo se empaco con aserrín. La zona biológica se empaco con una mezcla de aserrín e inóculo JH. El inóculo en esta etapa se obtuvo de 2 botellas serológicas (0.12L) que contenían el consorcio aislado de JH, y al cual se le cambió el medio de cultivo periódicamente, durante 5 meses, hasta obtener una concentración de biomasa final de  $\sim 400 \text{ mg SSV} \cdot \text{L}^{-1}$

El medio de cultivo utilizado en la columna de estabilización, tuvo la composición equivalente a la cinética microbiana del consorcio JH0. El flujo volumétrico en la columna se estableció en  $\sim 0.19 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$  con una bomba peristáltica (Stenner, Mod. 45M5).

## 5. Materiales y métodos para pruebas de estabilización de inorgánicos

Las pruebas de estabilizaciones en la columna de percolación se realizaron utilizando 150 g de la muestra JH (*cf.* Sección 7.3.1). Una vez concluido el tiempo teórico estimado para llevar a cabo la estabilización, 50 g de la muestra húmeda estabilizada fue trasladada a un vaso de precipitado para determinar la fracción de sólidos, como lo sugiere la NOM-141-SEMARNAT-2003. Lo anterior se llevo a cabo, con el objetivo de determinar el peso de la fracción húmeda equivalente a 1 g de suelo seco y, de esta forma, realizar la prueba de bioaccesibilidad considerando la muestra húmeda (sin secado). El protocolo anterior se propone para evitar etapas de alteración de las “nuevas” fases formadas durante el tratamiento biológico.

Durante las pruebas de estabilización de EPT en las columnas de percolación con actividad reductora de sulfatos, la evolución del potencial redox con respecto al tiempo fue utilizada como respuesta de la evolución en la producción del sulfuro biogénico. Además, de los puertos de muestreo establecidos en la columna (*cf.* Capítulo 6), se retiraron aproximadamente 1.5 mL de solución siendo colocados en viales de 2 mL de capacidad para la determinación del pH, la cual se realizó con un electrodo de ROSS (metrohm) especial para micromuestras.

### **5.10 Microanálisis, identificación y observación de fases mineralógicas por EDS-MEB**

Las fases asociadas al plomo formadas en los estudios de cinética, así como en las pruebas de estabilización de metales, fueron microanalizadas cuantitativamente utilizando espectroscopia de energía dispersa (EDS; EDAX, Mod. DX4) asociado al microscopio electrónico de barrido (MEB; Philips, modelo XL30). Con el objetivo de identificar las diferentes fases presentes, en los microanálisis realizados, se utilizó el detector de electrones electrodispersados (BSE). La identificación de fases de los estudios de cinética se realizó colocando el residuo de la calcinación de los sólidos suspendidos volátiles sobre soportes de aluminio, los cuales fueron posteriormente recubiertos con carbón para su microanálisis.

## 5. Materiales y métodos para pruebas de estabilización de inorgánicos

Con el objetivo de evitar procesos de oxidación durante el secado, en estufa, de las muestras provenientes de las columnas de estabilización, éstas fueron liofilizadas y almacenada al vacío hasta su observación al MEB. Posteriormente, los residuos tratados se prepararon sobre probetas de resina epóxica para su posterior análisis en el MEB.



## 6. DISEÑO DE COLUMNA PARA LA ESTABILIZACIÓN DE METALES EN SUELOS

Las lecturas del potencial redox son muy importantes en cualquier estudio hidrológico y geoquímico debido a que este parámetro tiene un efecto en las especies de los compuestos químicos presentes y, por lo tanto, en su respectiva movilidad. Además, los procesos biológicos también son dependientes del potencial redox presente en el medio, por ejemplo, las BSR se desarrollan eficazmente a potenciales redox (Eh) cercanos a -200 mV/SHE (*cf.* Capítulo 2). Por lo tanto, para conocer la evolución de un sistema biológico con reducción de sulfatos se propone en esta tesis conocer de manera *in situ* la variación del potencial redox del sistema.

En el presente estudio se propone el uso de una columna de flujo ascendente con puertos de muestreo a lo largo de la misma, en los cuales se colocan los electrodos de trabajo y de referencia (*cf.* Sección 5.7). Dichos electrodos pueden ser desmontados y tienen la ventaja de que los electrodos de referencia pueden ser calibrados nuevamente al final de cada prueba. La lectura del potencial redox se realiza de manera intersticial colocando dos puertos de muestreo separados diametralmente, uno para el electrodo de referencia y otro para el electrodo de trabajo. Se propone además la instalación, a lo largo de la columna, de puntos de muestreo para líquido a través de puertos sellados con septas de neopreno, que permitan obtener una pequeña cantidad de muestra para determinar el perfil de pH a través de la columna.

La columna de estabilización con flujo ascendente (Figura 6.1) fue construida en acrílico de 6" de espesor, con un diámetro interior de 4 cm y una longitud de 50 cm. Esta relación 1:10 diámetro:longitud fue definida para disminuir la formación de canales preferenciales de flujo (Froment y Bischoff, 1990). El sistema de columna fue segmentado y distribuido en 3 partes. La especificación de cada parte, en orden descendente, se describe a continuación:

## 6. Diseño de columna para la estabilización de metales en suelos

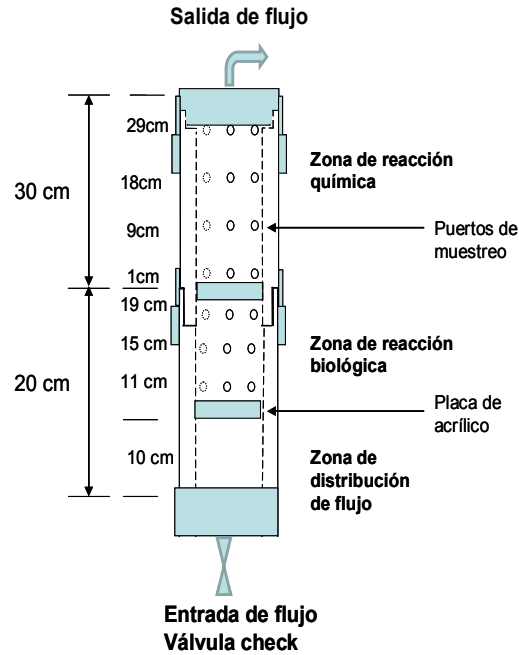
- Zona de estabilización química: Esta zona fue diseñada para tratar un máximo de 1 kg de muestra en el estudio, con un volumen máximo de  $\sim 380 \text{ cm}^3$  y una longitud de 30 cm, y consta de 4 puertos de muestreo.
- Zona de reacción biológica: Esta zona está constituida por 10 cm de largo y consta de 3 puertos de muestreo anteriormente mencionados. En este sitio se colocan las BSR mezcladas con aserrín formando una zona biológicamente reactiva en la cual se lleva a cabo el consumo de lactato y la reducción de sulfato a sulfuro de hidrógeno. El flujo ascendente transporta el sulfuro de hidrógeno hacia la zona de estabilización del suelo mencionada anteriormente.
- Zona de distribución de flujo: Esta zona está constituida por 10 cm de largo a la entrada del sistema, en donde se colocó aserrín como material de soporte para la biomasa y distribuidor de flujo. El aserrín fue lavado y esterilizado previo a su uso como soporte en la columna.

Para evitar la mezcla de las diferentes zonas se utilizó una placa de acrílico con orificios para el paso uniforme de agua, cubierta por filtros de  $0.45 \mu\text{m}$  para evitar la pérdida de biomasa. A la entrada del sistema se colocó una válvula check.

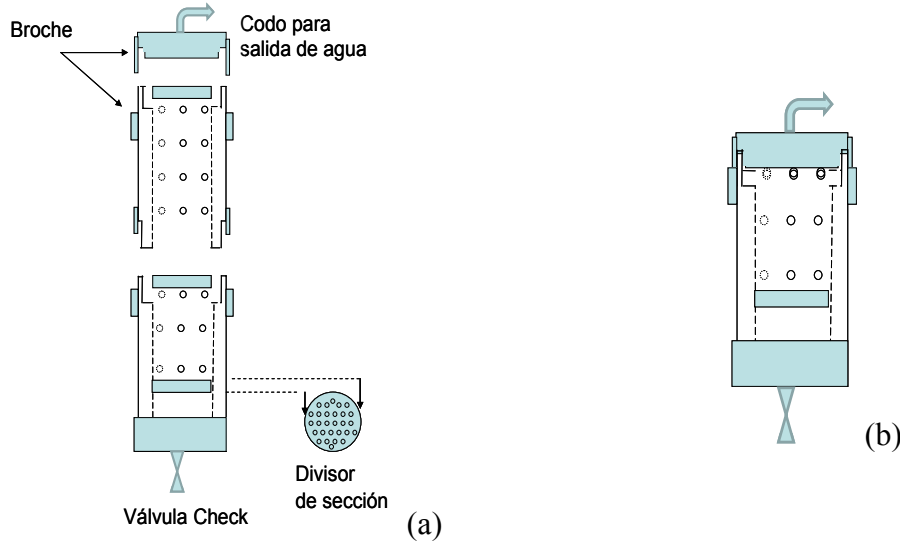
Un aspecto sobresaliente de este diseño de columna es que las zonas de estabilización y biológica son desmontables (Figura 6.2a). Esta característica fue diseñada con el objetivo de establecer primeramente las condiciones redox necesarias para las BSR, es decir, se coloca el inóculo de bacterias, se satura con medio de cultivo y posteriormente se coloca la tapa de salida de flujo sobre esta sección (Figura 6.2b). Una vez que se alcanzan las condiciones de actividad biológica sulfato-reductora, es posible colocar la tercera sección del dispositivo, la cual contiene el suelo a ser estabilizado (zona de estabilización química) y finalmente la tapa de salida de flujo. Si se desea mantener activas las bacterias para pruebas de estabilización posteriores basta con desmontar la zona química, colocar la tapa de salida de flujo en la zona biológica y circular medio de cultivo de manera periódica.



6. Diseño de columna para la estabilización de metales en suelos



**Figura 6.1** Diseño de columna para la estabilización de metales con cada una de sus secciones, zona de estabilización (suelo), zona biológica (consorcio microbiano), zona de distribución de flujo (aserrín).



**Figura 6.2** Secciones desmontables de la columna: (a) Distribución de flujo y biológicamente reactiva así como de estabilización química. (b) Secciones de reacción biológica y de distribución de flujo, necesarias para alcanzar las condiciones de potencial redox, que evidencian una actividad microbiana reductora de sulfatos.



## **7. RESULTADOS Y DISCUSIONES SOBRE CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESTABILIZACIÓN BIOLÓGICA DE SUELOS**

### **7.1 Resultados sobre la caracterización de muestras de suelo y residuos mineros**

Considerando que el principal objetivo de un proceso de remediación de suelo es la protección de la salud humana y del medio ambiente, antes de decidir la estrategia de remediación a seguir, es necesario conocer algunas características físicoquímicas del suelo a ser tratado. Algunas de esas características son la composición mineral del mismo, la concentración total de los metales, la concentración capaz de lixiviarse a través de suelo (móvil), así como la fracción potencialmente disponible para los seres humanos y definida como la concentración bioaccesible.

Cuando se evalúa el sulfuro de hidrógeno biogénico como técnica de remediación de suelos a escala laboratorio, en columnas de percolación, es recomendable utilizar suelos previamente caracterizados, con un alto grado de bioaccesibilidad o movilidad. Esto se decidió en función de poder comparar los cambios provocados después de la prueba de estabilización en las columnas. De esta forma, es posible evaluar la eficiencia de la estabilización de EPT empleando pruebas de movilidad, extracción secuencial selectiva o métodos *in vitro* para determinación de bioaccesibilidad de EPT. Por lo tanto, con el objetivo de elegir la muestra a ser considerada para someterse a un proceso de estabilización en columnas de percolación se realizó la caracterización físicoquímica preliminar de algunas muestras de suelo y jales mineros. Los puntos de muestreo, identificación, ubicación y toma de muestra se presentaron en la Tabla 5.1.

La caracterización físicoquímica preliminar de las muestras consistió del análisis de la concentración total de EPT, difracción de rayos X, densidad, así como, de la determinación de la concentración bioaccesible y móvil de los EPT descritos previamente (*cf.* Sección 5.2.2).

### 7.1.1 Concentración total de EPT en las muestras de suelo y residuos mineros

La concentración total de metales pesados y arsénico obtenida mediante la digestión en horno de microondas es reportado en la Tabla 7.1. Estos resultados muestran que las concentraciones totales de arsénico y/o plomo de las muestras M1, J1 y P1 son menores que en las muestras J2, M2, M3 y JH, por lo que estas últimas fueron las muestras consideradas como potenciales casos de estudio, para ser estabilizadas en las columnas de flujo ascendente. Además, considerando que la NOM -147-SEMARNAT/SSA1-2004 establece, como criterio para remediación, concentraciones de referencia totales de plomo de 800  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (para suelos industriales), se optó por preseleccionar las muestras M2, M3, J2 y JH para las siguientes pruebas de movilidad, bioaccesibilidad y selección final de muestra.

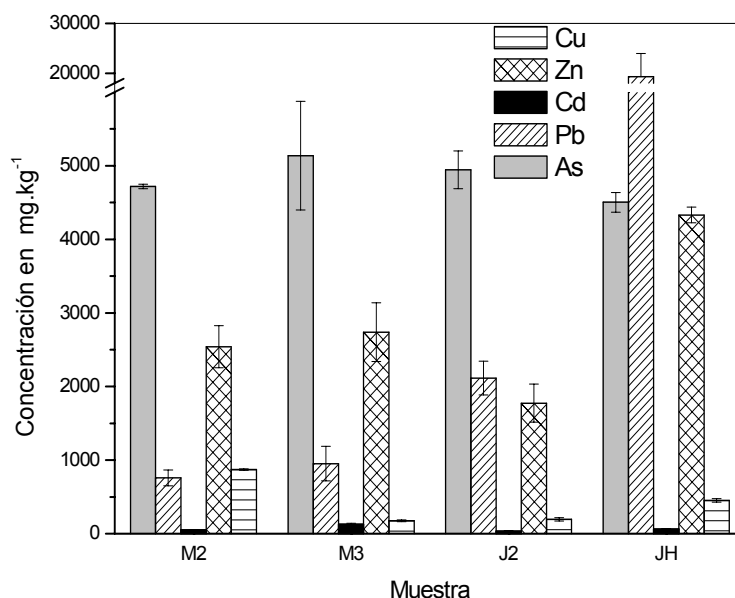
Los porcentajes de recuperación de EPT, utilizando el NIST 2710 como estándar de control, fueron: arsénico ~90 %, plomo ~80 %, cadmio ~83 %, zinc ~72 %, cobre ~70 %, hierro ~80 %. Estos porcentajes determinan el porcentaje de incertidumbre del valor obtenido en las muestras analizadas.

**Tabla 7.1** Concentraciones totales de EPT en las muestras recolectadas

Elemento	Concentración de EPT en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , excepto donde se indica <sup>b</sup>								% Rec.
	P1	M1	M2	M3	J1	J2	JH	NIST 2710	
<b>As</b>	385	205	4719 ± 31	5138 ± 738	2000	4944 ± 256	4.5 ± 1.3 <sup>b</sup>	556	90
<b>Pb</b>	284	192	758 ± 108	951 ± 236	422	2114 ± 229	19.3 ± 4.6 <sup>b</sup>	4344	80
<b>Cd</b>	16	9	50 ± 2	127 ± 14	26	36 ± 2	64 ± 3	18	83
<b>Zn</b>	280	315	2540 ± 285	2739 ± 399	1070	1773 ± 258	4331 ± 106	5000	72
<b>Cu</b>	133	212	871 ± 11	175 ± 11	1580	194 ± 25	451 ± 24	2025	70
<b>Fe</b>	18.9 <sup>b</sup>	18.9 <sup>b</sup>	53 ± 1.2 <sup>b</sup>	21.4 ± 2.9 <sup>b</sup>	67.5 <sup>b</sup>	30.9 ± 7.9 <sup>b</sup>	8.2 ± 7.7 <sup>b</sup>	25.5 <sup>b</sup>	80

La desviación estándar corresponde a duplicados (n=2). % Rec: se refiere al porcentaje de recuperación obtenido para cada elemento con el NIST 2710. <sup>b</sup> está referido en  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

La concentración total de los EPT para las muestras JH, J2, M3 y M2 es mostrado en la Figura 7.1, donde se observa que todas las muestras poseen una concentración total de arsénico similar. Sin embargo, esto no implica necesariamente que todas las muestras posean el mismo grado de riesgo debido a la presencia de este elemento. Además, también se aprecia que la muestra JH es la que presenta la mayor concentración de plomo (19313  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). De hecho, esta concentración es mayor en comparación al resto de las muestras, siendo  $\sim 9$  veces más grande que la de J2,  $\sim 920$  veces más grande que M3 y  $\sim 25$  veces más grande que M2. Además del plomo, en JH también se presenta la mayor concentración de zinc (4331  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).



**Figura 7.1** Concentraciones totales de arsénico, plomo, zinc y cobre en las muestras M2, M3, J2 y JH.

Las barras representan la desviación estándar de duplicados.

### 7.1.2 Fases primarias de las muestras seleccionadas y su respectiva densidad

De los resultados de digestión total se preseleccionaron cuatro muestras en función del contenido total de EPT, las cuales fueron (M2, M3, J2 y JH). Los difractogramas obtenidos se encuentran en el Anexo F. Todas las muestras analizadas se encuentran constituidas

## 7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

principalmente por calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) y cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ). Sin embargo, en la muestra M2 se encuentran también algunos feldespatos, como la albita ( $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$ ) y algunas formas de carbonatos de calcio más estables que la calcita, como la aragonita. El caso más complejo lo presentó JH, debido a que presenta numerosos picos de baja intensidad, a lo largo de  $2\theta$ , los cuales podrían estar relacionados a la formación de fases amorfas provenientes de diferentes procesos de alteración de los minerales constituyentes de este sitio. Se identificó también, la presencia de fases cristalinas que contienen hierro (II), como es la Clinoferrosilita ( $\text{Fe}^{2+}_{1.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Si}_2\text{O}_6$ ).

Por otra parte, los resultados de las pruebas de densidad, de las muestras preseleccionadas, se reportan en la Tabla 7.2. Estos valores de densidad permiten establecer la cantidad de material que puede ser tratado en las columnas de percolación prediseñadas para este estudio.

**Tabla 7.2** Densidad de las muestras de suelo y jales, seleccionadas como potenciales casos de estudio

Muestra	Densidad (en $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )
M2	$3.49 \pm 0.152$
M3	$2.25 \pm 0.050$
J2	$2.40 \pm 0.036$
JH	$2.76 \pm 0.012$
El valor representa el promedio de duplicados	

### 7.1.3 Concentración bioaccesible de EPT en las muestras seleccionadas

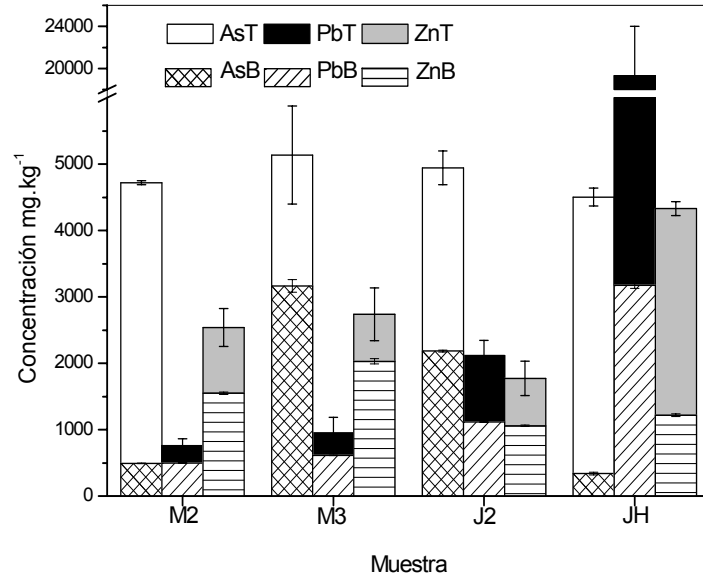
Los resultados de la prueba de bioaccesibilidad se presentan en la Tabla 7.3. Sin embargo, al momento de analizar la bioaccesibilidad, suele ser más útil contrastar para cada muestra la concentración bioaccesible contra la concentración total del elemento en cuestión.

**Tabla 7.3** Concentración bioaccesible de EPT en las muestras M2, M3, J2 y JH, empleando el protocolo SBRC

Elemento	Concentración (en mg•kg <sup>-1</sup> ):			
	M2	M3	J2	JH
<b>As</b>	495 ± 5	3165 ± 95	2185 ± 15	340 ± 20
<b>Pb</b>	500 ± 6	614 ± 6	1115 ± 5	3175 ± 45
<b>Cd</b>	36 ± 0	108 ± 2	30 ± 0	60 ± 2
<b>Zn</b>	1550 ± 20	2030 ± 40	1060 ± 10	1220 ± 20
<b>Cu</b>	274 ± 5	95 ± 2	126 ± 3	83 ± 0.5
<b>Fe</b>	2380 ± 30	2015 ± 65	5395 ± 105	404 ± 7

La desviación estándar corresponde a duplicados (n=2)

Con la consideración anterior, en la Figura 7.2 se aprecia la concentración total (T) de arsénico, plomo y zinc (AsT, PbT y ZnT respectivamente), así como la concentración bioaccesible (B) de estos elementos (AsB, PbB y ZnB respectivamente). Así mismo, en la Figura 7.3 se presentan los resultados correspondientes para cadmio y cobre; y finalmente la Figura 7.4 presenta los resultados para el hierro. Las figuras mencionadas anteriormente permiten diferenciar, en base a la concentración bioaccesible, aquellas muestras que representan un mayor problema de contaminación, considerando que mientras mayor sea la concentración bioaccesible mayor es el impacto en los diferentes receptores ambientales. Por ejemplo, en el caso del arsénico, se observa que las concentraciones totales son similares para las muestras M2, M3, J2 y JH (Figura 7.2). Sin embargo, en dos de ellas (M2 y JH), presenta porcentajes bioaccesibles, con respecto a la concentración total, del 10 y 8 % respectivamente. En cambio, el porcentaje bioaccesible del arsénico en J2 es de un 44 %, y en M3 del 62 %. El resultado obtenido en M3 sugiere la presencia de fases secundarias de arsénico susceptibles de ser lixiviados en medios ácidos, como podrían ser óxidos de arsénico (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), encontrados con frecuencia en sitios donde se encuentran plantas de fundición (Smedley y Kinniburgh, 2002), como es el caso donde se recolectó dicha muestra (*cf.* Sección 5.1).



**Figura 7.2** Concentraciones totales de arsénico, plomo, zinc y su respectiva bioaccesibilidad, en las muestras M2, M3, J2 y JH. La letra T representa la concentración total y la B representa la concentración bioaccesible para cada EPT respectivamente. Las barras representan la desviación estándar de duplicados.

Con respecto al plomo (Figura 7.2), se observa que las muestras M2, J2 y M3 presentan una bioaccesibilidad del 66 % ( $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 53 % ( $1115 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) y del 65 % ( $614 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) con respecto a la concentración total respectivamente, en tanto que JH presenta solamente el 16 % bioaccesible. Aunque en términos de porcentaje dicho valor aparentemente es más bajo que las demás muestras, considerando la alta concentración total de plomo en esta muestra este porcentaje equivale a  $3175 \text{ mg Pb}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Lo cual implica una concentración bioaccesible superior con respecto a las demás muestras. La alta bioaccesibilidad de JH se encuentra asociada a procesos de alteración de las fases primarias como los sulfuros de plomo ( $k_{ps} = 10^{-27.5}$ ), el cual ha originado la aparición de fases secundarias de mayor solubilidad y que pueden incluir oxihidróxidos de hierro con una mayor cristalinidad, como se observó en el DRX de esta muestra (*cf.* Apéndice F, Figura F.1d). Además, las fases secundarias, menos estables termodinámicamente de los sulfuros de plomo, podrían ser sulfatos de plomo ( $k_{ps} = 10^{-7.7}$ ) o incluso los carbonatos de plomo ( $k_{ps} = 10^{-12.8}$ ) característicos de los suelos gipsicos-carbonatados del sitio de estudio.

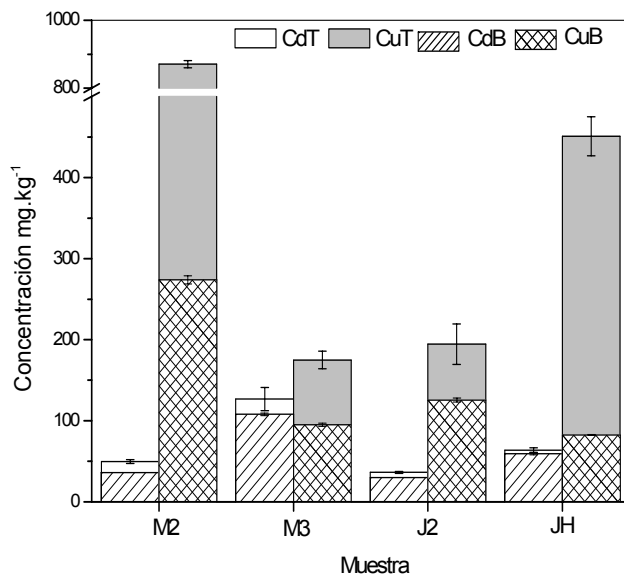


Además del plomo, en la muestra de JH, se presenta la mayor concentración total de zinc ( $4331 \text{ mg Zn}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), la cual es mayor a la concentración de M2 y M3 ( $2540$  y  $2739 \text{ mg Zn}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Sin embargo, en términos de bioaccesibilidad la concentración en JH, con respecto al zinc ( $1220 \text{ mg Zn}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), es menor que en M2 y M3 ( $1550$  y  $2030 \text{ mg Zn}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), por lo que en este caso el riesgo asociado a la presencia de zinc es más evidente en M3.

En cuanto al cadmio, como se puede observar en la Figura 7.1, en todas las muestras analizadas las concentraciones totales en suelo se encuentran por debajo de las concentraciones de referencia totales establecidos, en la NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004, para suelos industriales ( $450 \text{ mg Cd}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Sin embargo, en todos los casos el porcentaje bioaccesible de este elemento se encuentra por arriba del 70 %. Este resultado probablemente se debe a que el cadmio suele formar complejos estables en solución con compuestos orgánicos, como son los que se presentan en el protocolo empleado para evaluar la bioaccesibilidad (*cf.* Anexo B), lo cual favorece su movilidad entre los diversos receptores ambientales del suelo (fases primarias, secundarias, materia orgánica y biota).

La Figura 7.3, también presenta las concentraciones totales de cobre en las diferentes muestras, y en todas ellas se observa que se encuentra por debajo de los  $1000 \text{ mg Cu}\cdot\text{kg}^{-1}$ , siendo M2 la muestra con una mayor concentración bioaccesible ( $274 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Este elemento, no se encuentra normado, pero es importante determinarlo para establecer los balances de masa entre todos los elementos que pueden tener asociación con el sulfuro que será producido en el sistema de tratamiento.

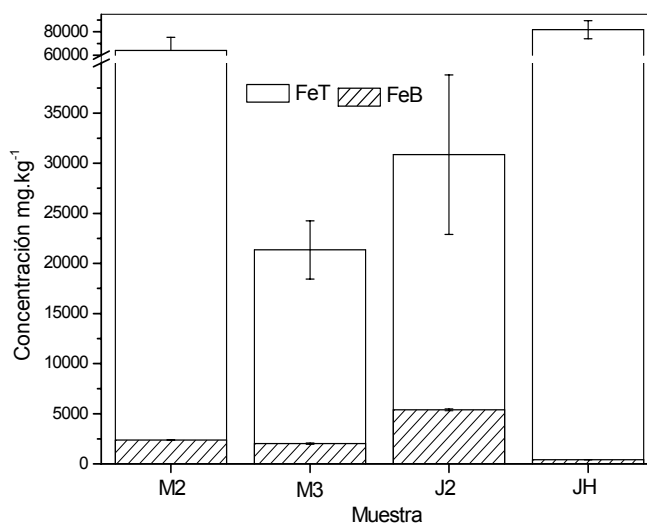
## 7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos



**Figura 7.3** Concentración total de cobre y cadmio, así como su respectiva bioaccesibilidad, en las muestras M2, M3, J2 y JH. La letra T representa la concentración total y la B representa la concentración bioaccesible respectivamente. Las barras representan la desviación estándar de duplicados.

Como se mencionó anteriormente, el hierro es el elemento predominante en las muestras analizadas, la concentración total y bioaccesible se muestra en la Figura 7.4. A pesar de que este elemento no se encuentra regulado en el NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, es importante conocer las cantidades que podría consumir el sulfuro biogénico del sistema de estabilización que se propone en esta tesis. Los resultados indican que J2 presenta la mayor concentración bioaccesible de este elemento ( $5395 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) siendo esta muestra la que se encuentra en la zona actual de disposición de jales. La muestra JH, que se encuentra en la presa más antigua de disposición de jales, es la que presenta la menor bioaccesibilidad, resultado probablemente asociado a una mayor estabilidad de este elemento por el tiempo de intemperización que ha pasado en este sitio.

## 7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos



**Figura 7.4** Concentración total de hierro (FeT) y su respectiva bioaccesibilidad (FeB). Las barras representan la desviación estándar de duplicados.

### 7.1.4 Concentración móvil de los EPT en las muestras preseleccionadas

Los resultados obtenidos simulando el contacto del agua meteórica con la matriz sólida se muestran en la Tabla 7.4, mientras que los resultados simulando el contacto de la matriz sólida con la solución de ácido acético (*cf.* Anexo C) son presentados en la Tabla 7.5. En ambos resultados la relación sólido-líquido fue 1-20, como lo establecen los respectivos protocolos (*cf.* Anexo C).

**Tabla 7.4** Resultados de la prueba de movilidad de EPT de acuerdo al protocolo ASTM 3987, utilizando agua meteórica como extractante

Elemento	Movilidad agua meteórica (mg.kg <sup>-1</sup> )			
	M2	M3	J2	JH
As	22.27±3.33	117±6	8.09±0.39	2.78±0.34
Pb	<2	<2	<2	<2
Cd	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4
Zn	7.6 ±0.6	6 ±1.2	6.2 ±0.2	4.4 ±0
Fe	3.9±0.1	3.2±0.5	<1.2	1.2±0

Los resultados para la movilidad con agua meteórica también se presentan en la Figura 7.5,

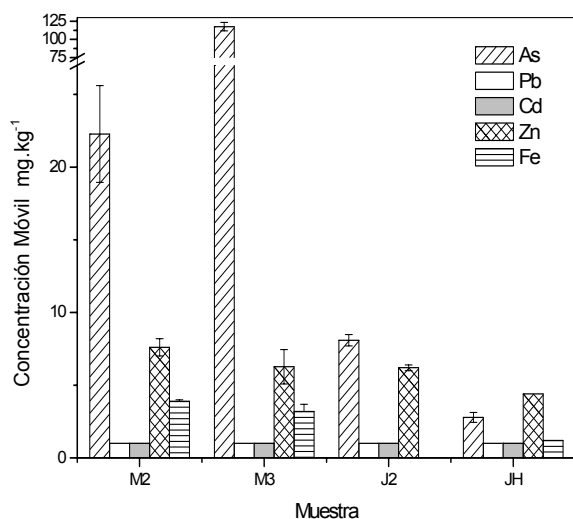
7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

en la cual se observa que la muestra M3, recuperada en el sitio de la fundición, posee la mayor concentración móvil de arsénico ( $117 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

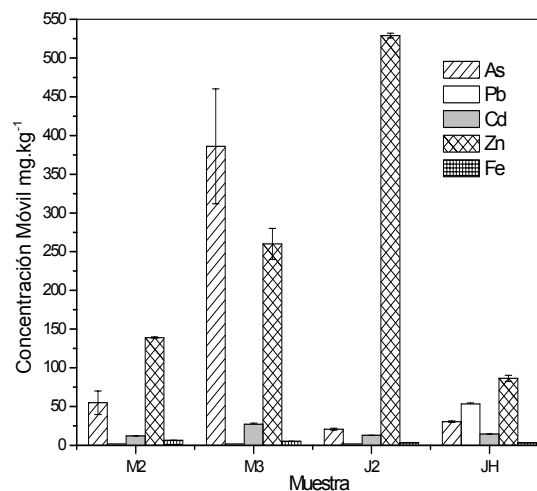
**Tabla 7.5** Resultados de la prueba de movilidad de EPT de acuerdo a la prueba de extracción PECT-NOM-53, utilizando una solución de ácido acético como extractante

Elemento	Movilidad ácido acético con 50 g de sólido ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )			
	M2	M3	J2	JH
As	$55 \pm 15$	$386 \pm 74$	$21 \pm 1.32$	$31 \pm 1$
Pb	<2	<2	<2	$54 \pm 1.1$
Cd	$12 \pm 0.1$	$27 \pm 1.5$	$13 \pm 0.1$	$15 \pm 0.1$
Zn	$139 \pm 0.9$	$260 \pm 20$	$529 \pm 3$	$87 \pm 4$
Fe	$6.4 \pm 0.2$	$5.3 \pm 0.1$	$3.5 \pm 0.1$	$3.3 \pm 0.1$

Lo cual se encuentra asociado a una alta solubilidad de los compuestos que contienen este elemento, y a la facilidad del mismo para moverse a diferentes intervalos de pH. Por su parte, el plomo no muestra movilidad bajo estas condiciones, lo que sugiere una baja fracción intercambiable y la probable asociación de éste con carbonatos, u otras fases de mayor estabilidad.



