

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Reducción biológica de As(V) y sulfato en sedimentos
de un sistema hidráulico contaminado con arsénico**

Tesis que presenta

Erika Elizabeth Ríos Valenciana

Para obtener el grado de

Maestría en Ciencias Ambientales

Directora de la Tesis:

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García

San Luis Potosí, S.L.P., Octubre del 2015



Constancia de aprobación de la tesis

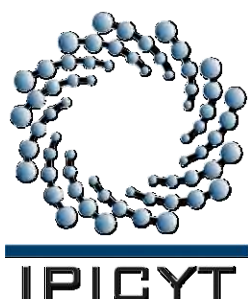
La tesis "*Reducción biológica de As(V) y sulfato en sedimentos de un sistema hidráulico contaminado con arsénico*" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Erika Elizabeth Ríos Valenciana** y aprobada el **veintiuno de octubre del dos mil quince** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García
Directora de la tesis

Dra. Nadia Valentina Martínez Villegas
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Roberto Briones Gallardo
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Luis Felipe Cházaro Ruiz
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-299514) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT-181809 “Comunidades sulfatorreductoras de ambientes extremos: estructura y función a pH ácido” asignado a la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 025 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 22 días del mes de octubre del año 2015, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Roberto Briones Gallardo	Presidente	UASLP
Dra. Nadia Valentina Martínez Villegas	Secretaria	IPICYT
Dr. Luis Felipe Cházaro Ruiz	Sinodal	IPICYT
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Erika Elizabeth Ríos Valenciana

sobre la Tesis intitulada:

Reducción biológica de As(V) y sulfato en sedimentos de un sistema hidráulico contaminado con arsénico

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García

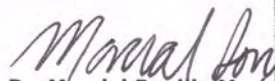
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:20 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 22 días del mes de octubre de 2015.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A mis padres por todo su amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos, por su paciencia, cariño y compañía. A mis sobrinos, que me contagian su alegría e inquietud.

Gracias por estar conmigo en todo momento y formar parte de mi vida. Ustedes son mi fuerza y motivación para lograr mis propósitos en la vida.

A mi gatito hermoso, por esos dulces momentos.

Agradecimiento

Agradezco a la Dra. Berenice Celis de manera especial por darme la oportunidad de trabajar bajo su dirección y desde luego por compartir su conocimiento y experiencia. A mi comité tutorial la Dra. Nadia Martínez Villegas, Dr. Luis Felipe Cházaro Ruíz y Dr. Roberto Briones Gallardo les agradezco por su tiempo valioso y dedicación, por sus aportaciones y sus críticas constructivas. Trabajar con ustedes fue bastante enriquecedor.

Agradezco al IPICYT por la infraestructura y facilidades para realizar mi maestría.

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada.

Agradezco a la M. en C. Elizabeth Cortés Cedillo, a la M. en C. Dulce Partida, al M. en C. Guillermo Vidriales, al M. en C. Juan Pablo Rodas Ortiz, a la I.Q. María del Carmen Rocha Medina y a la Dra. Angélica Aguilar Aguilar por su apoyo técnico y por sus acertadas sugerencias.

Gracias a Christian por su apoyo durante toda la maestría y motivación en la preparación de este documento. Gracias a mis amigos por tantos buenos momentos compartidos en el transcurso de estos años.

Finalmente, y con énfasis, agradezco a toda mi familia, por sus consejos, sacrificios, disposición para ayudarme y todo el amor que me brindan.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de Examen	iv
Dedicatorias	v
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xii
Índice de Anexos	xv
Abreviaturas	xvi
Glosario	xvii
Resumen	xviii
Abstract	xix
1. Introducción	1
2. Marco referencial	4
2.1 Incidencia, movilización e impacto del arsénico en el medio ambiente	4
2.1.1 Química general	4
2.1.2 Distribución en el ambiente	4
2.1.3 Fuentes y usos	5
2.1.4 Legislación ambiental	5
2.1.5 Toxicidad	6
2.1.6 Transformaciones en agua y sedimentos	6
2.2 Arsénico, caso de estudio	7
2.3 Incidencia, movilización e impacto del azufre en el medio ambiente	9
2.4 Procesos microbianos de reducción de As(V) y sulfato	10
2.4.1 Reducción de arsénico	10
2.4.2 Reducción de sulfato	14
2.4.3 Bio-mineralización de arsénico	15
2.5 Comunidades bacterianas en sedimentos	17
2.6 Rol de la materia orgánica en la movilización de arsénico y azufre en sedimentos	18
3. Justificación, hipótesis y objetivos	20
3.1 Justificación	20
3.2 Hipótesis	21
3.3 Objetivos	22
3.3.1 Objetivo General	22
3.3.2 Objetivos específicos	22
4. Materiales y métodos	23
4.1 Materiales	23
4.1.1 Fuente de inóculo	23

4.1.2	Muestreo de sedimentos, agua de poro y columna de agua	23
4.1.3	Reactivos	24
4.1.4	Medios de cultivo	24
4.2	Estrategia experimental	25
4.3	Métodos	27
4.3.1	Caracterización fisicoquímica de sedimentos, agua de poro y columna de agua	27
4.3.2	Ensayos en lote	28
4.3.2.1	Valoración de la actividad sulfato-reductora de los sedimentos	28
4.3.2.2	Valoración de actividad microbiana sulfato-reductora y arseniato-reductora	28
4.3.3	Recuperación y preparación de precipitados minerales	29
4.3.4	Determinación de As(III) y As(V)	29
4.3.5	Determinación del número más probable	31
4.4	Análisis químicos	32
4.4.1	Cuantificación analítica de elementos en sedimentos y muestras de cultivo	32
4.4.2	Microanálisis morfológico y elemental	32
4.4.3	Mineralogía de precipitados biogénicos y sedimento	32
4.4.4	Cuantificación de la concentración de arsénico total	33
4.4.5	Cuantificación de la concentración de sulfato, lactato y acetato	33
4.4.6	Cuantificación de carbono orgánico, inorgánico y total	33
4.4.7	Cuantificación del sulfuro por el método Cord-Ruwisch	34
4.4.8	pH	34
4.4.9	Potencial óxido-reducción	34
4.4.10	Determinación de sólidos totales, fijos y volátiles	35
4.4.11	Medición de alcalinidad en columna de agua	35
4.5	Cálculos	36
4.5.1	Balance general de electrones	36
5.	Resultados y discusión	38
5.1	Caracterización fisicoquímica de sedimentos, agua de poro y columna de agua	38
5.2	Evaluación de la capacidad sulfato-reductora de la biota microbiana nativa presente en los sedimentos	45
5.3	Ensayos en lote para evaluar la actividad reductora de sulfato en presencia de As(V)	50
5.3.1	Remoción de arsénico disuelto	55
5.4	Velocidades de reducción de sulfato	56
5.5	Procesos biológicos de sulfato/arseniato-reducción	59
5.5.1	Cinéticas de especiación de arsénico con sedimento Cerrito Blanco	59
5.5.2	Cinética de especiación de arsénico con sedimento Club de Tiro	64
5.5.3	Velocidades de reducción de As(V)	69
5.5.4	Balance general de electrones	72
5.6	Caracterización de precipitados biogénicos formados en los cultivos en lote	74

5.6.1	Mineralogía de precipitados biogénicos	80
5.6.2	Análisis de la morfología y la composición elemental	83
5.7	Caracterización microbiológica de los sedimentos.....	86
5.7.1	Estimación del número más probable de bacterias arseniato reductoras.	86
5.7.2	Morfología celular	88
5.7.3	Comparación del precipitado favorecido por actividad microbiana y el obtenido en la prueba de NMP	89
6.	Conclusiones y perspectivas	91
6.1	Conclusiones	91
6.2	Perspectivas.....	93
7.	Referencias bibliográficas.....	94
Anexos	105

Índice de tablas

Tabla 2.1 Reacciones de ionización y valores de pKa del ácido arsénico y el ácido arsenioso (Cornelis <i>et al.</i> , 2005).	4
Tabla 2.2 Procesos microbianos que influyen la movilización de arsénico (Huang, 2014b).	11
Tabla 2.3 Estequiometría de la reacción de arseniato-reducción tomando como compuestos orgánicos representativos acetato y lactato (Newman <i>et al.</i> , 1997a; Macy <i>et al.</i> , 2000; Ohtsuka <i>et al.</i> , 2013)	13
Tabla 2.4 Estequiometría de la reacción de sulfato-reducción utilizando como compuestos orgánicos representativos acetato y lactato (Sánchez-Andrea <i>et al.</i> , 2014).	15
Tabla 4.1. Ensayos en lote para evaluar la actividad microbiana sulfato-reductora de los sedimentos.	26
Tabla 4.2 Componentes de los ensayos en lote para evaluar la reducción microbiana de SO_4^{2-} en presencia de As(V).	26
Tabla 4.3 Componentes de los ensayos en lote para evaluar la reducción microbiana de SO_4^{2-} en combinación con la reducción de As(V).	26
Tabla 4.4. Pruebas de especiación de arsénico por cromatografía aniónica.	30
Tabla 5.1 Parámetros fisicoquímicos ensayados en los sedimentos que se usaron como inóculo. Se muestran los valores promedio (^a n = 3 y ^b n=2) y la desviación estándar (±).	42
Tabla 5.2 Parámetros fisicoquímicos del agua de poro de los sedimentos y de la columna de agua. Se muestran los valores promedio (n=2) y la desviación estándar (±). Únicamente la alcalinidad se determinó <i>in situ</i>	44
Tabla 5.3 Potenciales redox de los ensayos en lote determinados al final de los experimentos (30 días de incubación) para ensayos inoculados con CB y CT (sección 5.3).	54
Tabla 5.4 Velocidades máximas de reducción de sulfato de ensayos en lote con muestras de sedimento de Cerrito Blanco y Club de Tiro	57

Tabla 5.5 Efecto del molibdato en la concentración de sulfato liberado del
sedimento Cerrito Blanco a la fase líquida
..... 62

Tabla. 5.6 Velocidades máximas de reducción de As(V) y sulfato en ensayos con sedimento CB.	70
Tabla. 5.7 Velocidades máximas de reducción de As(V) y sulfato en ensayos con sedimento CT	70
Tabla 5.8. Balance de miliequivalentes de electrones (meqv e-) de ensayos en lote para evaluar capacidad reductora de sulfato y arseniato en sedimento CB.	72
Tabla 5.9. Balance de miliequivalentes de electrones (meqv e-) de ensayos en lote para evaluar capacidad reductora de sulfato y arseniato en sedimento CT.	73

Índice de figuras

- Figura 2.1** Modelo biogeoquímico de las transformaciones de arsénico en los sedimentos Cerrito Blanco y Club de Tiro. CH₂O: materia orgánica. 9
- Figura 2.2** Representación esquemática del ciclo biogeoquímico del arsénico y su interacción con los procesos microbianos de oxidación de sulfuro y reducción de sulfato y de hierro; (ads)=adsorbido; (pct)=precipitado (Modificado de Reisinger *et al.*, 2005). *Mediado por microorganismos. 10
- Figura 2.3.** Esquema representativo de un microorganismo y los diferentes mecanismos de interacción con los compuestos de arsénico (modificado de Huang *et al.*, 2014). 12
- Figura 2.4.** Esquema representativo de un microorganismo y los diferentes mecanismos de interacción con los compuestos de azufre (modificado de Rabus *et al.*, 2006). 14
- Figura 2.5** Oxidantes dominantes para la mineralización en sedimentos en relación al potencial redox (tomado de Gorny *et al.*, 2015) 18
- Figura 4.1** Esquema simplificado de la estrategia experimental. 27
- Figura 5.1** Composición mineralógica de los sedimentos: a) Cerrito Blanco, b) Club de Tiro. C: calcita; Q: cuarzo; Gy: yeso.* picos de difracción de mayor intensidad 38
- Figura 5.2** Micrografía electrónica de barrido y análisis EDS del sedimento Cerrito Blanco (CB) 39
- Figura 5.3** Micrografía electrónica de barrido y análisis EDS del sedimento Club de Tiro (CT). 40
- Figura 5.4.** Análisis de la composición elemental de columna de agua, sedimentos y aguade poro por ICP-OES 41
- Figura 5.5.** Perfiles de a) Producción de sulfuro, b) Consumo de sulfato, c) Consumo de lactato, d) Producción de acetato y e) pH, obtenidos en los ensayos en lote para evaluar la actividad sulfato-reductora utilizando como

inóculo sedimento CB, la leyenda inferior muestra los reactantes
suplementados en cada caso
..... 46

Figura 5.6. Perfiles de a) Producción de sulfuro, b) Consumo de sulfato, c) Consumo de lactato, d) Producción de acetato y e) pH, obtenidos en los ensayos en lote para evaluar la actividad sulfato-reductora utilizando como

inóculo sedimento CT, la leyenda muestra los reactantes suplementados en cada caso	48
Figura 5.7. Perfiles de a) Producción de sulfuro, b) Consumo de sulfato, c) Consumo de lactato, d) Producción de acetato y e) pH, obtenidos en los ensayos en lote para evaluar la actividad sulfato-reductora en presencia de As(V) utilizando como inóculo sedimento CB, la leyenda muestra los reactantes suplementados en cada caso	51
Figura 5.8. Perfiles de a) Producción de sulfuro, b) Consumo de sulfato, c) Consumo de lactato, d) Producción de acetato y e) pH, obtenidos en los ensayos en lote para evaluar la actividad sulfato-reductora en presencia de As(V) utilizando como inóculo sedimento CT, la leyenda muestra los reactantes suplementados en cada caso	52
Figura 5.9 Concentración de arsénico, sulfato, lactato y acetato en los ensayos bióticos (a y c) comparados con los ensayos esterilizados (b y d) con los sedimentos de CB y CT. Muestras tomadas al día 1 y 15 de incubación para CB y al día 1 y 30 para CT	56
Figura 5.10. Ensayos en lote para evaluar los procesos arseniato/sulfato respiratorios utilizando como inóculo sedimento CB: a) Consumo de sulfato, b) Producción de sulfuro, c) Consumo de As(V), d) Producción de As (III). La leyenda superior muestra los reactantes suplementados en cada caso	60
Figura 5.11. Perfiles de consumo de lactato (a) y producción de acetato (b), en cultivos en lote utilizando como inoculo sedimento CB.	63
Figura 5.12. Ensayos en lote para evaluar los procesos arseniato/sulfato respiratorios utilizando como inóculo sedimento CT: a) Reducción de sulfato, b) Producción de sulfuro, c) Consumo de As(V), d) Reducción de As (III). La leyenda superior muestra los reactantes suplementados en cada caso	65
Figura 5.13. Perfiles de consumo de lactato (a) y producción de acetato (b) en cultivos en lote utilizando como inoculo sedimento CT	66
Figura 5.14 Efecto de distintas concentraciones de donador y aceptor de electrones en los procesos de sulfato/arseniatto reducción con sedimento CT: a) Tratamiento con lactato 10 mM, As(V) 10 mM y SO ₄ ²⁻ 10 mM, b) Tratamiento con lactato 15 mM, As(V) 2.5 mM y SO ₄ ²⁻ 10 mM	68

Figura 5.15. Evidencia de la formación de precipitados en ensayos inoculados con sedimento CT. 75

Figura 5.16 Composición elemental de los precipitados minerales recuperados de los cultivos en lote. Concentraciones determinadas en ICP-OES 77

- Figura 5.17.** Porcentaje de remoción de arsénico disuelto en función del tiempo para sedimentos CB y CT a partir del ensayo con lactato 10 mM, As(V) 10 mM y SO_4^{2-} 10 mM 79
- Figura 5.18.** Patrones de difracción de rayos X de precipitados de los cultivos en lote con sedimento CB: a) ensayo con lactato (10 mM), As(V) (10 mM) y SO_4^{2-} (10 mM); b) ensayo con lactato (15 mM), As(V) (10 mM) y SO_4^{2-} (10 mM). Muestras tomadas después de 30 días de incubación. C: calcita; Q: cuarzo; Gy: yeso; O: oropimente. * Picos de difracción de mayor intensidad 81
- Figura 5.19.** Patrones de difracción de rayos X de precipitados de los cultivos en lote con sedimento CT: a) ensayo con lactato (10 mM), As(V) (10 mM) y SO_4^{2-} (10 mM); b) ensayo con lactato (10 mM). Muestras tomadas después de 30 días de incubación. C: calcita; Q: cuarzo; Gy: yeso. * Picos de difracción de mayor intensidad 82
- Figura 5.20.** Análisis EDS-MEB de precipitados recuperados de la cinética de sulfato-arseniato reducción con sedimento CB: Ensayo con lactato (10 mM), As(V) (10 mM) y SO_4^{2-} (10 mM). 84
- Figura 5.21** Análisis EDS-MEB de precipitados recuperados de la cinética de sulfato-arseniato reducción con sedimento CB: Ensayo con lactato (15 mM), As(V) (10 mM) y SO_4^{2-} (10 mM). 84
- Figura 5.22** Análisis EDS-MEB de precipitados recuperados de cinética de sulfato-arseniato reducción con sedimento CT: Ensayo con lactato (10 mM), As(V) (10 mM) y SO_4^{2-} (10 mM). 85
- Figura 5.23** Análisis EDS-MEB de precipitados recuperados de cinética de sulfato-arseniato reducción con sedimento CT: Ensayo con lactato (10 mM) 85
- Figura 5.24.** Determinación de NMP. **a)** Aspecto de las botellas en las que se detectó reducción de arsénico, **b)** Aspecto de las botellas donde no hubo crecimiento o presencia de microorganismos reductores de arsénico 87
- Figura 5.25.** Micrografías de frotis con tinción Gram de un cultivo correspondiente a una dilución de 1×10^{-6} de sedimento CB₂: a) Cultivo en medio NMP b) Cultivo con medio basal, lactato, As(V) y SO_4^{2-} 10mM. Imagen obtenida con un microscopio óptico ZEISS Axiostar Plus, con un lente de inmersión Neofluar 60x y una cámara Zeiss Axion-MR3..... 89
- Figura 5.26** Análisis EDS-MED de precipitados recuperados de cultivos de sedimento CB: a) Precipitado cuya síntesis fue inducida por la adición de sulfuro en una concentración final de 1-1.5 mM, b) Precipitado favorecido por actividad microbiana reductora de As(V) y SO_4^{2-} 90

Índice de Anexos

Anexo 1. Solución mineral Wolfe's	105
Anexo 2. Precipitados biogénicos recuperados de ensayos en lote para evaluar capacidad reductora de sulfato en presencia de As(V)	106
Anexo 3. Cristales de precipitado amarillo formado en cultivos NMP por adición de sulfuro ~1.5 mM	109
Anexo 4. Mineralogía de los sedimentos mezclados con el precipitado biogénico formado en los cultivos microbianos: a) CB y b) CT	110

Abreviaturas

BSR	bacterias sulfato-reductoras
CB	Cerrito Blanco
COT	carbono orgánico total
CT	Club de Tiro
EAA	espectroscopía de absorción atómica
EDS	detector de electrones dispersivos
ICP	siglas en Inglés de Plasma de Acoplamiento Inductivo
keV	kilo electrón volts
kPa	kilopascal
MEB	microscopio electrónico de barrido
meqv e⁻	miliequivalente de electrones
mM	milimolar
nm	nanómetros
pH	potencial de hidrógeno
pKa	logaritmo negativo de la constante de disociación ácida
rpm	revoluciones por minuto
SFT	sólidos fijos totales
SVT	sólidos volátiles totales
µm	micrometros
ORP	potencial óxido reducción

Glosario

Actividad endógena. Actividad propia del sitio, sin intervención de factores externos, en sedimentos se refiere a que no se adicionan ni aceptores ni donadores de electrones externos.

Bio-mineralización. Proceso mediante el cual los microorganismos propician o aceleran las condiciones para la formación de fases minerales.

Biogénico. Producido por la acción de un organismo vivo.

Biodisponible. Se refiere a que los microorganismos pueden aprovechar determinado compuesto ya que no existe una barrera físico-química que limite el bioproceso.

Aclimatación. Proceso por el cual un organismo se adapta fisiológicamente a distintos cambios en el medio en que se desarrolla.

Resumen

Ríos Valenciana Erika Elizabeth (2015). Reducción biológica de As(V) y sulfato en sedimentos de un sistema hidráulico contaminado con arsénico. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.

El arsénico (As) es un contaminante prioritario por su gran potencial ecotoxicológico. La creciente problemática global de acuíferos contaminados con As hace necesario el estudio de los procesos químicos y biológicos involucrados en las transformaciones de dicho metaloide. La movilidad y toxicidad del As dependen de reacciones redox, adsorción-desorción, precipitación-disolución y actividad biológica, esta última interviene ampliamente en el ciclo biogeoquímico del As en sedimentos de acuíferos. En los sistemas sedimentarios se presentan zonas óxicas y anóxicas aunado a la disponibilidad de materia orgánica lo que promueve el metabolismo microbiano. En este contexto, la arseniato-reducción, es un metabolismo microbiano no deseable ya que incrementa la toxicidad y movilidad del As al reducir el As(V) a As(III) que es una especie más tóxica y móvil. Para contrarrestar el efecto negativo de la arseniato-reducción ésta se puede asociar al proceso de sulfato-reducción, con lo que se promueve la bio-mineralización de As(III) al formarse sulfuros de As, retirándolo de la fase acuosa e inmovilizándolo en fases minerales. El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio microbiológico con sedimentos enriquecidos con As, para evaluar, en microcosmos, la reducción microbiana de As(V) y su efecto en la especiación de arsénico en presencia de materia orgánica y condiciones propicias para el proceso de sulfato-reducción. Se realizaron ensayos en lote utilizando como inóculo dos sedimentos con características distintas, Cerrito Blanco (CB) y Club de Tiro (CT) para estudiar las reacciones de sulfato/arseniato reducción. En el transcurso de los experimentos se siguió la producción de sulfuro, consumo de sustrato y sulfato, producción de acetato y las especies de As(III) y As(V). Los resultados indicaron que en presencia de As(V) y sulfato la biota microbiana de los sedimentos tiene preferencia por el proceso de arseniato-reducción, no obstante, si hay una fuente de carbono también se efectúa la sulfato-reducción. Cuando existen concentraciones bajas de sulfuro disuelto (<3 mM) ocurre la bio-mineralización de sulfuros de arsénico, cuya formación está ligada a la actividad microbiana. Con la formación de precipitados se remueve arsénico de la fase líquida. Después de que los cultivos se incubaron 30 días se alcanzó una remoción de 90% en ensayos con sedimento CB y de 52% en ensayos con sedimento CT, de una concentración inicial del 10 mM de As(V). Se obtuvieron velocidades de reducción de 0.10-0.15 mmol de As(V)/L·h para CB y para CT de 0.24-0.31 mmol de As(V)/L·h dichas velocidades fueron en promedio 3 y 8 veces mayores que las velocidades de sulfato-reducción. Esta investigación demostró que la comunidad bacteriana nativa presente en los sedimentos puede efectuar los procesos de arseniato y sulfato reducción sin un previo enriquecimiento. Esto se puede aprovechar para favorecer la bio-mineralización de As si se proveen concentraciones apropiadas de donador y aceptores de electrones, eventualmente se puede aplicar como una tecnología de bio-remediación en sistemas anaerobios.

Abstract

Ríos Valenciana Erika Elizabeth (2015). Biological As(V)- and sulfate-reduction in sediments of a hydraulic system contaminated with arsenic. Master Thesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.

Arsenic (As) is a priority pollutant due to its great ecotoxicological potential. Arsenic-contaminated aquifers are a widespread worldwide problem; therefore, the study of chemical and biological processes involved in the transformation of this metalloid is highly relevant. The fate, mobility, and toxicity of arsenic, are mainly controlled by redox reactions, adsorption-desorption, precipitation-dissolution, and biological activity. The latter, is recognized by playing a critical role in biogeochemical cycling of arsenic in aquifer sediments. Sedimentary systems possess oxic, and anoxic zones, these characteristics along with the availability of organic matter, promote reducing microbial mechanisms such as the arsenate-reducing process. This metabolic function is undesirable because it increases the toxicity and mobility of As (by reducing it from the oxidation state V to III). To counteract the negative effect of arsenate-reduction, this process can be associated with the sulfate-reduction process because the availability of As (III) and sulfide can promote the bio-mineralization of As by removing it from the aqueous phase by its immobilization as As-bearing sulfide minerals. The aim of this work was to perform a microbiological study using arsenic enriched sediments to assess the microbial reduction of As(V), and its effect on arsenic speciation. Two scenarios were evaluated: the presence of organic matter, and favorable conditions for the sulfate-reduction process. Batch experiments were conducted using two sediments as inoculum with different characteristics: Cerrito Blanco (CB) and Club de Tiro (CT). Microcosms were periodically sampled to follow sulfide production, consumption of substrate and sulfate, acetate production and arsenic species (III and V), in order to evaluate the cultures performance. The results indicate that in the presence of As(V) and sulfate, the microbial community of the sediment has preference for the arsenate reduction process; however, if a carbon source is available, it also performs sulfate-reduction. When low concentrations of sulfide (<3 mM) are present, the arsenic bio-mineralization linked to microbial activity occurs, and besides the disappearance of As from the aqueous phase there is also formation of precipitates containing arsenic and sulfur. After incubating the cultures for 30 days 90% of arsenic removal was reached in assays with the CB sediment, and 52% with the CT sediment. The arsenic reduction rates achieved for CB assays was 0.10-0.15 mmol of As(V) L⁻¹ h⁻¹, and for CT assays was 0.24 to 0.31 mmol of As(V) L⁻¹ h⁻¹. The rates of As(V) reduction were on average 3 and 8 times higher than the rates of sulfate-reduction obtained with CB y CT, respectively. This research demonstrated that the indigenous bacterial community present in the sediment could perform the process of arsenate- and sulfate-reduction without previous enrichment. These activities can be harnessed for the bio-mineralization of arsenic if provided appropriate concentrations of donor and electron acceptors. Such process can be applied as a bioremediation technology in anaerobic systems.