**Figura 7.5** Resultados de movilidad de EPT, empleando agua meteórica como extractante, según protocolo ASTM 3987. Las barras representan la desviación estándar de duplicados.



**Figura 7.6** Resultados de movilidad de EPT, empleando una solución con ácido acético como extractante, según prueba de extracción PECT-NOM 53. Las barras representan la desviación estándar de duplicados.

## 7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

En la Figura 7.6 se observa la movilidad de EPT cuando se utiliza ácido acético como extractante. Para el arsénico se observa un comportamiento similar al anterior, siendo M3 la muestra con la mayor concentración móvil de arsénico ( $386 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), seguida de M2 ( $55 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Por otro lado, la movilidad del zinc en J2 sugiere la presencia de fases de mayor solubilidad, las cuales son producto de procesos de alteración de las fases primarias de estos jales. Bajo estas condiciones, también es posible observar que la única muestra con una elevada movilidad de plomo es JH, con una relación de móvil de  $54 \text{ mg Pb}\cdot\text{kg}^{-1}_{\text{suelo}}$ .

De manera general, en las Figuras 7.5 y 7.6, se aprecia que la concentración móvil es mayor cuando se emplea ácido acético como extractante, a un pH de 2.88, que cuando se utiliza agua en equilibrio con  $\text{CO}_2$  a pH de 5.5. Esto podría estar asociado a dos procesos, uno es la disolución de los carbonatos, ésta disolución ocasiona la liberación de metales asociados a carbonatos hacia el seno de la solución, y el segundo es atribuido a que el ion acetato estabiliza el ión en solución por complejación del metal con el grupo carboxílico.

En el caso del arsénico, el incremento en la concentración móvil del mismo, utilizando ácido acético, podría estar atribuido a una mayor disolución ácida de las fases secundarias. Las fases secundarias identificadas por MEB en estas muestras son principalmente oxihidróxidos de hierro, generadas por procesos de alteración de arsenopirita ( $\text{AsFeS}$ ) mineral, usualmente encontrados en los yacimientos tipo skarn de este sitio (Castro-Larragoitia, 1997). Aunque también se han reportado como fuentes de arsénico en el norte del país fases de tenantita ( $\text{Cu}_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$ ) y enargita ( $\text{Cu}_3\text{AsS}_4$ ) (Megaw, 1998). Además, a menor pH, se favorece la disolución de óxidos de hierro y con ello se favorece la liberación del arsénico que podría encontrarse adsorbido en la superficie de estos.

7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

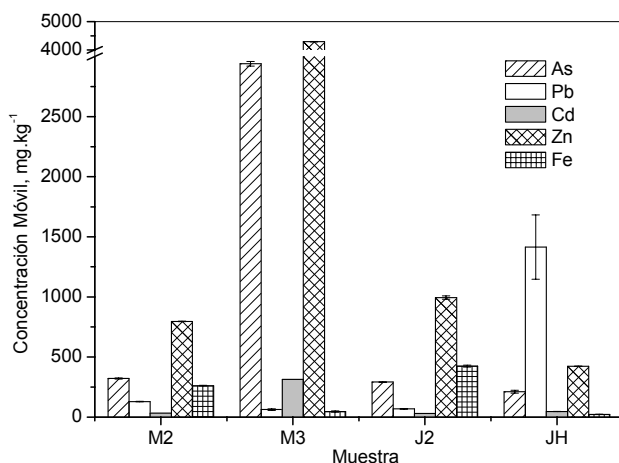
**Tabla 7.6** Resultados de la prueba de movilidad con ácido acético de acuerdo al protocolo PECT-NOM-53 modificado

Elemento	Movilidad expresada en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$			
	M2	M3	J2	JH
<b>As</b>	$321 \pm 4.6$	$2940 \pm 20$	$291 \pm 3$	$211 \pm 11.4$
<b>Pb</b>	$130 \pm 2$	$62 \pm 6$	$68 \pm 4$	$1415 \pm 267$
<b>Cd</b>	$34 \pm 0$	$314 \pm 0$	$30 \pm 0$	$47 \pm 1$
<b>Zn</b>	$796 \pm 2$	$4290 \pm 10$	$994 \pm 14$	$423 \pm 1$
<b>Fe</b>	$261 \pm 3$	$46 \pm 6$	$424 \pm 8$	$23 \pm 1$
Relación sólido:líquido 1:200; 5 g de suelo por 1 L de solución. La desviación estándar corresponde a duplicados (n=2).				

Con el objetivo de evaluar la movilidad de los elementos utilizando ácido acético como extractante, se aumentó la relación sólido-solución en la prueba de movilidad con ácido acético. Lo anterior con la intención de simular soluciones con concentraciones elevadas de ácidos orgánicos, que pueden presentarse en los suelos rizosféricos por la actividad biológicas de especies vegetales o bien en suelos agrícolas que han recibido el impacto de la dispersión de partículas con altos contenido de EPT. Por lo tanto, para poder estudiar este efecto, de concentraciones saturadas con ácidos orgánicos, la fracción sólida fue disminuida de 50 g a 5 g de sólido, manteniendo el volumen de líquido en 1 litro. Los resultados se muestran en la Tabla 7.6, así mismo, se presentan también los resultados de la concentración obtenida en solución (en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) antes de hacerse la equivalencia a kilogramo de suelo, dicha concentración en solución será utilizada en la sección de cinéticas de producción de sulfuro para estimar los requerimientos de producción de sulfuro biogénico (cf. Sección 7.2).

La Figura 7.7 ilustra los resultados para las matrices sólidas anteriores y se observa que la movilidad para cada elemento analizado aumentó en comparación a la prueba anterior. Con el cambio de la relación sólido-líquido todos los EPT incrementaron su movilidad, por ejemplo, el plomo en JH incrementó su rango de movilidad de  $53\text{-}55 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a  $1148\text{-}1682 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , cuando la relación sólido-líquido de 1:20 se modificó a 1:200. Este resultado demuestra la importancia de la relación mineral-ligante en los procesos de disolución, ya que al disminuir la cantidad de sólido, aumentan los ligandos disponibles para estabilizar los cationes en solución.

## 7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos



**Figura 7.7** Movilidad de EPT, empleando una solución con ácido acético como extractante, según prueba de extracción PECT-NOM 53 modificada. Las barras representan la desviación estándar de duplicados (n=2).

Con las pruebas fisicoquímicas realizadas se permitió establecer en base a la concentración total con mayor contenido de EPT, aquellas muestras que pueden ser consideradas como potenciales casos de estudio en las pruebas de estabilización en columnas, estas muestras fueron M2, M3, J2 y JH. Posteriormente, los resultados de la caracterización mineralógica mostraron que la matriz mineral de estas muestras está constituida principalmente por silicatos y carbonatos de calcio. La muestra JH presentó una constitución más compleja, debido a la probable presencia de fases amorfas, formadas probablemente por diferentes procesos de alteración de los minerales de ese sitio.

Además, las pruebas de bioaccesibilidad y movilidad mostraron que existen dos muestras que sobresalen por su alta concentración bioaccesible, así como por la movilidad de arsénico y plomo, dichas muestras son M3 y JH respectivamente. De las muestras citadas anteriormente, se decidió emplear la muestra JH, como muestra problema para evaluar las pruebas de estabilización de EPT en columnas utilizando la producción de sulfuro de hidrógeno biogénico, producido alguno de los consorcios microbianos que presentaron actividad reductora de sulfatos.

Además la concentración de plomo móvil de  $62 \pm 6 \text{ mgPb} \cdot \text{kg}^{-1}$ , obtenida con el protocolo PECT-NOM-53 modificado (Tabla 7.6), fue elegida como la concentración a la que podrían

estar expuestas las BSR de manera *in situ*. Por lo tanto, esta concentración de plomo fue seleccionada como base para establecer las concentraciones de plomo en las pruebas cinéticas, evaluadas con los consorcios microbianos aislados de los sitios de muestreo (*cf.* Sección 7.2).

### **7.2 Evaluación de la producción de H<sub>2</sub>S biogénico (PSH) de dos consorcios microbianos aislados del sitio de estudio**

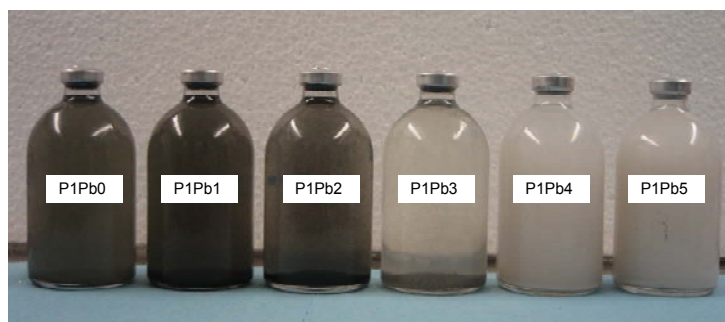
Los estudios de cinética de producción de sulfuro de hidrógeno se realizaron en botellas serológicas con el objetivo de constatar la obtención de un consorcio bacteriano con menor inhibición ante la presencia de plomo, estableciendo su capacidad y velocidad de producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), bajo condiciones óptimas para este tipo de microorganismos (Postgate, 1984). El parámetro cinético de velocidad de producción es básico para determinar el tiempo de operación del sistema de columnas de estabilización. De las 7 muestras recolectadas para obtención de inóculo de suelos contaminados con EPT, solamente 4 presentaron actividad reductora de sulfato P1, M2, JH y M3. Sin embargo, debido a los tiempos de respuesta para la producción de biomasa con el medio líquido Postgate y sólido, en este estudio únicamente se evaluaron P1 y JH. El inóculo recuperado del sitio M2 presentó evidencias de actividad reductora de sulfatos 6 meses después y M3 al año de realizar el inóculo. Además, también se reportan las relaciones entre los resultados de producción de sulfuro de hidrógeno (PSH) con respecto a la cantidad de biomasa producida por los consorcios P1 y JH.

Los resultados de las cinéticas se presentan, para su discusión en esta sección, representados gráficamente. Los resultados para cada cinética reportados en tablas, se encuentran en el Anexo G.



### 7.2.1 Cinética de PSH, en presencia de plomo, obtenida con el Consorcio P1

Al comienzo del estudio, y por cuestión de tiempo, se implementaron los protocolos para evaluar las cinéticas microbianas, así como las pruebas de inhibición al plomo, empleando solamente el consorcio P1 del que se tenía mayor producción de biomasa. Al momento de la adición del plomo, los cultivos presentaron una coloración blanco-grisácea (Foto 7.1), siendo ésta más evidente para concentraciones de plomo de 1687 y 3380 mg•L<sup>-1</sup> (cf. Tabla 5.3).



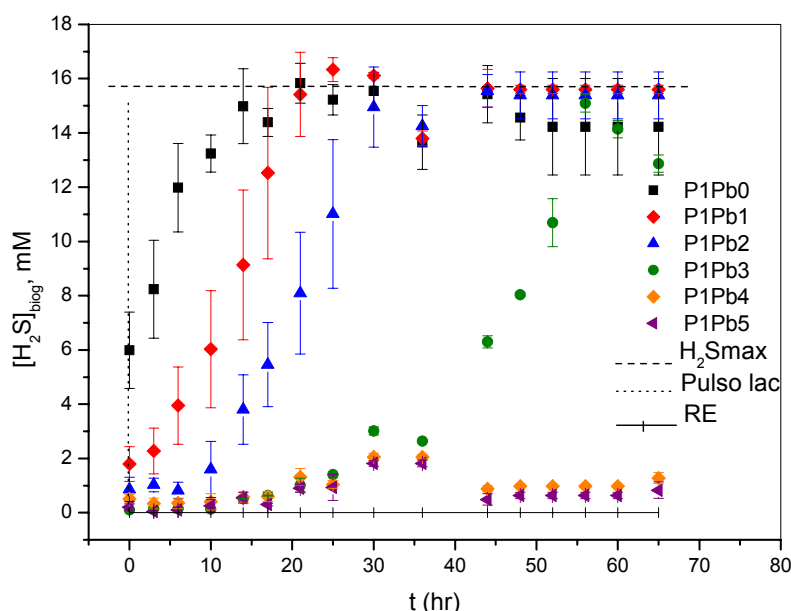
**Fotografía 7.1** Color presentado por los cultivos en las cinéticas con el consorcio P1.

Los cultivos fueron colocados en un agitador orbital a 100 rpm (Fotografía 7.2) de acuerdo al protocolo previamente establecido (cf. Sección 5.5). Después de un tiempo de adaptación al sustrato de ~72 h, se adicionó un segundo pulso de carga orgánica (como lactato), y se retiró periódicamente 0.1 mL de solución de los frascos para determinar la producción H<sub>2</sub>S con respecto al tiempo. Para la descripción de la cinética, respecto al efecto tóxico de un componente en el sistema, se considero como tiempo inicial la lectura de PHS después del segundo pulso de lactato como recomienda Celis (2004).



**Fotografía 7.2** Sistema de agitación orbital para evaluar las cinéticas microbianas con el consorcio P1.

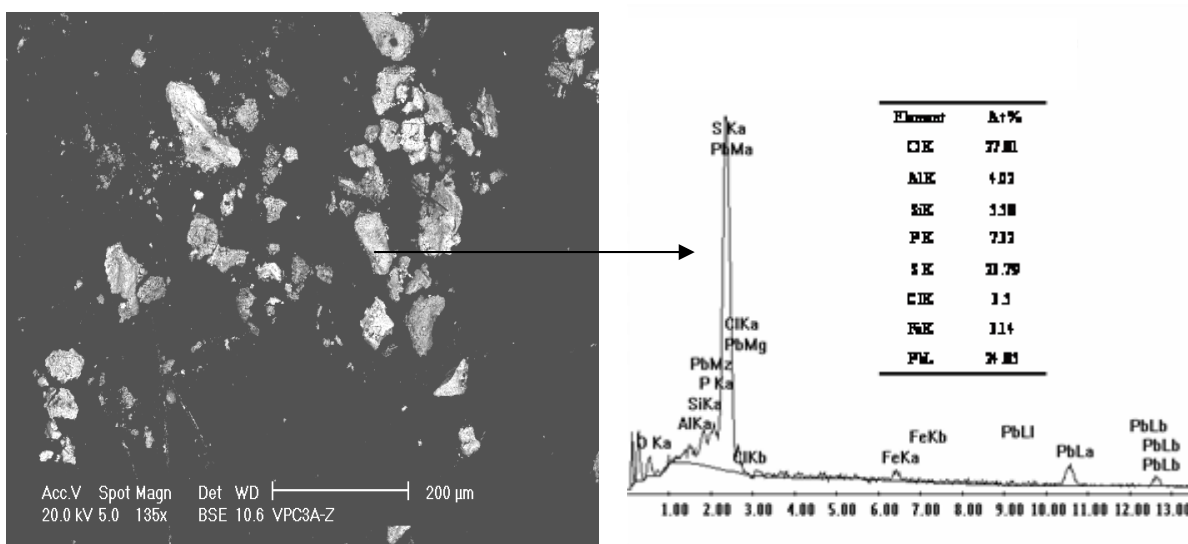
Los resultados se observan en la Figura 7.8. Como puede apreciarse, existe una clara influencia de la concentración de plomo sobre los cultivos biológicos, ya que conforme se incrementa la concentración de este elemento también comienza a incrementarse la fase de retardo. Es decir, al incrementarse la concentración de plomo, ocurre una disminución de la PSH acumulada. Esta disminución puede ser atribuida a dos situaciones, o a la combinación de las mismas. La primera relacionada al consumo de sulfuro por precipitación de PbS biogénico. La segunda, puede estar relacionada a un efecto inhibitorio del plomo, sobre algunas enzimas de las bacterias del consorcio, como se encuentra documentado en la literatura (Rajesh *et al*, 2003; Cabrera *et al*, 2006).



**Figura 7.8** Cinética de producción de sulfuro del consorcio P1, para el cultivo sin plomo (P1Pb0) y para los cultivos con las concentraciones de plomo: P1Pb1 (34  $\mu\text{M}$ ), P1Pb2 (169 $\mu\text{M}$ ), P1Pb3 (337 $\mu\text{M}$ ), P1Pb4 (1687 $\mu\text{M}$ ), P1Pb5 (3380  $\mu\text{M}$ ). Las barras representan la desviación estándar entre duplicados.

Los resultados sugieren que, la máxima concentración de plomo a la que el consorcio microbiano P1 puede ser expuesto es de 337  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  (P1Pb3). En los cultivos P1Pb4 y P1Pb5 se presenta una ligera PHS a las 30 h, registrándose concentraciones de 2.05 y 1.8 mM  $\text{H}_2\text{S}$  respectivamente. Sin embargo, a partir de las 35 h, existe una caída en la concentración acumulada de  $\text{H}_2\text{S}$ , lo cual fue asociado a un consumo del mismo debido a un cambio de fase dentro del microcosmos. Para tiempos posteriores no existieron indicios de actividad biológica. En este experimento, la inactividad mostrada por los cultivos P1Pb4 y P1Pb5, es asociada directamente a un efecto tóxico del plomo debido a una elevada concentración. Por otra parte, se evaluó la respiración endógena (RE), cuyas lecturas de absorbancia se mantuvieron por debajo del límite de detección de la curva de calibración empleada (*cf.* Anexo D), por lo que la PHS debido a la respiración endógena se consideró despreciable.

La microfotografía de la Figura 7.9 muestra algunas partículas de los sólidos suspendidos fijos recuperados durante las determinaciones de sólidos suspendidos volátiles del cultivo P1Pb3. El microanálisis químico utilizando EDS acoplado MEB, muestra una asociación atómica porcentual cercana a uno entre el azufre (23.79 %) y el plomo (24.85 %), lo que sugiere la formación de fases de sulfuro de plomo (PbS). Sin embargo, la presencia de hierro, aunque en bajo porcentaje (3%) podría indicar la formación de FeS, descompensando el balance de atómico Pb-S. En este caso, el plomo remanente podría estar asociado también a fases sólidas de clorofosfatos.



**Figura 7.9** Microfotografía y microanálisis químico de partículas del cultivo P1Pb3.

### 7.2.2 Biomasa estimada como sólidos suspendidos volátiles en las cinéticas del consorcio P1

La biomasa cuantificada como sólidos suspendidos volátiles (SSV) obtenida en el estudio cinético del consorcio P1 se presenta en la Tabla 7.7, con las correspondientes concentraciones de plomo definidas en la Tabla 5.3.

**Tabla 7.7** Biomasa generada en el estudio cinético del consorcio P1

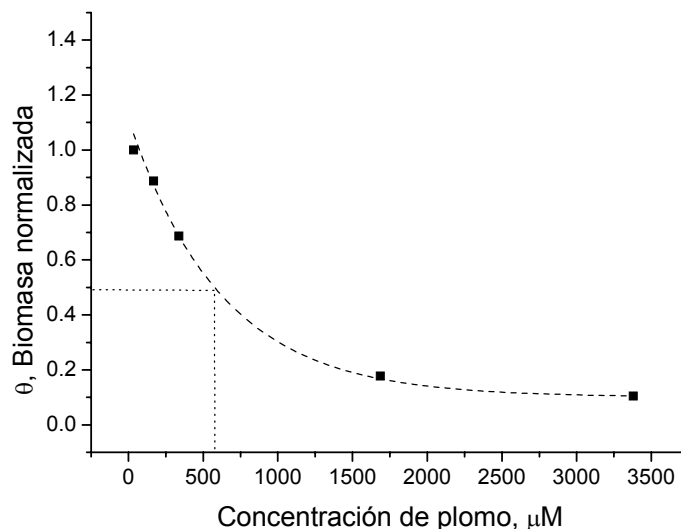
Cultivo	SSV en mg•L <sup>-1</sup>
P1Pb0	60.00 (6.70)
P1Pb1	75.17 (24.83)
P1Pb2	66.70 (6.70)
P1Pb3	51.70 (1.70)
P1Pb4	13.33 (6.70)
P1Pb5	7.92 (1.25)
El valor entre paréntesis indica la desviación estándar de duplicados (n=2)	

Reis *et al.* (1992) han mencionado que el sulfuro de hidrógeno tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de las BSR, sin embargo, la presencia de plomo podría favorecer en cierto punto el crecimiento de las bacterias, ya que éste precipita como sulfuro conforme se va generando el H<sub>2</sub>S<sub>biog</sub> durante el consumo de la materia orgánica. Lo anterior, puede ser descrito de manera adecuada por el comportamiento cinético de los cultivos P1Pb1, y P1Pb2, cultivos con la mayor producción de biomasa (75 mg SSV•L<sup>-1</sup> y 66 mg SSV•L<sup>-1</sup>). Este hecho sugiere que la presencia de plomo ocasiona una destoxificación por eliminación del H<sub>2</sub>S<sub>biog</sub> acuoso debido a la precipitación de ambas especies, provocando que la síntesis celular se vea favorecida. Sin embargo, a partir de los cultivos P1Pb3 (337 μM Pb<sup>2+</sup>), la producción de biomasa comienza a disminuir (52 mg SSV•L<sup>-1</sup>), efecto probablemente asociado a la inhibición del plomo dentro del sistema, el cual afecta en un 78 % y 87 % la síntesis celular en los cultivos P1Pb4 (13 mg SSV•L<sup>-1</sup>) y P1Pb5 (8 mg SSV•L<sup>-1</sup>) respectivamente.

Para poder estimar el impacto que tiene la concentración de plomo sobre la producción de biomasa, ésta se correlacionó estableciendo una concentración normalizada de biomasa ( $\theta$ ). Asumiendo que la presencia de plomo podría consumir el sulfuro y, por ende, disminuir su inhibición en tiempos cortos incrementado la producción de biomasa en el sistema, se propuso como constante de normalización la cantidad de biomasa obtenida con la primera concentración de plomo evaluada (34 μM):

$$\theta = \frac{BM}{BM_{max}} \quad (7.1)$$

La biomasa normalizada en función de la concentración de plomo en el sistema, se muestra en la Figura 7.10. Como se puede observar en dicha figura, la producción de biomasa sigue una tendencia, en función de la concentración de plomo en el sistema  $[Pb^{2+}]$ , con decaimiento exponencial de primer orden. La curva muestra que para cualquier concentración de plomo comprendida entre 34.12 y 3380  $\mu M$  la biomasa disminuirá de manera exponencial con una constante de decaimiento aproximadamente igual a 619  $\mu M Pb^{2+}$ . En este caso, la amplitud de la función, debido a la normalización, quedo ajustada a la unidad, sin embargo el modelo de ajuste presenta una desviación del 1% y un coeficiente de regresión ( $R^2$ ) de 0.99984.



**Figura 7.10** Producción de biomasa normalizada ( $\theta$ ), del inóculo P1, como una función de la concentración de plomo. La línea punteada es el ajuste con una función de decaimiento exponencial de primer orden.

Los parámetros de ajuste del modelo se presentan en la Tabla 7.8.a. El cálculo de la biomasa adimensional (teórica,  $[\theta_{P1}]_T$  y experimental,  $[\theta_{P1}]_{Exp}$ ), se presentan en la Tabla 7.8.b. A partir de estos parámetros se puede concluir que para una concentración de plomo de 619.08  $\mu M$  se estima una reducción del 46% en la producción de biomasa, que con respecto al valor máximo producido ( $\sim 75 \text{ mg SSV} \cdot L^{-1}$ ) sería de  $\sim 35 \text{ mg SSV} \cdot L^{-1}$ . También

7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

se aprecia que teóricamente la producción de biomasa se ve disminuida en un 50 % para una concentración de plomo de 575  $\mu\text{M Pb}^{2+}$ .

**Tabla 7.8** Parámetros de ajuste de la función de decaimiento exponencial de primer orden (a). Valores experimentales y estimados de  $\theta$  en función de  $[\text{Pb}^{2+}]$

a) Parámetros de ajuste			b) Biomasa teórica y experimental		
Parámetro	Valor medio	DS	$[\text{Pb}^{2+}]$	$[\theta_{\text{P1}}]_{\text{T}}$	$[\theta_{\text{P1}}]_{\text{Exp}}$
$\theta_{\text{max}}$	1.01	$\pm 0.17$	0	-	0.798
$[\text{Pb}^{2+}]_{\theta=0.47}$	619.1	$\pm 215.03$	34.1	1.059	1
$R^2$	0.9998		169	0.871	0.887
Función	$\theta = \theta_{\text{max}} e^{-\frac{[\text{Pb}]}{[\text{Pb}]_{\theta=0.47}}}$		337	0.688	0.687
			575	0.501	-
			619	0.473	-
			1687	0.168	0.177
			3380	0.106	0.105

### 7.2.3 Estimación de las velocidades específicas de PSH con el consorcio P1

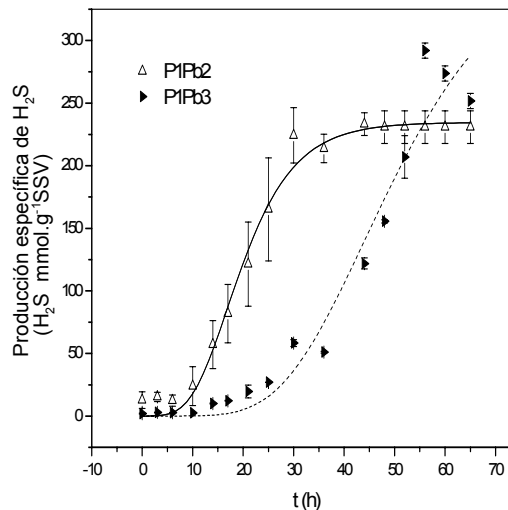
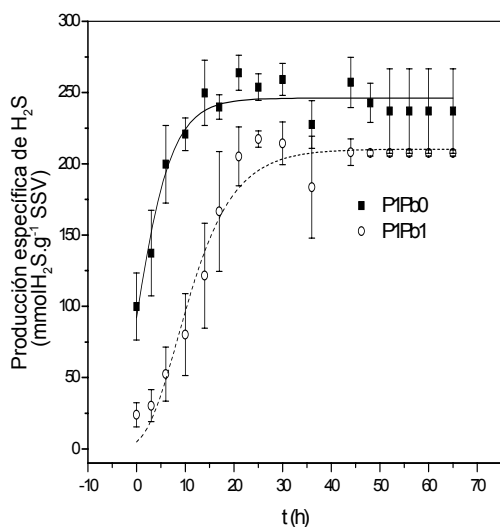
La concentración de  $\text{H}_2\text{S}$  dividida entre la cantidad de biomasa final producida, permite estimar la producción de sulfuro específico ( $\text{mmolH}_2\text{S} \cdot \text{mg}^{-1} \text{SSV}$ ) que permite evaluar y comparar diferentes microcosmos con cantidades de biomasa diferentes. Los resultados obtenidos, permiten construir las Figuras 7.11a y 7.11b, las cuales fueron ajustadas con el Modelo Gompertz descrito anteriormente (*cf.* Capítulo 2.6). El ajuste permitió estimar la velocidad específica máxima de producción de sulfuro ( $V_{\text{max, P1}}$ ) para cada condición de concentración de plomo del consorcio microbiano P1. Los parámetros de ajuste obtenidos se reportan en la Tabla 7.9.

7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

**Tabla 7.9** Efecto de la concentración de plomo sobre la velocidad específica máxima de producción de sulfuro del consorcio P1

Cultivo	[Pb <sup>2+</sup> ] μM	K (h <sup>-1</sup> )	V <sub>max, PHS</sub>	R <sup>2</sup>
P1Pb0	0	0.236	21.38	0.980
P1Pb1	34.12	0.157	12.17	0.981
P1Pb2	169	0.137	11.87	0.967
P1Pb3	337	0.061	8.54	0.977
P1Pb4*	1687	0.11	9.3	0.859
P1Pb5*	3380	0.25	13.8	0.71

\* El ajuste con el modelo Gompertz se efectuó hasta un tiempo de 36 h. La Vel<sub>max</sub> de PHS en (mM H<sub>2</sub>S•g<sup>-1</sup>SSV•h<sup>-1</sup>)



a)

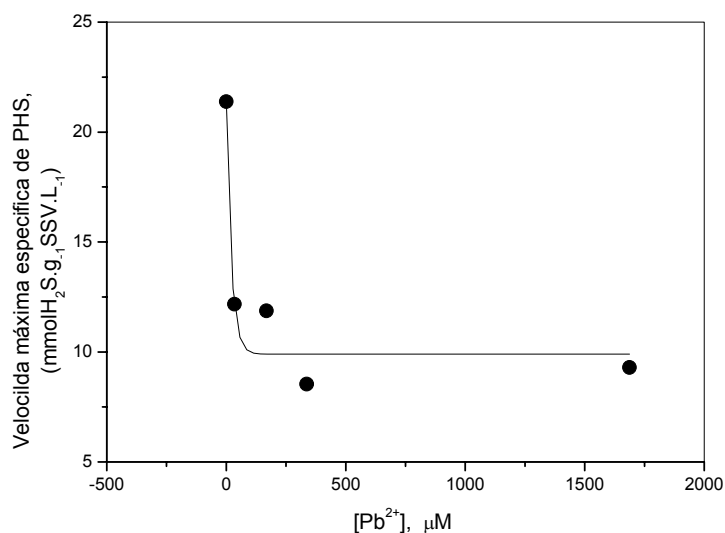
b)

**Figura 7.11** Producción específica de sulfuro de hidrógeno bajo diferentes concentraciones de plomo del consorcio P1: (a) Cultivos P1Pb0 y P1Pb1 (34.12 μM Pb<sup>2+</sup>); (b) Cultivos P1Pb2 (169 μM Pb<sup>2+</sup>) y P1Pb3 (337 μM Pb<sup>2+</sup>). La línea representa el ajuste obtenido con el modelo Gompertz.

Si se grafica la velocidad específica máxima de PHS con respecto a la concentración de plomo, se obtiene la Figura 7.12. En esta puede apreciarse que los cultivos que presentan mayor concentración de plomo (mayor fase de retardo) también presentaron una menor velocidad de producción de sulfuro de hidrógeno. La curva obtenida fue asociada a un decaimiento exponencial de primer orden, los parámetros de ajuste se observan en la Tabla 7.10.



7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos



**Figura 7.12** Velocidad específica máxima de producción de sulfuro de hidrógeno respecto a la concentración de plomo y su ajuste correspondiente a un decaimiento exponencial de primer orden.

**Tabla 7.10** Parámetros de ajuste de la función de decaimiento exponencial de primer orden, de acuerdo al comportamiento de la velocidad específica máxima de PSH

Función	$V_{\max} = V_0 + V_{\max} e^{-\frac{[Pb^{2+}]}{[Pb^{2+}]_{\theta=0.5}}}$	
Parámetro	Valor medio	DS
$V_0$	9.89	1
$V_{\max}$	11.47	2
$[Pb^{2+}]_{\theta=0.5}$	21	11
$R^2$	0.943	

La  $V_{\max}$  PSH obtenida, considerando la biomasa final producida, presentó un decaimiento exponencial de primer orden. Disminuyendo en un 50 % la velocidad de producción de sulfuro a concentraciones de 21  $\mu\text{M Pb}^{2+}$ .

Los resultados del estudio de inhibición realizados al consorcio P1 sugieren que existe una influencia del plomo en la PSH, así como en la producción de biomasa. Además, es importante señalar que los cultivos con la mayor concentración de plomo presentaron mayor tiempo de adaptación, lo que puede estar relacionado a un efecto inhibitorio del

plomo en este consorcio. De hecho, la máxima concentración de plomo a la cual el consorcio P1 puede ser expuesto es de 337  $\mu\text{M}$ . Para concentraciones superiores se observó una etapa de retardo prolongada, con decaimiento en la PHS después de 36 h, lo cual podría estar asociado a un efecto tóxico del plomo.

La producción de biomasa, determinada como SSV, se favoreció a concentraciones de plomo de 34.12 y 168.9  $\mu\text{M}$ , atribuido principalmente a un efecto de destoxificación al precipitar el sulfuro de hidrógeno con el plomo en solución. Para concentraciones por encima de éstas, el cultivo sin la presencia de plomo presentó mayor producción de biomasa, hecho que se atribuye a que, para concentraciones por encima de 168.9  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  el plomo comienza a tener efectos adversos en la síntesis celular.

Las constantes se encuentran asociadas al decaimiento abrupto de la  $V_{\text{max}}$  PSH, entre el cultivo sin la presencia de plomo, asociado a la toxicidad del sulfuro y, en segundo lugar a la inhibición de la concentración de plomo en solución en las pruebas subsiguientes.

Por otra parte, utilizando el EDS-MEB fue posible demostrar la formación de sulfuro de plomo con relaciones atómicas 1:1, entre el azufre y el plomo. Sin embargo, este elemento podría también presentarse en forma de cloropiromorfitas.