1. Introducción

El arsénico encabeza la lista de contaminantes prioritarios por su gran potencial ecotoxicológico, ya que puede bioacumularse y movilizarse a través de la cadena trófica además de ser un agente carcinogénico reconocido (EPA-US, 2006; IARC, 2004). Actualmente la contaminación de acuíferos por arsénico es una problemática creciente que afecta a una gran proporción de la población mundial. Se han identificado áreas con alto contenido de arsénico en aguas subterráneas (> 50 µg/L) en Argentina, Chile, México, China, Hungría, India, Bangladesh y Vietnam (Smedley & Kinniburgh, 2002). En México los ambientes hidrogeológicos donde se ha detectado presencia de arsénico en aguas subterráneas son principalmente acuíferos aluviales (centro y norte del país), áreas de actividad minera y aguas geotermales. Específicamente en el estado de San Luis Potosí, México, casos representativos de una elevada concentración de arsénico en agua se localizan en el distrito minero Santa María de la Paz y Matehuala; para efectos de este trabajo se hace referencia concretamente al complejo hidráulico “Cerrito Blanco” y a una emanación de agua en el club de tiro privado “Los Halcones” situados en el municipio de Matehuala, con base en reportes previos que consideran la distribución espacial y temporal en el complejo Cerrito Blanco la concentración de arsénico oscila entre 6 y 16 mg/L y en el Club de tiro desde 44 hasta 155 mg/L (Martínez-Villegas *et al.*, 2013). Dichas concentraciones sobrepasan considerablemente los niveles señalados por la normatividad mexicana, la cual establece que el límite máximo permisible de arsénico en agua para consumo humano es de 0.025 mg/L y para aguas destinadas a actividades recreacionales o riego, como en el caso de los sitios referidos, es de 0.4 mg/L (NOM-127-SSA1-1994; NOM-001-SEMARNAT-1996).

La incidencia y movilización de arsénico en un sistema hidráulico depende principalmente de la hidrología, de la composición geológica, de la química del agua y de los procesos biológicos (Lièvremon *et al.*, 2009; Saalfeld & Bostick, 2009); estos últimos tienen una intervención significativa en las distintas transformaciones de arsénico por lo que motivaron esta investigación. Para relacionar los procesos biológicos y el ciclo de arsénico es importante mencionar

que la especiación de este metaloide está determinada por reacciones óxido-reducción, de disolución, adsorción y precipitación; los microorganismos pueden interactuar con el ciclo del arsénico a través de estos mecanismos teniendo efectos positivos o negativos en su estabilización (Cheng *et al.*, 2009).

En ambientes sedimentarios tienen lugar múltiples interacciones biogeoquímicas debido a su gran diversidad microbiana, disponibilidad de materia orgánica y estratificación redox (McArthur *et al.*, 2004; Castelle *et al.*, 2013;). En sedimentos ricos en hierro el predominio de óxidos y oxihidróxidos de hierro controla la movilización de arsénico. Por ejemplo, la disolución reductiva de oxihidróxidos de hierro se ha reportado como uno de los mecanismos más importantes que causa la desorción y liberación de arsénico hacia la fase acuosa y es consecuencia de la reducción microbiana de Fe(III) (Mirza *et al.*, 2014; Muehe *et al.*, 2013; Neidhardt *et al.*, 2014). Sin embargo, existen ambientes pobres en hierro y ricos en azufre, siendo este el caso de los sitios donde se colectaron los sedimentos para este estudio, por lo que es importante considerar la interrelación entre el ciclo del azufre y el ciclo arsénico debido a que procesos como la reducción microbiana de sulfato desempeñan un papel primordial en la especiación del arsénico (Burton *et al.*, 2013). Existen evidencias de la movilización biogénica de arsénico y azufre en sedimentos de lagos, ríos y acuíferos (Oremland *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2011, Jiang *et al.*, 2014;), dicho proceso va a depender de la composición geoquímica y mineralógica del sedimento y desde luego la disponibilidad de materia orgánica, ya que ésta estimula a la comunidad microbiana nativa desencadenando una serie de procesos biológicos que afectan la composición química del agua (Neidhardt *et al.*, 2014).

La integración y comprensión de todos los aspectos mencionados anteriormente es fundamental en la bio-remediación de sitios contaminados. Partiendo de que la movilización e inmovilización de arsénico es una interacción compleja de reacciones mediadas por microorganismos y procesos geoquímicos es evidente la importancia de estudiar los procesos implicados en la distribución y especiación de arsénico así como su relación con otros ciclos biogeoquímicos

afines, tal es el caso del ciclo de azufre. Entre los factores clave para lograr el objetivo anterior se encuentra el estudio de la biota microbiana asociada a las transformaciones de especies de arsénico y azufre como una aproximación para comprender mejor los procesos biogeoquímicos que ocurren en el sitio particular de estudio y a su vez contribuir al planteamiento de estrategias de remediación y prevención de contaminación, así como de atenuación de riesgos.

El presente trabajo tuvo como propósito estudiar en microcosmos la contribución de la comunidad microbiana proveniente de sedimentos contaminados con arsénico sobre los procesos de especiación y estabilización de este contaminante de interés global.

2. Marco referencial

2.1 Incidencia, movilización e impacto del arsénico en el medio ambiente

2.1.1 Química general

El arsénico es un metaloide, por lo que no se encuentra como cationes individuales, reacciona rápidamente para formar oxianiones y sus sales correspondientes, puede formar parte de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos; los estados de oxidación en que predomina son As(V) y As(III) con menor frecuencia encontramos el As(-III) y el As(0) (Gorny *et al.*, 2015). El arseniato o As(V) predomina en condiciones oxidantes, mientras que el arsenito o As(III) predomina cuando las condiciones son reductoras (Cheng *et al.*, 2009). En la Tabla 2.1 se muestran las principales reacciones de ionización de los oxianiones de As(V) y As(III) así como el pKa al que se llevan a cabo.

Tabla 2.1 Reacciones de ionización y valores de pKa del ácido arsénico y el ácido arsenioso (Cornelis *et al.*, 2005).

	Reacción	pKa
As(V)		
Ácido arsénico (H₃AsO₄)	H ₃ AsO ₄ + H ₂ O → H ₂ AsO ₄ ⁻ + H ₃ O ⁺	2.20
	H ₂ AsO ₄ ⁻ + H ₂ O → HAsO ₄ ²⁻ + H ₃ O ⁺	6.97
	HAsO ₄ ²⁻ + H ₂ O → AsO ₄ ³⁻ + H ₃ O ⁺	11.53
As(III)		
Ácido arsenioso (H₃AsO₃)	H ₃ AsO ₃ + H ₂ O → H ₂ AsO ₃ ⁻ + H ₃ O ⁺	9.22
	H ₂ AsO ₃ ⁻ + H ₂ O → HAsO ₃ ²⁻ + H ₃ O ⁺	12.13
	HAsO ₃ ²⁻ + H ₂ O → AsO ₃ ³⁻ + H ₃ O ⁺	13.4

2.1.2 Distribución en el ambiente

El arsénico es el veintavo elemento más abundante en la corteza terrestre (Ma *et al.*, 2010). En la naturaleza pueden existir más de 300 minerales con arsénico, de estos 60% son algún tipo de arseniato, ~20% son sulfuros y sulfosales, 10% son óxidos y el resto son arsenitos, arseniuros, arsénico nativo y aleaciones metálicas (Bowell & Parshley, 2001). Las mayores concentraciones de arsénico las

encontramos en los sulfuros (pirita, galena), óxidos y oxihidróxidos de hierro, manganesos y aluminio (Cheng *et al.*, 2009).

La incidencia de arsénico en los cuerpos de agua naturales está determinada por complejas interacciones de la geología, hidrología, química del agua, y los procesos biológicos y por consiguiente está relacionada con el pH, el potencial redox (Eh), el estado de oxidación de las especies químicas, y las reacciones de adsorción, intercambio iónico y precipitación (Cheng *et al.*, 2009).

2.1.3 Fuentes y usos

El arsénico ingresa y se moviliza en el medio ambiente por procesos geológicos naturales como reacciones de meteorización, emisiones volcánicas, actividad biológica y por actividades antropogénicas. Estas últimas incluyen su uso industrial como agente de aleación en procesos mineros, procesamiento de vidrio, pigmentos, textiles, papel, adhesivos metálicos, protectores de la madera y municiones. El arsénico también se emplea en los procesos de curtido de pieles y en la fabricación de plaguicidas, aditivos para piensos y productos farmacéuticos (Jong & Parry, 2005).

El As(III) y As(V) son los productos finales habituales de liberación de arsénico al medio ambiente por procesos mineros, de meteorización y oxidación (Moriarty *et al.*, 2014). Cabe destacar que el arsénico es único entre los metales tóxicos y elementos que forman oxianiones por su alta sensibilidad de movilización a valores de pH típicos de aguas subterráneas (6.5-8.5), ya sea bajo condiciones oxidadas o reducidas. Es importante considerar que la mayoría de los problemas de contaminación por arsénico son causadas por arsénico inorgánico natural (Oremland & Stolz, 2003).

2.1.4 Legislación ambiental

Los niveles máximos permisibles de arsénico en agua para consumo humano han sido reducidos en muchos países debido a los efectos adversos que ha tenido la contaminación por arsénico de agua subterránea para consumo humano. El arsénico es una de las 10 sustancias químicas que la organización mundial de la

salud (OMS) considera más preocupante para la salud pública por lo que ha reducido el límite máximo permisible en agua potable de 50 a 10 µg/L, lo mismo que las directrices de la agencia de protección ambiental de Estados Unidos (USEPA), que además tiene como objetivo llevar el límite permisible a cero (Ma *et al.*, 2010). La norma mexicana (NOM-127-SSA1-1994) disminuyó el límite permisible de 50 a 25 µg/L en agua potable, y para cuerpos de agua usados para riego, actividades recreativas o protección de ecosistemas acuáticos el límite permisible establecido es 0.4 mg/L (NOM-001-SEMARNAT-1996).

El intervalo de concentraciones de arsénico reportados en las aguas subterráneas a nivel mundial comprende desde 0.5 µg/L hasta más de 5000 µg/L (Smedley & Kinniburgh, 2002).

2.1.5 Toxicidad

Según la OMS la mayor amenaza del arsénico para la salud pública reside en la utilización de agua contaminada para beber, preparar alimentos y regar cultivos alimentarios. La exposición prolongada al arsénico a través del consumo de agua y alimentos contaminados puede causar cáncer y lesiones cutáneas. También se ha asociado a problemas de desarrollo, enfermedades cardiovasculares, neurotoxicidad, enfermedades gastrointestinales y diabetes. En humanos el arsénico ingerido se excreta principalmente por la vía renal. Sin embargo, este elemento es bioacumulable en huesos, piel, cabello y uñas (Ma *et al.*, 2014).

2.1.6 Transformaciones en agua y sedimentos

Las especies de arsénico tienden a ser inestables en aguas naturales. La inestabilidad depende fuertemente de las condiciones redox del medio, pH, presencia de agentes precipitantes como Ca^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} , materia orgánica y actividad microbiana (Litter *et al.*, 2009).

Los sedimentos constituyen un factor muy importante del sistema acuático, por su participación en el equilibrio de los contaminantes solubles/insolubles y por su mayor permanencia en el cuerpo de agua. Existen reportes de distintos mecanismos para explicar la liberación de arsénico de los sedimentos al agua de

los cuales, se puede resaltar la disolución reductiva de minerales con alto contenido de arsénico, desorción de arsénico de óxidos de hierro y manganeso, y la oxidación microbiana de materia orgánica (Smedley & Kinniburgh, 2002, Saafeld *et al.*, 2009). Cabe mencionar que el arsénico puede inmovilizarse *in situ* por procesos de adsorción y precipitación, principalmente si existen óxidos de hierro, es decir, si prevalece una relación alta de Fe/As. Sin embargo, hay ambientes sedimentarios que no son ricos en hierro, donde habrá una marcada intervención de otros cationes abundantes tal es el caso de Ca^{2+} y aniones como el sulfato (Martínez-Villegas *et al.*, 2013).

2.2 Arsénico, caso de estudio

El estudio del arsénico se ha abordado desde diferentes perspectivas, entre las más importantes se pueden destacar las siguientes:

- ✓ Toxicidad en seres vivos, se consideran las propiedades químicas y físicas de arsénico en el amplio contexto de la toxicidad en humanos, plantas, animales y microorganismos. Se evalúan las consecuencias de la exposición crónica, rutas de exposición, respuesta biológica, concentraciones, por ejemplo, el nivel de riesgo mínimo de exposición oral y dosis letal (DL50) (Hettick *et al.*, 2015).
- ✓ Especiación y detección de arsénico, básicamente comprende el estudio de ventajas y desventajas de tecnologías analíticas, límites de detección, preparación y preservación de muestras y desde luego incorpora la implementación de nuevas metodologías (Ma *et al.*, 2014).
- ✓ Contaminación por arsénico y tecnologías de remediación, remoción de arsénico de ambientes contaminados ya sea por tratamientos químicos o biológicos (Fazi *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015).
- ✓ Biotransformación de especies de arsénico, se abordan los procesos biológicos, rutas metabólicas y energéticas además, reacciones oxido-reducción mediadas por microorganismos que involucran la transformación de diferentes especies químicas de arsénico (Oremland & Stolz, 2003).