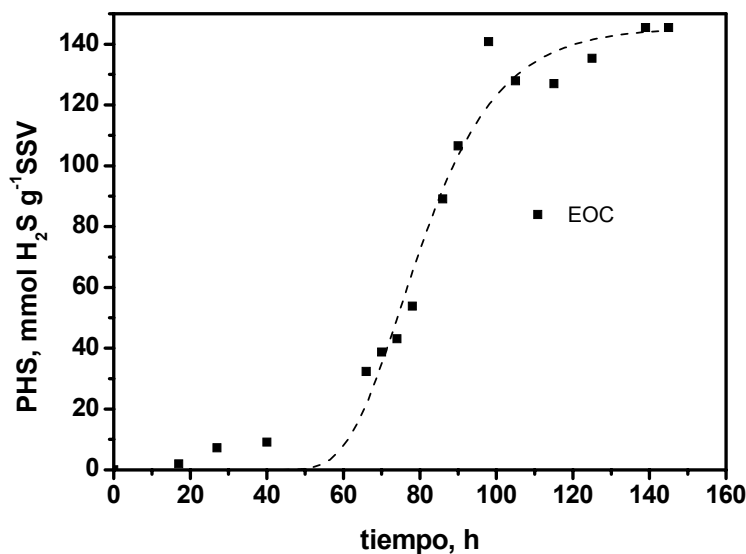
#### **7.2.4 Estequiometría del consorcio JH**

Con la experiencia de la cinética anterior se planteó estudiar la respuesta del consorcio microbiano JH (*cf.* Capítulo 5.1) considerando: la estequiometría del consorcio JH con respecto al lactato, la formación de fases abióticas en los medios de cultivo observada en los sólidos suspendidos fijos de P1Pb3, y las concentraciones de plomo que disminuyen la actividad microbiana.

Con respecto a la estequiometría y para la primera cinética con JH, se analizaron dos escenarios: oxidación completa del sustrato orgánico y oxidación incompleta con producción de ácido acético (Ecuación 2.5 y 2.9 respectivamente). Para llevar a cabo este

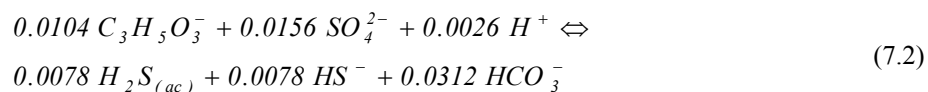
análisis, se preparó un medio de cultivo con 5 mL del consorcio JH. En este cultivo la adición del lactato se realizó en un solo pulso siguiendo la estequiometría de oxidación completa (Rec) (*cf.* Sección 2.3.1 y Sección 5.4), y la concentración final de biomasa en este sistema fue de 50 mg SSV•L<sup>-1</sup>.

La PHS del consorcio JH, en este experimento, fue ajustada con el modelo Gompertz (Figura 7.13) encontrando una V<sub>max</sub> específica de PHS de 3.83 mmolH<sub>2</sub>Sg<sup>-1</sup>SSVh<sup>-1</sup>, con una correlación del 97.9%. El valor de la constante cinética de primer orden (K), determinada con este modelo, fue de 0.072 h<sup>-1</sup>



**Figura 7.13** PHS experimental por el consorcio JH, considerando una estequiometría de oxidación de lactato completa.

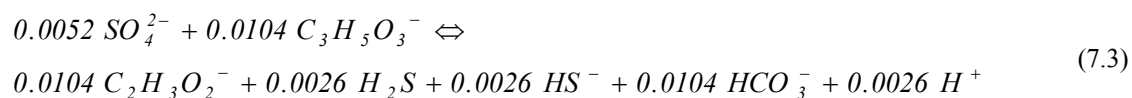
La reacción en términos de las concentraciones de sulfato y lactato, utilizadas para este experimento se escriben como:



7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

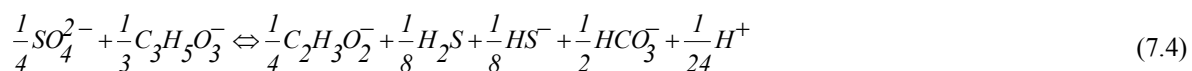
La ecuación anterior indica que en casos de oxidación completa la máxima concentración de sulfuro total ( $H_2S_T = H_2S_{ac} + HS^-$ ) que se puede obtener adicionando 10.4 mM de lactato es de 15.6 mM de  $H_2S$ . Sin embargo, los resultados experimentales del cultivo con la concentración de los reactivos mencionados, presentan solamente una concentración máxima de  $H_2S_T$  de 7.2 mM, valor que corresponde aproximadamente al 50 % de la concentración máxima esperada. Este resultado indicó que el consorcio bacteriano JH no sigue, precisamente, una reacción de oxidación completa.

En cambio, si se consideran las relaciones estequiométricas de la reacción de oxidación incompleta (Ecuación 2.9), se tiene que la reacción, en términos del sustrato orgánico utilizado en el experimento, queda expresado como:



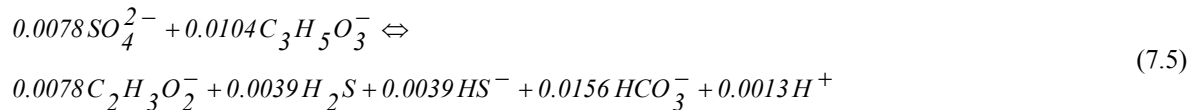
La ecuación anterior indica que, si el cultivo siguiera una estequiometría de oxidación incompleta, la concentración de lactato únicamente hubiera sido suficiente para producir una concentración de  $H_2S_{biog}$  de 5.2 mM, siendo este valor menor a los 7.2 mM determinados experimentalmente. Este cálculo indica que el consorcio bacteriano tampoco sigue estrictamente la relación estequiométrica de oxidación incompleta.

Por lo tanto, si se considera la suma de las reacciones de oxidación completa e incompleta (Ecuaciones 2.5 y 2.9), el resultado proporciona un mecanismo de oxidación mixta, que puede ser expresado por la siguiente ecuación:



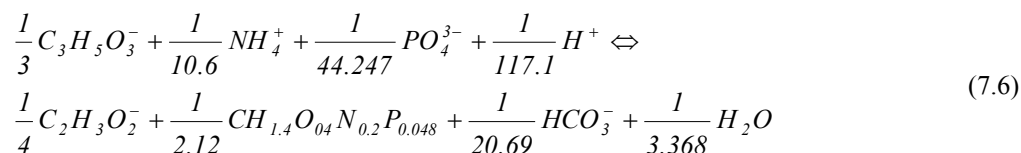
La ecuación anterior expresada en términos de la concentración de sustrato orgánico empleada en este experimento (0.0140 mM) es:

7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

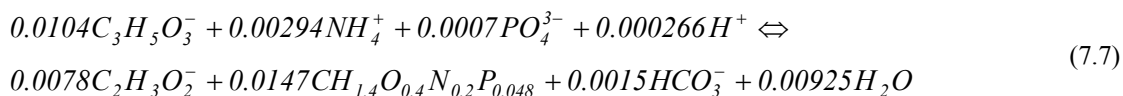


En base a la ecuación anterior se obtiene que la máxima cantidad de sulfuro producido sería de 7.8 M que presenta una desviación del 8 % con respecto al valor experimental (7.2 mM). Por lo tanto, la relación estequiométrica molar ( $C_3H_5O_3^-/SO_4^{2-}=1.33$ ), indica que si en los cultivos se agregan dos pulsos de lactato (0.0208 moles de lactato), entonces se requieren 0.0156 moles de  $SO_4^{2-}$ . Ésta es la relación experimental obtenida para la degradación de lactato por el mecanismos de reducción de sulfatos del consorcio bacteriano aislado de la muestra JH considerando un mecanismo de oxidación mixta.

Por lo tanto, la reacción de síntesis “mixta” propuesta en esta tesis considera la suma de las reacciones Rsc (2.14) y Rsi (2.16) descritas anteriormente (*cf.* Sección 2.3.2). Dicha ecuación da como resultado la siguiente reacción:



La ecuación anterior puede ser representada para la concentración de lactato utilizada en este estudio como:



La reacción anterior es propuesta como la reacción de síntesis celular, para el consorcio JH empleado en este estudio, y será empleada posteriormente para estimar la estequiometría global de los cultivos del consorcio JH con presencia de plomo (*cf.* Sección 7.2.10).

### 7.2.5 Formación de clorofosfato de plomo

A diferencia de los resultados cinéticos obtenidos con el consorcio microbiano P1 y con el objetivo de comprender para este estudio las fases formadas de manera abiótica, se evaluó la especiación química del plomo, en cada cultivo del consorcio JH, a fin de conocer las especies solubles involucradas en el sistema al inicio del experimento y su evolución con respecto al tiempo.

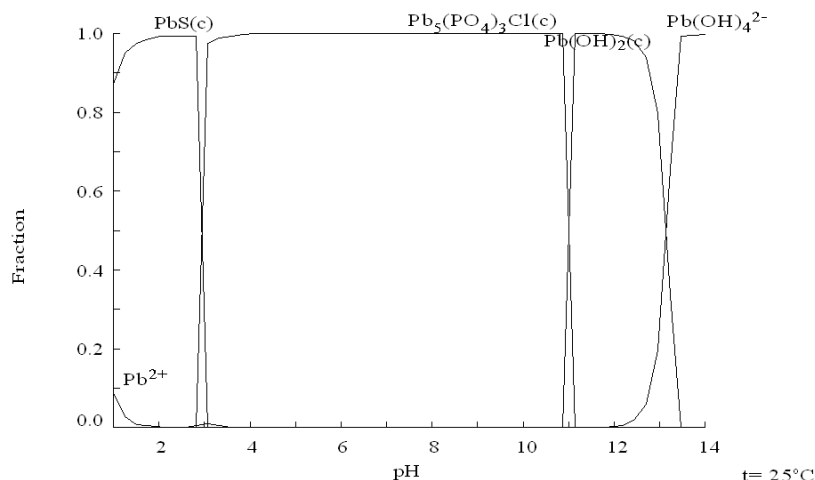
Inicialmente, se analizó la concentración de plomo en solución de los cultivos con mayor concentración de éste, del consorcio JH (JHPb4, JHPb5 y JHPb6). Los resultados mostraron que la concentración de plomo en solución se encuentra por debajo de  $0.917 \mu\text{M Pb}^{2+}$ .

Este resultado analítico sugiere que el plomo interaccionó abióticamente con algunos elementos del medio de cultivo, ocasionando la formación de precipitados y afectando la composición del mismo. De acuerdo a los resultados obtenidos por el MEB-EDAX para el consorcio P1 (Figura 7.9), dichos precipitados podrían estar asociados a fases de clorofosfatos de plomo (cloropiromorfita), la cual es la fase de plomo más estable termodinámicamente en condiciones óxicas (*cf.* Sección 3.4) y cuya formación se ve favorecida en medios que contengan cloruros y fosfatos.

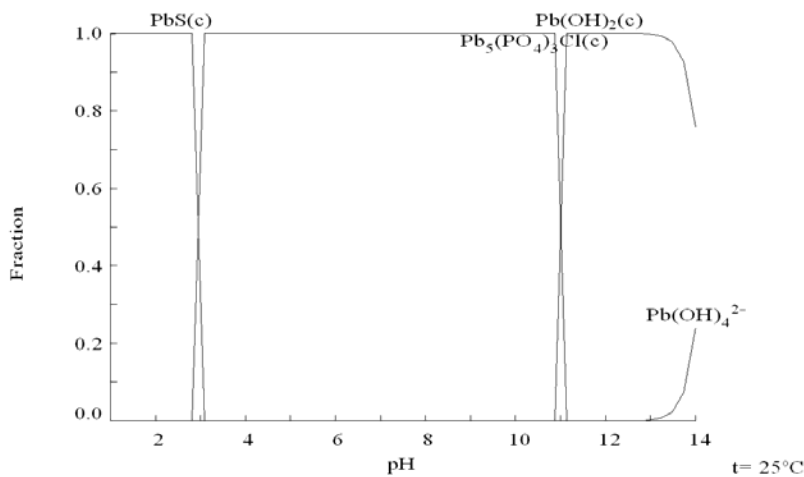
Para identificar las especies formadas en el sistema se construyeron diagramas de distribución de especies, empleando el software MEDUSA® (Puigdomenech, 2004), con el cual, fue posible determinar que la formación del clorofosfato de plomo se ve favorecida al pH, concentración de especies y fuerza iónica (I) inicial del sistema (pH=7.0, I=0.1 M).

En las Figuras 7.14 y 7.15, se observa que para el rango de concentraciones de plomo empleadas en este estudio (límite inferior  $34 \mu\text{M}$  y límite superior  $3378 \mu\text{M}$  de plomo respectivamente) y en un intervalo de pH de 3 a 11, la fase dominante en un 100 % es el clorofosfato de plomo (expresado como fracción).

7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos



**Figura 7.14** Diagrama de distribución de especies que muestra la formación del clorofosfato de plomo en la concentración de plomo más baja empleada en este estudio. Las condiciones del diagrama son:  $[Pb^{2+}] = 34 \mu M$ ,  $[Cl^-] = 19.4 \text{ mM}$ ,  $[PO_4^{3-}] = 3.67 \text{ mM}$ ,  $[SO_4^{2-}] = 15.60 \text{ mM}$ ,  $I = 0.1 \text{ M}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ C$ . Simulación efectuada con el software MEDUSA ® (Puigdomenech, 2004).



**Figura 7.15** Diagrama de distribución de especies que muestra la formación del clorofosfato de plomo en la concentración de plomo más alta empleada en este estudio. Las condiciones del diagrama son:  $[Pb^{2+}] = 3378 \mu M$ ,  $[Cl^-] = 19.4 \text{ mM}$ ,  $[PO_4^{3-}] = 3.67 \text{ mM}$ ,  $[SO_4^{2-}] = 15.60 \text{ mM}$ ,  $I = 0.1 \text{ M}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ C$ . Simulación efectuada con el software MEDUSA ® (Puigdomenech, 2004).

La solución sobresaturada por la presencia del clorofosfato de plomo también se demostró calculando el índice de saturación en la solución (SI), definido como el logaritmo base 10 del cociente entre el producto de la actividad iónica (IAP) y la constante del producto de solubilidad ( $K_{sp}$ ) (Kehew, 2001):

$$SI = \log\left(\frac{IAP}{K_{sp}}\right) \quad (7.8)$$

Los valores del IAP obtenidos para cada concentración de plomo se muestran en la Tabla 7.11. Sustituyendo los valores del IAP y de la  $K_{sp}$  ( $10^{-84.48}$ ) en la Ecuación 7.8, se obtuvieron los valores del SI para cada concentración de plomo, los cuales se reportan en la misma Tabla.

**Tabla 7.11** Valores de IAP y del SI encontrados para las diferentes concentraciones de plomo empleadas en este estudio

$[Pb^{2+}]$ $\mu mol \cdot L^{-1}$	IAP	SI
JHPb1 [34.1]	$5.16 \times 10^{-38}$	47.11
JHPb2 [168.7]	$1.53 \times 10^{-34}$	50.58
JHPb2 [337]	$4.86 \times 10^{-33}$	52.09
JHPb3 [1687]	$1.52 \times 10^{-29}$	55.58
JHPb4 [2530]	$1.16 \times 10^{-28}$	56.46
JHPb5 [3380]	$4.93 \times 10^{-28}$	57.09

El signo positivo del SI en cada concentración de plomo indica que la reacción de disolución del clorofosfato de plomo (Ecuación 7.9) va de derecha a izquierda, favoreciéndose la precipitación de las especies. Los cálculos detallados del IAP y de la  $K_{sp}$ , se encuentran en el Anexo H.



Por otra parte, siguiendo las relaciones estequiométricas molares de la Ecuación 7.9 para fosfato  $[PO_4^{3-}] = \frac{3}{5}[Pb^{2+}]$  y para cloruros  $[Cl^-] = \frac{1}{5}[Pb^{2+}]$ , se estimó la concentración de estos necesaria para la precipitación con el plomo. A su vez, con la diferencia entre el fosfato introducido inicialmente ( $3.67 \times 10^{-3} M$ ), y el fosfato consumido por la precipitación, se estimó la concentración de fosfato que permanece en solución. Los valores encontrados son presentados en la Tabla 7.12.



7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

**Tabla 7.12** Concentración de fosfatos y cloruros (en mM), requerida para su precipitación como clorofosfato de plomo, y la respectiva concentración soluble, disponible después de la precipitación, para cada concentración de plomo.

$[\text{Pb}^{2+}]_{\mu\text{M}}$	$[\text{PO}_4^{3-}]_r$	$[\text{Cl}]_r$	$[\text{PO}_4^{3-}]_d$	$[\text{Cl}]_d$
34.12	$2.05 \times 10^{-5}$	$6.82 \times 10^{-6}$	$3.65 \times 10^{-3}$	$1.87 \times 10^{-2}$
168.9	$1.01 \times 10^{-4}$	$3.36 \times 10^{-5}$	$3.57 \times 10^{-3}$	$1.87 \times 10^{-2}$
337	$2.02 \times 10^{-4}$	$6.74 \times 10^{-5}$	$3.47 \times 10^{-3}$	$1.86 \times 10^{-2}$
1687	$1.01 \times 10^{-3}$	$3.36 \times 10^{-4}$	$2.66 \times 10^{-3}$	$1.84 \times 10^{-2}$
2530	$1.52 \times 10^{-3}$	$5.06 \times 10^{-4}$	$2.15 \times 10^{-3}$	$1.82 \times 10^{-2}$
3378	$2.03 \times 10^{-3}$	$6.76 \times 10^{-4}$	$1.64 \times 10^{-3}$	$1.80 \times 10^{-2}$
<b>Los subíndices de los corchetes indican la concentración molar: r=requerida; d=disponible</b>				

Los resultados anteriores, sugieren dos posibles escenarios, que podrían ocurrir en los estudios cinéticos del consorcio JH:

- Primero, se podría considerar que el plomo no se encuentra disponible en solución y por lo tanto cualquier efecto en la actividad biológica puede atribuirse a un déficit en la concentración de fosfato;
- Segundo, se podría considerar que la concentración de fosfato que permanece en solución podría ser suficiente para llevar a cabo la actividad reductora de sulfatos, sin embargo, el impacto sobre la producción de biomasa podría estar asociado a la toxicidad del plomo en la fase, no consolidada, de cloropiromorfita.

### 7.2.6 Cinética de PSH, en presencia de plomo, obtenida con el Consorcio JH

Los resultados experimentales de las cinéticas de PSH del consorcio JH, se observan en la Figura 7.16. En todos los casos se observó un incremento en la tasa de PHS después del segundo pulso de lactato. A partir de las 27 horas, las concentraciones de  $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$  en los cultivos JHPb1, JHPb2 y el cultivo sin plomo (JHPb0) son muy similares. Es decir, no se aprecia un efecto considerable de la concentración de plomo, o del fosfato, en la PSH. A partir de JHPb3, la acumulación  $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$  comienza a incrementarse con respecto a las concentraciones de los cultivos mencionados anteriormente, siendo ésta mayor en JHPb4 y JHPb5.

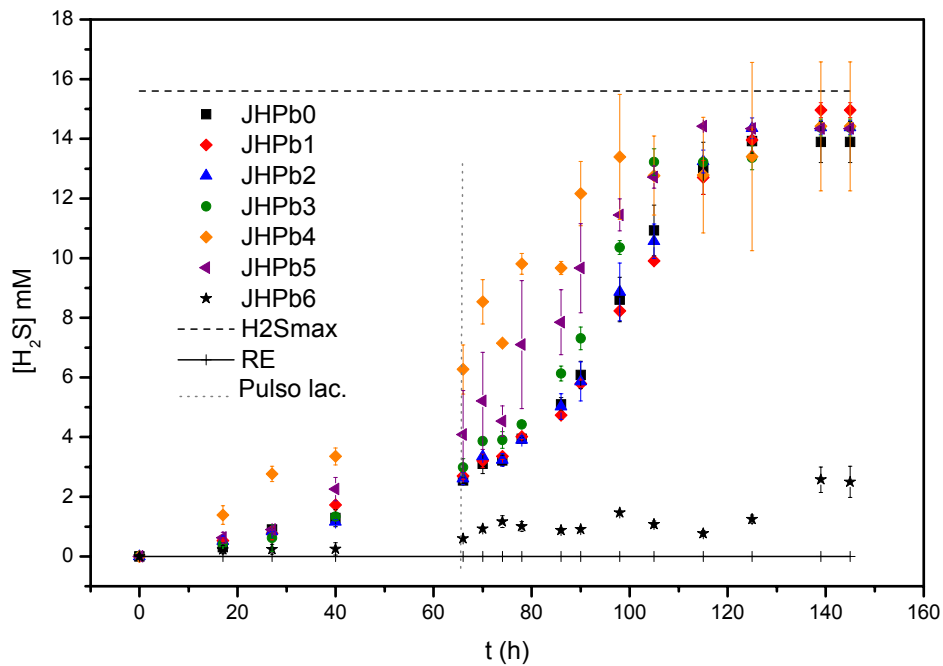
Estos resultados sugieren que, cuando se incrementa la concentración de plomo y por ende disminuye la de fosfato, la producción de sulfuro de hidrógeno se ve beneficiada. A partir de la concentración de JHPb4, la acumulación de  $H_2S_{biog}$  comienza a disminuir, siendo prácticamente inhibida en su totalidad a concentraciones de JHPb6 ( $3380 \mu M Pb^{2+}$ ). Esta inactividad podría estar asociada a un déficit de fosfatos, ó a un efecto del plomo en las fases abióticas no consolidadas de clorofosfatos de plomo, lo cual será abordado en la Sección 7.2.12.

En la misma Figura 7.16, se aprecia que aproximadamente a las 120 horas, se alcanza el estado estacionario en la PSH, esto podría estar relacionado con la limitación del sustrato o del aceptor de electrones (déficit de lactato ó sulfato). Por otra parte, se observa que la PSH, asociada a la respiración endógena, se mantuvo por debajo de los límites de detección de la curva de calibración empleada.

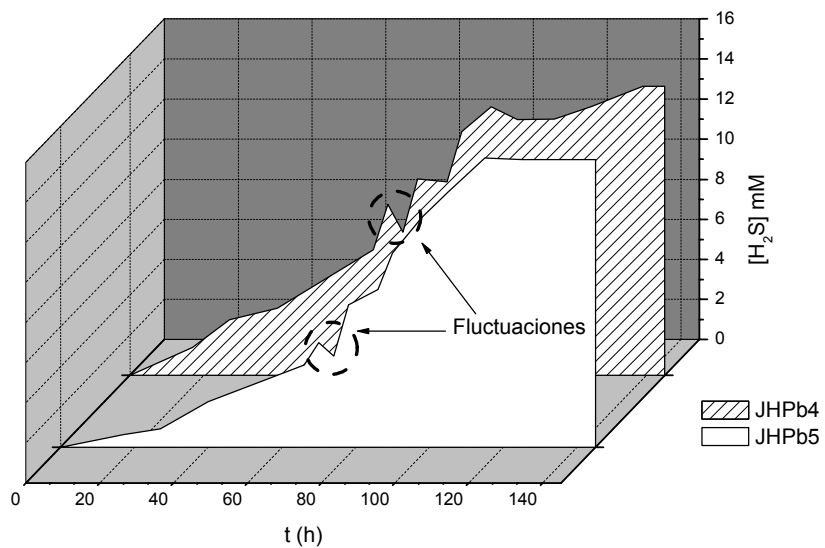
Es importante recordar que el consorcio microbiano JH fue aislado de un suelo con concentraciones bioaccesibles de plomo mayores ( $3175 mg \cdot kg^{-1}$ ) que las encontradas en la comunidad P1 ( $316 mg \cdot kg^{-1}$ ). Lo anterior, podría explicar que se observe actividad reductora de sulfatos, en un rango más amplio de concentraciones de plomo, con el consorcio JH que con el consorcio P1 (*cf.* Figura 7.8).

Durante el transcurso de la cinética, y en los casos de dos de las concentraciones más altas de plomo (JH4Pb y JH5Pb) fue posible observar, a las 70 h, una disminución en la concentración del  $H_2S_{biog}$ . Las fluctuaciones del  $H_2S_{biog}$  se aprecian en la Figura 7.17, las cuales pueden ser atribuidas a la formación de sulfuro de plomo (PbS), siendo más evidentes en estos cultivos, debido a que la concentración de plomo es mayor. Lo anterior hace suponer que existe una transición de fases de plomo, previamente asociado a clorofosfatos hacia sulfuros de plomo.

7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos



**Figura 7.16** Cinética de PSH del consorcio JH para el cultivo sin plomo (JHPb0) y para los cultivos con diferentes concentraciones de plomo: JHPb1 (34  $\mu\text{M}$ ), JHPb2 (169 $\mu\text{M}$ ), JHPb3 (337 $\mu\text{M}$ ), JHPb4 (1687 $\mu\text{M}$ ), JHPb5 (2530  $\mu\text{M}$ ), JHPb6 (3380  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 7.17** Perspectiva de las caídas en la concentración de sulfuro acumulado en los cultivos JHPb4 y JHPb5.

### 7.2.7 Transición de fases de clorofosfatos de plomo a sulfuros de plomo

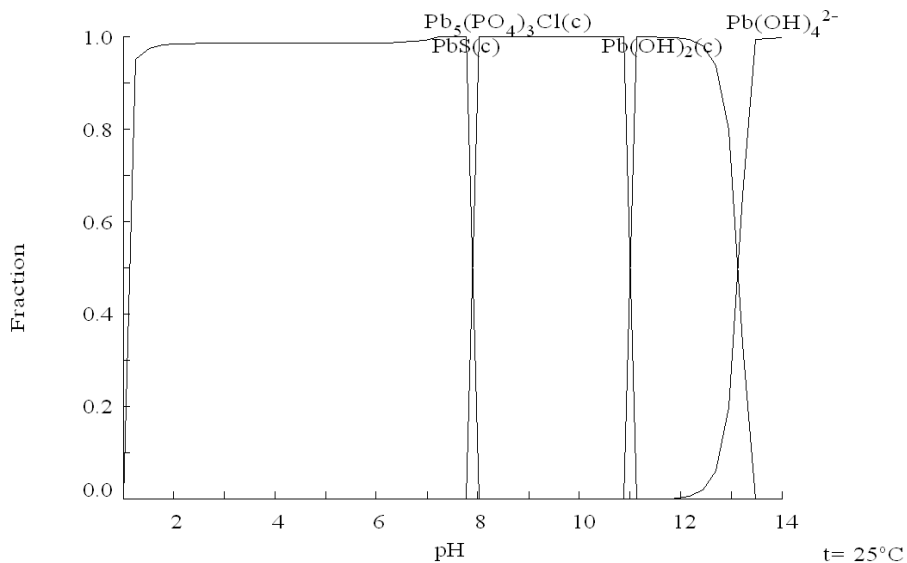
La formación del PbS se presenta una vez que el plomo ha sido liberado del clorofosfato. Este hecho ocurre por acción directa del  $H_2S_{biog}$  así como, de la consecuente disminución del potencial redox. Dichos valores, así como los del pH se encuentran en la Tabla 7.13. Cabe mencionar que los valores del pH, al final de las cinéticas disminuyeron con respecto al valor inicial (pH=7). Esta disminución puede deberse a la generación de acetato, producto de la oxidación incompleta del lactato (Ecuación 7.5).

**Tabla 7.13** Potenciales de óxido-reducción y pH, al inicio y al final, en las pruebas cinéticas del consorcio JH

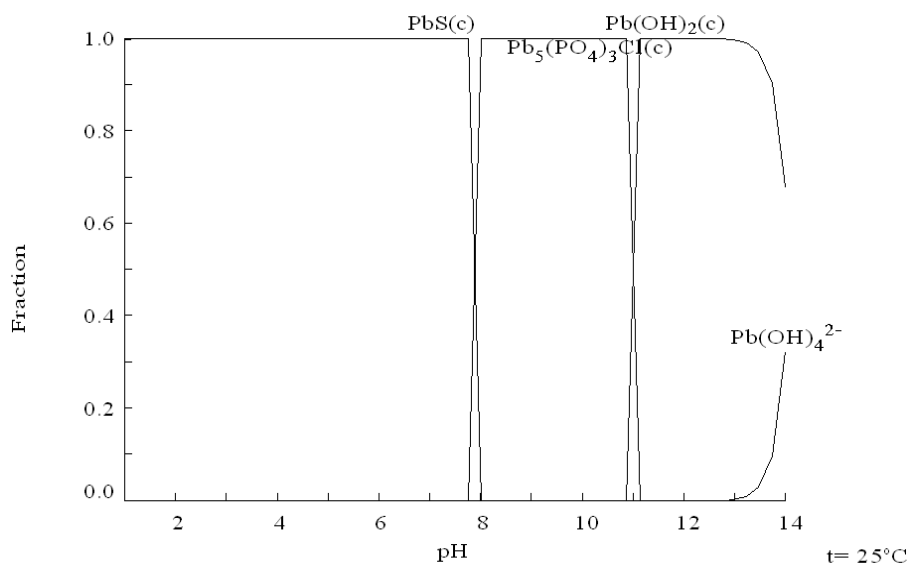
Muestra	$[Pb^{2+}]_0, \mu mol \cdot L^{-1}$	$Eh_i$ (mV)	$Eh_f$ (mV)	pH <sub>i</sub>	pH <sub>f</sub>
JHPb0	0.0	100	-206 ± 6	7	6.84 ± 2
JHPb1	34.1	100	-224 ± 10	7	6.85 ± 1
JHPb2	168.7	100	-218 ± 5	7	6.83 ± 2
JHPb3	337	100	-220 ± 2	7	6.86 ± 1
JHPb4	1687	100	-228 ± 5	7	6.86 ± 2
JHPb5	2530	100	-226 ± 4	7	6.84 ± 2
JHPb6	3380	100	ND	7	ND
ND = No determinado. La desviación estándar corresponde a duplicados (n=2)					

El desplazamiento del plomo desde clorofosfato hacia el PbS puede apreciarse en los diagramas de especiación de las Figuras 7.18 y 7.19. Estos diagramas fueron construidos con las condiciones prevalentes al final de las cinéticas de los cultivos JHPb1 y JHPb5, considerando una conversión de sulfato a sulfuro del 100% (15.6 mM de  $H_2S$ ). Como se puede observar en estos diagramas, y los correspondientes a las condiciones iniciales (Figuras 7.17 y 7.18), la fase de clorofosfato de plomo es desplazada hacia la derecha, en el intervalo de pH de 8 a 11.

7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos



**Figura 7.18** Diagrama de distribución de especies que muestra el predominio del sulfuro de plomo, y el desplazamiento del clorofosfato de plomo a pH cercano a 8, en el cultivo con la menor concentración de plomo empleada en este estudio (JHPb1). Las condiciones del diagrama son:  $[Pb^{2+}] = 34 \mu M$ ,  $[Cl^-] = 19.4 \text{ mM}$ ,  $[PO_4^{3-}] = 3.67 \text{ mM}$ ,  $[HS^-] = 15.60 \text{ mM}$ ,  $I = 0.1 \text{ M}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Diagrama realizado con el software MEDUSA ® (Puigdomenech, 2004).



**Figura 7.19** Diagrama de distribución de especies que muestra la formación del sulfuro de plomo y el desplazamiento del clorofosfato de plomo a pH cercano de 8, en el cultivo con una concentración de plomo de JHPb5. Las condiciones del diagrama son:  $[Pb^{2+}] = 2530 \mu M$ ,  $[Cl^-] = 19.4 \text{ mM}$ ,  $[PO_4^{3-}] = 3.67 \text{ mM}$ ,  $[HS^-] = 15.60 \text{ mM}$ ,  $I = 0.1 \text{ M}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Diagrama realizado con el software MEDUSA ® (Puigdomenech, 2004).

Por lo tanto, con el objetivo de correlacionar la concentración de  $H_2S_{biog}$  con el potencial redox, y estimar a que valores de Eh se puede presentar la transformación de clorofosfato a sulfuro de plomo, se preparó un cultivo de JH en una botella serológica y el Eh se siguió de manera continua con los electrodos preparados previamente (*cf.* Sección 5.8). En esta botella, además del potencial redox, se determinó la concentración de  $H_2S_{biog}$ . Para corroborar las lecturas de potencial de óxido-reducción obtenidas con los electrodos se realizaron cálculos del potencial empleando la ecuación de Nernst (Ecuación 7.10) considerando la reacción de reducción de sulfato a sulfuro reportada en la Tabla 2.1. Para ello se consideró el balance de azufre ( $SO_4^{2-}$ ,  $H_2S$ ), que indica que el sulfato disponible es el equivalente a la concentración del sulfato agregado inicialmente menos la concentración de sulfuro que se ha producido.

$$E = E^\circ - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad (7.10)$$

Donde  $E^\circ$  indica el potencial de óxido-reducción en estado estándar, R es la constante universal de los gases y T es la temperatura en °K, F es la constante de Faraday, n indica los electrones transferidos y Q es igual a las concentraciones de los compuestos elevadas a su coeficiente estequiométrico, Los cálculos detallados se reportan en el anexo I.

Los datos de las lecturas obtenidas, con los electrodos y con la ecuación de Nernst se presentan en la Tabla 7.14.

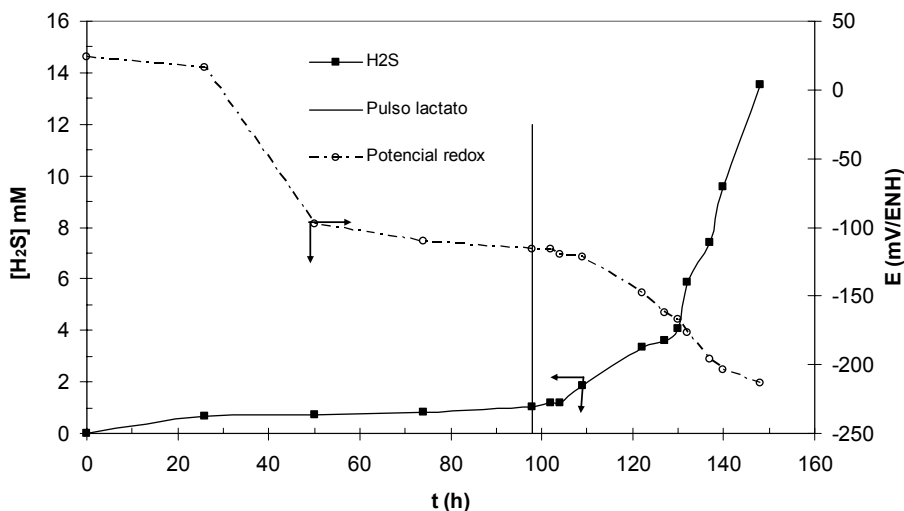
**Tabla 7.14** Correlación entre el sulfuro de hidrógeno biogénico y el potencial de óxido-reducción determinado experimentalmente con los electrodos y calculado empleando la ecuación de Nernst

<b>Tiempo (h)</b>	<b>H<sub>2</sub>S (mM)</b>	<b>Potencial redox con electrodos (mV/SHE)</b>	<b>Potencial redox con Ec. Nernst (mV/SHE)</b>
0	0.00	24	306
26	0.66	16	-195
50	0.70	-98	-195
74	0.80	-110	-196
98	1.05	-116	-197
102	1.20	-116	-197
104	1.21	-120	-198
109	1.84	-122	-199
122	3.33	-148	-201
127	3.59	-162	-202
130	4.08	-167	-202
132	5.85	-177	-204
137	7.39	-196	-205
140	9.57	-204	-207
148	13.51	-213	-212

Los resultados del potencial de óxido-reducción muestran que hasta las 130 horas existe una diferencia considerable entre los valores encontrados con los electrodos y los valores calculados empleando la ecuación de Nernst. Estas variaciones podrían estar asociadas, en un inicio, a la presencia de oxígeno remanente y con cambios en las concentraciones de lactato-acetato. A partir de las 132 horas se observa que la diferencia entre los potenciales comienza a disminuir, siendo prácticamente iguales al final del experimento.

La correlación de los datos de potencial obtenidos con los electrodos y la concentración de sulfuro se presenta en la Figura 7.20. Se observa que en un lapso de 24 h, el Eh disminuye inicialmente hasta 16 mV/SHE. Esto podría estar asociado al establecimiento del equilibrio entre el oxígeno, presente en la cabeza de aire de la botella, y los compuestos incorporados

en el sistema para su control (tioglicolato y del ácido ascórbico). Posteriormente, y después de 50 h, se observa un decaimiento abrupto del Eh hasta un valor de -98 mV/SHE alcanzando una primera fase pseudo-estacionara de 60 h. Finalmente, se observa un decaimiento constante del Eh que comienza 6 h después del segundo pulso de sustrato y que se correlaciona de manera semejante con la acumulación del  $H_2S_{biog}$  en solución, alcanzando finalmente el valor de -213 mV/SHE.

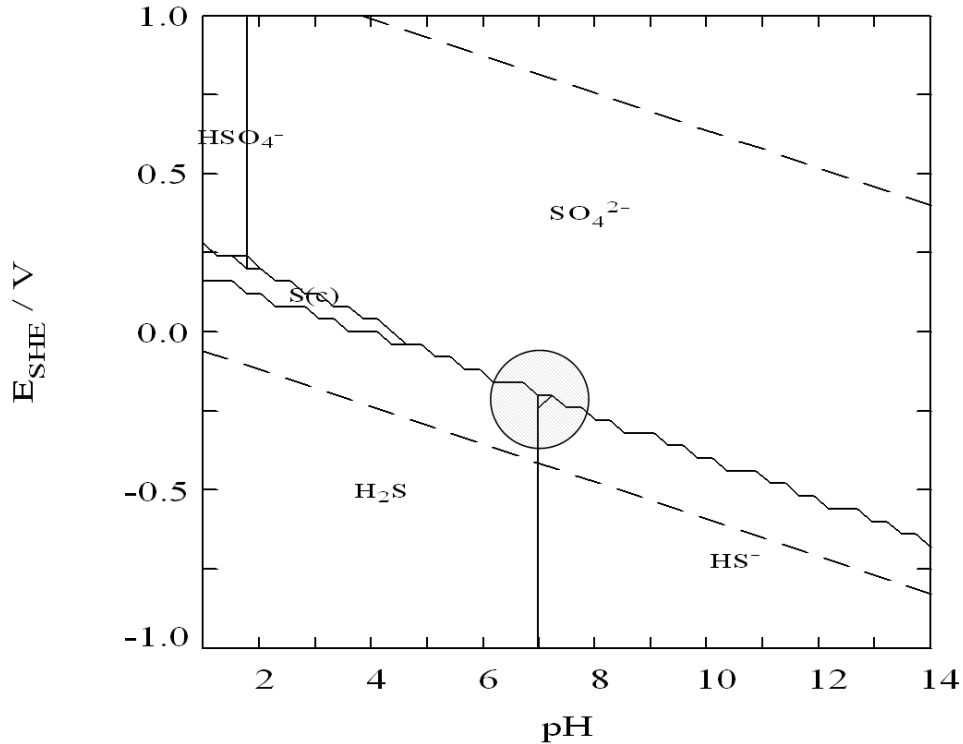


**Figura 7.20** Relación de evolución del potencial de óxido-reducción y la concentración de sulfuro de hidrógeno con respecto al tiempo.

Asociando a la figura anterior, el comportamiento mostrado por los cultivos JHPb4 y JHPb5 (*cf.* Figura 7.17) presentan fluctuaciones en concentraciones de sulfuro de hidrógeno de 5 y 8 mM respectivamente que corresponden a potenciales de óxido-reducción entre -170 y -200 mV respectivamente. Ubicando estos potenciales en un diagrama de predominio Eh-pH (Figura 7.21), se observa que para los potenciales reportados, a un pH de 7, el potencial se encuentra prácticamente en la frontera de predominio de las especies de sulfuro y sulfato. Este resultado experimental concuerda con los cálculos 5 y 8 mM de sulfuro, que indican la coexistencia de sulfatos que, de manera experimental, corresponden a valores de 10.6 y 7.6 mM de sulfato respectivamente. Lo anterior hace suponer que para valores cercanos a este potencial, y a las concentraciones de sulfuro determinadas, podría presentarse la transición de fases de clorofosfato de plomo a sulfuro de plomo. Además, la formación del sulfuro de plomo propicia también la liberación del grupo fosfato a la



solución, y por lo tanto la biodisponibilidad del mismo para las BSR, lo cual se ve reflejado en un incremento en la velocidad de producción de  $H_2S_{biog}$  que corresponden a la cinética observada después de 130 h en la Figura 7.20



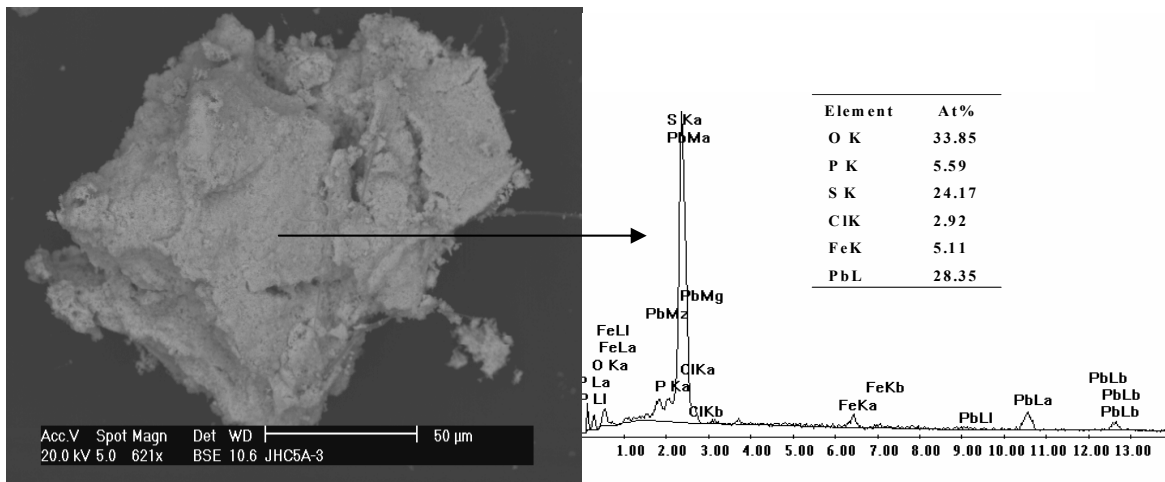
**Figura 7.21** Diagrama de predominio de especies (Eh-pH) considerando una concentración de 0.5 mM de  $H_2S$ , se observa que un potencial de -170 y -200, se encuentra en la frontera de predominio entre  $H_2S$  y  $SO_4^{2-}$ .

Diagrama efectuado con el software MEDUSA®.

El desplazamiento de la fase fosfatada se corroboró utilizando el EDS del MEB sobre algunos precipitados formados en el cultivo JHPb5, como el que se observa en la Figura 7.22. En el microanálisis de la partícula, se observa un porcentaje de hierro de 5.11 %, si esta cantidad es asociada a la neutralización inicial del sulfuro de hidrógeno, en la cual se buscó establecer una relación 1:1, entonces el azufre disponible asociado al plomo es de 19.06 %. Este porcentaje sugiere que existe una cantidad de plomo (9.29 %) que no se encuentra asociado al azufre y que, por lo tanto, se encuentra asociado al clorofosfato de plomo. Si se aplica la relación estequiométrica molar existente en dicha fase se tiene un valor de 9.31%:

$$Pb = \frac{5}{3}P = \frac{5}{3}5.59 = 9.31\% \quad (7.11)$$

El valor anterior de 9.31% es muy cercano al analizado por EDS-MEB, con un error del 0.2%. El resultado anterior corrobora que existen clorofosfatos y sulfuros de plomo, encontrándose el plomo primordialmente asociado a fases de sulfuro (19.06 %).



**Figura 7.22** Microanálisis químico de precipitados recuperados al final de las cinéticas, efectuadas en las botellas serológicas del cultivo JHPb5.

### 7.2.8 Biomasa estimada como sólidos suspendidos volátiles en las cinéticas del consorcio JH

La biomasa producida en los cultivos sin, y con la presencia de plomo, se reporta en la Tabla 7.15. Se observa que los sistemas de microcosmos JHPb1 (118 mg•L<sup>-1</sup>), JHPb2 (113 mg•L<sup>-1</sup>) y JHPb3 (97 mg•L<sup>-1</sup>) produjeron más biomasa en comparación con los cultivos sin plomo JHPb0 (93 mg•L<sup>-1</sup>). Este resultado, similar al observado con el consorcio P1 (*cf.* Tabla 7.7), podría estar relacionado al efecto de destoxificación de sulfuro por precipitación, del mismo, con el plomo. De esta forma conforme la concentración de plomo se incrementa (hasta JHPb3), la eliminación del sulfuro de hidrógeno es mayor, favoreciéndose así un ambiente propicio para el desarrollo de las comunidades microbianas presentes, reflejándose con una mayor producción de biomasa. Sin embargo, a partir de los

7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

cultivos JHPb4 ( $1687 \mu\text{MPb}^{2+}$ ) la biomasa comienza a disminuir ( $70 \text{ mg SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ ), probablemente por inhibición del plomo, o bien un déficit de fosfatos en el medio. Para la mayor concentración de plomo, en el cultivo JHPb6 ( $3380 \mu\text{MPb}^{2+}$ ), la biomasa decae abruptamente hasta  $8 \text{ mg SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ .

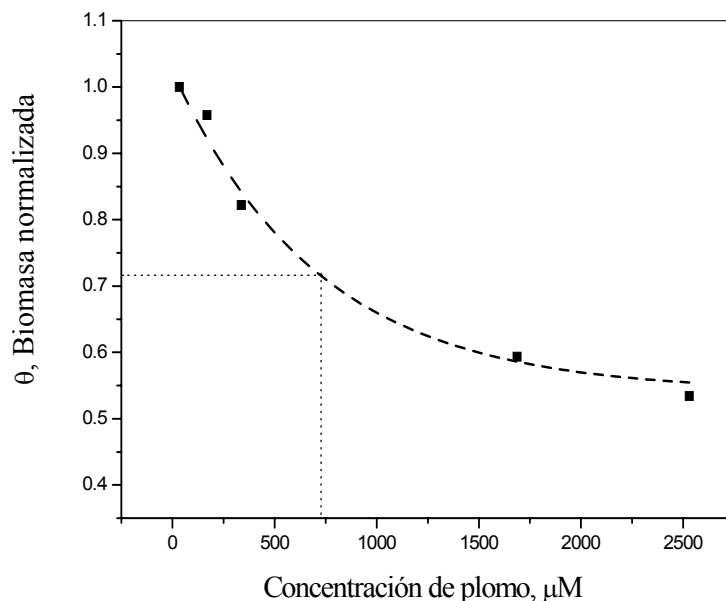
Realizando una comparación entre la biomasa producida por cultivos de los consorcios JH y Pb1 (exceptuando los cultivos con una concentración de  $3380 \mu\text{M Pb}^{2+}$ ), se observa que cada cultivo del consorcio JH, produjo una mayor cantidad de biomasa comparado con su equivalente de P1. Además, la biomasa en P1 comienza a disminuir en comparación con el cultivo sin plomo a partir de concentraciones de  $337 \mu\text{M Pb}^{2+}$ , mientras que la de JH comienza a disminuir en comparación con el cultivo sin plomo a partir de concentraciones de  $1687 \mu\text{M Pb}^{2+}$ . Este hecho constata que las comunidades de JH poseen una menor inhibición a la presencia de plomo, probablemente relacionado con la mayor concentración bioaccesible ( $3175 \text{ mg Pb}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) presente en el sitio de donde fueron recuperadas. Mientras que el consorcio P1 resulto ser más sensible a las concentraciones de plomo, y esto podría estar relacionado a que éste consorcio, ha estado expuesto a una concentración bioaccesible ( $316 \text{ mg Pb}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 10 veces menor que el consorcio JH.

**Tabla 7.15** Biomasa generada en el estudio cinético del consorcio JH

Cultivo	SSV en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
JHPb0	93 (25)
JHPb1	118 (38)
JHPb2	113 (27)
JHPb3	97 (17)
JHPb4	70 (10)
JHPb5	63 (10)
JHPb6	8 (2)
El valor entre paréntesis indica la desviación estándar de duplicados	

El impacto de la concentración de plomo en la biomasa, se analizó normalizando la biomasa ( $\theta$ ) (Ecuación 7.1). La biomasa normalizada en función de la concentración de plomo en el sistema, se muestra en la Figura 7.23. Como puede observarse, la producción

de biomasa sigue una tendencia, en función de la concentración de plomo, con decaimiento exponencial de primer orden ( $R^2 = 0.988$ ).



**Figura 7.23** Producción de biomasa normalizada ( $\theta$ ), del inóculo JH, como una función de la concentración de plomo. La línea punteada es el ajuste con una función de decaimiento exponencial de primer orden

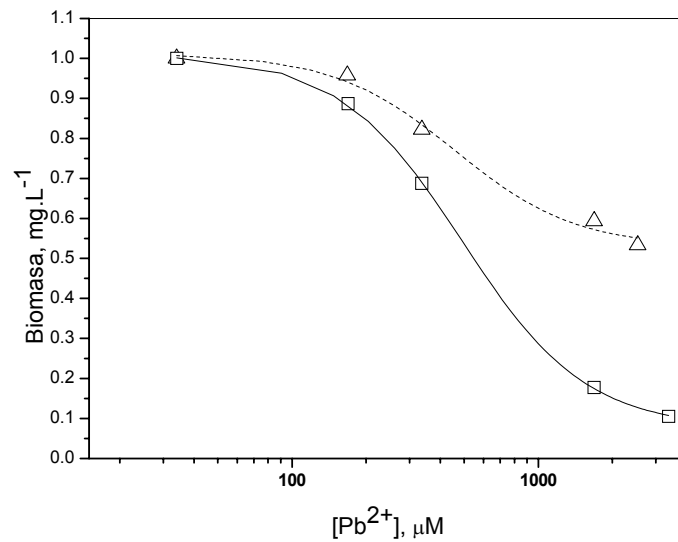
Los parámetros de ajuste del modelo se presentan en la Tabla 7.16a. El cálculo de la biomasa adimensional (teórica,  $[\theta_{\text{JH}}]_{\text{T}}$  y experimental  $[\theta_{\text{JH}}]_{\text{Exp}}$ ), se presentan en la Tabla 7.16b. A partir de estos parámetros se puede concluir que para una concentración de plomo de 715.4  $\mu\text{M}$ , la biomasa disminuiría al 71 %, que representa un 50% del incremento de biomasa entre las condiciones óptimas (JHPb1) a las más desfavorables (JHPB5) observadas experimentalmente.

Los resultados de producción de biomasa de P1 y JH, también pueden ser ajustados utilizando un modelo logístico de dosis-respuesta. La biomasa adimensional ajustada se observa en la Figura 7.24, cuyos parámetros de ajuste y función logística se presentan en la Tabla 7.17.

7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

**Tabla 7.16** Parámetros de ajuste de la función de decaimiento exponencial de primer orden (a). Valores experimentales y estimados de  $\theta$  en función de  $[Pb^{2+}]$

a) Parámetros de ajuste			b) Biomasa teórica y experimental		
Parámetro	Valor medio	DS	$[Pb^{2+}]$	$[\theta_{JH}]_T$	$[\theta_{JH}]_{Exp}$
$\theta_{max}$	0.48	$\pm 0.026$	0	1.02	0.79
$[Pb^{2+}]_{\theta=0.50}$	715.4	$\pm 201.3$	34.1	0.99	1
$\theta_0$	0.54	$\pm 0.02$	169	0.92	0.96
$R^2$	0.988		337	0.83	0.82
Función	$\theta = \theta_{max} e^{-\frac{[Pb]}{[Pb]_{\theta=0.50}}} + \theta_0$		715	0.71	
			1687	0.58	0.59
			2530	0.55	0.53



**Figura 7.24** Comportamiento de la biomasa producida por cada cultivo de los consorcios P1 ( $\square$ ), JH ( $\Delta$ ) y su respectivo ajuste a un decaimiento logístico, P1 (—), JH (----).

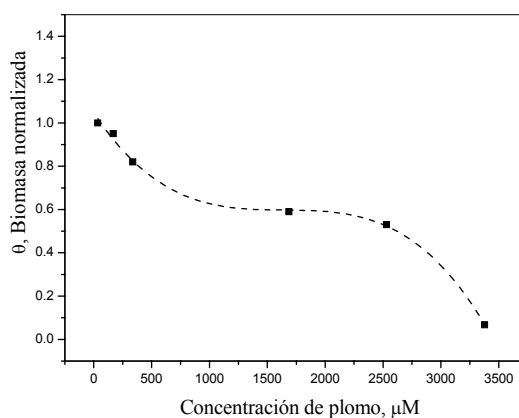
7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

**Tabla 7.17** Parámetros de ajuste de la función logística aplicada a los consorcios P1 y JH.

Parámetro	P1	JH
$\theta_{\min}$	1.01 ± 0.00706	1.01 ± 0.04
$\theta_{\max}$	0.0753 ± 0.01	0.52 ± 0.073
$[\text{Pb}^{2+}]_{\theta=0.50}$	491 ± 15	457 ± 164.8
P	1.7 ± 0.07	1.77 ± 1.05
R <sup>2</sup>	0.999	0.993
Función: $\theta = \theta_{\max} + \frac{\theta_{\min} - \theta_{\max}}{1 + ([\text{Pb}^{2+}] / [\text{Pb}^{2+}]_{\theta=50})^P}$		

El ajuste muestra que los parámetros  $\theta_{\min}$  y  $\theta_{\max}$  definen la biomasa comprendida entre los cultivos con mayor y menor producción de ésta. P indica la pendiente de la curva en el punto de inflexión, y  $[\text{Pb}^{2+}]_{\theta=0.50}$  representa la concentración de plomo a la cual existe una inhibición del 50 % en la producción de biomasa. Sin embargo, el ajuste logístico en JH sólo se puede aplicar considerando las primeras 5 concentraciones de plomo, y no es posible ajustar la función incluyendo la última concentración de plomo analizada.

Este último valor, implica un cambio en la función, la cual puede aproximarse con un polinomio de tercer orden (Figura 7.25), sin embargo, a pesar de tener un buen ajuste ( $R^2=0.998$ ), los parámetros de ajuste no tienen ningún significado físico como el expuesto en los modelos anteriores.



**Figura 7.25** Comportamiento de la biomasa de los cultivos en presencia de plomo del consorcio JH y su ajuste polinomial de tercer orden.

### 7.2.9 Estimación de las velocidades específicas de PSH con el consorcio JH.

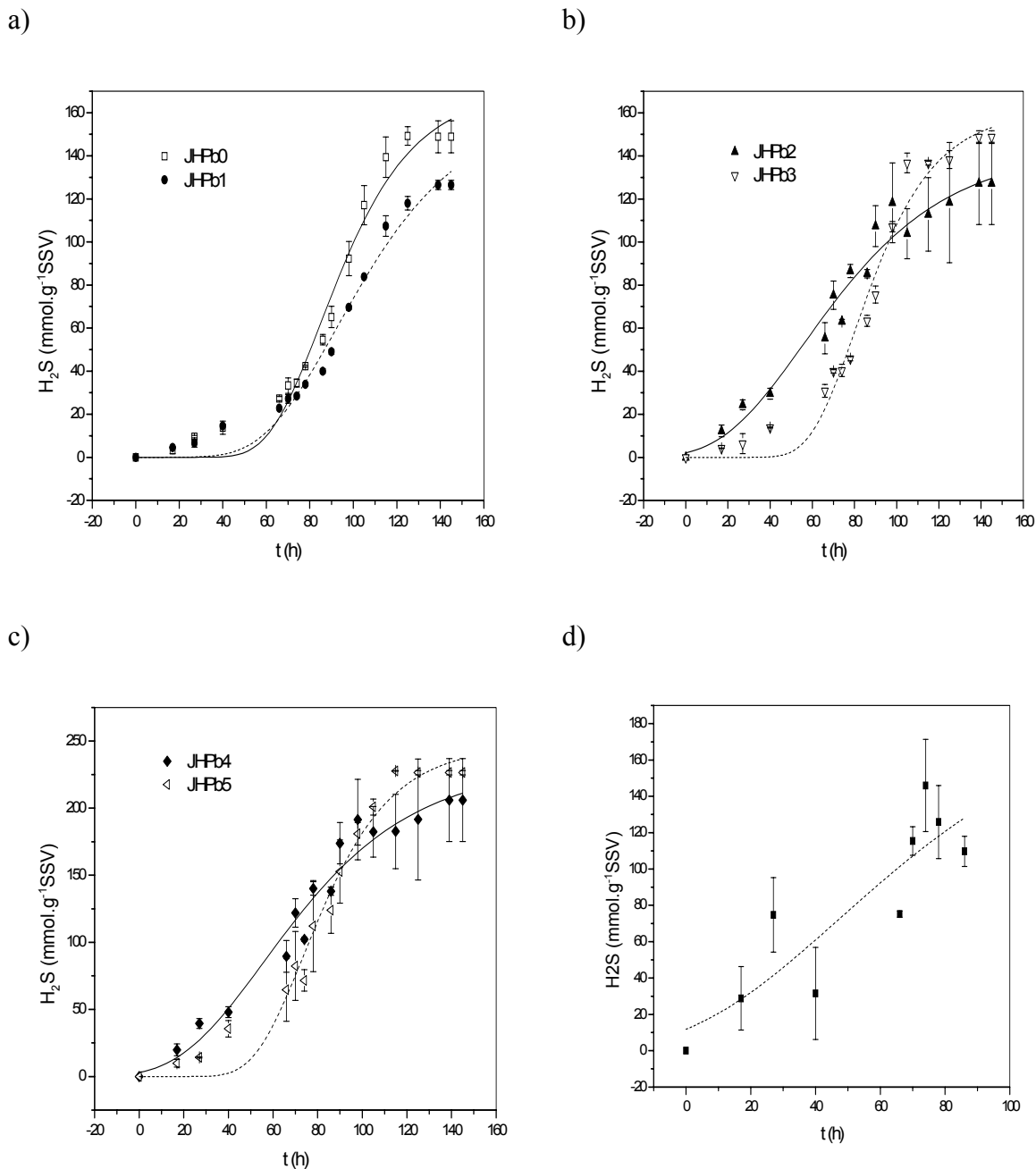
La producción específica de sulfuro biogénico ( $\text{mmolH}_2\text{S}\cdot\text{g}^{-1}\text{SSV}$ ) obtenido en las cinéticas microbianas del consorcio JH se observa en la Figura 7.26. Como en el caso de las cinéticas del consorcio P1 (*cf* Sección 7.2.1), se empleó el modelo de Gompertz (*cf* Sección 2.6) para calcular los parámetros cinéticos y las velocidades máximas específicas de PSH, obtenidas con el consorcio JH. La Figura 7.26, también presenta el ajuste de cada uno de los experimentos.

La Tabla 7.18 resume los parámetros de ajuste del modelo, así como, las velocidades máximas específicas de PSH para cada concentración de plomo.

**Tabla 7.18** Efecto de la concentración de plomo sobre la velocidad específica máxima de producción de sulfuro del consorcio JH

Cultivo	[Pb] en $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	K ( $\text{h}^{-1}$ )	$V_{\text{max PHS JH}}$	$R^2$
JHPb0	0	0.042	2.62	0.980
JHPb1	34	0.030	1.8	0.981
JHPb2	169	0.026	1.36	0.967
JHPb3	337	0.047	2.79	0.977
JHPb4	1687	0.026	2.2	0.967
JHPb5	2530	0.045	4.1	0.975
JHPb6	3380	0.026	1.95	0.87
$V_{\text{max}}$ representa la velocidad máxima de producción de sulfuro biogénico [en $\text{mmol H}_2\text{S}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ] aplicando el modelo Gompertz				

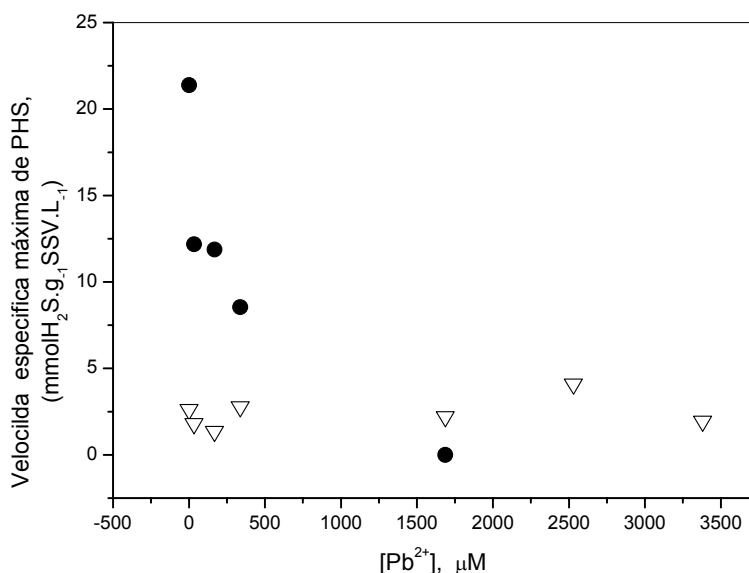
7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos



**Figura 7.26** Producción específica de sulfuro de hidrógeno del consorcio JH y ajuste con el modelo de Gompertz. a) Cultivos JHPb0 y JHPb1 (34.12μM Pb<sup>2+</sup>); b) Cultivos JHPb2 (169 μM Pb<sup>2+</sup>) y JHPb3 (337μM Pb<sup>2+</sup>); c) JHPb4 (1687 μM Pb<sup>2+</sup>) y JHPb5 (2530μM Pb<sup>2+</sup>); d) JHPb6 (3380μM Pb<sup>2+</sup>).

Las velocidades máximas específicas de producción de  $H_2S$  obtenidas para cada consorcio son comparadas en la Figura 7.27.





**Figura 7.27** Comparación entre la dependencia de la velocidad específica máxima de PSH en función de la concentración de plomo en: (●) Consorcio P1 y (▽) Consorcio JH.

La Tabla 7.19, de manera comparativa, resume las  $V_{\max}$  obtenidas para cada uno de los consorcios P1 y JH en función de la concentración de plomo. Como se puede observar, en las cinéticas sin plomo, la  $V_{\max}$  obtenida con JH es 10 veces menor que la alcanzada con P1. De hecho, la  $V_{\max}$  calculada con JH parece ser independiente de la concentración de plomo, a diferencia de P1. En el caso de JH, no se logra observar un cambio de la  $V_{\max}$  con la concentración de  $[Pb^{2+}]$ . Sin embargo, en el caso de P1, su valor se ve disminuido con cualquier concentración de plomo, lo que sugiere procesos de adaptación más lentos por la presencia de plomo. Este resultado sugiere además, que los consorcios bacterianos aislados de un sitio de mayor bioaccesibilidad de plomo, como es el caso de JH ( $3175 \mu\text{M Pb}^{2+}$ ), se encuentran condicionados a desarrollarse en sistemas con déficit de nutrientes (asociados a la presencia de plomo por consumo de fosfatos) y que han desarrollado un metabolismo más lento.

En cambio, en sitios donde la bioaccesibilidad de plomo es menor, como es el caso del consorcio P1 ( $316 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), la disponibilidad de fosfato favorece el metabolismo de las bacterias nativas del sitio, reflejado en una mayor velocidad de PSH.

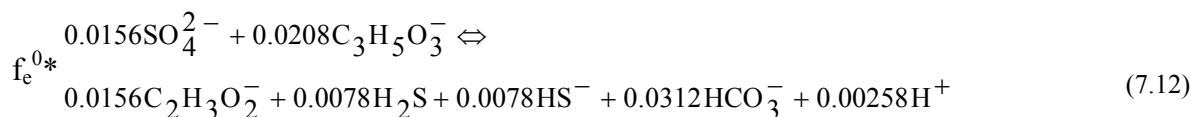
**Tabla 7.19** Efecto de la concentración de plomo sobre la velocidad específica máxima de producción de sulfuro de los consorcio JH y P1

Cultivo	$\mu\text{molPb}\cdot\text{L}^{-1}$	P1 $V_{\text{max}}$ ( $\text{mmol H}_2\text{S}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	JH $V_{\text{max}}$ ( $\text{mmol H}_2\text{S}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
<b>Pb0</b>	0	21.37616	2.62
<b>Pb1</b>	34.1	12.17313	1.8
<b>Pb2</b>	168.7	11.86731	1.36
<b>Pb3</b>	337	8.54416	2.79
<b>Pb4</b>	1687	--	2.2
<b>Pb5</b>	2530	--	4.1
<b>Pb6</b>	3380	13.8	1.95

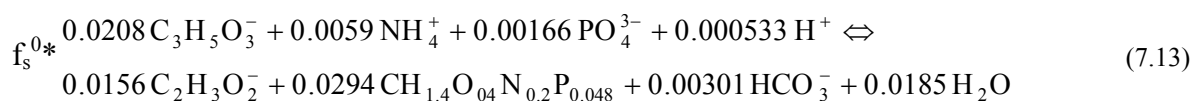
### 7.2.10 Estequiometría global de los cultivos del consorcio JH

Las ecuaciones de energía (Re) y de síntesis celular (Rs) descritas en la sección 2.3.1 y 2.3.2 respectivamente, pueden escribirse en términos de las concentraciones de lactato y de sulfatos utilizadas en los estudios de cinética del consorcio JH. Una vez expresadas, estas reacciones se correlacionaron con la fracción de electrones utilizada para la producción de energía ( $f_e^0$ ) y la correspondiente a síntesis celular ( $f_s^0$ ) (Sección 2.3.4). De esta forma se estimó la reacción global de cada cultivo bacteriano del consorcio JH, la cual muestra la concentración de  $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$  y la concentración de biomasa en una sola reacción.

Reacción de energía (Re):



Reacción de síntesis (Rs):



## 7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

Considerando la concentración final de  $H_2S_{\text{biog}}$  acumulado en cada uno de los cultivos es posible aproximarse al valor de  $f_e^0$ , correspondiente a la fracción energética, mediante un proceso iterativo. Esto se realizó multiplicando  $f_e^0 \cdot R_e$  y considerando la cantidad de sulfuro producido experimentalmente. Al cambiar  $f_e^0$ , el valor de  $f_s^0$  se debe ajustar automáticamente debido a que  $f_s^0 = 1 - f_e^0$  (Sección 2.3.4). Al multiplicar el valor ajustado por la reacción de síntesis ( $f_s^0 \cdot R_s$ ), se debe obtener una aproximación de la biomasa producida experimentalmente. La Tabla 7.20 reporta los valores teóricos encontrados para  $f_e^0$  y  $f_s^0$ .