- ✓ Procesos geoquímicos e hidrogenoquímicos implicados en las transformaciones de arsénico, estudios *in situ* o *ex situ* ya sea de acuíferos, ríos, lagos y los sedimentos de dichos ambientes relacionando la geología local con las altas o bajas concentraciones de arsénico. Además se evalúan procesos químicos que potencialmente impactan la estabilización de arsénico tal es el caso de la disolución y precipitación de minerales con arsénico o procesos de adsorción/desorción (Smedley & Kinniburgh, 2002; Drahotka & Filippi, 2009).
- ✓ Procesos biogeoquímicos, estudian las transformaciones de arsénico, considerando, además de los procesos químicos, los procesos biológicos, esto debido a que la movilización geogénica de arsénico en cuerpos de agua involucra procesos geológicos, hidrológicos, físico-químicos y biológicos (Lièvreumont *et al.*, 2009). Haciendo énfasis en los procesos biológicos el principal escenario es la interface agua-sólido, incluye diversos metabolismos microbianos y su participación en ciclo biogeoquímico del arsénico; considera aspectos como la resistencia microbiana a altas concentraciones de arsénico, reacciones redox catalizadas por microorganismos, caracterización molecular de comunidades microbianas y sus mecanismos de captación de arsénico. En este sentido los microorganismos anaerobios juegan un importante rol en la liberación de arsénico en sedimentos, dentro de los procesos microbianos que tienen mayor impacto se puede resaltar la reducción microbiana de hierro, de sulfato y desde luego de arsénico (Huang, 2014). El presente trabajo se enfoca en la actividad biológica específicamente en el estudio de dos procesos microbianos la sulfato-reducción y arseniato-reducción, ya que dichos procesos impactan la movilización e inmovilización de arsénico en sedimentos contaminados que en este estudio son la fuente de microorganismos, cabe destacar que en sistemas sedimentarios es de vital importancia considerar la relación de la composición química de los sedimentos y procesos microbianos. En la Figura 2.1 se ilustran los posibles procesos de especiación de arsénico que se ven influenciados por la disponibilidad de materia orgánica y actividad microbiana en los sedimentos de los sitios de muestreo.

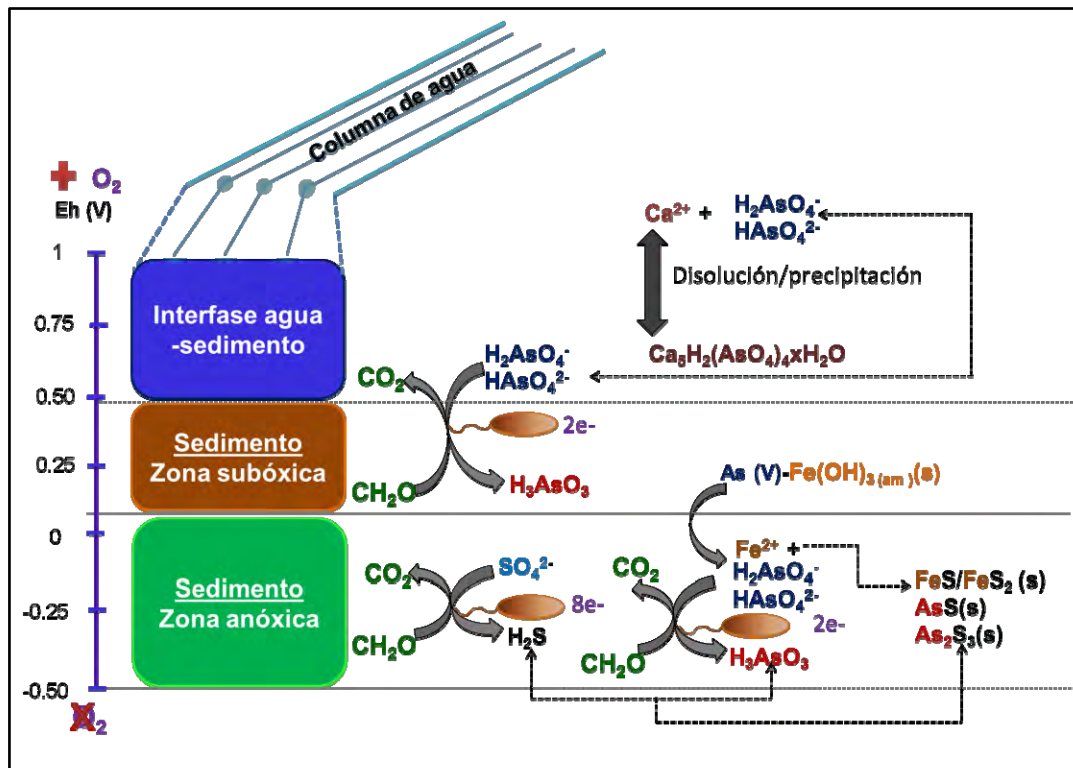


Figura 2.1 Modelo biogeoquímico de las transformaciones de arsénico en los sedimentos Cerrito Blanco y Club de Tiro. CH₂O: materia orgánica.

2.3 Incidencia, movilización e impacto del azufre en el medio ambiente

El azufre forma parte de los elementos más abundantes en la Tierra. Los mayores depósitos de azufre se encuentran en sedimentos y rocas (7800×10^{18} g) en forma de sulfuros de hierro, principalmente la pirita (FeS₂), yeso (CaSO₄·2H₂O) o como sulfato en agua de mar (1280×10^{18} g). El azufre se presenta en diferentes estados de oxidación (-II a +VI) y formas químicas (cisteína, sulfuro, sulfato, etc.) (Sánchez-Andrea *et al.*, 2014). Este elemento se libera al medio ambiente por fuentes naturales (erupciones volcánicas) y actividades antropogénicas. El ciclo del azufre en los sedimentos implica procesos bioquímicos tanto reductivos como oxidativos (Kijjanapanich *et al.*, 2014).

Las reacciones de azufre con arsénico son importantes en ambientes sedimentarios ya que determinan en gran medida la movilidad y toxicidad del arsénico. Dentro de un marco biogeoquímico, se ha documentado la interferencia del ciclo del azufre en la movilización de arsénico en acuíferos debido a la

oxidación de minerales de sulfuro ricos en arsénico o a la reducción del sulfato (Corkhill & Vaughan, 2009). En la siguiente sección se describen en detalle los procesos biológicos que involucran arsénico y azufre.

2.4 Procesos microbianos de reducción de As(V) y sulfato

2.4.1 Reducción de arsénico

Debido a que la movilidad del arsénico depende ampliamente de las formas químicas de azufre, hierro y del mismo arsénico, y a su vez la especiación química de estos elementos se ve impactada por transformaciones microbianas entonces, las biotransformaciones representan uno de los principales factores que influyen en el ciclo biogeoquímico del arsénico. En la Figura 2.2 se resume el ciclo biogeoquímico del arsénico y su relación con especies de azufre y hierro.

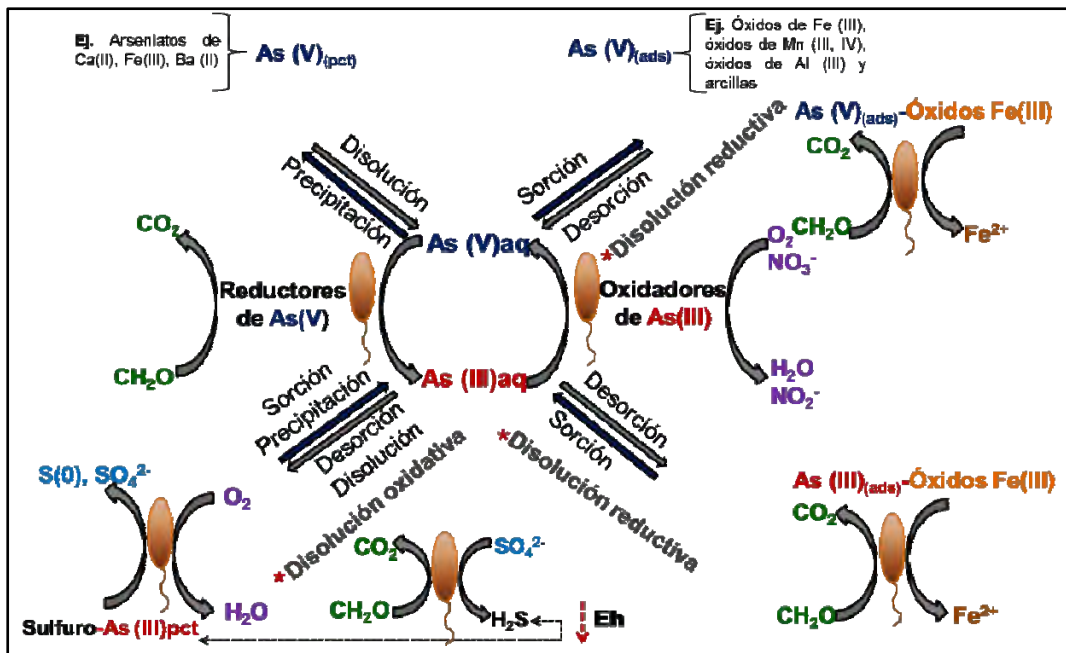


Figura 2.2 Representación esquemática del ciclo biogeoquímico del arsénico y su interacción con los procesos microbianos de oxidación de sulfuro y reducción de sulfato y de hierro; (ads): adsorbido; (pct): precipitado. *Mediado por microorganismos (Modificado de Reisinger *et al.*, 2005).

Las biotransformaciones referidas anteriormente incluyen procesos microbianos de reducción, oxidación, metilación y desmetilación, en la Tabla 2.2

se desglosa el efecto de los procesos mencionados en la movilización de arsénico, tomando como base la interface agua-mineral (Huang, 2014).

Tabla 2.2 Procesos microbianos que influyen la movilización de arsénico (Huang, 2014b).

Procesos	Características
Movilización	
Reducción de As(V) a As(III)	El As(III) es más móvil que el As(V)
Metilación de arsénico	El arsénico metilado (gas) es más móvil que el arsénico inorgánico
Inmovilización	
Oxidación de As(III) a As(V)	El As(V) es menos móvil que el As(III)
Desmetilación	El arsénico metilado (gas) es más móvil que el arsénico inorgánico
Biom mineralización	Formación de minerales con arsénico
Biosorción	Secuestro extracelular
Bioacumulación	Secuestro intracelular
Oxidación de hierro	Formación de hidróxidos de hierro que adsorben arsénico
Movilización e Inmovilización	
Reducción de hierro	Movilización: disolución reductiva de hidróxidos de hierro Inmovilización: secuestro mineral secundario.
Sulfuración	Movilización: formación de complejos disueltos de As-S Inmovilización: formación de precipitados de sulfuro
Biolixiviación	Movilización: disolución oxidativa Inmovilización: secuestro mineral secundario

La reducción microbiana de As(V) se puede llevar a cabo por dos mecanismos, el primer mecanismo es de desintoxicación (tolerancia a concentraciones elevadas de arsénico) y el segundo es la obtención de energía (respiración anaerobia) (Huang *et al.*, 2014; Osborne *et al.*, 2015). La desintoxicación es un mecanismo de resistencia al arsénico que ocurre cuando el As(V) entra al interior de la célula (al citoplasma) es reducido y exportado como As(III) por un sistema de excreción (E-flujo). Este proceso requiere inversión de energía. La similitud en tamaño iónico y carga entre PO_4^{3-} disuelto y los oxianiones

de As(V) le permite a este último entrar en la célula a través de vías de transporte de fosfato. La presencia de arsénico en la célula afecta su operación debido a que el As(V) desacopla la fosforilación oxidativa y el As(III) se une a grupos sulfhidrilo de las proteínas, la célula presenta un sistema de excreción de As(III) (Kruger & Bertin., 2013). En cambio, la respiración de arsénico es catalizada por la enzima arseniato reductasa (*Arr*), una enzima de la familia dimetil-sulfóxido que forma parte de las enzimas molibdeno. La enzima *Arr* se encuentra fuera del citoplasma ya sea unido a la membrana citoplasmática (en las bacterias Gram-positivas) o en el periplasma (en las bacterias Gram-negativas) (Osborne *et al.*, 2015). En la Figura 2.3 se ilustran las posibles interacciones del arsénico con una célula microbiana.

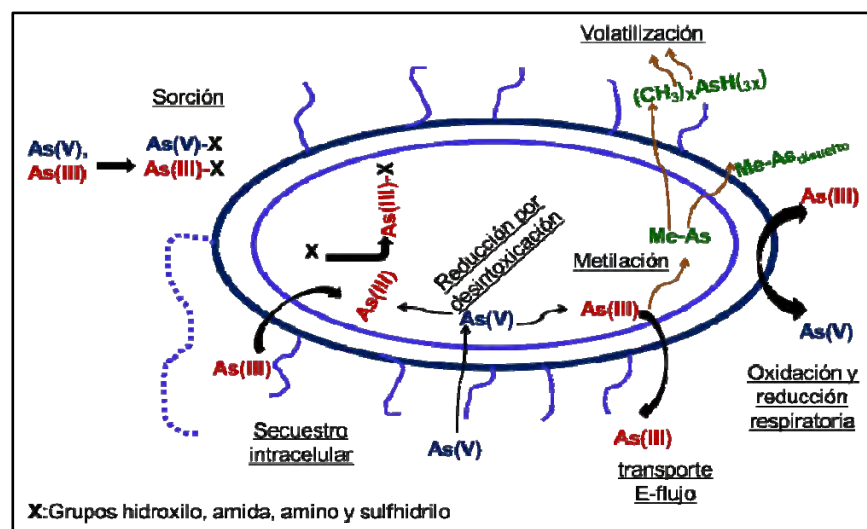


Figura 2.3. Esquema representativo de un microorganismo y los diferentes mecanismos de interacción con los compuestos de arsénico (modificado de Huang *et al.*, 2014).

La respiración de arsénico se lleva a cabo por bacterias arseniato-reductoras (BAR) que utilizan As(V) como aceptor terminal de electrones dando como resultado la formación de As (III). Esta reacción es energéticamente favorable cuando se acopla a la oxidación de materia orgánica, ya que el potencial redox de la pareja As(V)/As(III) es de +135 mV (Niggemyer *et al.*, 2001a; Oremland & Stolz, 2003). En la Tabla 2.3 se muestran las reacciones de reducción de arsénico usando como donadores de electrones el acetato y lactato.

Tabla 2.3 Estequiometría de la reacción de arseniato-reducción tomando como compuestos orgánicos representativos acetato y lactato (*Newman et al.*, 1997a; *Macy et al.*, 2000; *Ohtsuka et al.*, 2013).

Fuente de carbono	Reacción	ΔG° pH=7	Reacción
Acetato	$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^- + 2 \text{HAsO}_4^{2-} + 2 \text{H}_2\text{AsO}_4^- + 5 \text{H}^+ \rightarrow 4 \text{H}_3\text{AsO}_3 + 2 \text{HCO}_3^-$	-252.6 (kJ/mol)	2.1
Lactato	$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3^- + 2 \text{H}^+ + \text{HAsO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{AsO}_4^- \rightarrow 2 \text{H}_3\text{AsO}_3 + \text{HCO}_3^- + \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$	-172 (kJ/mol)	2.2

Las bacterias arseniato-reductoras han sido aisladas de distintos ambientes como sedimentos, lagos, complejos mineros, superficies de acuíferos, etc. Estos microorganismos pueden utilizar una amplia variedad de donadores de electrones como acetato, lactato, piruvato, citrato, glucosa e incluso se ha encontrado que pueden degradar moléculas aromáticas complejas ya que son filogenéticamente diversas, incluyen miembros del género *Firmicutes* (*Bacillus*), *Gamma*, *Delta*, y *Epsilon-Proteobacteria* (Oremaland & Stoltz, 2003).

Las especies bacterianas capaces de realizar la reducción de As(V) pueden tener un impacto negativo en el ambiente, debido a que el As(III) es una especie más tóxica y más susceptible a movilizarse ya que se presenta como una especie sin carga en un rango de pH neutro por lo que tiene menor afinidad por superficies minerales. Las bacterias arseniato-reductoras desempeñan un papel significativo en la liberación de arsénico en forma de As(III) de sedimentos subóxicos y anóxicos, debido a que pueden efectuar la reducción directa de arseniato adsorbido en los óxidos y oxihidróxidos de hierro o manganeso, ya que estos compuestos son inestables en condiciones reducidas, el arsénico unido a ellos es susceptible a desorberse lo que se resume en una mayor movilidad y toxicidad (*Niggemyer et al.*, 2001; *Al Lawati et al.*, 2013; *Moriarty et al.*, 2014; *Neidhardt et al.*, 2014;).

2.4.2 Reducción de sulfato

Los procesos microbianos desempeñan un papel esencial en el ciclo del azufre catalizando las reacciones de oxidación y reducción, estas reacciones incluyen la reducción no asimilativa de sulfato (conservación de energía y crecimiento microbiano), la reducción no asimilativa de azufre, la reducción asimilativa de sulfato (el sulfuro reducido se asimila en biomasa, proteínas y aminoácidos), oxidación de sulfuro y dismutación que se refiere a la oxidación y la reducción acoplada de compuestos de azufre (tiosulfato, sulfito y azufre) a sulfato y sulfuro (Sánchez-Andrea *et al.*, 2014). En la Figura 2.4 se muestran los mecanismos de reducción asimilativa y no asimilativa de sulfato y azufre elemental así como la oxidación de sulfuro en una célula microbiana.

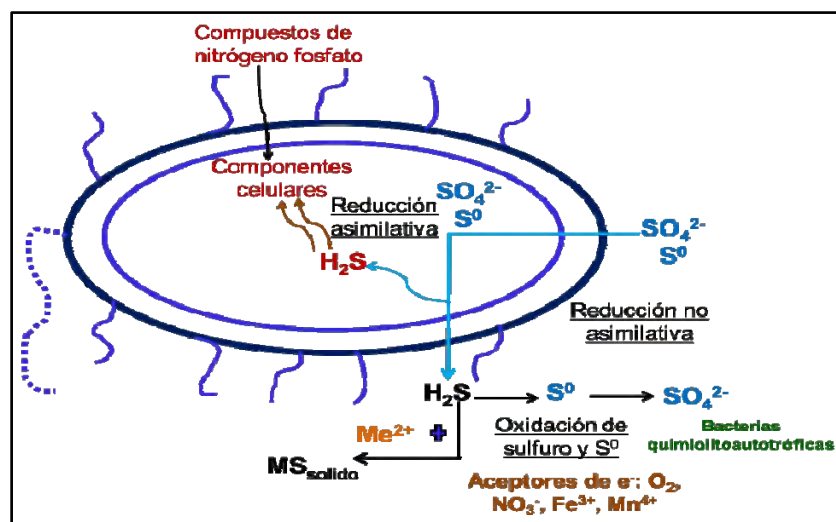


Figura 2.4. Esquema representativo de un microorganismo y los diferentes mecanismos de interacción con los compuestos de azufre (modificado de Rabus *et al.*, 2006).

Para nuestro propósito nos enfocaremos en la reducción no asimilativa de sulfato. Las bacterias sulfato sulfato-reductoras (BSR) son microorganismos anaerobios que utilizan el sulfato (SO_4^{2-}) como aceptor final de electrones durante la oxidación de una fuente de carbono, usualmente compuestos orgánicos, dando como resultado la producción de sulfuro (H_2S), el potencial redox (Eh) de la pareja $\text{SO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{S}$ es -222 mV. En la Tabla 2.4 se ejemplifican dos reacciones de sulfato-reducción en donde se aprecia que la energía libre de Gibbs que se produce es

menor a la que se produce si el aceptor final de electrones fuera el As(V) en lugar de sulfato (Tabla 2.3).

Tabla 2.4 Estequiometría de la reacción de sulfato-reducción utilizando como compuestos orgánicos representativos acetato y lactato (Sánchez-Andrea *et al.*, 2014).

Fuente de carbono	Reacción	$\Delta G^{\circ'}$ pH=7	
Acetato	$C_2H_3O_2 + SO_4^{2-} \rightarrow 2 HCO_3^- + HS^-$	-48 (kJ/mol)	Reacción 2.3
Lactato	$2 C_3H_5O_3^- + SO_4^{2-} \rightarrow 2 C_2H_3O_2^- + 2 HCO_3^- + 0.5 HS^- + 0.5 H_2S + 0.5 H^+$	-89 (kJ/mol)	Reacción 2.4

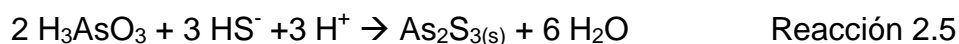
Las BSR pueden utilizar distintos aceptores de electrones en su metabolismo energético además del sulfato estos pueden ser sulfito, tiosulfato, azufre elemental (S^0), fumarato, nitrato (NO_3^-), Mn (IV), Fe(III) e incluso As(V). Las BSR utilizan como sustratos compuestos de bajo peso molecular (acetato, lactato) (Liamleam & Annachhatre, 2007). La reducción de sulfato requiere en primer lugar la activación del sulfato por medio de la enzima ATP sulfurilasa la cual une el sulfato a un fosfato del ATP para formar adenosina fosfosulfato (APS), la cual se incorpora a la célula y posteriormente puede reducirse a sulfito ($SO_3^{2-} + AMP$) por la actividad de la enzima APS reductasa y por último el sulfito se reduce al sulfuro (H_2S) por la acción de la enzima sulfito reductasa (Rabus *et al.*, 2006; Aguilar-Barajas *et al.*, 2011).

2.4.3 Bio-mineralización de arsénico

Algunos de los miembros de la comunidad sulfato-reductora también tienen la capacidad de utilizar As(V) como aceptor terminal de electrones: *Desulfotomaculum auripigmentum*, *Desulfomicrobium*, *Desulfosporosinus*, *Desulfitobacterium frappieri*, entre otros (Newman *et al.*, 1997a; Niggemyer *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Macy *et al.*, 2000a;). Dado que el sulfato es el aceptor terminal de electrones por excelencia para las BSR, resulta interesante saber si éstas pueden usar ambos aceptores cuando el arsénico también está presente. En este sentido, Newman y colaboradores (1997a) reportaron que la reducción de

sulfato únicamente ocurre cuando todo el arseniato presente en el medio es reducido a arsenito, por su parte Macy y colaboradores (2000) afirman que ambos procesos de reducción se pueden efectuar simultáneamente. De lo que no queda duda es que existen bacterias sulfato-reductoras capaces de emplear As(V) como aceptor final de electrones.

La importancia de tener bacterias arseniato y sulfato reductoras radica en que al acoplar el proceso de reducción de As(V) al de reducción de SO_4^{2-} , se obtiene As (III) y H_2S , respectivamente, los cuales en concentraciones apropiadas aunado a un potencial redox alrededor de -200 mV dan lugar a la formación de fases minerales de sulfuro y una vez que se exceda la solubilidad de estos minerales (As_2S_3 5×10^{-4} g/L en agua 25 °C) puede ocurrir la bio-mineralización de arsénico. El oropimente As_2S_3 y el rejalgar AsS son los principales productos en dicho proceso, incluso estos minerales se forman o existen naturalmente en sedimentos ricos en azufre; en la literatura se reporta que la formación de oropimente, rejalgar o sus polimorfos pararejalgar y alacranita (AsS o As_4S_4) en sedimentos naturales es consecuencia principalmente de la actividad microbiológica (O'Day *et al.*, 2004). A continuación se muestra la estequiometría de las reacciones respectivamente (Peng Lu & Chen Zhu., 2011):



Los sulfuros de arsénico son conocidos por ser una fuente de contaminación a causa de los procesos de meteorización que causan su disolución y con ello la liberación de arsénico a la fase acuosa. No obstante, hay reportes que sustentan que la actividad microbiana puede favorecer en gran medida la formación de dichos sulfuros de arsénico lo cual es deseable pues conduce a la estabilización de este contaminante (Newman *et al.*, 1997a; Macy *et al.*, 2000a).

El proceso de bio-mineralización puede contribuir a la remoción de arsénico de la fase acuosa y al secuestro de éste en fase sólida; si se considera que los sulfuros son fases estables, bajo condiciones reducidas, el desarrollo de estos

minerales puede fungir como un mecanismo de control de la movilización de arsénico en sistemas hídricos que presenten zonas subóxicas y anóxicas (Demergasso *et al.*, 2007; Rodríguez-Freire *et al.*, 2014).

2.5 Comunidades bacterianas en sedimentos

Los sedimentos son sede de una gran parte de la biomasa viva en la tierra. En el medio ambiente terrestre, los sedimentos proporcionan la estructura para los sistemas hídricos y para los microorganismos, dentro de ellos está controlada la incidencia de carbón orgánico, influyen en la especiación y por lo tanto el destino y el transporte de los metales y metaloides, al alterar la forma química de contaminantes como arsénico (Castelle *et al.*, 2013). Aunque se ha reportado la presencia de una gran variedad de especies que forman parte de las comunidades bacterianas en los sedimentos, debido a su gran diversidad se conoce relativamente poco de la microbiología de estos ambientes. Los miembros más representativos se encuentran entre las clases *Proteobacteria*, *Gamma-*, *Delta-* y *Alpha-proteobacteria*, *Euryarchaeota*, *Spirochetes*, *Planctomycetes*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes/Chlorobi*, *Thaumarchaeota*, *Elusimicrobia* y *Acidobacteria* (Castelle *et al.*, 2013).

Para entender los mecanismos de movilización de arsénico, mediados por microorganismos de los sedimentos hacia la fase acuosa, resulta de suma importancia la distribución vertical de las poblaciones de bacterias en los sedimentos (Jiang *et al.*, 2014). Un ambiente sedimentario permite que se lleven a cabo múltiples procesos microbianos por la existencia de diferentes condiciones redox y aceptores de electrones intrínsecos. En la Figura 2.5 se muestra una distribución vertical de los procesos microbianos, en relación al Eh y la concentración de oxígeno, que pueden tener lugar en sedimentos cuando se oxida la materia orgánica o se llevan a cabo procesos quimiolitotrofos (Gorny *et al.*, 2015).

En sedimentos existen microorganismos enzimáticamente activos capaces de sobrevivir en ambientes ricos en arsénico, ya sea con un pH alto o bajo y en condiciones de oxidación o reducción. Al mismo tiempo, son capaces de obtener

su energía de un fluido donde ocurren reacciones de disolución que contiene minerales, a través de la oxidación de arsenito o respiración de arseniato (Islam *et al.*, 2013). Por otro lado, el proceso de disolución de minerales que contienen arsénico puede ser acelerada por la producción bacteriana de sustancias poliméricas extracelulares lo que conlleva a la extracción de elementos vitales de la red cristalina de los minerales (Lukasz *et al.*, 2014).