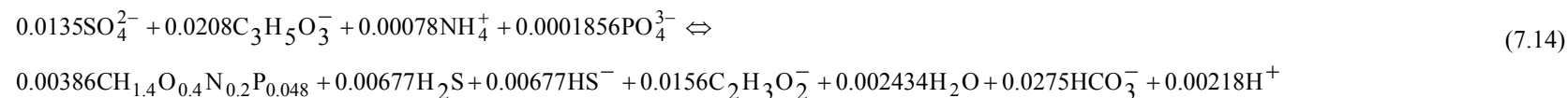
**Tabla 7.20** Parámetros estimados de  $f_e^0$  y  $f_s^0$  para los cultivos del consorcio JH

Cultivo [Pb <sup>2+</sup> ] $\mu\text{M}$	$f_e^0$	$f_s^0$
<b>SPb</b>	0.868	0.132
<b>34</b>	0.850	0.150
<b>169</b>	0.841	0.159
<b>337</b>	0.864	0.136
<b>1687</b>	0.901	0.099
<b>2530</b>	0.911	0.089

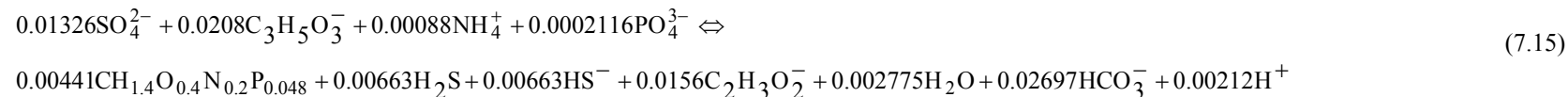
Sumando las reacciones anteriores, 7.12 y 7.13, se estima la estequiometría seguida para cada cultivo. Estas relaciones se presentan a continuación:

7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

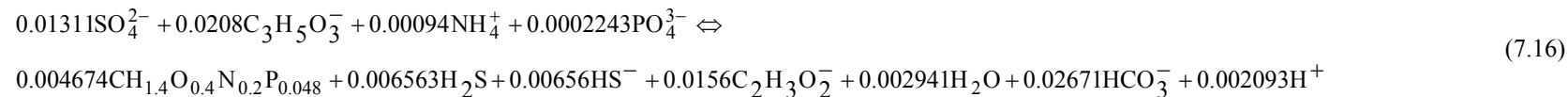
JHPb0



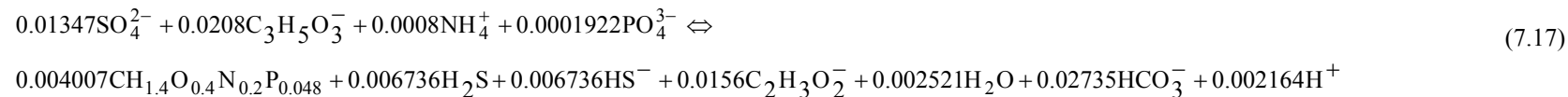
JHPb1



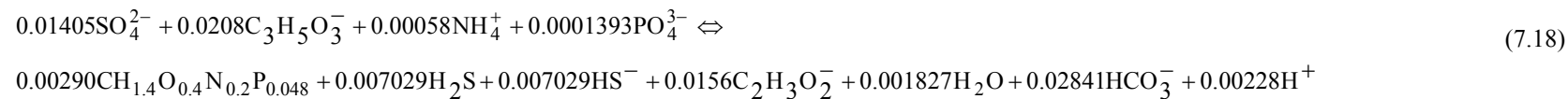
JHPb2



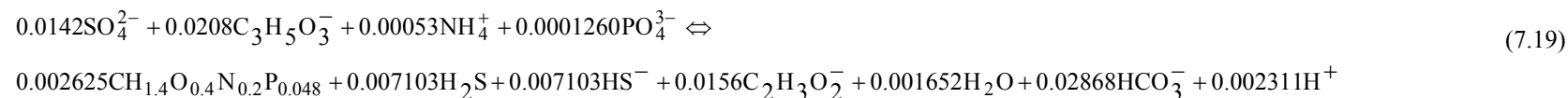
JHPb3



JHPb4



JHPb5



7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

Las Tablas 7.21 y 7.22 reportan los valores obtenidos experimentalmente de sulfuro (concentración final) y de biomasa, así como los respectivos valores obtenidos teóricamente mediante  $f_e^0$  y  $f_s^0$ . La incertidumbre del  $H_2S_{\text{biog}}$  estimado entre los valores experimentales y la aproximaciones teóricas se encuentran en un rango de porcentaje del 1.5 al 11.36 %. En cuanto a la biomasa, la incertidumbre entre los valores teóricos y experimentales, se encuentra en un rango de 0.04 al 10 %, siendo el cultivo JHPb1, el que presenta la mayor diferencia entre los valores teóricos y experimentales para sulfuro y biomasa.

**Tabla 7.21** Valores de sulfuro del consorcio JH determinados experimentalmente y correlacionados teóricamente empleando la reacción global para energía y síntesis celular

Cinética	Sulfuro total Experimental (mM H <sub>2</sub> S)	Desviación Estándar	Sulfuro total Teórico (mM H <sub>2</sub> S)	Diferencia entre los sulfuros (mM H <sub>2</sub> S)	% de error estimado
JHPb0	13.926	0.688	13.547	0.379	2.73
JHPb1	14.965	0.251	13.260	1.705	11.39
JHPb2	14.388	0.234	13.120	1.268	8.82
JHPb3	14.377	0.286	13.473	0.903	6.29
JHPb4	14.419	2.160	14.058	0.360	2.50
JHPb5	14.423	0.099	14.206	0.246	1.71
Los valores de sulfuro experimental corresponden al promedio de duplicados					

**Tabla 7.22** Valores de biomasa del consorcio JH determinados experimentalmente y correlacionados teóricamente empleando la reacción global para energía y síntesis celular

Cinética	Biomasa Experimental (mgSSV•L <sup>-1</sup> )	Desviación estándar	Biomasa Teórica (mgSSV•L <sup>-1</sup> )	Diferencia entre las biombras (mgSSV•L <sup>-1</sup> )	% de error estimado
JHPb0	93.333	10	93.197	0.135	0.15
JHPb1	118.333	38.333	106.228	12.105	10.23
JHPb2	113.333	26.666	112.601	0.731	0.65
JHPb3	96.666	16.666	96.525	0.140	0.15
JHPb4	70	10	69.968	0.031	0.04
JHPb5	63.333	10	63.241	0.092	0.15
Los valores de sulfuro experimental corresponden al promedio de duplicados					

La estequiometría propuesta anteriormente sugiere que: para los cultivos con concentraciones de plomo hasta 337  $\mu\text{M}$  (JHPb3) éste muestra un efecto benéfico, reflejado en un incremento de biomasa en comparación con el sistema sin plomo JHPb0. Sin embargo, la producción de sulfuro de hidrógeno disminuye, en comparación con las cinéticas con mayor concentración de plomo JHPb4 (1687  $\mu\text{M}$ ) y JHPb5 (2530  $\mu\text{M}$ ).

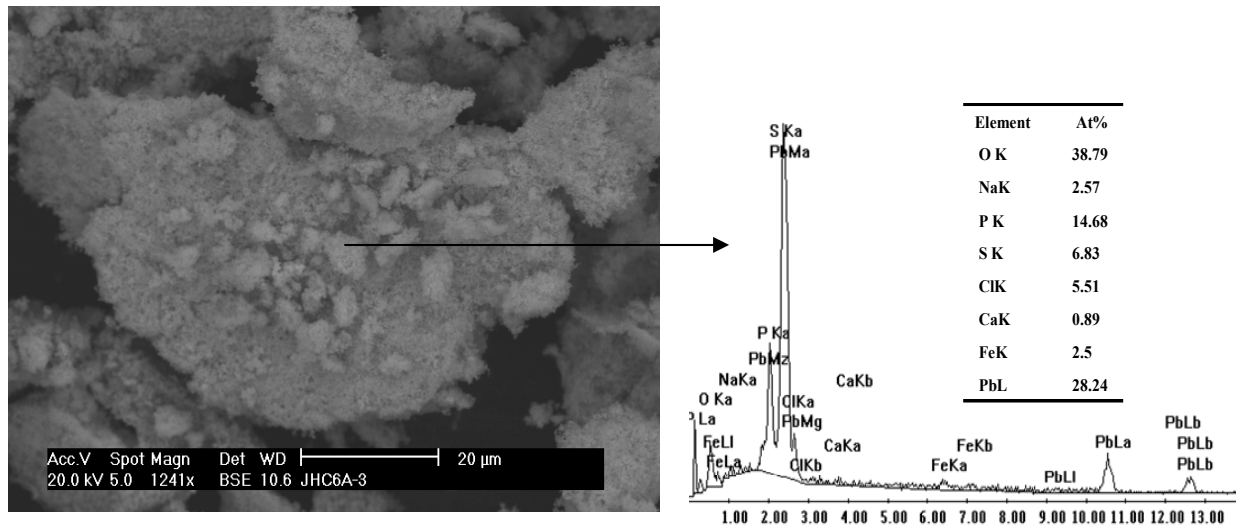
Las cinéticas JHPb4 y JHPb5 comienzan a mostrar un efecto inhibitorio por las concentraciones de plomo a las que son expuestas. El efecto más visible se observa en la producción de biomasa, ya que, en estos cultivos la producción de biomasa es menor en comparación con el resto de los cultivos (JHPb0, JHPb1, JHPb2, JHPb3). En cambio, la PSH en estos cultivos es ligeramente mayor en comparación al resto. Esta aseveración indica que la energía proveniente del donador de electrones es utilizada principalmente para dar mantenimiento a la célula, función que se ve reflejada en una mayor PSH, y no para la síntesis celular. La mayor acumulación de  $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$  en estos cultivos es visible experimentalmente durante la parte exponencial (*cf.* Figura 7.16).

#### **7.2.11 EDS-MEB sobre el precipitado en cinéticas de PHS bajo el escenario JHPb6**

El comportamiento del cultivo JHPb6 es diferente en comparación con los demás cultivos. La inhibición observada podría ser atribuida a una baja concentración de fosfato biodisponible, la cual no es suficiente para que la actividad biológica se desarrolle adecuadamente, o bien, podría estar asociada al efecto tóxico del plomo, presente en la fase no consolidada de clorofosfato de plomo, sobre el consorcio microbiano.

La limitada actividad biológica en este cultivo, sugiere que debe prevalecer la fase de clorofosfato de plomo anteriormente mencionada (*cf.* Sección 7.2.5). De hecho, esta fase fue confirmada por medio de los análisis realizados EDS-MEB en los sólidos suspendidos fijos obtenidos de las determinaciones de biomasa (Figura 7.28).

## 7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos



**Figura 7.28** Microfotografía y microanálisis de los precipitados recuperados al final de las cinéticas efectuadas en las botellas serológicas de la cinética JHPb6.

Los resultados EDS-MEB confirman las relaciones estequiométricas del plomo en la fase de clorofosfato ( $Pb_5(PO_4)_3Cl$ ) en los precipitados del cultivo JHPb6. Teóricamente, para un porcentaje de fósforo de 14.68 %, es necesario un porcentaje atómico de plomo de 24.46 % (Ecuación 7.20). El valor experimental presenta un error del 3.78 % con respecto a la cantidad de plomo en el precipitado (28.24 %).

$$Pb = \frac{5}{3}P = \frac{5}{3}14.68 = 24.46 \quad (7.20)$$

Según las estimaciones anteriores, existe un 3.78 % de plomo remanente que se encuentra asociado a otra fase. Considerando que las relaciones atómicas del azufre con los iones de plomo y hierro son 1:1, entonces la suma del porcentaje atómico de ambos elementos debe coincidir con la cantidad de azufre obtenida en el microanálisis, es decir:  $Fe + Pb = 2.5 + 3.74 = 6.24$ .

El valor teórico anterior, se encuentra muy cercano al valor del azufre reportado en el microanálisis de la Figura 7.28, siendo éste de 6.83 %, con una porcentaje de error del 0.59 %.

Este resultado sugiere que las fluctuaciones del  $H_2S_{\text{biog}}$  observadas en la Figura 7.16, en un tiempo cercano a las 80 horas y 100 horas, podrían estar relacionadas a las transiciones parciales de las fases de clorofosfatos de plomo hacia las fases de sulfuro correspondiente.

El análisis realizado al cultivo JHPb6 sugiere dos hipótesis:

- La concentración de fosfato disponible en solución de 1.64 mM  $PO_4^{3-}$  (cf. Tabla 7.12) no fue suficiente para que el consorcio JH presentará actividad reductora de sulfato. Sin embargo, en las ecuaciones que describen la estequiometría global de los cultivos, se estima que la máxima concentración requerida de fosfato es de 0.22 mM (cultivo JHPb2) valor 7.45 veces inferior al disponible.
- Las fluctuaciones observadas en la Figura 7.16, así como el microanálisis de las partículas del cultivo JHPb6, indican un cambio parcial de fases, sugieren que existió actividad sulfato-reductora. Dicha actividad podría haber sido limitada por la presencia y formación del clorofosfatos de plomo.

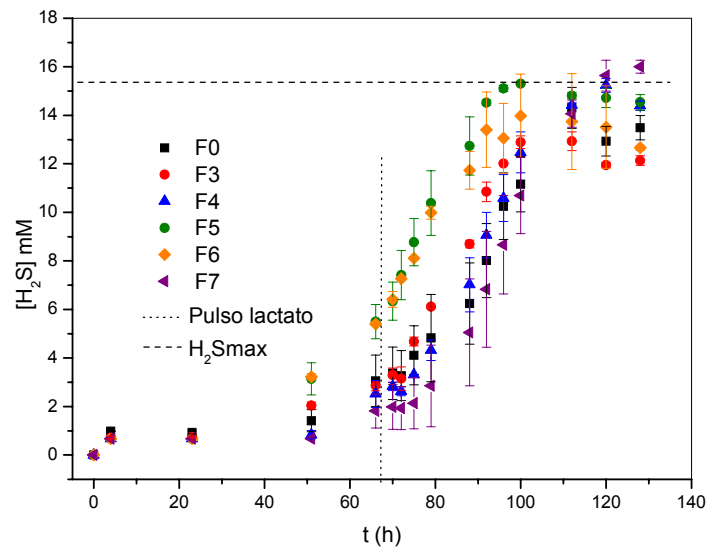
### 7.2.12 Cinéticas microbianas con déficit de fosfato

Con el objetivo de discernir si las diferencias observadas en las cinéticas microbianas con plomo, son atribuidas a un efecto inhibitorio de éste, o a la biodisponibilidad de fosfato, se prepararon cultivos sin plomo, y con concentraciones de fosfato menores a la recomendada para el medio Postgate C (cf. Sección 5.5). Por lo tanto, se consideraron las cantidades de fosfato que quedarían disponibles en solución, si este reaccionara con el plomo incorporado al sistema en las cinéticas JHPb3, JHPb4, JHPb5 y JHPb6 (Tabla 7.12). Se establecieron estas cinéticas de plomo como referencia, debido a que son las que presentaron mayor diferencia en la PSH, y biomasa. Además, se analizó un caso extremo de déficit de fosfato, denominado JHPb7. Los valores de las cinéticas se presentan en el Anexo G (Tabla H.3).



La Figura 7.29, muestra que todas las cinéticas presentaron actividad reductora de sulfatos. Sin embargo, se aprecia una diferencia en las cinéticas F5 y F6, que serían las equivalentes a JHPb5 y JHPb6 (cf. Sección 7.2.14). Inclusive, en la cinética con déficit de fosfato (F7), que corresponde a una concentración aun menor a la biodisponible en el cultivo JHPb6, también se observó actividad biológica. Por lo tanto, este resultado indica que la inactividad mostrada por el cultivo JHPb6 no se debió a un déficit de fosfatos, sino a un efecto inhibitorio del plomo en la fase no consolidada de clorofosfato de plomo.

A pesar de que en todas las cinéticas, con déficit de fosfatos, se aprecia PHS, es importante señalar que la disponibilidad de fosfato no fue un factor limitante para la actividad biológica. Esto se puede concluir por los resultados de la cinética F7 donde la PHS es incluso superior después de 120 h, a la PHS observada en las demás cinéticas. Sin embargo, la diferencia con este factor es que el tiempo de retardo es mayor.



**Figura 7.29** Cinéticas de producción de sulfuro del consorcio JH, en ausencia de plomo y con déficit de fosfatos: F0 (3670  $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ ), F3 (3470  $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ ), F4 (2660  $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ ), F5 (2150  $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ ), F6 (1640  $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ ) F7 (820  $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ ).

### 7.2.13 Biomasa estimada en las cinéticas con déficit de fosfato del consorcio JH

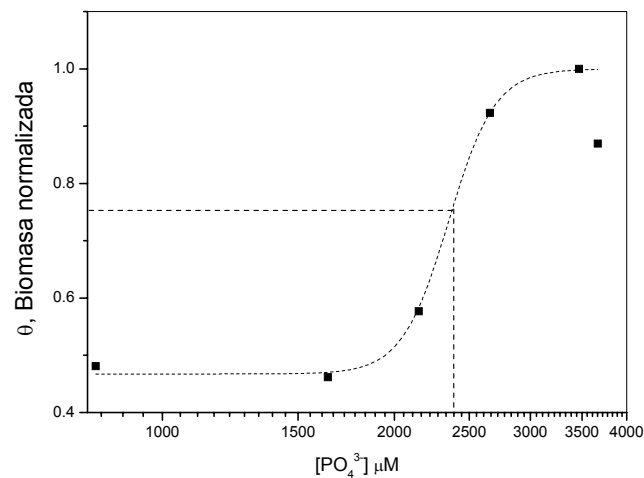
La producción de biomasa en los cultivos anteriores se reporta en la Tabla 7.23, estos resultados muestran que la producción de biomasa es disminuida conforme el consorcio se encuentra en un sistema con déficit de fosfato. Esto es más evidente en las cinéticas F5, F6 y F7.

**Tabla 7.23** Biomasa generada en el estudio cinético con déficit de fosfato del consorcio JH

Cultivo	SSV (en mg•kg <sup>-1</sup> )
F0 [3670]	113 (8.05)
F3 [3470]	130 (10)
F4 [2660]	120 (20)
F5 [2150]	75 (5)
F6 [1640]	60 (20)
F7 [820]	63 (7.5)

El valor entre corchetes representa la concentración de fosfato en el sistema en  $\mu\text{M}$ . El valor entre paréntesis representa la desviación estándar de duplicados

Los datos anteriores son representados gráficamente, normalizando la biomasa (Ecuación 7.1), como se aprecia en la Figura 7.230, así mismo, se presenta su ajuste mediante una curva logística de dosis-respuesta ( $R^2 = 0.96$ ):



**Figura 7.30** Biomasa producida por los cultivos con déficit de fosfatos y su respectivo ajuste a un crecimiento logístico.

## 7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

Donde  $\theta_{\max}$  y  $\theta_{\min}$  son los valores asintóticos máximo y mínimo, que es posible obtener con estas comunidades con respecto a las condiciones óptimas o de stress con respecto al fosfato. El valor de  $\theta_0$  representa en este caso, la menor concentración de fosfato que por su déficit provoca una disminución del 50% del valor del incremento de biomasa, medido entre los valores asintóticos (Tabla 7.24). En este modelo, la concentración correspondiente al punto de inflexión (2350  $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ ), indica que por debajo de esta concentración se reduce la producción de biomasa por déficit del nutriente.

**Tabla 7.24** Parámetros de ajuste de la función logística aplicada a los consorcios P1y JH

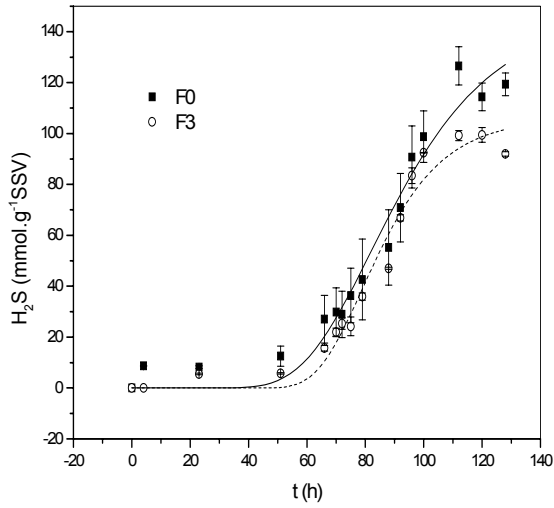
Parámetro	P1
$\theta_{\min}$	$0.46 \pm 0.04$
$\theta_{\max}$	1
$[\text{PO}_4^{3-}]_{\theta=0.50}$	2350
P	$14.46 \pm 6$
$R^2$	0.96
Función:	$\theta = \theta_{\max} + \frac{\theta_{\min} - \theta_{\max}}{1 + ([\text{PO}_4^{3-}]/[\text{PO}_4^{3-}]_{\theta=50})^P}$

### 7.2.14 Velocidades máximas específicas de producción de sulfuro del consorcio JH con déficit de fosfato

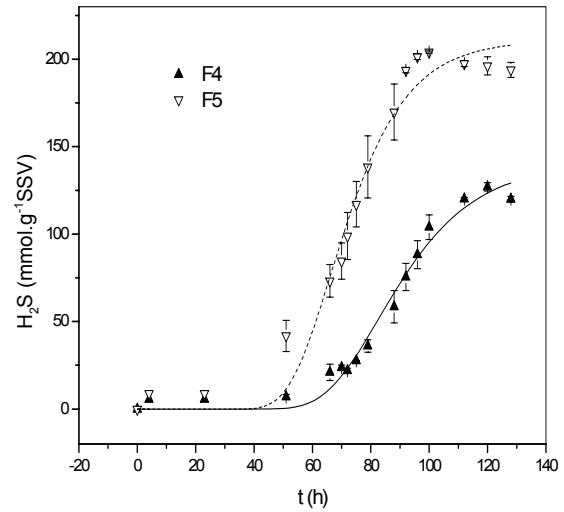
Los resultados de la producción específica de  $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$  ( $\text{mmolH}_2\text{S} \cdot \text{g}^{-1}\text{SSV} \cdot \text{h}^{-1}$ ) se indican en el Anexo G (Tabla G.4) y el comportamiento de las cinéticas se ilustran en la Figura 7.31, así como su el ajuste correspondiente con el modelo de Gompertz.

Posteriormente de manera similar a las cinéticas anteriores, los parámetros del modelo de Gompertz (*cf.* Sección 2.6) fueron utilizados para calcular la  $V_{\max}$  de PHS, la cual se reporta en la Tabla 7.25.

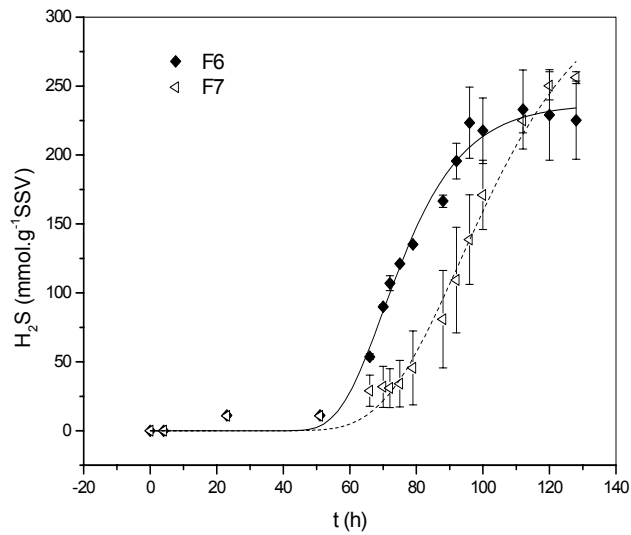
7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos



a)



b)



c)

**Figura 7.31** Producción específica de sulfuro de hidrógeno y ajuste con el modelo de Gompertz de los cultivos con déficit de fósforo: a) Cultivos F0 ( $3670 \mu M PO_4^{3-}$ ) y F3 ( $3470 \mu M PO_4^{3-}$ ); b) Cultivos F4 ( $2660 \mu M PO_4^{3-}$ ) y F5 ( $2150 \mu M PO_4^{3-}$ ) y c) F6 ( $1640 \mu M PO_4^{3-}$ ) y F7 ( $820 \mu M PO_4^{3-}$ ).

**Tabla 7.25** Efecto del déficit de fosfato sobre la velocidad específica máxima de producción de sulfuro del consorcio

JH

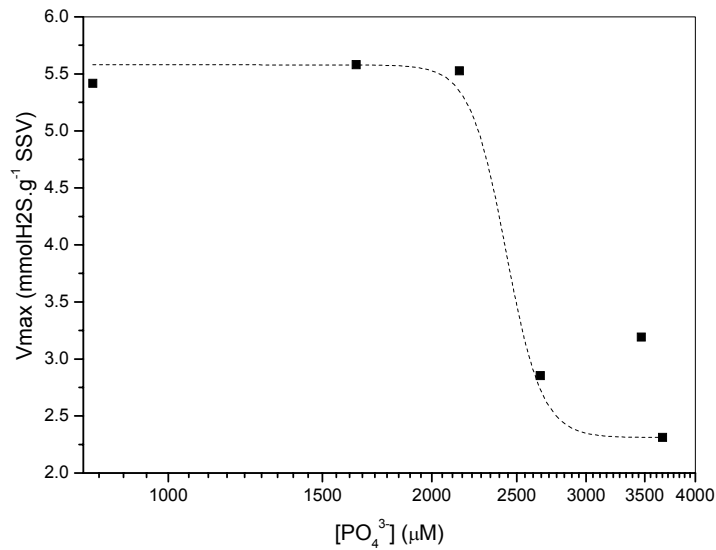
Cultivo	$[\text{PO}_4^{3-}] \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$V_{\text{max}} (\text{mmol H}_2\text{S}\cdot\text{gSSV}\cdot\text{h}^{-1})$	$R^2$
F0	3670	2.31	0.970
F3	3470	3.19	0.970
F4	2660	2.85	0.985
F5	2150	5.52	0.975
F6	1640	5.58	0.973
F7	820	5.42	0.990

La  $V_{\text{max}}$  de PHS, reportada en la Tabla 7.25, se presenta en la Figura 7.32, donde se observa que un déficit de fosfatos favorece la  $V_{\text{max}}$  de PHS.

Comparando las  $V_{\text{max}}$  de PSH de las cinéticas, con el consorcio JH, en función de la concentración de plomo, con las obtenidas con el análisis de déficit de fosfatos, se observa que: Para las cinéticas JHPb0 y F0, las velocidades de los cultivos que contienen plomo similares e iguales a 2.62 y 2.31 mmoles de  $\text{H}_2\text{S}\cdot\text{g}^{-1}\text{SSV}$ , respectivamente. Lo mismo se observa hasta la comparación de las cinéticas de JHPb3 y F3. Sin embargo, para el resto de los cultivos las diferencias son más evidentes, por ejemplo la velocidad máxima en F4 (2.85 mmoles  $\text{H}_2\text{S}\cdot\text{g}^{-1}\text{SSV}$ ) es  $\sim 0.65$  veces superior al obtenido con su equivalente de plomo JHPb4 (2.20 mmoles  $\text{H}_2\text{S}\cdot\text{g}^{-1}\text{SSV}$ ) y es 1.4 veces superior para los cultivos F5 (5.52 mmoles  $\text{H}_2\text{S}\cdot\text{g}^{-1}\text{SSV}$ ) que en JHPb5 (4.1 mmoles  $\text{H}_2\text{S}\cdot\text{g}^{-1}\text{SSV}$ ). Este hecho sugiere que los cultivos que presentan déficit de fosfato tienen un comportamiento diferente a los cultivos en los cuales se tiene la presencia de plomo, lo cual es reflejado en las velocidades máximas de producción de sulfuro.

Las  $V_{\text{max}}$  de PSH se ajustaron empleando el modelo logístico de dosis-respuesta, como se observa en la Figura 7.32. Los parámetros de ajuste se reportan en la Tabla 7.26. Se observa que para una concentración de fosfatos de 2430  $\mu\text{M}$ , la velocidad de producción decaerá en un 50 %, concentración de fosfatos similar a la cual la biomasa decae en un 50 % (2350  $\mu\text{M}$ ). Los datos anteriores sugieren que para concentraciones menores al punto de inflexión, 2430  $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ , la velocidad de producción de sulfuro será de 50 %, comparado con la velocidad máxima, la cual se presenta a concentraciones de 1640  $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ .

7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos



**Figura 7.32** Velocidad específica máxima de producción de sulfuro de hidrógeno con respecto a la concentración de fosfatos y su respectivo ajuste a un decaimiento logístico.

**Tabla 7.26** Parámetros de ajuste de la función logística aplicada a los consorcios P1y JH

Parámetro	Valor medio
$\theta_{\min}$	2.34
$\theta_{\max}$	5.58
$[\text{PO}_4^{3-}]_{\theta=0.50}$	2430
P	$21.15 \pm 9.7$
$R^2$	0.93
Función:	$\theta = \theta_{\max} + \frac{\theta_{\min} - \theta_{\max}}{1 + ([\text{PO}_4^{3-}] / [\text{PO}_4^{3-}]_{\theta=50})^p}$

### 7.3 Pruebas de estabilización en columnas

En esta sección se presentan los resultados de los balances de sulfuro de hidrógeno requeridos en una columna de percolación, con actividad sulfato reductora, con el propósito de estabilizar los EPT bioaccesibles presentes en la muestra clasificada como JH (*cf.* Sección 7.1.3). Se presenta también, la estimación del tiempo de residencia necesario del medio de cultivo en la zona biológica para el consumo del lactato y del sulfato, así como el monitoreo del pH y de los perfiles del potencial redox del sistema propuesto. Además, se incluyen los resultados de los análisis de bioaccesibilidad de la muestra posterior a la estabilización y las micrografías, con los microanálisis químicos respectivos, obtenidas mediante EDS-MEB, de las fases sólidas presentes después de la estabilización.

#### 7.3.1 Balances de masa para la estimación del sulfuro de hidrógeno biogénico requerido para la estabilización de EPT en la muestra JH

Para la estabilización de los iones metálicos de JH se requiere estimar la cantidad estequiométrica de sulfuro biogénico requerido en la columna. Lo anterior se estima con las concentraciones bioaccesibles determinadas en la caracterización previa de la muestra JH (*cf.* Sección 7.1.3, Tabla 7.3). Los valores de EPT bioaccesibles, en esta sección son expresados en mM EPT kg<sup>-1</sup><sub>suelo</sub> y son reportados en la Tabla 7.27.

**Tabla 7. 27** Concentración bioaccesible de EPT en la muestra JH, expresada en mmol•kg<sup>-1</sup> suelo

Muestra	Concentración bioaccesible					
	As	Pb	Cd	Zn	Cu	Fe
JH	4.53 ± 0.27	15.34 ± 0.22	0.53 ± 0.01	18.66 ± 0.31	1.30 ± 0.01	7.23 ± 0.12

De acuerdo a la mineralogía que podría esperarse con respecto a los elementos de la Tabla 7.27, se consideró la formación de las siguientes fases de sulfuro: sulfuros de arsénico (As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>, AsS),

sulfuro de plomo (PbS), sulfuro de cadmio (CdS), sulfuro de zinc (ZnS) y sulfuro de hierro (FeS<sub>2</sub>). Considerando sus respectivas relaciones estequiométricas se obtienen las mM de H<sub>2</sub>S biogénico requerido para estabilizar un kilogramo de muestra JH (Ecuación 7.21).

$$[\text{H}_2\text{S}_{\text{necesario}}] = \frac{3}{2} [\text{As}^{5+}] + [\text{Pb}^{2+}] + [\text{Cd}^{2+}] + [\text{Zn}^{2+}] + 2[\text{Fe}^{2+}] \quad (7.21)$$

Siguiendo la ecuación anterior, la cantidad necesaria de sulfuro por kilogramo de muestra es de 55.784 mMol H<sub>2</sub>S<sub>biog</sub>•kg<sup>-1</sup><sub>muestra</sub>. En este caso se propone estabilizar 150 gramos de suelo, por lo que la cantidad de sulfuro requerido es de ~8.4 mM H<sub>2</sub>S<sub>biog</sub>. Dicha cantidad sería aproximadamente equivalente a la cantidad de sulfato que se tendría que agregar al sistema, si se considera una conversión cercana al 100% de S-sulfato hacia S-sulfuro. Además, siguiendo la relación estequiométrica del consorcio bacteriano JH, obtenida en la Sección 7.2.4 y, expresada en términos de cantidad de materia como mM C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>=1.33\*mM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, se obtiene que para 8.368 mM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> la cantidad de lactato necesaria es de 11.154 mM.

### 7.3.2 Estimación del tiempo de residencia en las columnas de estabilización

Por otra parte, también es necesario conocer la velocidad a la que se producirá el H<sub>2</sub>S. Esta velocidad depende de la cantidad de biomasa que puede emplearse como inóculo. Por lo tanto, se emplearon botellas serológicas de 120 ml, para producción de biomasa, obteniendo un inóculo de 96 mg de biomasa medida como SSV para comenzar el experimento en columnas. (*cf.* Sección 5.6). Considerando que dentro del diseño experimental de esta propuesta, el objetivo es observar las modificaciones obtenidas sobre la cantidad de EPT disponibles (medida en términos de fracción bioaccesible), se propuso un arreglo de columna con flujo ascendente en donde la zona biológica no entra en contacto con plomo. De esta manera se elimina la restricción por inhibición al crecimiento microbiano en presencia de plomo en solución interfacial, y se evaluó el tiempo de estabilización en función de los resultados obtenidos con la velocidad específica del cultivo JHPb0, que corresponde a 2.62 mM H<sub>2</sub>S•g SSV•h<sup>-1</sup> (Tabla 7.22).