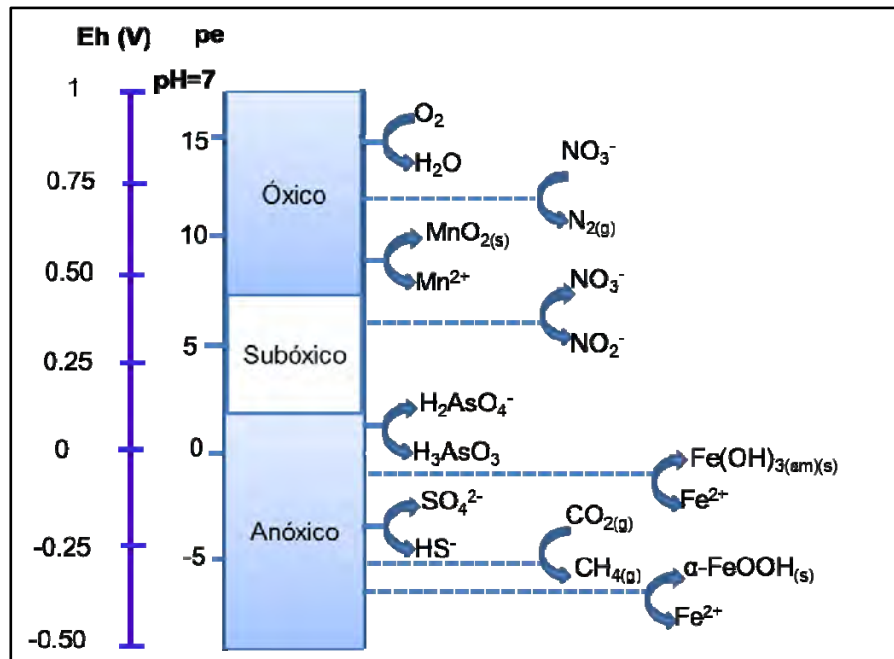


Figura 2.5 Oxidantes dominantes para la mineralización en sedimentos en relación al potencial redox (tomado de Gorny *et al.*, 2015)

2.6 Rol de la materia orgánica en la movilización de arsénico y azufre en sedimentos

La disponibilidad de carbono orgánico en cuerpos de agua, ya sea como materia orgánica sedimentaria o bien en la forma de carbono orgánico disuelto, se considera un factor limitante para reacciones redox mediadas por microorganismos (McArthur *et al.*, 2004; Radloff *et al.*, 2008, Lièvremon *et al.*, 2009). En la zona con mayor concentración de oxígeno la descomposición de la materia orgánica procede por la respiración aerobia. Sin embargo, en la zona

anaeróbica subyacente, la descomposición se produce principalmente a través de los procesos anaerobios, como la reducción del sulfato (Kijjanapanich *et al.*, 2014).

El metabolismo microbiano de la materia orgánica resulta en un ambiente con condiciones reductoras o diferentes zonas de estratificación redox (McArthur *et al.*, 2004). La materia orgánica fresca y la difusión lenta de O₂ a través del sedimento fomentan condiciones reducidas en la interfase agua-sedimento, a su vez favorecen la reducción de As(V) y también la desorción de As(V) de óxidos de hierro y manganeso, así como la disolución reductiva de estos minerales ya que son inestables bajo condiciones anóxicas (Neidhardt *et al.*, 2014; Smedley & Kinniburgh, 2002).

Se cree que la reducción microbiana de arsénico ocurre principalmente en la sub-superficie donde se encuentra disponible una fuente de carbono, el mencionado proceso de reducción puede ser sustentado con una baja disponibilidad de sustrato (p. ej. decaimiento microbiano) (Rodríguez-Freire *et al.*, 2014). Las poblaciones bacterianas son abundantes en sedimentos superficiales, lo que se refleja en las altas tasas de mineralización que disminuyen exponencialmente con la profundidad del sedimento (Li *et al.*, 1996; Neidhardt *et al.*, 2014; Kijjanapanich *et al.*, 2014). La frontera óxica-subóxica es la zona donde se desarrolla la diagénesis, es decir, la oxidación de la materia orgánica empleando los oxidantes presentes en los sedimentos. En resumen se puede decir que en los sedimentos la liberación o retención de arsénico está estrechamente ligada con la descomposición de materia orgánica.

3. Justificación, hipótesis y objetivos

3.1 Justificación

La calidad del agua subterránea y la predisposición de un sistema hidráulico a problemas de contaminación depende de las características del sistema en cuestión, dado que los acuíferos difieren entre sí ya sea por las condiciones climáticas, propiedades del ambiente hidrogeológico (profundidad, composición del acuífero, interacciones agua-minerales, contenido de metales etc.) y las comunidades microbianas nativas (Lièvreumont *et al.*, 2009; Alarcón-Herrera, 2012). De aquí se desprende la importancia de la identificación y caracterización de acuíferos contaminados así como el estudio de los mecanismos implicados en la movilización e inmovilización de metales y metaloides potencialmente tóxicos como el arsénico.

A nivel nacional se han efectuado estudios detallados de aspectos hidrogeoquímicos de la contaminación de acuíferos por arsénico (Castro-Larragoitia *et al.*, 1997; Carrillo-Chávez *et al.*, 2000; Armienta *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2004; Razo *et al.*, 2004; Alarcón-Herrera *et al.*, 2012; Reyes-Gómez *et al.*, 2013; Martínez-Villegas *et al.*, 2013). Sin embargo, no existen estudios al respecto que impliquen la caracterización biogeoquímica, es decir, que incluyan los procesos biológicos; lo cual es relevante si se considera que la actividad microbiana desempeña un rol importante en los ciclos biogeoquímicos de elementos como azufre y arsénico y es responsable en gran medida de la movilización e inmovilización de este último (Hoeft *et al.*, 2004; Burton *et al.*, 2013a;). Por lo anterior, estudiar los procesos biológicos que eventualmente se pueden llevar a cabo de ambientes que presentan altas concentraciones de azufre (en forma de sulfato) y arsénico puede ser una herramienta útil para comprender los mecanismos biogeoquímicos de movilización y transformación de especies químicas. Una vez entendidos los procesos biológicos que podrían ocurrir se podrían plantear estrategias de remediación adecuadas para los sitios contaminados. Otro aspecto que impulsa el desarrollo de este trabajo es que en la literatura hay poca información de la actividad biológica en acuíferos someros con

bajo contenido de hierro y alto contenido de especies de azufre y arsénico; en México una proporción considerable de acuíferos pertenece a este grupo.

3.2 Hipótesis

- ✓ En los sedimentos de un sistema hidráulico que presenta una elevada concentración de arsénico existen comunidades bacterianas capaces de reducir sulfato y arseniato, dichas comunidades contribuyen con la transformación y retención de especies de arsénico mediante las reacciones óxido-reducción que catalizan.
- ✓ Los procesos microbianos de sulfato-reducción y arseniato-reducción ligados a la oxidación de materia orgánica propiciarán la mineralización de arsénico en forma de sulfuros de arsénico. No obstante, el proceso de mineralización dependerá de la concentración de As(V) y sulfato en el medio así como de la disponibilidad de una fuente de carbono.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo General

Realizar un estudio microbiológico con sedimentos de un sistema hidráulico contaminado con arsénico, para evaluar en microcosmos la aportación de actividad microbiana en la reducción de As(V) e inmovilización de As(III), considerando el efecto de la materia orgánica y el proceso de sulfato-reducción.

3.3.2 Objetivos específicos

- a) Obtener y caracterizar fisicoquímicamente los sedimentos para definir las concentraciones de arsénico, azufre y materia orgánica.
- b) Llevar a cabo ensayos de microcosmos, para evaluar la capacidad reductora de sulfato y As(V) de la biota microbiana nativa.
- c) Realizar ensayos en lote para valorar el efecto de la materia orgánica y el proceso de sulfato-reducción en la transformación de especies de arsénico.
- d) Recuperar los minerales biogénicos precipitados en los cultivos microbianos para su identificación morfológica, estructural y elemental.
- e) Analizar cuantitativa y morfológicamente la comunidad bacteriana mediante estimación por número más probable y por técnicas de tinción diferencial.

4. Materiales y métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Fuente de inóculo

Para inocular los ensayos biológicos se utilizaron sedimentos recuperados de dos sitios de muestreo, un punto del canal “Cerrito Blanco” (CB) (100°36'41” longitud O y 23°40'23” latitud N) y el segundo sitio en un afloramiento de agua en el interior del club de tiro privado Los halcones (CT) (100°38'22” longitud O y 23°38'22” latitud N), ambos se localizan en el municipio de Matehuala, San Luis Potosí, México. Dichos sitios son cercanos al distrito minero de Santa María de la Paz, en Matehuala, San Luis Potosí, donde han sido extraídos sulfuros polimetálicos tipo skarn (Pb-Zn-Ag-Cu-Au) por más de 200 años, estos minerales generalmente están asociados con impurezas de arsénico. Previamente se ha reportado un alto grado de contaminación por arsénico atribuido a la dispersión fluvial de desechos de la mina a través de arroyos, a la dispersión eólica de relaves y las emisiones de partículas de una antigua fundidora (Castro, 1995; Castro *et al.*, 1997; Razo *et al.*, 2004; Martínez-Villegas *et al.*, 2013). Además se propuso que en la columna de agua de los sitios CB y CT la movilidad del arsénico está controlada por la precipitación y disolución de arseniatos de calcio (Martínez-Villegas *et al.*, 2013). Cabe destacar que en el área de estudio la abundancia de arsénico también podría deberse a la meteorización de minerales presentes naturalmente (Razo *et al.*, 2004).

4.1.2 Muestreo de sedimentos, agua de poro y columna de agua

Los sedimentos CB y CT se homogenizaron y se tamizaron (malla 1.7 mm) dentro de una cámara de anaerobiosis. El agua de poro de los sedimentos fue extraída a partir de la centrifugación de 200 g de sedimento a 10500 g durante 30 minutos, el líquido que se obtuvo se filtró empleando filtros Millipore de 0.22 μm y se acidificó con HNO_3 0.1N hasta alcanzar un $\text{pH} = 4.0$. También se tomaron muestras de agua superficial de los dos sitios de muestreo (un total de 1 a 2 L), en frascos de polipropileno o frascos de vidrio ámbar de 200 mL con tapa recubierta con teflón

según se requería para cada análisis, los contenedores fueron previamente lavados con HNO_3 (10% v/v). Para el análisis de la composición elemental las muestras fueron acidificadas con HNO_3 (pH <2). Se realizó la caracterización fisicoquímica del sedimento, el agua intersticial y la columna de agua de ambos sitios de muestreo, los análisis se desglosan en la sección 4.4.

4.1.3 Reactivos

Para los experimentos se utilizaron como aceptores de electrones arseniato de sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 99.9%, Sigma Aldrich, CAS: 10048-95-0) y sulfato de sodio (Na_2SO_4 , 99.2%, Fermont, CAS: 7757-82-6). Como donador de electrones y fuente de carbono se usó ácido láctico 85% grado reactivo (Baker Analyzed, CAS: 50-21-5).

Otros reactivos importantes que se usaron durante la etapa experimental fueron: ácido acético glacial (ACS 99.8%, Fermont CAS: 64-19-7), sulfuro de sodio ($\text{NaS} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 99.2%, Fermont CAS: 1313-84-4) y Trióxido de arsenito As_2O_3 (Sigma Aldrich, CAS: 1327-53-3).

4.1.4 Medios de cultivo

Para todos los ensayos en lote de reducción microbiana de arsénico (V) y sulfato se utilizó un medio basal representativo de agua subterránea (modificado de Burton *et al.*, 2013) que contenía: KCl 1 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 anhidro 1 mM, NH_4Cl 1 mM, KH_2PO_4 0.08 mM, se adicionó 0.1 mL/L de solución mineral de Wolfe's (Anexo 1). Para ajustar el pH a 7.0 y 6.5 se utilizó de NaHCO_3 (~24 y ~22 mM respectivamente). Dependiendo del ensayo se agregó además lactato como fuente de carbono, sulfato de sodio y/o arseniato de sodio.

Para llevar a cabo la cuantificación del número más probable (NMP) de bacterias reductoras de arseniato se usó un medio de cultivo con la siguiente composición (modificado de Kuai *et al.*, 2001): KH_2PO_4 1 mM, NH_4Cl 4.7 mM, KCl 6.7 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, NaCl 17 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3 mM; el pH se ajustó a 6.8 mediante la adición de NaHCO_3 ~23 mM. Además se adicionó 0.1 mL/L de solución mineral de Wolfe's (Anexo 1) y 0.025 g/L de extracto de levadura. Se

utilizó acetato 10 mM y lactato 5 mM como fuentes de carbono y arseniato 5 mM como el aceptor de electrones.

4.2 Estrategia experimental

En primer lugar se caracterizaron los sedimentos, el agua de poro y columna de agua del sitio de muestreo. En segundo lugar se llevaron a cabo los ensayos en lote o microcosmos para evaluar si la biota microbiana nativa presente en los sedimentos efectuaba reducción de SO_4^{2-} al proporcionar sulfato y materia orgánica al medio (Tabla 4.1). Posteriormente se realizaron ensayos para evaluar la actividad sulfato-reductora en presencia tanto de SO_4^{2-} como de As(V), con el objetivo de observar la competencia entre el sulfato y As(V) como aceptores de electrones (Tabla 4.2). También se efectuaron ensayos en lote para determinar la actividad microbiana sulfato-reductora y arseniato-reductora de cada uno de los sedimentos (Tabla 4.3).

En las tablas se muestran los componentes de cada ensayo y sus respectivos controles, se determinó la actividad endógena de los sedimentos, es decir, la actividad microbiana sin la adición de un aceptor o donador de electrones externo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en medio de cultivo basal. Los detalles de preparación de cultivos se muestran en la sección 4.3.3.

Cabe aclarar que las condiciones bajo la cuales se realizaron los experimentos en ningún momento pretendían reproducir las condiciones originales de los sitios de muestreo. Estos ensayos se realizaron bajo condiciones anaerobias las cuales son propicias para poder observar las actividades biológicas de interés: sulfato-reducción y arseniato-reducción.

Tabla 4.1. Ensayos en lote para evaluar la actividad microbiana sulfato-reductora de los sedimentos.

Ensayo	Sedimento	Lactato	SO ₄ ²⁻
Sulfato-reducción	✓	✓	✓
Aceptor de electrones endógeno	✓	✓	-
Donador de electrones endógeno	✓	-	✓
Control endógeno	✓	-	-
Control estéril (Abiótico)	✓	✓	✓

✓ Adicionado, - no adicionado

Tabla 4.2 Componentes de los ensayos en lote para evaluar la reducción microbiana de SO₄²⁻ en presencia de As(V).

Ensayo	Sedimento	Lactato	As(V)	SO ₄ ²⁻
Reducción de arseniato y sulfato	✓	✓	✓	✓
Sulfato-reducción	✓	✓	-	✓
Donador de electrones endógeno	✓	-	✓	✓
Donador de electrones endógeno (c/ SO ₄ ²⁻)	✓	-	-	✓
Control estéril (Abiótico)	✓	✓	✓	✓

✓ Adicionado, - no adicionado

Tabla 4.3 Componentes de los ensayos en lote para evaluar la reducción microbiana de SO₄²⁻ en combinación con la reducción de As(V).

Ensayo	Sedimento	Lactato	As(V)	SO ₄ ²⁻
Reducción de arseniato y sulfato	✓	✓	✓	✓
Aceptor de electrones endógeno	✓	✓	-	-
Donador de electrones endógeno	✓	-	✓	✓
Inhibición de sulfato-reducción (c/MoO ₄ ²⁻ 25 mM)	✓	✓	✓	✓
Control endógeno	✓	-	-	-
Control estéril (Abiótico)	✓	✓	✓	✓
Control químico	-	✓	✓	✓

✓ Adicionado, - no adicionado

Finalmente se caracterizaron los precipitados biogénicos formados en los cultivos y se realizó la estimación del número más probable de bacterias reductoras de arsénico en los sedimentos. En la Figura 4.1 se muestra un resumen del diseño experimental.

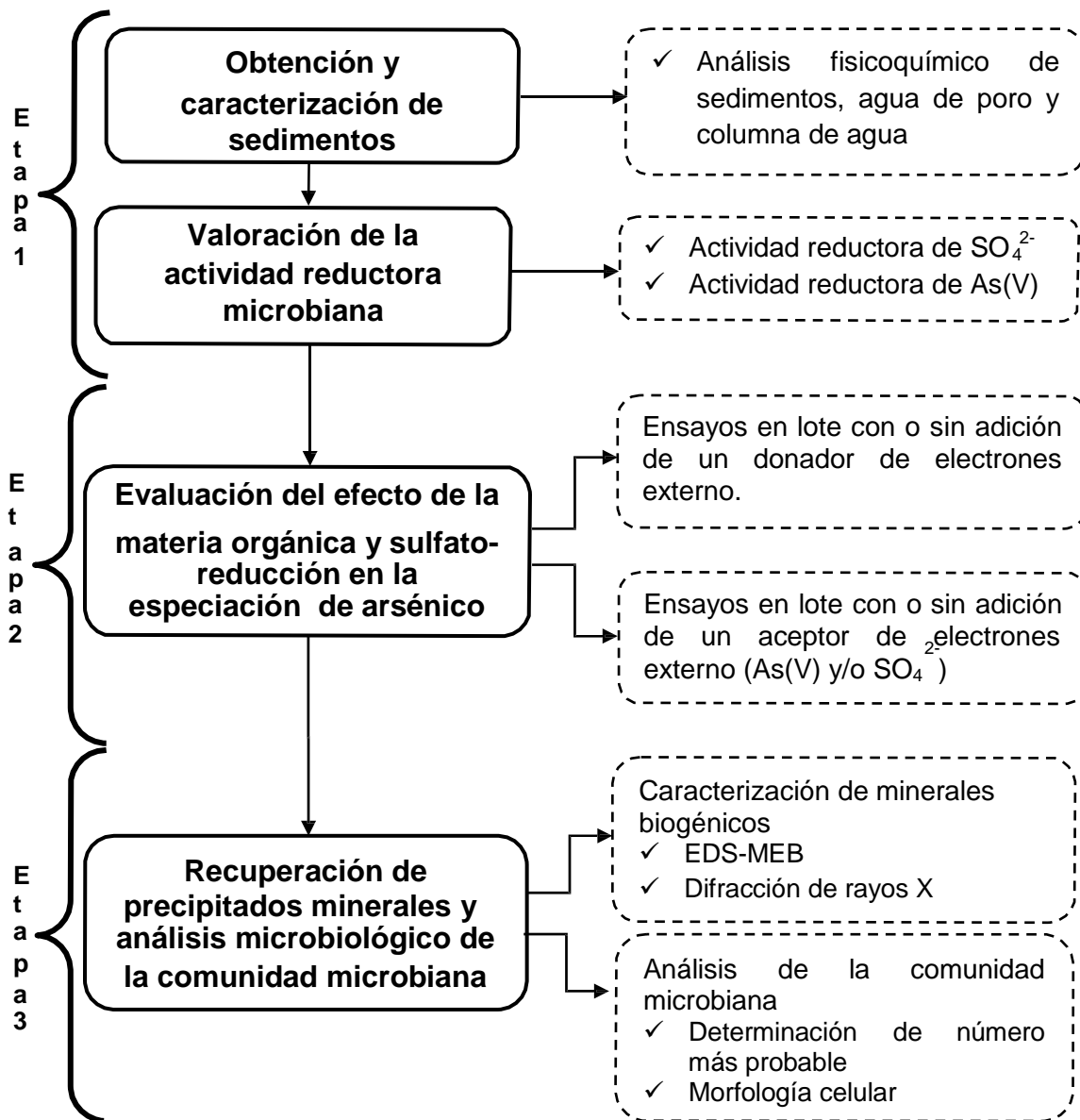


Figura 4.1 Esquema simplificado de la estrategia experimental.

4.3 Métodos

4.3.1 Caracterización fisicoquímica de sedimentos, agua de poro y columna de agua

La caracterización consistió en la medición de pH, potencial redox, carbono orgánico total (COT), sólidos volátiles, fijos y totales, concentración de sulfato,

concentración de arsénico total, determinación de la composición elemental y determinación de fases cristalinas presentes en el sedimento (los métodos se detallan en la sección 4.4).

4.3.2 Ensayos en lote

En todos los ensayos en lote se usaron botellas serológicas de 125 mL cuyo volumen de trabajo se ajustó a 120 mL con inóculo (sedimento 10% p/v) y con medio basal, de esta forma en cada botella solo quedó libre un espacio de cabeza mínimo (~5 mL). Dependiendo del ensayo el medio basal se suplementó con el donador de electrones (lactato) y los aceptores de electrones correspondientes (sulfato y/o arseniato). Las botellas se sellaron con tapones de goma y anillos de aluminio. Todo el proceso se efectuó dentro de una cámara de anaerobiosis (atmósfera N₂/H₂ 95/5 v/v; 14,500 Coy), una vez concluida la preparación de botellas se intercambié la atmósfera de cada una con N₂/CO₂ (80/20 v/v) para garantizar condiciones anóxicas. Posteriormente, las botellas se incuban a 30 ±2 °C en la oscuridad y sin agitación.

4.3.2.1 oración de la actividad sulfato-reductora de los sedimentos

Dependiendo del experimento (Tabla 4.1), la actividad sulfato-reductora de los sedimentos se determinó adicionando a los ensayos 10 mM de lactato y/o 10 mM de sulfato (Saalfield & Bostick, 2009); el pH inicial en estos ensayos se ajustó a 7.5. Cada 5 días se tomaban 2 mL de muestra para hacer las determinaciones de sulfato, lactato y acetato. De igual forma cada 5 días se determinaba la concentración de sulfuro disuelto en los ensayos.

4.3.2.2 Valoración de actividad microbiana sulfato-reductora y arseniato-reductora

Para determinar la capacidad reductora de arseniato y sulfato de acuerdo a los requerimientos del ensayo (Tabla 4.2 y Tabla 4.3) se adicionó al medio de cultivo basal lactato (10 mM), As(V) (10 mM) y sulfato (10 mM) (Liu *et al.*, 2004; Saalfield & Bostick, 2009). Además con el objetivo de distinguir si la reducción de arsénico

se debía únicamente al sulfuro producto de la reacción de sulfato-reducción se evaluó un tratamiento con lactato, As(V) y sulfato pero con adición de molibdato (MoO_4^{2-}) 25 mM, en este rango de concentración este último inhibe la actividad sulfato-reductora (Patidar & Tare, 2005). Adicionalmente, en este conjunto de ensayos se llevó a cabo un control químico (sin inóculo) para descartar la posibilidad de que la reducción de As(V) fuera debida solo a reacciones químicas. Cada uno o dos días se colectaron 4 mL de muestra de las botellas, se midió el pH y posteriormente las muestras se centrifugaron y filtraron para determinar la concentración de lactato, acetato y sulfato; después de 10 días de incubación las muestras se tomaban cada 5 días (Hoeft *et al.*, 2004; Al Lawati *et al.*, 2013). El sulfuro disuelto se determinó inmediatamente después de tomar la muestra directamente de la botella de acuerdo a la técnica descrita por Cord-Ruwisch (1985). También se determinó el arsénico total y para las cinéticas de especiación de arsénico se cuantificó la concentración de As(III) y As(V) (los métodos analíticos se describen en la sección 4.4).

4.3.3 Recuperación y preparación de precipitados minerales

Los cultivos con formación de precipitados se abrieron dentro de una cámara de anaerobiosis (14,500 Coy) y a continuación con una pipeta Pasteur se extrajo una mezcla de precipitado con medio de cultivo y se colocó en tubos eppendorf de 2 mL, los cuales se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min; luego se sustituyó el medio por agua desionizada libre de oxígeno se repitió el proceso de centrifugación y finalmente el pellet se secó a 32 °C. La muestra seca se pulverizó en un mortero de ágata para su posterior caracterización.

4.3.4 Determinación de As(III) y As(V)

El seguimiento de las concentraciones de As(III) y As(V) presentes en los cultivos en lote se efectuó por medio de cromatografía de intercambio aniónico utilizando una resina aniónica Dowex base fuerte 1x8, con grupos Cl^- y tamaño de malla 100–200 (Sigma Aldrich CAS: 69011-19-4). El As(III) y el As(V) se separan cuando este último es retenido en la resina de intercambio aniónico, esto debido a

que las constantes de disociación (pK_{a1}) para As(III) y As(V) son 9.22 y 2.20 respectivamente, por lo que el As(III) se presentará como especie neutra en un rango de pH circumneutral (4-8), mientras las especies de As(V) tendrán carga negativa en el mismo intervalo de pH (Higashidani *et al.*, 2014).

En primera instancia 9.3 g de resina se acondicionaron con NaOH 1M y después ésta se empacó en un tubo cromatográfico (PIREX de 30 cm de altura por 1.4 cm de diámetro interno), a continuación se intercambiaron los grupos Cl^- de la resina por grupos acetato mediante la adición de 20.5 mL de CH_3COOH 1 M. Después de la adición de cada reactante la resina se lavó con agua desionizada (~60 mL). Una vez preparada la resina, se adicionaron 20.5 mL de muestra previamente filtrada (0.22 μm) y acidificada hasta pH 5, posteriormente se adicionó agua desionizada libre de oxígeno (25 mL) para arrastrar el As(III), como eluyente para recuperar el As(V) se adicionaron 41 mL de HCl 0.5 M (Ficklin, 1983; Escot-Espinoza, 2014, Higashidani *et al.*, 2014). Las muestras tratadas tanto de As(V) como As(III) se aforaron a 50 mL y se acidificaron para determinar el contenido de arsénico total. Estas fueron analizadas por duplicado.

Cabe destacar que previamente al análisis de muestras de cultivos se efectuaron pruebas con soluciones estándar de As(III) y As(V) preparadas a concentraciones conocidas (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Pruebas de especiación de arsénico por cromatografía aniónica.

Muestra	Muestra I (mg/L)	Muestra II (mg/L)	Desviación estándar
Estándar de As(III) (10 ppm)			
As total	10.98	9.56	1.01
As(III)	11.17	9.02	1.52
As(V)	0.10	0.07	0.02
Estándar As(V) 12 ppm + As(III) 12 ppm			
As total	24.22	22.92	0.92
As(III)	12.51	10.20	1.63
As(V)	12.83	12.57	0.18

4.3.5 Determinación del número más probable

La concentración de células viables puede estimarse por el número más probable (NMP). Este método consiste en un protocolo de enumeración para bacterias con una característica metabólica específica, a grandes rasgos se efectúan diluciones sucesivas y replicadas de un cultivo en un medio de crecimiento y se hace un conteo de la fracción de tubos que muestran resultado positivo.