## 7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

Por lo tanto, la velocidad de producción de  $\text{H}_2\text{S}$ , por hora calculada para la cantidad de inóculo introducida en la columna fue de  $6.115 \text{ mM H}_2\text{S}\cdot\text{d}^{-1}$ . Con una producción total de  $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ , de  $8.37 \text{ mM}$  en  $1.36$  días.

Por lo tanto, considerando un caudal de entrada a la columna de estabilización de  $4.5 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$  y un volumen en la zona biológica de  $0.14 \text{ L}$  (volumen de control), se estimó que el tiempo de residencia del volumen de sustrato orgánico alimentado a la columna de percolación fue de  $0.75 \text{ h}$  con una producción de  $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ , por cada volumen de control igual a  $0.192 \text{ mM}$ .

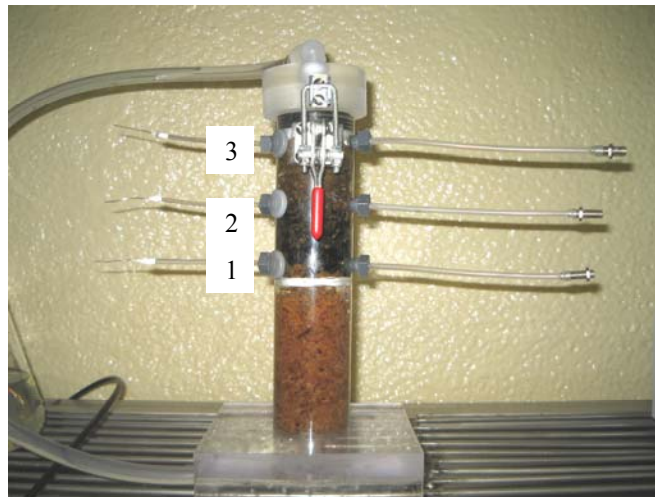
Por lo tanto, el tiempo necesario para la producción de  $8.4 \text{ mM}$  de  $\text{H}_2\text{S}$  es de  $33$  horas, tiempo estimado para la estabilización de los EPT contenidos en  $150 \text{ g}$  de muestra JH, con un volumen total procesado de  $4.5 \text{ L}$ . Las condiciones de operación estimadas se resumen en la Tabla 7.28.

**Tabla 7.28** Condiciones de operación estimadas para las pruebas de estabilización en columnas

Concentración total requerida de sulfuro de hidrógeno biogénico	$8.4 \text{ mM H}_2\text{S}$
Concentración de lactato a emplear	$11.154 \text{ mM C}_3\text{H}_5\text{O}_3^-$
Concentración de sulfatos	$8.4 \text{ mM SO}_4^{2-}$
Cantidad de muestra a estabilizar	$150 \text{ g}$
Tiempo de residencia del medio de cultivo en la zona biológica	$0.75 \text{ h}$
Flujo Volumétrico	$4.5 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$
Tiempo de estabilización	$33 \text{ h}$
Concentración de EPT a estabilizar:	En $\text{mM}\cdot\text{kg}_{\text{suelo}}^{-1}$
As	$4.53$
Pb	$15.34$
Cd	$0.53$
Zn	$18.66$
Fe	$7.23$
Cu	$1.30$

### 7.3.3 Bioestabilización de suelo en la columna de flujo ascendente

En la etapa de adaptación de las BSR, únicamente se colocó la sección de la columna correspondiente a la zona biológica y la zona de distribución de flujo (Fotografía 7.3). En este caso se registró solamente la evolución del potencial de óxido reducción, en cada puerto de muestreo, como respuesta de la actividad sulfato-reductora de la comunidad inoculada. Los potenciales obtenidos durante la etapa de adaptación de las BSR se reportan en la Tabla 7.29. La identificación de los puertos de muestreo en la columna de flujo ascendente sigue la dirección de flujo, es decir, desde la parte inferior de la columna hacia la parte superior (Fotografía 7.3).

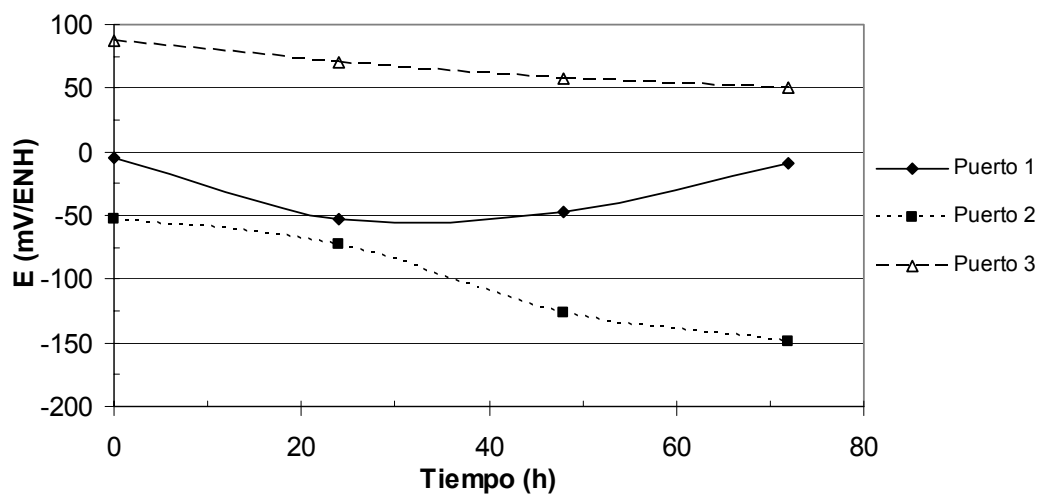


**Fotografía 7.3** Zona de reacción biológica, para la adaptación de las BSR

**Tabla 7.29** Potenciales de óxido-reducción obtenidos en la zona biológica de la columna, durante la adaptación de las bacterias

Tiempo (h)	Potencial (mV/SHE)		
	Puerto 1	Puerto 2	Puerto 3
0	-5	-53	87
24	-53	-73	70
48	-47	-126	57
72	-9	-150	51

Los resultados anteriores se presentan en la Figura 7.33, donde puede observarse que el potencial en el puerto uno tiende a decaer durante las primeras 20 horas de adaptación, sin embargo, a partir de las 48 horas comienza a incrementarse. Dicho incremento podría estar asociado a interferencias en las lecturas del potencial, debido quizá al contacto entre los electrodos con material sólido. El decaimiento del potencial es más visible en el puerto dos donde alcanza valores de -150 mV/SHE, si este potencial es ubicado en la Figura 7.20 (*cf.* Sección 7.2.7), se observa que se encuentra en la zona exponencial de la producción de sulfuro de hidrógeno. El puerto tres presenta los valores más positivos desde el inicio de la prueba, esto podría estar relacionado con el hecho de que la biomasa fue colocada principalmente en la zona media y en la zona baja (Fotografía 7.4), por lo que el decaimiento del potencial en la zona superior es más lento.



**Figura 7.33** Perfil de potencial de óxido reducción en la zona biológica de la columna durante el periodo de adaptación de las BSR

## 7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos



**Fotografía 7.4** Zona biológica de la columna, asentamiento de la biomasa principalmente en la zona media y baja, ocasionando que el potencial es más bajo que en la zona superior de esta sección.

Posteriormente al tiempo de adaptación, se colocó la zona de reacción estabilización de EPT incluyendo la muestra JH a estabilizar y el ensamble de todo el conjunto se puede observar en la Fotografía 7.5.



**Fotografía 7.5** Ensamble de la columna con cada una de sus secciones, zona de estabilización (suelo), zona biológica (bacterias), zona de distribución de flujo (aserrín), multímetro, bomba y depósito para recuperar la solución al final de la estabilización.

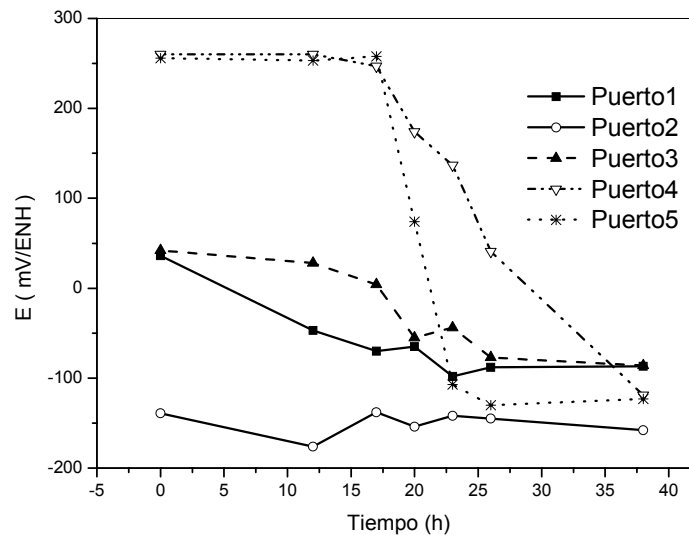
7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

Una vez que la columna fue conformada con las diferentes secciones se tomaron lecturas del pH, y del potencial, en cada puerto de muestreo para la primera prueba de estabilización. Dichos valores se muestran en la Tabla 7.30.

**Tabla 7.30** Valores del potencial de óxido reducción (Eh) y del pH en la columna durante la primera estabilización

Tiempo h	Puerto 1		Puerto 2		Puerto 3		Puerto 4		Puerto 5	
	E (mV <sub>SHE</sub> )	pH	E (mV <sub>SHE</sub> )	pH	E (mV <sub>SHE</sub> )	pH	E (mV <sub>SHE</sub> )	pH	E (mV <sub>SHE</sub> )	pH
0	36	7.01	-139	7.14	42	7.09	260	ND	256	7.01
12	-47	7.05	-176	7.15	28	7.3	260	ND	253	7.42
17	-70	7.08	-138	7.17	4	7.24	247	ND	258	7.4
20	-65	7.16	-154	7.18	-55	7.26	174	ND	74	7.27
23	-98	7.08	-142	7.11	-44	7.1	137	ND	-107	7.13
26	-88	7.12	-145	7.11	-77	7.14	41	ND	-130	7.15
38	-87	7.2	-158	7.09	-86	7.15	-119	ND	-123	7.16

Los datos del potencial se presentan en la Figura 7.34. En esta figura se puede observar que desde el inicio de la prueba el potencial disminuye en la zona biológica, y que a partir de las 23 horas existe poca variación en los valores registrados en los puertos 1 y 3.



**Figura 7.34** Comportamiento del potencial de óxido-reducción durante la primera estabilización de EPT en la muestra JH.

El potencial del puerto 2 se mantuvo prácticamente constante a lo largo de la estabilización. En cambio, la zona química presenta una ligera disminución del potencial durante las primeras 17 horas, lo cual fue asociado a la aparición de flujos preferenciales dentro de la columna, por donde el sulfuro salía de la zona sin entrar en contacto con el suelo, estos caminos fueron identificados por la aparición de tonalidades oscuras alrededor del suelo (Fotografía 7.6).

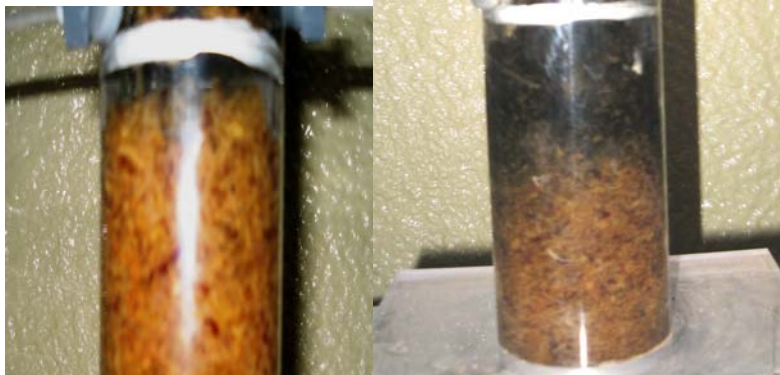


**Fotografía 7.6** Caminos preferenciales de flujo en el suelo JH, durante el transcurso de la primer prueba de estabilización de EPT.

Debido a lo anterior, se realizó la homogenización del suelo manualmente y se observó el decaimiento del potencial a partir de las 20 horas. Para el puerto 4, la tendencia del potencial a disminuir se mantuvo hasta el final de la prueba (-119 mV/SHE). Precisamente una vez que se cumplió el tiempo establecido de 38 horas, los puertos 4 y 5 (-123 mV/SHE) presentaron valores de potencial similares. En cuanto a los datos de pH, no fue posible tomar muestras del puerto 4, debido a que al momento de realizar la succión no fue posible extraer la solución

A pesar de que las zonas biológica y la de distribución de flujo están separadas por una placa de acrílico cubierta con papel filtro, es posible que durante la primera prueba de estabilización haya existido un proceso difusivo del sulfuro hacia la zona de distribución de flujo. Lo anterior debido a que dicha zona comenzó a presentar una tonalidad oscura en la parte superior. Incluso, al término de la primera prueba de estabilización, la tonalidad oscura abarcó hasta la mitad de esta

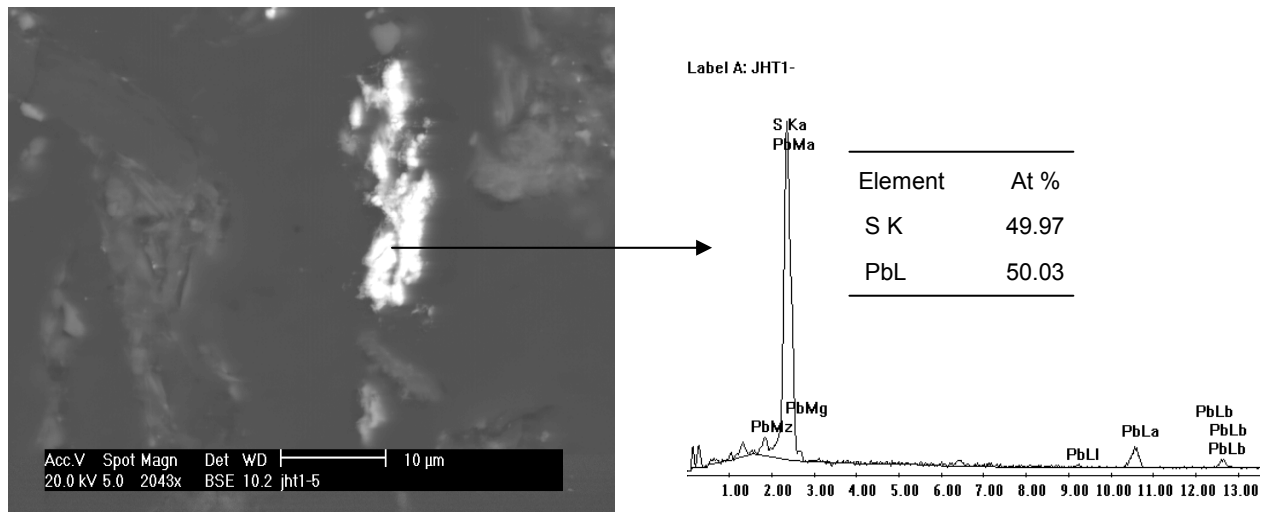
zona por lo que además de la presencia de sulfuro de hidrógeno, es posible que haya existido el transporte de bacterias por las paredes de la columna (Fotografía 7.7).



**Fotografía 7.7** Tonalidad oscura en la de distribución de flujo, al comienzo y al final de la primer prueba de estabilización de EPT en la muestra JH.

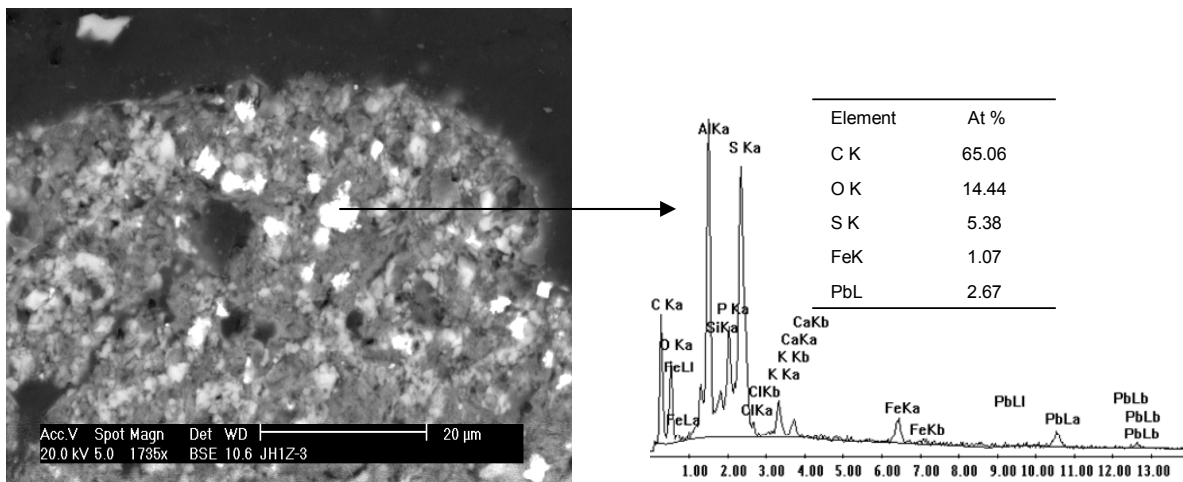
La formación de fases asociadas a sulfuros fue comprobada por microanálisis EDS acoplado al MEB (Figura 7.35). En la microfotografía se observan aglomeraciones de partículas sin morfología definida que pueden considerarse de formación biogénica. Además, el resultado del microanálisis indica que existe una relación atómica 1:1 entre el azufre y el plomo sugiriendo la formación de PbS.

7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos



**Figura 7.35** Microfotografía y microanálisis químico de partículas del suelo posteriormente a la primer estabilización con  $H_2S_{biog}$

La fotomicrografía de la Figura 7.36 también muestra algunas partículas pequeñas sobre la superficie del suelo analizado, las cuales fueron formadas por el contacto entre la superficie del suelo y el  $H_2S_{biog}$ . El microanálisis sugiere la presencia de sulfuros de plomo y hierro biogénicos.



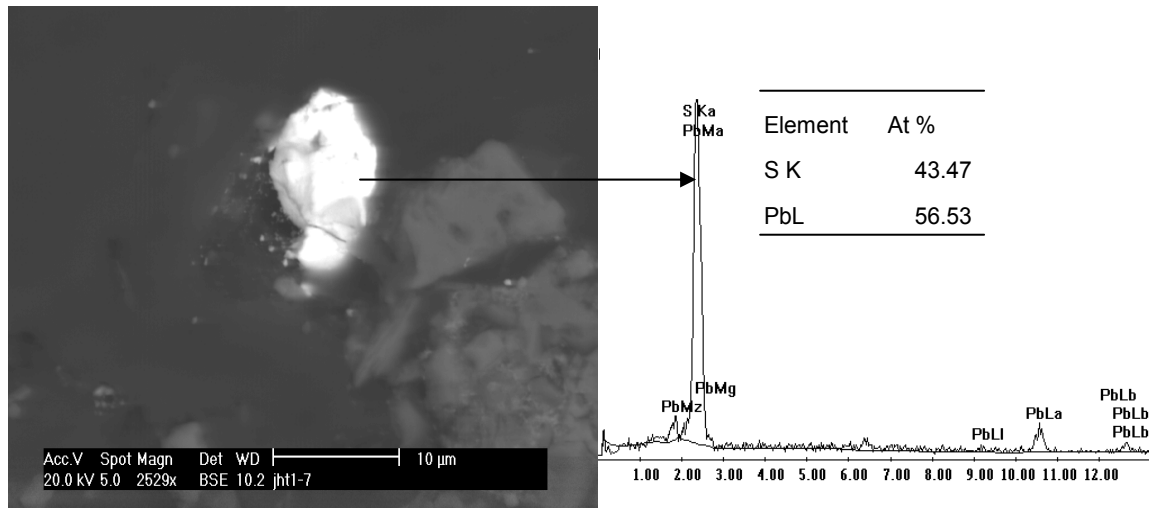
**Figura 7.36** Microfotografía del suelo estabilizado, donde se aprecian aglomeraciones atribuidas a  $H_2S_{biog}$  sobre la superficie de partículas de suelo.

Lo descrito anteriormente es más evidente cuando se observan partículas con morfologías diferentes y bien definidas. La partícula que se muestra en la Figura 7.37, cuyo microanálisis



## 7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

muestra que se trata de sulfuro de plomo, ejemplifica esta aseveración. En este caso se visualizan planos bien definidos, lo que es un indicativo de que esta partícula no se formó durante el periodo de estabilización en la columna, sino por el contrario es una partícula primaria, nativa del sitio de muestreo.



**Figura 7.37** Micrografía y microanálisis químico de una partícula con morfología definida de JH.

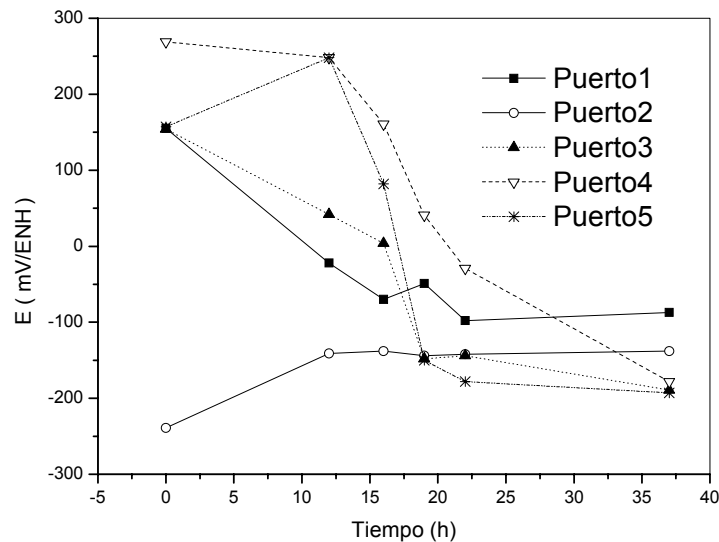
Con el objeto de verificar el proceso de estabilización y la reproducibilidad del sistema relativo a la actividad biológica reductora de sulfatos, se realizó una segunda prueba de estabilización. En esta última, se mantuvieron las condiciones de operación definidos en la Tabla 7.28. Sin embargo, es importante mencionar que no se considero el posible cambio en la velocidad de producción de sulfuro asociado al incremento de biomasa obtenido en la primera estabilización. Los resultados del pH y el potencial de óxido-reducción de la segunda estabilización se muestran en la Tabla 7.31.

7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

**Tabla 7.31** Valores del potencial de óxido-reducción y del pH en la columna durante la segunda estabilización

Tiempo	Puerto 1		Puerto 2		Puerto 3		Puerto 4		Puerto 5	
	E (mV <sub>SHE</sub> )	pH	E (mV <sub>SHE</sub> )	pH	E (mV <sub>SHE</sub> )	pH	E (mV <sub>SHE</sub> )	pH	E (mV <sub>SHE</sub> )	pH
0	155	7.01	-239	7.07	154	7.05	269	ND	157	7.4
12	-22	8.05	-141	7.54	42	7.27	248	ND	248	7.64
16	-70	7.61	-138	7.3	4	7.51	161	ND	82	7.4
19	-49	7.03	-144	6.95	-148	7.14	41	ND	-150	7.19
22	-98	7.45	-142	7.36	-144	7.42	-29	ND	-178	7.6
37	-87	7.30	-138	7.41	-189	7.15	-178	ND	-193	8.11

Los valores anteriores se representan en la Figura 7.38. En ésta se puede observar que, al inicio del experimento, únicamente el puerto 2 presenta un potencial redox negativo. Para la siguiente lectura efectuada a las 12 h, la lectura del puerto 1 y 3 fue de -22 y 42 mV/SHE respectivamente.



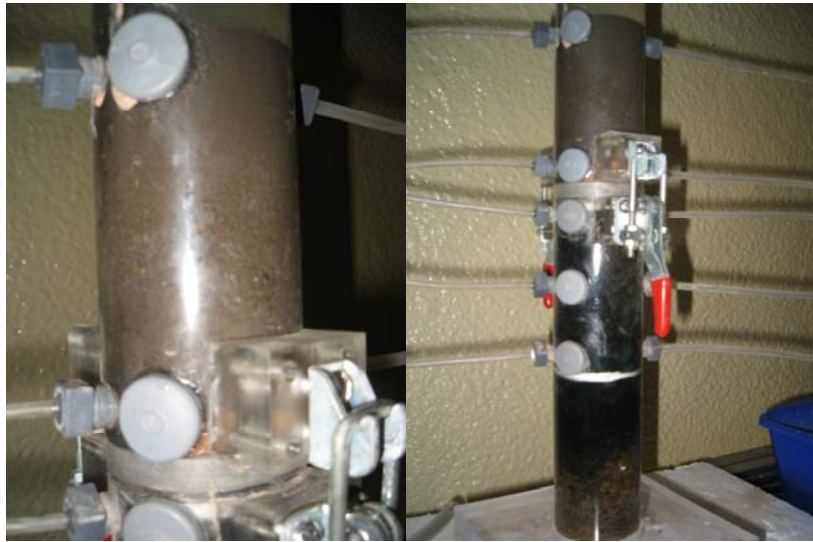
**Figura 7.38** Comportamiento del potencial de óxido-reducción durante la segunda prueba de estabilización de EPT en la muestra JH

Una vez cumplidas las 19 horas el potencial alcanzó valores negativos en la zona biológica, manteniéndose prácticamente constante, disminuyendo únicamente en el puerto 3. En la zona de estabilización del suelo la disminución en el potencial es más visible a partir de las 16 horas, tiempo en el cual aparecieron flujos preferenciales por lo que se realizó una agitación manual, para homogeneizar el suelo, a partir de ese momento, dicha agitación se realizó de manera constante al registrar las lecturas del potencial. El comportamiento del potencial en los puertos 4

y 5 fue de manera similar a la primera estabilización, en el puerto 4 el potencial continuó disminuyendo hasta el final de la prueba, mientras que en el puerto 5 el potencial se mantuvo constante a partir de las 22 horas. El puerto 4 tuvo un comportamiento similar a la primera estabilización, debido a que el potencial redox continuó disminuyendo hasta el final de la prueba. Como puede observarse, al igual que en la primera estabilización, los puertos 4 y 5 adquieren un valor de potencial redox muy similar (-178 y -193 mV/SHE) al final de la prueba, lo cual es un indicativo de que el sistema ha alcanzado el equilibrio con los elementos disponibles para estabilizarse en la muestra. Este resultado asevera los cálculos de operación presentados en la Tabla 7.28.

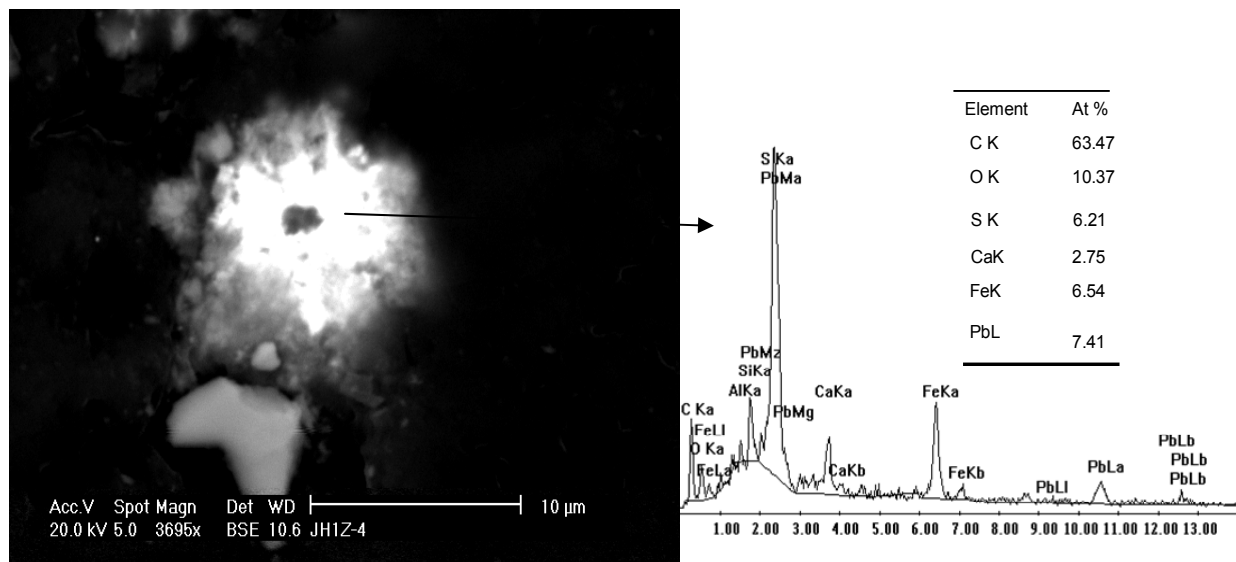
Durante ambas pruebas, la zona de estabilización del suelo fue la última en registrar valores de potencial negativos, este suceso se encuentra relacionado al consumo del sulfuro de hidrógeno por parte de los EPT susceptibles de estabilizarse. Posteriormente conforme los elementos susceptibles de estabilizarse disminuyen, el sulfuro de hidrógeno comienza a acumularse, disminuyendo el potencial de óxido reducción.

Durante las pruebas, el suelo se tornó oscuro conforme fue pasando el tiempo de estabilización, la Fotografía 7.8 muestra una imagen del suelo al final de la segunda estabilización, además de mostrar que la zona de distribución de flujo adquirió una coloración idéntica a la zona biológica.



**Fotografía 7.8** Coloración oscura adquirida por la muestra JH al final de la segunda prueba de estabilización de EPT  
b) Coloración idéntica en las zonas de distribución de flujo y biológica.

La microfotografía obtenida para las partículas de JH correspondientes a la segunda estabilización muestra, al igual que en el caso anterior, algunas aglomeraciones, sin morfología definida, debidas a la formación de sulfuros por actividad biológica (Figura 7.39). El microanálisis muestra una relación atómica cercana 1:1 entre el sulfuro y el plomo, lo que sugiere la presencia de sulfuro de plomo biogénico. En este caso el hierro podría estar asociado a óxidos de hierro, los cuales por el poco tiempo de operación no fueron desestabilizados en su totalidad.



**Figura 7.39** Microfotografía y microanálisis de partículas de la muestra JH posteriormente a la segunda estabilización.

### 7.3.4 Bioaccesibilidad de los suelos estabilizados

Con el objetivo de comprobar si el sulfuro de hidrógeno producido tuvo un efecto en el suelo, se realizaron pruebas de bioaccesibilidad a las muestras tratadas, las cuales fueron comparadas con la prueba de bioaccesibilidad de la muestra antes del tratamiento. Las muestras correspondientes a la primera y segunda estabilización se denominaron JHD1 y JHD2, la muestra sin estabilizar se denominó JHA. Sin embargo, dado que la prueba de bioaccesibilidad utiliza un gramo de suelo seco (*cf.* Anexo B), y para evitar procesos de oxidación durante el secado de las muestras recién estabilizadas, se determinó la fracción de sólido, siguiendo la relación:

$$FS = \frac{P_S}{P_H} \quad (7.22)$$

Donde  $P_H$  corresponde al peso de la muestra húmeda (aproximadamente se colocaron 50 g) y  $P_S$  corresponde al peso seco final de la muestra (44.15 g para JHD1 y 46.3 g para JHD2). De esta

## 7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

forma, se determinó que la fracción de sólidos de JHD1 fue de 0.8830, mientras que para JHD2 fue de 0.926.

Una vez que se conoce la fracción de sólidos, se calculó la cantidad de peso húmedo correspondiente a un gramo de suelo seco. Así, en la prueba de bioaccesibilidad se utilizaron 1.132 g de JHD1 y 1.08 g de JHD2, considerando el contenido volumétrico de agua en cada una de las muestras.

Los resultados de la prueba de bioaccesibilidad se presentan en la Tabla 7.32. Donde JHD1 representa al suelo JH después de la primera prueba de estabilización, JHD2 representa el suelo tratado después de la segunda prueba de estabilización y JHA representa el suelo sin tratar.

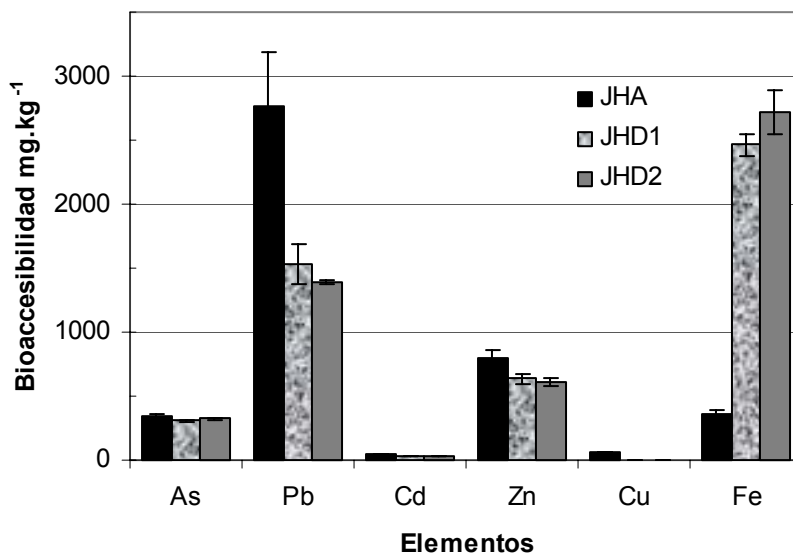
**Tabla 7.32** Concentración bioaccesible de EPT en el suelo antes y después de las pruebas de estabilización con



Muestra	Concentración bioaccesible en suelo $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (n=2)					
	As	Pb	Cd	Zn	Cu	Fe
JHA	330-360	2350-3180	40-52	749-855	58-64	315-391
JHD1	300-305	1380-1680	32-34	596-674	3-5	2380-2550
JHD2	320 -325	1380 -1400	31-37	580-640	4-8	2550-2890
El intervalo corresponde a duplicados						

Si se representan gráficamente los resultados anteriores se obtiene la Figura 7.40, en la cual se observa que la bioaccesibilidad de arsénico y del cadmio prácticamente se mantuvo constante, con una ligera disminución. Sin embargo, el efecto del sulfuro es más notable en el caso del cobre, plomo y zinc. Diminuyendo la bioaccesibilidad del cobre del 90 al 93 %, plomo del 45 al 50 % y finalmente la del zinc del 21 al 24 %. Sin embargo, se observa también que la bioaccesibilidad del hierro aumento considerablemente, este hecho podría ser atribuido al elevado contenido de especies oxidadas de hierro presentes, como oxihidróxidos férricos, en la muestra original, mismos que bajo un potencial reducido son desestabilizados liberando inclusive el arsénico adsorbido sobre dichas fases. En el caso del arsénico, no es posible asegurar que este pueda ser estabilizado para el régimen de operación establecido en este experimento. Sin

embargo, es probable que si el suelo estabilizado se deja inundado por más tiempo, con la solución conteniendo el sulfuro biogénico, el arsénico asociado a los oxihidróxidos de hierro pueden precipitar como sulfuros del mismo y con ello disminuir su bioaccesibilidad.



**Figura 7.40** Concentraciones bioaccesibles de EPT en las muestras de JH antes y después de la estabilización por  $H_2S_{\text{biog}}$ .

La Tabla 7.33 reporta las bioaccesibilidades anteriores expresadas en términos porcentuales referidas a la concentración total inicial de JH calculada en la sección 7.1.1 ( $19312 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). En dicha Tabla se observa que el porcentaje bioaccesible del plomo disminuye prácticamente a la mitad en comparación con el porcentaje inicial. Así mismo, el porcentaje del cobre disminuye hasta prácticamente el 1 %, efecto contrario observado para el hierro quien presentó un incremento del 0.4 al 3 % de su bioaccesibilidad inicial

**Tabla 7.33** Porcentaje de bioaccesibilidad con respecto a la concentración total de EPT de las muestras antes (JHA) y después de estabilizar (JHD1 y JHD2)

Muestra	% bioaccesible					
	As	Pb	Cd	Zn	Cu	Fe
JHA	7.661	14.317	71.372	18.505	13.416	0.431
JHD1	6.773	7.922	51.764	14.660	0.887	3.015
JHD2	7.217	7.197	53.333	14.072	1.219	3.327

## 7. Resultados y discusiones sobre caracterización fisicoquímica y estabilización biológica de suelos

Con el objetivo de aseverar los porcentajes de bioaccesibilidad mencionados, se realizó una digestión total, de una muestra sin estabilizar y una muestra correspondiente a cada estabilización, para determinar si durante las estabilizaciones existió la pérdida de EPT en el efluente de la columna, la cual podría repercutir en los resultados reportados en la Tabla 7.32.

Los resultados obtenidos, los cuales se reportan en la Tabla 7.34, muestran que las concentraciones totales de EPT, en la muestra sin estabilizar (JHA) y en las muestras estabilizadas (JHD1 y JHD2) son similares, ya que prácticamente las variaciones de cada EPT se encuentran dentro de los valores de incertidumbre obtenidos.

**Tabla 7.34** Concentración total de EPT en las muestras JH, antes y después de ser estabilizadas por el  $H_2S_{biog}$  en un sistema de flujo ascendente

Muestra	Concentración total de EPT en JH ( $mg \cdot kg^{-1}$ )					
	As	Pb	Cd	Zn	Cu	Fe
JHA	5408 ± 713	13000 ± 1650	59 ± 4	4708 ± 343	503 ± 57	85275 ± 9225
JHD1	4203 ± 213	11575 ± 925	62 ± 8	3365 ± 315	430 ± 37	70000 ± 6500
JHD2	4845 ± 410	12350 ± 250	67 ± 9	4155 ± 110	540 ± 20	83750 ± 6250
La desviación estándar corresponde a duplicados						

Por lo tanto, se puede concluir que el sistema propuesto permite disminuir la fracción bioaccesible del plomo presente en una muestra de jales en donde se determinó actividad reductora de sulfatos. Sin embargo, el hierro incrementa su bioaccesibilidad, probablemente relacionado con la destrucción de los oxihidróxidos de hierro identificados, encontrándose quizá como ion ferroso en el suelo tratado, el cual pudo haberse asociado a fases de carbonatos. Dichas fases son solubles bajo las condiciones de la prueba de bioaccesibilidad, por lo que se observó un incremento en la concentración bioaccesible de hierro. Sin embargo, esto no se puede aseverar debido a que no se realizó la especiación correspondiente. Es importante remarcar que la fracción bioaccesible de arsénico no se modificó, inclusive cuando se constata un proceso de reducción de hierro, como el mencionado anteriormente. La estabilidad observada en la fracción bioaccesible de arsénico probablemente esté relacionada con el tiempo de exposición a las que fue sometido el arseniato, y que debido a las condiciones redox, las condiciones de operación no fueron



suficientes para reducir este elemento para que interaccionara con el sulfuro producido en el sistema. Lo anterior deberá de evaluarse con un tiempo de operación más largo o en un arreglo de columna diferente al establecido en esta tesis. Además, se debe evaluar las relaciones de materia orgánica-sulfatos para asegurar la producción suficiente de sulfuro que conlleve a la reducción del arsénico, o inclusive la disminución de sulfato para que las comunidades microbianas empleen el arseniato como aceptor final de electrones.



## 8. CONCLUSIONES

De las pruebas realizadas en el presente estudio se concluye lo siguiente:

En la caracterización preliminar de las muestras sólidas recolectadas se identificaron dos con altas concentraciones bioaccesibles de plomo y arsénico, JH (3175 mg Pb•kg<sup>-1</sup><sub>suelo</sub>) y M3 (3165 mg As•kg<sup>-1</sup><sub>suelo</sub>). La muestra JH fue seleccionada como caso de estudio para pruebas de estabilización de plomo en columnas, empleando sulfuro de hidrógeno biogénico.

Los consorcios con actividad sulfato reductora fueron aislados de las muestras sólidas P1 y JH, los cuales se encuentran expuestos *in situ* a concentraciones bioaccesibles de 316 y 3175 mg Pb•kg<sup>-1</sup><sub>suelo</sub> respectivamente. Los resultados de las pruebas cinéticas, mostraron que el consorcio microbiano P1 puede ser expuesto a una concentración máxima de plomo de 337 µM, mientras que el consorcio JH puede ser expuesto a una concentración máxima de plomo de 2530 µM. Este resultado indicó que el consorcio expuesto a mayores concentraciones bioaccesibles de plomo es menos inhibido por éste, que aquel consorcio expuesto a menores concentraciones bioaccesibles de este tóxico.

El análisis de la biomasa producida permite establecer que a concentraciones similares de plomo, la biomasa decae en un 50 % para cada uno. Lo anterior ocurre para P1 a una concentración de plomo entre 491 y 575 µMPb<sup>2+</sup>, mientras que para JH entre 457 y 715 µMPb<sup>2+</sup>. En cuanto a la velocidad de producción de sulfuro de hidrógeno, el consorcio P1 obtuvo mayores velocidades de producción de sulfuro en comparación a JH. Este hecho se asocia a que el consorcio JH ha desarrollado un metabolismo más lento debido a que proviene de un medio en el cual se encuentran altas concentraciones de plomo, además de que este elemento podría ocasionar problemas de déficit de nutrientes como el fosfato.

La adaptación a ambientes con la presencia de plomo del consorcio JH fue observada en el análisis del comportamiento de la velocidad máxima específica de producción de sulfuro, ya que

## 8. Conclusiones

JH mantiene una velocidad relativamente constante independientemente de la presencia de plomo. En cambio la velocidad en P1 se ve disminuida en un 50 % para concentraciones de plomo de 21  $\mu\text{M}$ .

En el caso de los cultivos que no mostraron actividad biológica, como en el caso de JHPb6, se concluyó que dicha inactividad se debió a una toxicidad del plomo en las fases no consolidadas de clorofosfato de plomo y no así a un déficit de fosfatos en el medio. Este resultado fue constatado por un comportamiento diferente de los cultivos con déficit de fosfato, los cuales disminuyeron su velocidad de producción de sulfuro de hidrógeno en un 50 % a concentraciones de 2430  $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ .

La presencia de fosfatos en el medio acuoso favoreció la formación de precipitados de clorofosfatos de plomo. Sin embargo, esta fase fue desestabilizada por el sulfuro de hidrógeno producido por las bacterias, ocurriendo una dinámica de transición de fase hacia sulfuros de plomo a potenciales cercanos a -170 y -200 mV/SHE.

Los estudios de cinética de producción de sulfuro permitieron elegir el consorcio JH, con una velocidad específica máxima de producción de sulfuro de 2.62  $\text{mmol H}_2\text{S}\cdot\text{g}^{-1}\text{SSV}\cdot\text{h}^{-1}$ , como el consorcio microbiano a ser empleado en columnas de flujo ascendente, para tratar la muestra previamente seleccionada y etiquetada con el mismo nombre. La velocidad específica mencionada, permitió establecer un tiempo de residencia de 33 horas para la muestra a ser tratada.

Las pruebas de estabilización en columnas de flujo ascendente, mostraron una disminución en la bioaccesibilidad de plomo del 50 %, lo cual fue asociado a la formación de fases de menor solubilidad como los sulfuros de plomo. La bioaccesibilidad del arsénico no cambió en comparación con la bioaccesibilidad inicial ( $345 \pm 15$ ), esto se atribuyó al corto tiempo en el cual el suelo estuvo en contacto con el sulfuro de hidrógeno. Posiblemente, si el sulfuro de hidrógeno se deja por más tiempo en contacto con el suelo, se lograría la estabilización del arsénico y con ello se disminuiría su bioaccesibilidad. El incremento en las concentraciones de hierro fue

## 8. Conclusiones

asociado a la desestabilización de oxihidróxidos de hierro, debido a la acción del sulfuro de hidrógeno. La liberación del hierro probablemente favoreció la formación de fases de carbonatos, las cuales son altamente solubles bajo las condiciones de acidez necesarias para llevar a cabo la prueba de bioaccesibilidad. De manera similar al arsénico, es probable que aumentando el tiempo de contacto entre la muestra y el sulfuro de hidrógeno se logre una mayor estabilidad debido a la formación de fases asociadas a sulfuros. Finalmente, con el empleo de la Microscopía Electrónica de Barrido, se corroboró la formación de fases de morfología biogénica asociadas a sulfuro de plomo.



## 9. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos permiten considerar el uso de sulfuro de hidrógeno producido por bacterias sulfatorreductoras como una técnica viable en la remediación de suelos contaminados con metales pesados. Sin embargo, es necesario hacer algunas consideraciones para estudios posteriores, como son:

- Considerar comunidades aisladas de las muestras de suelos M2 y M3 para estudios cinéticos de producción de sulfuro. Dichos estudios deben considerar la inhibición de las bacterias a la presencia de arsénico, cadmio, zinc, etc. Incluso puede considerarse la evaluación de la actividad bacteriana ante la presencia de dos o más EPT para considerar posibles efectos sinérgicos
- Manejar la concentración de biomasa como una variable de control en los experimentos cinéticos, tratando de partir siempre de la misma concentración, independientemente del consorcio en estudio
- Valorar los modelos de ajuste de velocidades máximas de producción específica de sulfuro de hidrógeno biogénico, considerando la concentración de plomo a la cual la biomasa decae en un 50 % de su concentración
- Emplear consorcios tolerantes a EPT, identificados en las pruebas cinéticas, en estudios de estabilización de suelos con elevadas concentraciones bioaccesibles de arsénico
- Evaluar la actividad sulfato-reductora cuando el consorcio bacteriano es sometido a diferentes fuentes de sustrato orgánico. De esta forma se puede conocer la cinética de consumo, afín a la fuente de materia orgánica, la cual proporciona información acerca del tiempo en el cual se produciría la cantidad de sulfuro de hidrógeno necesaria para estabilizar suelos contaminados con EPT

## 9. Perspectivas y recomendaciones

- Es necesario considerar que en los estudios en columnas probablemente exista pérdida de materia orgánica a la salida. Por ello es recomendable realizar pruebas de DQO con las que se obtendría información de la materia orgánica que no está siendo consumida. Dicha información sería indispensable para los tiempos de residencia del sustrato orgánico.



## **ANEXOS**

## ANEXO A

## Modelo sigmoial de Gompertz (Ortiz, 2004)

El modelo de Gompertz está representado por la siguiente ecuación:

$$PHS = A \cdot \exp[-B \exp(-Kt)] \quad A.1$$

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

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

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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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:

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

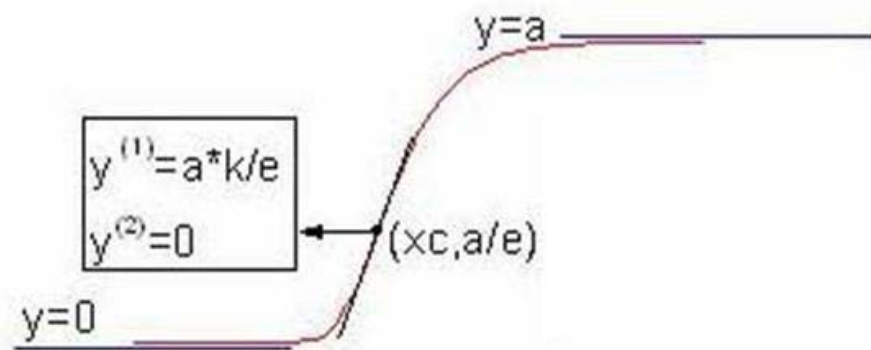
Por lo tanto:

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

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

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

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).

## ANEXO B

### **Procedimiento SBRC para determinar la bioaccesibilidad de arsénico, plomo, cadmio y níquel de la NOM 147-SEMARNAT/SSA1-2004 (DOF, 2007; NAVFAC, 2000)**

#### Solución de extracción.

1. Disolver 60.06 g de glicina (ultra sigma) en 1.5 L de agua desionizada.
2. Poner la mezcla en baño de agua a 37 °C hasta que la solución de extracción alcance la temperatura de 37 °C.
3. Agregar HCl (12.1N) hasta que la solución alcance un valor de pH de  $1.0 \pm 0.05$  (anotar el volumen de HCl agregado).
4. Aforar la solución a 2L (0.4 M de glicina).

#### Procedimiento de extracción

1. Medir 100 mL de la solución de extracción ( $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ), y transferir a un matraz erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar  $1.0 \pm 0.05$  g de suelo dentro del matraz, cerrando el mismo.  
Nota: En el caso de análisis de riesgo a la salud, las muestras de suelo deben ser tamizadas a  $<250 \text{ } \mu\text{M}$ . En este estudio en el que se considera la bioaccesibilidad como indicador de estabilización de EPT en suelos, las muestras se tamizaron a  $<2 \text{ mm}$ .
3. Colocar el matraz dentro de agitador orbital, previamente a una  $T = 37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .
4. Iniciar y mantener la agitación de los matraces a 150 rpm durante 1 hora.
5. Medir y ajustar el pH de la mezcla en el matraz erlenmeyer. Si el pH es menor de 1.5, se registra el valor del pH y se continúa con el procedimiento de análisis. Si el pH es superior a 1.5 se detiene, el agitador a los 5, 10, 15, 30 y 60 minutos, para ajustar el pH por debajo de 1.5, adicionando unas gotas de HCl concentrado.
6. Una vez concluido el procedimiento de agitación, remover cuidadosamente los matraces del agitador orbital y colocarlos sobre la mesa de trabajo y tomar el extracto de cada matraz con la ayuda de una pipeta volumétrica. Vaciar el contenido de la pipeta en un

dispositivo de filtración Millipore donde se coloca un filtro de acetato de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (de 47 mm de diámetro).

Nota: el tiempo transcurrido al final del proceso de filtrado de la solución no debe ser mayor de una hora con treinta minutos, de lo contrario deberá repetirse la prueba.

7. Colocar la solución filtrada en un tubo para centrifugado de polipropileno u otro frasco apropiado para muestras de análisis. Guardar las muestras filtradas en refrigeración a 4 °C previo al análisis.

## ANEXO C

### **Protocolos de movilidad de arsénico y metales pesados en muestras de suelo, sedimento y jales por NOM-053-ECOL/1993, ASTM D 3987-85 y NOM-141-SEMARNAT-2003 (DOF, 1993; DOF, 2004)**

#### **Procedimiento General**

1. Secar las muestras en una estufa a 30 °C durante 40 h o el tiempo necesario para asegurar que se haya eliminado el contenido de agua absorbida.
2. Se pesan 50 a 100 g de muestra, dependiendo de la cantidad disponible de ésta.
3. Las muestras pesadas se colocan en recipientes de PTFE de 2L previamente lavados con HNO<sub>3</sub> al 10% y enjuagados con agua desionizada.
4. Se añade lentamente un volumen de extractante en relación sólido:líquido 1:20 (1L para 50 g de muestra).
5. Los recipientes se cierran herméticamente y se colocan en un equipo de agitación rotatorio. La agitación se mantiene a 30 ± 2 rpm durante 18 ± 2 horas. La temperatura deberá permanecer a 23 ± 2 °C durante el periodo de extracción.
6. Conforme la agitación continúa se pueden generar gases que ejerzan presión dentro del frasco extractor. Para liberar el gas comprimido, el frasco puede abrirse en la campana de extracción periódicamente.
7. Después del tiempo de extracción se determina el pH de la pulpa. Se realiza la filtración, primero a través de un filtro poro cerrado (11µm) y después mediante una membrana de abertura de poro 0.45 µm.
8. Se recuperan 500 mL de solución final de cada extracción y se acidifican a pH < 2 con HNO<sub>3</sub> concentrado para evitar la precipitación de los elementos en solución. Las soluciones acidificadas se deben mantener en refrigeración a 4 °C previo a su análisis químico.
9. El residuo sólido recuperado de la filtración se debe lavar repetidamente con agua desionizada, se deberá secar en una estufa a 30 °C durante 48 horas y se determinará su peso final.

## Extractantes

### Método ASTM D3987-85

Este método simula los procesos de disolución de los residuos cuando éstos entran en contacto con agua meteórica. El extractante es agua desionizada a pH 5.5, en caso de que el pH del agua sea igual o menor de 5.5 ésta se emplea directamente en la extracción, si el pH es mayor debe ajustarse a 5.5 adicionando agua carbonatada. El agua carbonatada se prepara haciendo burbujear CO<sub>2</sub> en un volumen de agua desionizada hasta ajustar el pH a 5.5.

### Método de extracción PECT, NOM-53

Éste método establece el procedimiento para determinar si residuo peligroso por si el residuo es peligroso por su toxicidad al ambiente. Se emplean dos diferentes extractantes en éste método, los cuales simulan los ácidos generados en los rellenos sanitarios de residuos municipales. Los extractantes empleados son:

Extractante 1: Diluir 5.7 mL de ácido acético glacial en 500 mL de agua desionizada, y añadir 64.3 mL de NaOH 1.0 N. Aforar a 1L. Cuando se prepara de forma correcta, el pH de éste reactivo es de  $4.93 \pm 0.05$ .

Extractante 2: Diluir 5.7 mL de ácido acético glacial en agua desionizada y aforar a un volumen de 1 L. cuando se prepara en forma correcta, el pH es de  $2.88 \pm 0.05$ .

La selección del extractante adecuado se realiza mediante el siguiente procedimiento:

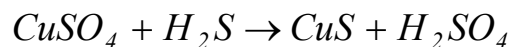
Pesar 5 g de muestra y transferir a un matraz. Añadir 96.5 mL de agua desionizada, cubrir con un vidrio de reloj y agitar vigorosamente por 5 minutos usando un agitador magnético. Si el pH final es menor de 5.0, usar el extractante 1. Si el pH es mayor de 5.0 añadir 3.5 mL de HCl 1N, mezclar y cubrir con un vidrio de reloj, caliente a 50 °C y mantener ésta temperatura durante 10 minutos. Dejar la solución enfriar a temperatura ambiente y medir el pH. Si éste es menor de 5.0 usar el reactivo de extracción 1. Si es mayor usar el reactivo de extracción 2.



## ANEXO D

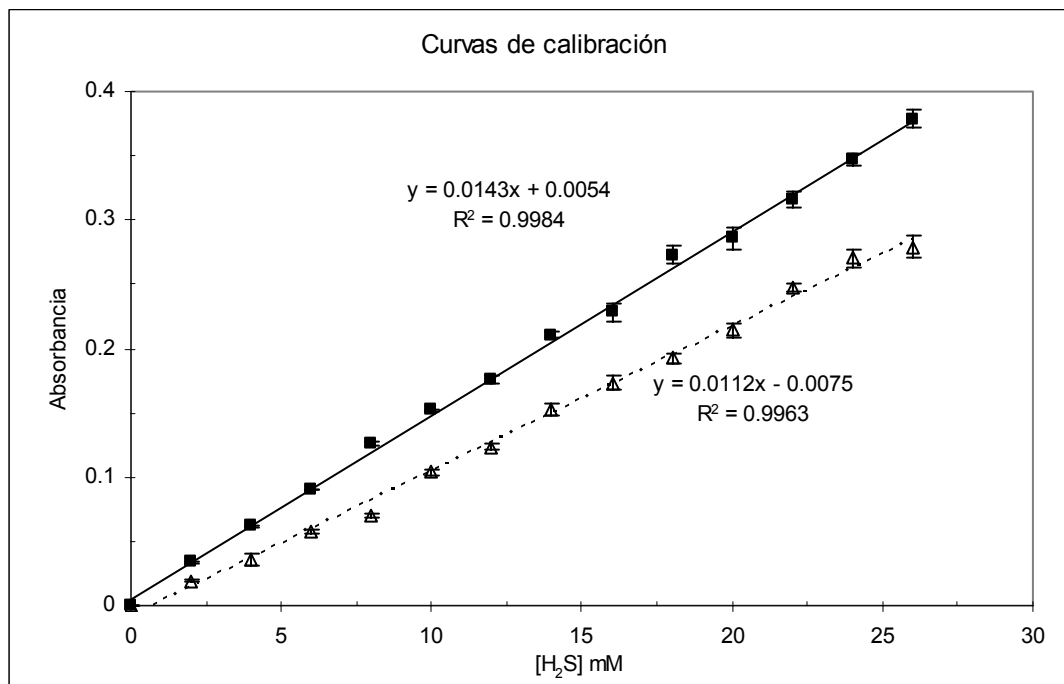
**Método de Cord-Ruwisch y curvas de calibración, para la determinación de sulfuro de hidrógeno (Modificado de Cord-Ruwisch, 1985)**

1. A 1 L de agua desionizada, agregar 50 mg de tioglicolato e introducir al autoclave para eliminar por ebullición, en lo mayor posible, el oxígeno contenido en el agua. Como condiciones en autoclave pueden emplearse las reportadas en este estudio; dos intervalos de 15 minutos cada uno a 120 °C y 15 psig.
2. Preparar 100 mL de una solución de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) 0.5M, empleando ácido clorhídrico (HCl) a 5 mM. De esta solución se toma 1 mL y se transfiere a un matraz de 100 mL aforando con la misma solución de 5 mM HCl.
3. De la solución anterior, transferir por triplicado 4 mL en tubos de ensaye. Con ésto, se tienen listos los tubos para la determinación del sulfuro.
4. Preparar 25 mL de solución estándar de sulfuro de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ), a una concentración de 100 mM.
5. A partir del estándar de  $\text{Na}_2\text{S}$ , preparar 13 tubos de ensaye (10 mL) a concentraciones desde 2 hasta 26 mM, en intervalos de 2 mM. Para la preparación de estos tubos se emplea el agua reducida preparada en el paso 1, ajustada a pH de 10 con NaOH. Con esta consideración, se favorece la formación del sulfuro ionizado  $\text{HS}^-$  y se evita la volatilización del  $\text{H}_2\text{S}$ , debido a que el pKa entre el  $\text{H}_2\text{S}$  y el  $\text{HS}^-$  es de 7.
6. De cada uno de los 13 tubos se toma 0.1 mL de solución (por triplicado) y se traslada a los tubos de ensaye descritos en los pasos 2 y 3. Homogeneizar por 5 s la solución, e inmediatamente tomar la lectura de absorbancia a 480 nm en un espectrofotómetro UV-vis. La reacción que se lleva a cabo entre el  $\text{H}_2\text{S}$  y el  $\text{CuSO}_4$  es:



D.1

Empleando el procedimiento anterior se obtuvieron dos curvas de calibración una empleada para las cinéticas de inhibición de las BSR por presencia del plomo y otra empleada para los experimentos de cinéticas con déficit de fosfatos. Ambas curvas se observan en la Figura D.1.



**Figura D.1** Curvas de calibración empleadas en las cinéticas de producción de sulfuro de hidrógeno. La línea continua representa la curva de calibración empleada en las pruebas de cinética de producción de sulfuro del consorcio P1 y JH en presencia de plomo. La línea punteada representa la curva de calibración empleada para los estudios de cinética de producción de sulfuro en los cultivos de JH con déficit de fosfato.

## ANEXO E

### Determinación de sólidos suspendidos volátiles (APHA, 2005)

#### Procedimiento

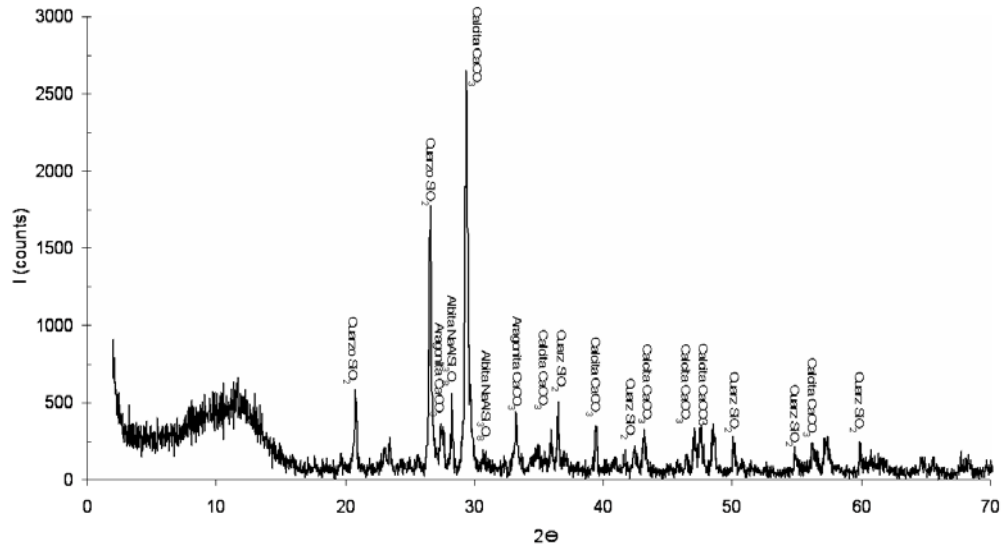
1. Introducir el filtro de fibra de vidrio con la cara rugosa hacia arriba, con la ayuda de unas pinzas, en el crisol y mojar el filtro para asegurar su adherencia en el fondo del crisol.
2. Introducir los crisoles a la mufla (550 °C) durante 20 minutos. Posteriormente, transferir los crisoles a la estufa a 105 °C por 20 minutos.
3. Sacar y enfriar a temperatura ambiente dentro de un desecador.
4. Colocar el crisol gooch con el filtro en el aparato de filtración y aplicar vacío, evitar en todo momento tocar el crisol con las manos.
5. Agitar el recipiente que contiene la muestra para homogeneizarla. Medir con una pipeta volumétrica el volumen seleccionado de acuerdo al tipo de muestra. En aguas naturales se recomienda filtrar de 25 a 50 mL, en aguas residuales entre 10 y 25.
6. Filtrar la muestra mediante vacío, tratando de que la muestra se vierta en el centro del filtro. Lavar el filtro dos veces con 5 o 10 mL de agua desionizada, dejando que el agua drene totalmente cada lavado.
7. Suspender el vacío y secar el crisol e la estufa a una temperatura de 105 °C durante 1 hora. Secar el crisol, dejar enfriar en un desecador a temperatura ambiente y determinar su peso. Registrar su peso como ES en mg.
8. Introducir el crisol con el residuo seco a la mufla, a una temperatura de 550 °C durante 15 minutos. Sacar el crisol y ponerlo en la estufa a 105 °C por 20 minutos aproximadamente. Sacar y enfriar a temperatura ambiente en un desecador y determinar su peso. Registrar su peso como MS en mg.

El contenido de sólidos suspendidos volátiles se calcula como:

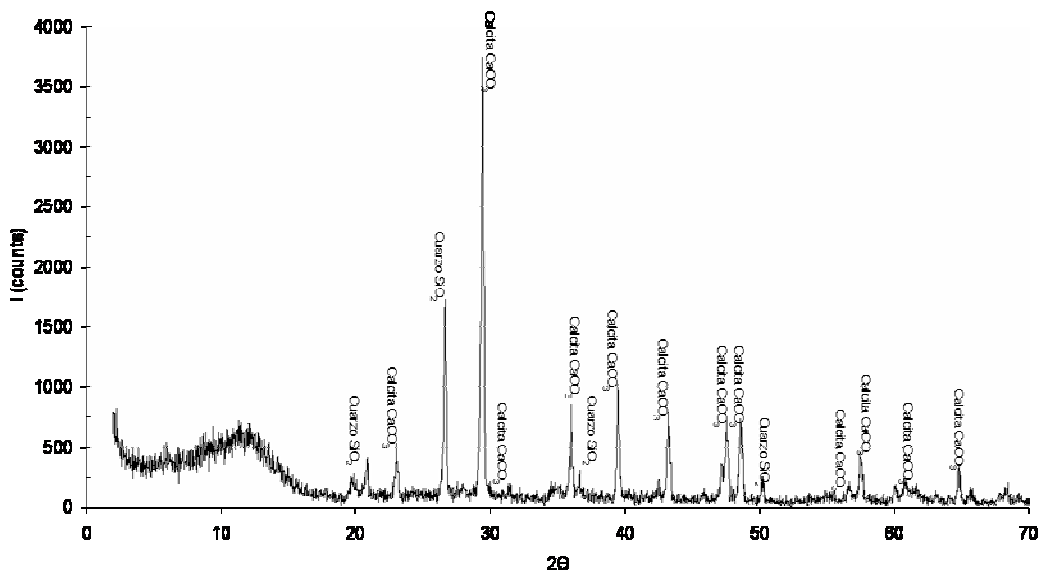
$$SSV = \frac{(ES - MS) \times 1000}{V} \quad \text{E.1}$$

## ANEXO F

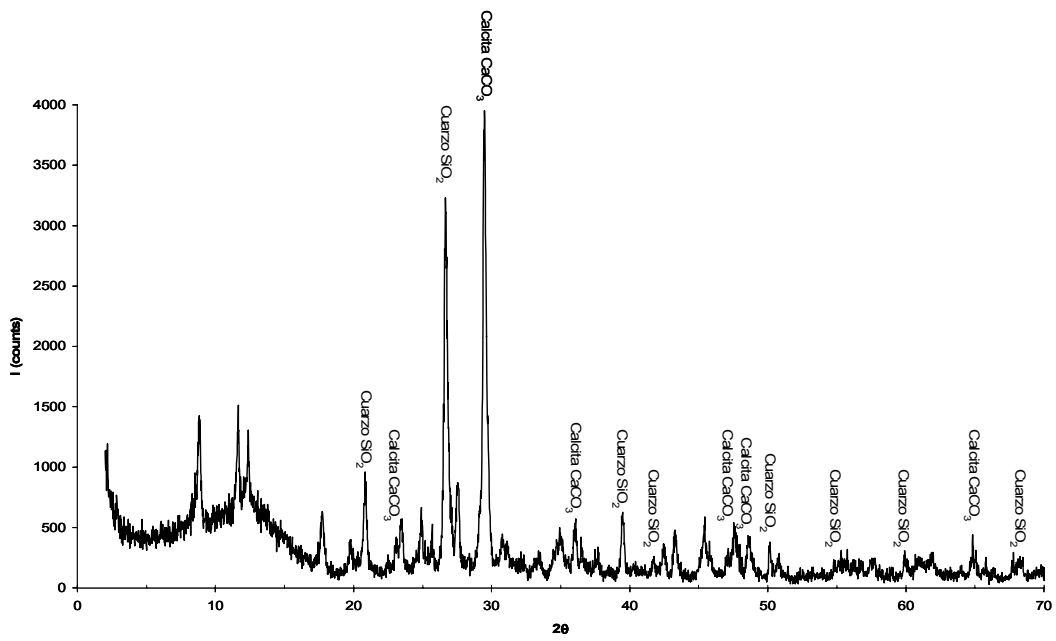
### Diagramas difracción de rayos X



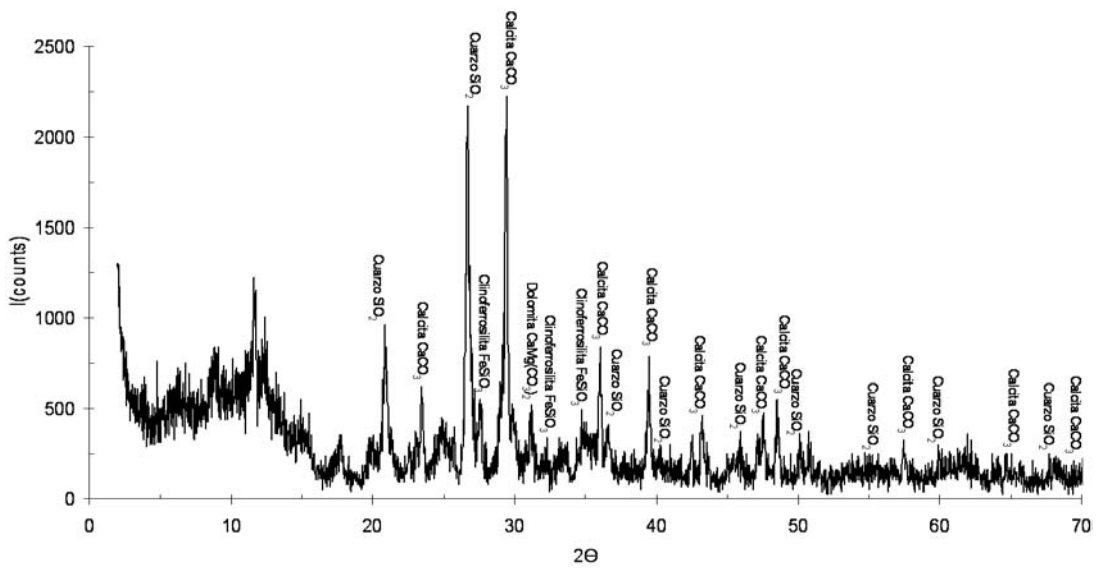
a) M2



b) M3



c)



d)

**Figura F.1** Difractogramas de las muestras seleccionadas como potenciales casos de estudio: a) M2, b) M3, c) J2,

d) JH

## ANEXO G

## Tablas de producción de sulfuro de hidrógeno y tabla de velocidad de producción específica

Tabla G.1 Cinéticas de PSH del consorcio P1 (en mM), a diferentes concentraciones de plomo

Tiempo (h)	P1Pb0	P1Pb1 [34.1]	P1Pb2 [169]	P1Pb3 [337]	P1Pb4 [1687]	P1Pb5 [3380]
0	5.989 (1.409)	1.793 (0.639)	0.853 (0.447)	0.097 (0.020)	0.506 (0.1643)	0.203 (0.119)
3	8.237 (1.804)	2.276 (0.842)	1.024 (0.248)	0.146 (0.014)	0.332 (0.206)	0.049 (0.049)
6	11.982 (1.632)	3.947 (1.423)	0.818 (0.300)	0.136 (0.010)	0.349 (0.188)	0.098 (0.098)
10	13.244 (0.685)	6.027 (2.160)	1.593 (1.035)	0.132 (0)	0.398 (0.300)	0.248 (0.234)
14	14.986 (1.377)	9.136 (2.765)	3.804 (1.279)	0.517 (0.021)	0.563 (0.199)	0.549 (0.199)
17	14.391(0.517)	12.524 (3.160)	5.454 (1.552)	0.629 (0.013)	0.594 (0.188)	0.297 (0.045)
21	15.832 (0.734)	15.423 (1.548)	8.094 (2.241)	1.010 (0.262)	1.318 (0.304)	0.895 (0.140)
25	15.223 (0.559)	16.335 (0.437)	11.010 (2.744)	1.395 (0.003)	1.038 (0.143)	0.930 (0.482)
30	15.548 (0.674)	16.111 (0.111)	14.951 (1.475)	3.013 (0.146)	2.056 (0.132)	1.814 (0.101)
36	13.653(1.003)	13.800 (0.269)	14.251 (0.762)	2.632 (0.038)	2.056 (0.077)	1.814 (0.129)
44	15.426(1.055)	15.643 (0.699)	15.548 (0.604)	6.297 (0.227)	0.881 (0.111)	0.486 (0.206)
48	14.562(0.821)	15.604 (0.157)	15.384 (0.867)	8.034 (0.063)	0.975 (0.052)	0.629 (0.119)
52	14.223(1.776)	15.604 (0.157)	15.384 (0.867)	10.692 (0.881)	0.975 (0.052)	0.629 (0.119)
56	14.223(1.776)	15.604 (0.157)	15.384 (0.867)	15.087 (0.318)	0.975 (0.052)	0.629 (0.119)
60	14.223(1.776)	15.604 (0.157)	15.384 (0.867)	15.087 (0.318)	0.975(0.052)	0.629 (0.119)
65	14.223 (1.776)	15.604 (0.157)	15.384 (0.867)	15.087 (0.318)	1.272 (0.202)	0.828 (0.304)

El valor entre corchetes representa la concentración de plomo en el sistema en  $\mu\text{M}$ .  
El valor entre paréntesis representa la desviación estándar de duplicados.

Tabla G.2 Producción específica de  $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$  del consorcio P1 (en  $\text{mmolH}_2\text{S}\cdot\text{g}^{-1}\text{SSV}$ )

Tiempo (h)	P1Pb0	P1Pb1 [34.12]	P1Pb2 [168.9]	P1Pb3 [337]	P1Pb4 [1687]	P1Pb5 [3378]
0	99 (23)	24 (8)	13 (6)	2 (0.4)	38 (12)	25 (15)
3	137 (30)	30 (11)	15(3)	3 (0.3)	25 (15)	6 (6)
6	199 (27)	52 (18)	12 (4)	2 (0.2)	26 (14)	12 (12)
10	220 (11)	80 (28)	24 (15)	2 (0)	29 (23)	31 (29)
14	249 (23)	121 (36)	57 (19)	10 (0.4)	42 (15)	69 (25)
17	239 (8)	166 (42)	82 (23)	12 (0.2)	44 (14)	37 (6)
21	263 (12)	205 (20)	121 (33)	19 (5.7)	98 (23)	113 (18)
25	253 (9)	217 (5)	165 (41)	27 (0)	77 (11)	117 (65)
30	259 (11)	214 (2)	224 (22)	58 (0.2)	154 (10)	229 (13)
36	227 (16)	183 (3)	213 (11)	51 (0.7)	154 (6)	229 (16)
44	257 (17)	208 (9)	233 (9)	122 (0.4)	66 (8)	61 (26)
48	242 (13)	207 (2)	230 (13)	155 (0.1)	73 (4)	79 (15)
52	237 (29)	207 (2)	230 (13)	206.9 (1.7)	73 (4)	79 (15)
56	237 (29)	207 (2)	230 (13)	292 (0.6)	73 (4)	79 (15)
60	237 (29)	207 (2)	230 (13)	292 (0.6)	73 (4)	79 (15)
65	237 (29)	207 (2)	230 (13)	292 (0.6)	95 (15)	104 (38)

El valor entre corchetes representa la concentración de plomo en el sistema en  $\mu\text{M}$ .  
El valor entre paréntesis representa la desviación estándar de duplicados.

**Tabla G.3** Cinéticas de PSH (en mM) del consorcio JH a diferentes concentraciones de plomo

Tiempo (h)	JHPb0	JHPb1 [34]	JHPb2 [168.9]	JHPb3 [337]	JHPb4 [1687]	JHPb5 [2530]	JHPb6 [3378]
17	0.30 (0.139)	0.53 (0.020)	0.52 (0.157)	0.40 (0.007)	1.38 (0.311)	0.62 (0.181)	0.230 (0.139)
27	0.89 (0.056)	0.77 (0.213)	0.84 (0.010)	0.61 (0.451)	2.76 (0.258)	0.89 (0.024)	0.59 (0.164)
40	1.28 (0.283)	1.72 (0.066)	1.15 (0.080)	1.33 (0.024)	3.35 (0.283)	2.25 (0.388)	0.25 (0.202)
66	2.54 (0.087)	2.69 (0.111)	2.60 (0.202)	2.98 (0.286)	6.26 (0.821)	4.08 (1.479)	0.60 (0.014)
70	3.108 (0.33)	3.20(0.237)	3.36 (0.101)	3.86 (0.0734)	8.53 (0.744)	5.21 (1.625)	0.92 (0.062)
74	3.21 (0.174)	3.36 (0.101)	3.23 (0.209)	3.90 (0.279)	7.15 (0.1118)	4.53 (0.506)	1.16 (0.202)
78	3.94 (0.038)	4.01 (0.083)	3.90 (0.062)	4.42 (0.091)	9.80 (0.3461)	7.09 (2.146)	1.00 (0.160)
86	5.09 (0.223)	4.73 (0.122)	5.02 (0.430)	6.12 (0.248)	9.66 (0.2202)	7.84 (1.087)	0.87 (0.066)
90	6.08 (0.461)	5.79 (0.118)	5.86 (0.653)	7.31 (0.381)	12.16 (1.0769)	9.66 (1.493)	0.91 (0.031)
98	8.61 (0.744)	8.23 (0.094)	8.87 (0.968)	10.35 (0.230)	13.39 (2.0980)	11.45 (0.534)	1.46 (0.041)
105	10.92 (0.849)	9.91 (0.003)	10.56 (0.580)	13.20 (0.444)	11.76 (1.3216)	12.72 (0.377)	1.08 (0.108)
115	13.01 (0.877)	12.70 (0.570)	13.24 (0.384)	13.21 (0.087)	12.78 (1.9370)	14.42 (0.017)	0.77 (0.094)
125	13.92 (0.402)	13.96 (0.374)	14.34 (0.349)	13.36 (0.402)	13.40 (3.1573)	14.34 (0.099)	1.25 (0.132)
139	13.89 (0.688)	14.96 (0.251)	14.38 (0.234)	14.37 (0.286)	14.41 (2.1608)	14.34 (0.099)	2.57 (0.426)
145	13.89 (0.688)	14.96 (0.251)	14.38 (0.234)	14.37 (0.286)	14.41 (2.1608)	14.34 (0.099)	2.49 (0.524)

El valor entre corchetes representa la concentración de plomo en el sistema en  $\mu\text{M}$ . Los valores entre paréntesis representan la desviación estándar de duplicados.

**Tabla G.4** Producción específica de sulfuro de hidrógeno del consorcio JH (en  $\text{mmolH}_2\text{S}\cdot\text{g}^{-1}\text{SSV}$ )

Tiempo (h)	JH	JHPb1 34.12 $\mu\text{M}$	JHPb2 168.9 $\mu\text{M}$	JHPb3 337 $\mu\text{M}$	JHPb4 1687 $\mu\text{M}$	JHPb5 2530 $\mu\text{M}$	JHPb6 3378 $\mu\text{M}$
0	0	0	0	0	0	0	0
17	3 (1.5)	5 (0.2)	12 (7)	4 (0.072)	20 (4.0)	10 (2.8)	28 (17)
27	9 (0.6)	6 (1.8)	24 (2.2)	6 (4.6)	39 (3.7)	14 (0.3)	30 (20)
40	14 (3.0)	14 (0.5)	29 (2.5)	14 (0.3)	48 (4.0)	35 (6.1)	31 (25)
66	27 (9)	23 (0.9)	55 (7.2)	31 (3)	89 (11.7)	64 (23.3)	751 (1.7)
70	33 (3.5)	27 (2.0)	75 (6.5)	40 (0.7)	122 (10.6)	82 (25.6)	115 (7.8)
74	34 (1.8)	28 (0.8)	63 (1.0)	40 (2.9)	102 (1.6)	71 (8.0)	146 (25)
78	42 (4)	34 (0.7)	86 (3.0)	46 (0.9)	140 (4.9)	112 (33.8)	126 (20.0)
86	54 (2.3)	40 (1)	85 (1.9)	64 (2.5)	138 (3.1)	124 (17.2)	109 (8)
90	65 (5)	49 (1.0)	107 (9.5)	75 (4.0)	174 (15.3)	152 (23.6)	114 (3.9)
98	92 (8.0)	69 (0.8)	118 (18.5)	107 (2.3)	191 (30)	180 (8.4)	183 (5.2)
105	117 (9.4)	83 (0.028)	104 (11.6)	136 (4.6)	168 (18.8)	200 (5.9)	135 (13.5)
115	139 (9.4)	107 (4.8)	113 (17.1)	137 (0.9)	182 (27.6)	227 (0.3)	96 (11.0)
125	149 (4.3)	118 (3.1)	118 (27.8)	138 (4.1)	191 (45.1)	226 (1.5)	156 (16.6)
139	148 (7.3)	126 (2.1)	127 (19.0)	148 (2.9)	0.206 (30.8)	226 (1.5)	321 (53.3)
145	148 (7.3)	126 (2.1)	127 (19.1)	148 (2.9)	206 (30.8)	226 (1.5)	312 (66)

El valor entre corchetes representa la concentración de plomo en el sistema en  $\mu\text{M}$ .

**Tabla G.5** Cinéticas de PSH en mM del consorcio JH a diferentes concentraciones iniciales de fosfato y en ausencia de plomo

Tiempo (h)	F0 [3670]	F3 [3470]	F4 [2660]	F5 [2150]	F6 [1640]	F7 [820]
0	0	0	0	0	0	0
4	0.98 (0.008)	0.71 (0.049)	0.67	0.669	0.669	0.669
23	0.92 (0.062)	0.75 (0.035)	0.67	0.669	0.669	0.669
51	1.41 (0.450)	2.03 (0.142)	0.83 (0.169)	3.13 (0.665)	3.22 (0.125)	0.66 (0)
66	3.05 (1.058)	2.85 (0.205)	2.52 (0.558)	5.49 (0.701)	5.40 (0.080)	1.81 (0.705)
70	3.37 (1.084)	3.29 (0.294)	2.830 (0.1696)	6.34 (0.781)	6.41 (0.321)	1.99 (0.928)
72	3.27 (1.031)	3.14 (0.477)	2.62 (0.183)	7.41 (1.013)	7.27 (0.004)	1.93 (0.883)
75	4.10 (1.214)	4.67(0.18)	3.30 (0.013)	8.77 (0.973)	8.11 (0.040)	2.13 (1.0580)
79	4.82 (1.794)	6.11 (0.053)	4.32 (0.419)	10.37 (1.334)	9.99 (0.267)	2.84 (1.678)
88	6.24 (1.674)	8.69 (0.160)	7.01 (1.116)	12.73 (1.201)	11.74 (0.776)	5.05 (2.205)
92	8.01 (1.522)	10.84 (0.401)	9.06 (0.937)	14.52 (0.107)	13.40 (1.549)	6.83 (2.392)
96	10.25 (1.375)	12.01 (0.008)	10.58 (0.964)	15.10 (0.125)	13.05 (1.433)	8.66 (2.031)
100	11.16 (1.142)	12.89 (0.258)	12.47 (0.839)	15.30 (0.044)	13.98 (1.714)	10.69 (1.567)
112	14.30 (0.843)	12.92 (0.383)	14.41 (0.093)	14.81 (0.134)	13.74 (1.973)	14.06 (0.558)
120	12.93 (0.611)	11.95 (0.107)	15.23 (0.285)	14.71 (0.392)	13.51 (1.700)	15.63 (0.638)
128	13.49 (0.5)	12.13 (0.196)	14.39 (0.191)	14.54 (0.317)	12.66 (0.098)	16.00 (0.267)

El valor entre corchetes representa la concentración de fosfato en el sistema en  $\mu\text{M}$

**Tabla G.6** Producción específica de  $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$  del consorcio JH con déficit de fosfatos (en  $\text{mmolH}_2\text{S}\cdot\text{g}^{-1}\text{SSV}$ )

Tiempo (h)	F0	F3	F4	F5	F6	F7
0	0	0	0	0	0	0
4	8 (0.078)	0 (0)	5.5 (0)	8.9 (0)	0	0
23	8 (0.5)	5.5 (3)	5.5 (0)	8.9 (0)	11 (0)	11 (0)
51	13 (4.0)	5.7 (0.3)	7.0 (1.4)	41.8 (8.8)	11 (0)	10.7 (0)
66	27 (9.3)	15.6 (1.1)	21.0 (4.6)	73.2 (9.3)	53 (2.1)	29 (11.2)
70	30 (9.6)	22 (1.5)	23.5 (1.4)	84.5 (10.4)	90 (1.3)	32 (14.8)
72	29.0 (9.1)	25 (2.2)	21.9 (1.5)	98.8 (13.5)	107.0 (5.3)	31 (14.1)
75	36 (10.7)	24.2 (3.6)	27.5 (0.1)	117.0 (13)	121.2 (0.074)	34 (17.0)
79	42.6 (15.8)	35.9 (1.4)	36.0 (3.4)	138.3 (17.8)	135.2 (0.6)	45 (26.8)
88	55 (14.8)	47.0 (0.4)	58.4 (9.3)	169.8 (16.0)	166.5 (4.4)	81 (35.3)
92	71 (13.4)	66.9 (1.2)	75.5 (7.8)	193.6 (1.4)	195.6 (12.9)	109.2 (38.3)
96	90 (12.1)	83.4 (3.1)	88.2 (8.0)	201.4 (1.6)	223.4 (25.8)	138.6 (32.5)
100	987 (10)	92.4 (0.068)	103.9 (7.0)	204.0 (0.6)	217.6 (23.8)	171.0 (25.0)
112	126 (7.4)	99.1 (2.0)	120.1 (0.8)	197.5 (1.7)	233.0 (28.57)	225.0 (8.9)
120	114 (5.4)	99.4 (2.9)	126.9 (2.3)	0.19 (0.005)	229.0 (32.8)	250.2 (10.2)
128	119 (4.4)	91.9 (0.8)	120.0 (1.6)	193.8 (4.2)	225.2 (28.3)	256.1 (4.2)

El valor entre paréntesis representa la desviación estándar de duplicados



## ANEXO H

**Cálculo de la constante de producto de solubilidad de la piromorfita y del producto de actividad iónica de los cultivos del consorcio JH**

La constante del producto de solubilidad de la piromorfita se calcula, utilizando la relación entre la energía libre y la constante del producto de solubilidad, como:

$$\Delta G_r^0 = -2.303RT \log K_{sp} \quad \text{H.1}$$

Empleando la energía de formación para la piromorfita ( $-3791.54 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), propuesta por Nriagu (1974), se calcula  $\Delta G_r^0$  como:

$$\Delta G_r^0 = [5\Delta G_f^0 Pb^{2+} + 3\Delta G_f^0 PO_4^{3-} + \Delta G_f^0 Cl^-] - [\Delta G_f^0 Pb_5(PO_4)_3 Cl] \quad \text{H.2}$$

Por lo tanto, la ksp de la cloropiromorfita es  $10^{-84.4}$ . Por otra parte, el IAP, se calcula a partir de la reacción de disolución de la fase sólida:



Que en términos de actividad iónica, se expresa como:

$$IAP = \{Pb^{2+}\}^5 \{PO_4^{3-}\}^3 \{Cl^-\} \quad \text{H.4}$$

La ecuación anterior se escribe en términos de concentración como:

$$IAP = \gamma_{Pb^{2+}}^5 [Pb^{2+}]^5 \gamma_{PO_4^{3-}}^3 [PO_4^{3-}]^3 \gamma_{Cl^-} [Cl^-] \quad \text{H.5}$$

## Anexos

En la Ecuación 7.14, el coeficiente de actividad ( $\gamma$ ) es calculado a partir de la ecuación de Güntelberg (Stumm and Morgan, 1996), propuesta para soluciones que contienen diferentes especies iónicas a una fuerza iónica (I) y definida como:

$$\log \gamma_i = \frac{-Az_i^2\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} \quad \text{H.6}$$

Donde  $A=1.82e^6(\epsilon T)^{-3/2}$ , siendo  $\epsilon$  la constante dieléctrica del agua a 30°C (76.75) y  $z$  la carga del i-ésimo ion en solución. La fuerza iónica se calcula a partir de la Ecuación I.7 (Stumm y Morgan, 1996).

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i z_i^2 \quad \text{H.7}$$

Donde  $C$  es la concentración de cada especie en la solución. En este estudio las fuerzas iónicas de los cultivos del consorcio JH se encontraron en un rango de 0.096 M, para el cultivo de plomo de 34  $\mu\text{M}$ , y de 0.018 M para los cultivos de plomo de 3780  $\mu\text{M}$ . Por lo que fue considerada de 0.1 M.

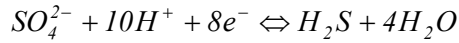
Realizando las respectivas sustituciones en la Ecuación I.6, los valores de los coeficientes de actividad para cada ion son:  $\gamma_{\text{Pb}^{2+}} = 0.32122$ ,  $\gamma_{\text{PO}_4^{3-}} = 0.07768$ ,  $\gamma_{\text{Cl}^-} = 0.75283$ . Posteriormente sustituyendo los respectivos coeficientes de actividad en la Ecuación I.5, se obtiene la expresión para calcular el IAP en función de la concentración de  $\text{Pb}^{2+}$ .

$$\text{IAP} = \left[ \text{Pb}_n^{2+} \right]_{n=1}^{n=6} * 1.119e^{-15} \quad \text{H.8}$$

## ANEXO I

**Determinación de los potenciales de óxido-reducción empleando la ecuación de Nernst**

La reacción de reducción de sulfato a sulfuro de hidrógeno es:



El potencial en estado estándar para la Ecuación I.1 se calcula como:

$$E^\circ = -\frac{\Delta G^\circ_R}{nF} \quad \text{I.1}$$

Siendo n el número de electrones involucrados en la reacción, 8 en este caso y F la constante de Faraday (96.485 kJ•V<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>).

El  $\Delta G_r^0$  de la reacción se calcula como:

$$\Delta G_r^0 = [\Delta G_f^0 H_2S + 4\Delta G_f^0 H_2O] - [\Delta G_f^0 SO_4^{2-} + 10\Delta G_f^0 H^+] \quad \text{I.2}$$

Realizando las sustituciones correspondientes se encuentra que el potencial en estado estándar es de 0.31 V.

El potencial para las condiciones empleadas en este experimento, el cual depende del pH, se determina con la ecuación I.3

$$E = E^\circ - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad \text{I.3}$$

Siendo R la constante universal de los gases y T la temperatura de las condiciones experimentales. Donde Q para la Ecuación I.1 se calcula como:

$$Q = \frac{[H_2S]}{[SO_4^{2-}][H^+]^{10}} \quad \text{I.4}$$

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almås Å., Mulder J. y Bakken L. (2005) Trace material of soil bacteria depends of their position in the soil matrix. *Environmental Science and Technology*, 39, 5927-5932.
- APHA American Public Health Association (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater. Eaton A. D., Clesceri L. S., Rice W. E. y Greenberg A. E. (eds.) 100 Ed. USA, pp. 2-59.
- Atlas R. M. y Bartha R. (2002) Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Addison Wesley, Madrid, pp. 279-287.
- Bååt E. (1989) Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review), *Water, Air and Soil Pollution*, 47, 335-379.
- Blake G. R. y Hartge K. H. (1986) Physical and Mineralogical Methods Klute A. (eds.) In *Methods of soil analysis, Part I, USA*, 378pp.
- Blowes D. W., Ptacek C. J., Jambor J.L. y Weisener C. G. (2005) The geochemistry of acid mine drainage, Barbara Sherwood Lollar (eds.). In *Environmental Geochemistry, USA*, 157-164pp.
- Cabrera G., Pérez R., Gómez J. M., Ábalos A. y Cantero D. (2006) Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio sp.* Strains. *Journal of Hazardous Materials*, A135, 40-46.
- Castro-Larragoitia J., Kramar U. y Pichelt H. (1997) 200 years of mining activities at La Paz/San Luis Potosí/Mexico-consequences for environment and geochemical exploration. *Journal of Geochemical exploration*, 58, 81-91.
- Celis G. M. L B. (2004) Bioeliminación de óxidos de azufre de efluentes. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, UAM-Iztapalapa, pp. 91-92.
- Celis G. M. L B. (2006) Comunicación personal.
- Cervantes C. y Moreno R. (1999) Contaminación ambiental por metales pesados, impacto en los seres vivos. AGT Editor S.A., México, pp 4.
- CGMinería: Coordinación General de Minería (2008) Reporte de coyuntura. Dirección General de Promoción Minera. Secretaría de Economía. Año 2, Número 10.

## Referencias Bibliográficas

- 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*, 4, 33-36.
- Costa M. C. y Duarte J. C. (2005) Bioremediation of acid mine drainage using acidic soil and organic wastes for promoting sulphate-reducing bacteria activity on a column reactor. *Water, Air and Soil Pollution*, 165, 325-345.
- Davis A. D. Webb C. J. y Dixon D. (2001) Arsenic remediation of drinking water. Report South Dakota Department of Environment and Natural Resources, pp 11-15.
- DOF (1993) Diario Oficial de la Federación NOM-053-ECOL/1993
- DOF (2004) Diario Oficial de la Federación NOM-141-SEMARNAT/2003
- DOF (2007) Diario Oficial de la Federación NOM 147-SEMARNAT/SSA1-2004
- Froment G. y Bischoff (1990) Chemical reactor analysis and design. Wiley series in chemical engineering, Canada pp 84.
- Gibert O., de Pablo J., Cortina J. L., y Ayora C. (2003) Evaluation of municipal compost/limestone/iron mixtures as filling material for permeable reactive barriers for *in-situ* acid mine drainage treatment. *Chemical Technology and Biotechnology*, 78, 489-496.
- Google Earth Software, Google <sup>TM</sup> (2008).
- Gottschalk G. (1986) Bacterial metabolism. Springer, New York, 260-264pp.
- Gron C., Andersen L. (2003) Human bioaccessibility of heavy metals and PHA in Soil. Environmental Project No. 840, Technology Programme for Soil and Groundwater Contamination. Denmark. 11-16, 32-34 pp.
- Hatzikioseyan A. y Tsezos M. (2006) Modelling of microbial metabolism stoichiometry: Application in bioleaching processes. *Hydrometallurgy*, 83, 29-34.
- Holt J., Krieg N., Peter H. A., Staley J. y Stanley W. (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology, William & Wilkins Eds, Baltimore, 1994.
- Jonhson F. M. (1998) The genetic effects of environmental lead. *Mutation Research*, 410, 123-140.
- Juárez Tomás M. S., de Labanda E. B., de Ruiz Holgado A. P. y Nader-Macías M. E. (2002) Estimation of vaginal probiotic lactobacilli growth parameters with the application of the Gompertz model. *Canadian Journal of Microbiology*, vol 48, 82-92.

## Referencias Bibliográficas

- INEGI (2007), Información geográfica, TRANINV WEB, Conversión de coordenadas, en línea <http://antares.inegi.gob.mx/traninv/>
- Kabata-Pendias A. y Pendias H. (2000) Trace elements in soil and plants. CRC Press, Florida, 143, pp. 208.
- Kaksonen A.H., Plumb J. J., Robertson W. J., Riekkola-Vanhanen M., Franzmann P. D. y Puhakka J. A. (2006) The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed treatment of acidic metal-and sulfate-containing waste water. *Hydrometallurgy*, 83, 204-213.
- Kehew A. E. (2001) Applied chemical hydrogeology. Prentice Hall, New Jersey, pp. 22-24.
- Koutsoumanis, K., Tassou, C. C., Taoukis, P. S. y Nychas, G. J. E. (1998). Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 981-987.
- Labastida I., Flores-Moreno A. y Briones R. (2007) Selecting samples in treatability test for metallic stabilization. Candela L., Vadillo I., Agaard P. (eds.) In water pollution in natural porous media at different scales, assessment of fate, impact and indicators. Publicaciones del Instituto Geológico y Minero de España, Serie Hidrología y aguas subterráneas, 22, 157-163.
- Lay J. J., Li Y. Y. Y Nioke T. (1998) Mathematical model for methane production from landfill bioreactor, *Journal Environmental Engineering*, 124, 730-736.
- Lázaro B. M. I., (2006) Comunicación personal.
- McLean J. y Bledsoe B. (1992) Behavior of metals in soils. Ground Water Issue EPA/540/S-92/018, pp. 3-6.
- Megaw P. Ruiz J. y Titley S. (1988) High-temperature, carbonate-hosted Ag-Pb-Zn-(Cu) deposits of Northern Mexico. *Economic Geology*, 83, 1856-1855.
- NAVFAC Naval Facilities Engineering Command (2000) *In vitro* method for determination of lead bioaccessibility: standard operating procedure for stomach phase extraction in guide to incorporating bioavailability adjustments into human health and ecological risk assessment at U.S. Navy and Marine Corps Facilities, Appendix C.
- Nies D. H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 730-750.
- Nriagu J. O. (1974), Lead orthophosphates-IV, Formation and stability in the environment. *Geochemica et Cosmochimica Acta*, 38, 887-898.

## Referencias Bibliográficas

- Nriagu J. O. y Pacyna J. M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333, 134-139.
- Okabe S. y Characklis W. G. (1992) Effects of temperature and phosphorous concentration on microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 1041-1042.
- Ongley L. K, Sherman L., Armienta A., Adams D., Concilio A., Salinas C. F. (2007) Arsenic in the soils of Zimapán, México. *Environmental Pollution*, 145, 793-799.
- Origin®, v7.0220, 1991-2002, nonlinear curve fitting, growth/sigmoidal sample curve, OriginLab Corporation.
- Ortiz I. (2004) Biodegradación de hidrocarburos en suelos: Efecto de la adición de cosubstratos gaseosos. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México. pp. 46- 49.
- Piantanelli L. (1986). A mathematical model of survival kinetics. I. Theoretical basis. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, vol 5, 107-118.
- Puigdomenech I. Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms (MEDUSA Software) (2004) Royal Institute of Technology, Sweden.
- Puigdomenech I (2004). (HYDRA®) Hydrochemical Equilibrium-Constant Database (data retrieval to create input files for MEDUSA).
- Postgate J. R. (1984) The sulphate-reducing bacteria, Cambridge University Press, England, pp. 31-32.
- Rajapaksha R. M., Tobor-Kaplon M. A. y Bååth E. (2004) Metal toxicity affects, fungal and bacterial activities in soil differently, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2966-2973.
- Rajesh K. S., Brent M. P. y Malathi J. (2003) Toxicity of lead in aqueous medium to *Desulfovibrio desulfuricans* G20. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 252-260.
- 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, México. pp. 4, 8-10, 31.
- Razo I., Carrizales L., Castro J., Díaz-Barriga 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*, 152, 129-152.
- Razo I. (2006) Identificación de áreas prioritarias de restauración de suelos contaminados por arsénico y metales pesados en el sitio minero y metalúrgico de Villa de la Paz-Matehuala,

## Referencias Bibliográficas

- S.L.P. México. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. pp. 72-74.
- Reis M. A., Almeida J. S., Lemos P. C. y Larrondo, M. J., (1992) Effect of hydrogen sulfide of sulfate reducing bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 593-600.
- Rittman B. E. y McCarty P.L. (2001) *Environmental biotechnology: principles and applications*. Mc Graw-Hill, New York, pp. 130-144.
- Ruby M. V., Davis A., Link T. E., Schoof R., Chaney R.L., Freeman G.B. y Bergstrom P.D., (1993), Development of an in vitro screening test to evaluate the in vivo bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environmental Science and Technology*, 27, 2870-2877.
- Ruby M. V., Davis A. y Nicholson A. (1994) *In situ* formation of lead phosphates in soils as a method to immobilize lead. *Environmental Science and Technology*, 28, 646-654.
- Ruby M V., Davis A., Schoof R., Eberle S. y Sellstone C M. (1996) Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environmental science and technology*, 30, 422-430.
- Schlesinger W., *Biogeochemistry an analysis of global change*. Academic press, pp. 234.
- Smedley P. L. y Kinniburgh D. G. (2002) A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Applied geochemistry*, 17, 517-568.
- Stumm W. y Morgan J. J. (1996) *Aquatic chemistry*, Wiley-Interscience Publication, E.U. 12, 103, 174, 476, pp. 993.
- Takii S (2003) Amino acids as main substrates for sulfate-reducing bacteria in surface sediment of a eutrophic bay. *Journal of General and Applied Microbiology*, 49, 329-336.
- UNEP United Nations Environment Programme (2000) *Mining and sustainable development II. Challenges and perspectives, industry and environment*, 23, pp. 95.
- Vandepitte V., Quataert P., DeRore H. y Vertraete W., (1995), Evaluation of the Gompertz function to model survival of bacteria introduced into soils. *Soil Biology and Biochemistry* vol 27, 365-372.
- Velasco A., Ramírez M., Volke-Sepúlveda T., González A. y Revah S. (2008) Evaluation of feed COD/sulfate ratio as a control criterion for the biological hydrogen sulfide production and lead precipitation. *Journal of Hazardous Materials*, 151, 407-413.
- Waybrant K. R., Blowes D. W. y Ptacek C. J. (1998) Selection of reactive mixtures for use in permeable reactive walls for treatment of mine drainage. *Environmental Science and Technology*; 32, 1972-1979.



## Referencias Bibliográficas

Webb M. (1972) Binding of cadmium ions by rat liver and kidney. *Biochemistry Pharmacology*, 21, 2751-2765.

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

WHO World Health Organization (2000), Air quality guidelines, Chapter 6: Arsenic, Denmark, pp. 8.

WHO World Health Organization. (2005) Guidelines ecosystems and human well-being, health synthesis. A report of the millennium ecosystem Assessment, pp. 2.