Para determinar el NMP de bacterias reductoras de arsénico en los sedimentos, primeramente se pesó 1g de sedimento y se diluyó en 9 mL de agua reducida (libre de O₂), a partir de esta mezcla se realizaron diluciones sucesivas (10⁻² a 10⁻¹⁰), colocando 1 mL de la dilución previa en 9 mL de agua reducida estéril contenida en botellas serológicas de 12 mL y con atmósfera de N₂/CO₂ (80/20). De cada una de las diluciones sucesivas se inoculó 1 mL, por triplicado, en botellas serológicas de 12 mL que contenían 9 mL de medio para cuantificación del NMP estéril (sección 4.1.4) y con atmósfera de N₂/CO₂ (80/20). Los cultivos se incubaron por 30 días a 30 ± 2°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación el procedimiento para determinar si había ocurrido o no la reducción de As(V) en cada botella fue el siguiente: las botellas se acidificaron inyectando 100 µL de HCl 1N y posteriormente se les adicionó sulfuro (1 mL) de una solución stock 15 mM para alcanzar una concentración de sulfuro en la botella de 1-1.5 mM. La formación casi inmediata de un precipitado amarillo se tomó como un resultado positivo (Kuai *et al.*, 2001). Se realizó un control negativo (medio NMP sin inóculo) el cual también se sometió a la prueba. Para el cálculo del número más probable de microorganismos se utilizaron las tablas proporcionadas en el reporte Techniques of Water-Resources Investigations of the United States Geological Survey (1989), Capítulo A4.

4.4 Análisis químicos

4.4.1 Cuantificación analítica de elementos en sedimentos y muestras de cultivo

Los elementos presentes en sedimentos, precipitados minerales y muestras líquidas se determinaron en un equipo de espectroscopia de plasma de acoplamiento inductivo sincronizado con un espectrofotómetro de emisión óptico ICP-OES (Varian 730-OES). Las muestras líquidas se filtran (0.22 μm) y acidifican con HNO_3 concentrado, los sedimentos y precipitados se someten previo al análisis a digestión ácida con agua regia (HCl y HNO_3 relación 3:1). Se determinó la presencia de azufre, arsénico, calcio, sodio, hierro, potasio, magnesio, manganeso, fosforo, molibdeno, níquel, plomo, silicio, litio, cadmio, zinc etc.

4.4.2 Microanálisis morfológico y elemental

Para conocer la morfología superficial y composición elemental de los sedimentos y minerales biogénicos, se efectuaron análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB, FEI-QUANTA 2000) acoplada a un sistema de espectroscopia de energía dispersiva (EDS; EDAX, Mod. DX4).

Para el análisis EDS-MEB se utilizan pines de aluminio y sobre estos se coloca cinta adhesiva de carbono (~0.5x0.5 cm) y esta se cubre con muestra pulverizada, posteriormente la muestra montada se recubre con polvo de oro para aumentar la conductividad (Recubridora-Au/Pt, Cressington Sputter Coater 108 auto).

4.4.3 Mineralogía de precipitados biogénicos y sedimento

Las fases minerales presentes en el precipitado y sedimentos se determinaron mediante un difractómetro de rayos X Bruker D8 Advance con una fuente de radiación $K\alpha$ de Cu, un barrido en el ángulo 2 theta de 10 a 80, aplicando un tamaño de paso de 0.02° , un tiempo en cada paso de 10 s. Aproximadamente 0.5 g de muestra previamente seca y pulverizada en un mortero de ágata se colocaron en un porta muestras de aluminio sobre el cual se hace incidir el haz de radiación. La identificación de fases se realizó comparando los difractogramas de cada

muestra con patrones estándar de fases minerales de la base de datos ICCD (International Center for Diffraction Data).

4.4.4 Cuantificación de la concentración de arsénico total

Se dio seguimiento a la concentración de arsénico en los cultivos a partir de espectrometría de absorción atómica de flama (Varian Spectra Mod. AA 240FS), la configuración del instrumento fue: longitud de onda 193.7 nm, anchura de rendija 0.5 nm, corriente de lámpara 10.0 mA, corrección de fondo C. El tipo de llama fue Aire/Acetileno (flujo de Aire: 13.50 L/min, flujo de acetileno: 2.45 L/min).

Para el análisis se utilizó un volumen de 25 o 50 mL de muestra la cual, se preparó haciéndose pasar por un filtro de 0.45 μm y posteriormente se acidificó con HCl 1 M.

4.4.5 Cuantificación de la concentración de sulfato, lactato y acetato

El sulfato, lactato y acetato se cuantificaron mediante comparación con estándares de alta pureza usando un equipo de electroforesis capilar Agilent 1600^a (Waldbronn, Germany). El equipo cuenta con una columna capilar de sílica fundida (Agilent, id =50 μm , L=80.5 cm, longitud efectiva =72 cm). El voltaje aplicado fue de -25 kV y la temperatura en el capilar 20 °C. La solución de corrida fue un buffer básico de aniones (Agilent, pH = 12.1). La determinación de analitos se realizó mediante detección indirecta UV usando un detector de arreglo de diodos. La señal de longitud de onda fue de 350 nm con una referencia a 230 nm. Las muestras se centrifugaron (12,000 rpm por 5 minutos) y se filtraron en membrana millipore de 0.22 μm .

4.4.6 Cuantificación de carbono orgánico, inorgánico y total

El carbono se determinó en muestras de la columna de agua, agua intersticial y sedimento. Para este análisis se empleó un analizador de carbono orgánico total (TOC-VCSN/TMN-1, Shimadzu), el cual, para muestras líquidas utiliza un detector de carbono total que emplea un método de oxidación catalítica a 680 °C y usa aire como gas acarreador.

La muestra se filtró en membranas de nitrocelulosa Millipore de 0.22 μm y se colocó en viales de vidrio de 24 mL. Para muestras sólidas se cuantificó el carbono total para lo cual, se usó un módulo muestreador de sólidos SSM-5000A, Shimadzu, en el cual la oxidación se realiza a una temperatura de 900 °C. Para tal fin se colocaron 0.5 g de muestra previamente seca (105 °C por 12 horas) en cápsulas de porcelana.

4.4.7 Cuantificación del sulfuro por el método Cord-Ruwisch

Se adicionaron 4 mL de una solución compuesta por sulfato de cobre (5 mM) y HCl (50 mM) en tubos Hach, consecutivamente con una jeringa de 1 mL se agregaron 0.1 mL de muestra y se agitaron en un vortex por 3 segundos, enseguida se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic) a una longitud de onda de 480 nm (Cord-Ruwisch, 1985). La curva de calibración se efectuó con sulfuro de sodio en un intervalo de 0 a 20 mM. La concentración de sulfuro se reportó en mmol/L.

4.4.8 pH

Inmediatamente después del muestreo, en el laboratorio se determinó el pH en el sedimento, agua de poro y columna de agua. Para realizar la medición de pH en sedimento se colocaron 10 g de éste en 50 mL de agua desionizada y se pusieron agitación, posteriormente la suspensión se dejó sedimentar por 30 minutos. Durante el desarrollo de los ensayos en lote también se dio seguimiento al pH.

Las mediciones del pH se realizaron con un potenciómetro marca Thermo Scientific™ Orion™ Versastar A211 equipado con un electrodo 8302BNUMD ROSS Ultra Triode glass-body pH/ATC.

4.4.9 Potencial óxido-reducción

Las mediciones se efectuaron con un equipo Thermo Scientific™ Orion™ Versastar A211 equipado con un electrodo (Redox/ORP Thermo Scientific), para calibrar el electrodo se utilizó una solución estándar (ORP Estandar, Orion Application solution, 967901, Thermo Electro corporation, 30 °C, +415 mV).

El ORP de los sedimentos y columna de agua se midió en el laboratorio aproximadamente 4 horas después del muestreo, los recipientes que contenían la muestra permanecieron herméticamente cerrados y la medición se efectuó en una cámara de anaerobiosis.

4.4.10 Determinación de sólidos totales, fijos y volátiles

La concentración de sólidos totales fijos y volátiles fue determinada en los sedimentos y en la columna de agua. Los sólidos totales (ST) se determinaron conforme el método gravimétrico de evaporación y secado de muestra a 105 °C; los sólidos volátiles (SV) hacen referencia a la cantidad de sólidos que se volatilizan por el efecto de la calcinación a 550 °C. Estas determinaciones se llevaron a cabo conforme a lo establecido en los métodos estándar (Standard Methods for Examination of Water and Wastewater APHA, 1998).

4.4.11 Medición de alcalinidad en columna de agua

La alcalinidad en la columna de agua de los sitios donde se colectó el sedimento se determinó *in situ* con un kit portátil (titulador digital HACH 1690001). Para esto se colocaron 25 mL de muestra en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, la muestra se tituló con HCl 1.6 N grado estándar incluido en el kit hasta que la solución cambió de color transparente a color rosado. Para el cálculo del valor de alcalinidad se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Alcalinidad} = \frac{A \times N}{V} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

Dónde:

A= mL de ácido estándar utilizados

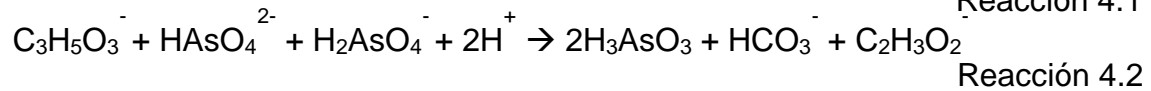
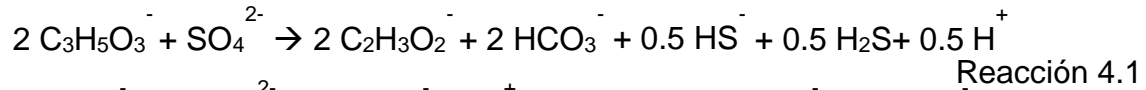
N= normalidad del ácido

4.5 Cálculos

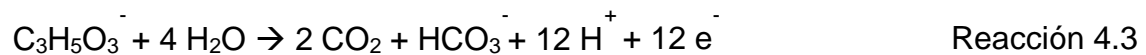
4.5.1 Balance general de electrones

Para efectuar los balances de electrones se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones (Rittmann & McCarty, 2001):

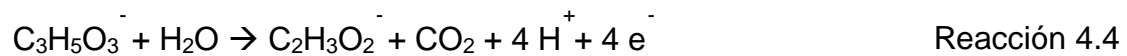
- ✓ La estequiometría del metabolismo sulfato-reductor y arseniato-reductor utilizando como donador el lactato obedece las siguientes reacciones respectivamente (Newman *et al.*, 1997, Liamleam & Annachhatre, 2007).



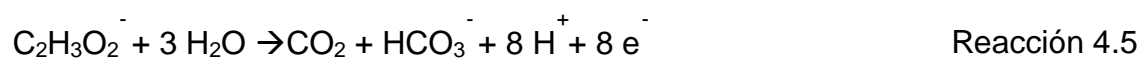
- ✓ Un mol de lactato que se oxida completamente hasta dióxido de carbono rinde 12 equivalentes reductores.



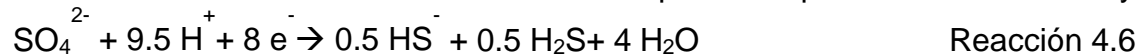
- ✓ La oxidación incompleta de lactato hasta acetato dona 4 equivalentes reductores.



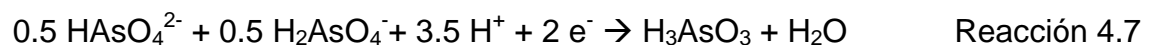
- ✓ La oxidación completa de 1 mol de acetato resulta en 8 equivalentes reductores.



- ✓ La reducción de 1 mol de SO_4^{2-} hasta H_2S requiere 8 equivalentes reductores y



- ✓ La reducción de 1 mol de As(V) a As(III) requiere 2 equivalentes reductores.



A continuación se presentan los cálculos realizados para estimar los miliequivalentes de electrones (meqv. e⁻):

1. Se calcularon los miliequivalentes de electrones (meqv e⁻) donados, estos corresponden al lactato consumido durante el experimento (concentración mmol/L) multiplicado por los 12 meqv e⁻ que rinde la oxidación completa de 1 mmol de lactato.

$$\frac{\text{---}}{\text{---}} \quad \text{(Ec. 4.2)}$$

()

2. Se calcularon los meqv e⁻ recuperados a partir del acetato producido por la oxidación incompleta de lactato.

$$\frac{\text{---}}{\text{---}} \quad \text{(Ec. 4.3)}$$

3. Se calcularon los meqv e⁻ recuperados por la reducción de As(V) a As(III) como resultados de la arseniato-reducción.

$$\frac{\text{---}}{\text{---}} \quad \text{(Ec. 4.4)}$$

()

4. Se calcularon los meqv. e⁻ recuperados por la reducción de SO₄²⁻ a H₂S como producto de la sulfato-reducción.

$$\frac{\text{---}}{\text{---}} \quad \text{(Ec. 4.5)}$$

()

Finalmente se sumaron los meqv e⁻ recuperados o aceptados y se dividieron entre el total de meqv e⁻ donados y de esta forma se obtuvo la fracción de recuperación de electrones, un valor de 1 indica la recuperación de 100% de los electrones invertidos.

5. Resultados y discusión

5.1 Caracterización fisicoquímica de sedimentos, agua de poro y columna de agua

Los resultados de la caracterización de los sedimentos que se usaron como inóculo se describen a continuación. En la Figura 5.1 se muestra la mineralogía de los sedimentos, las principales fases cristalinas identificadas en el sedimento del sitio identificado como Cerrito Blanco (CB) son calcita, yeso y cuarzo; mientras que en la muestra del sedimento recuperado del sitio Club de Tiro (CT) se observa solamente calcita y cuarzo. La composición mineralógica encontrada en CB es consistente con lo reportado previamente para sedimentos de dicho sistema hidráulico (Razo *et al.*, 2004).

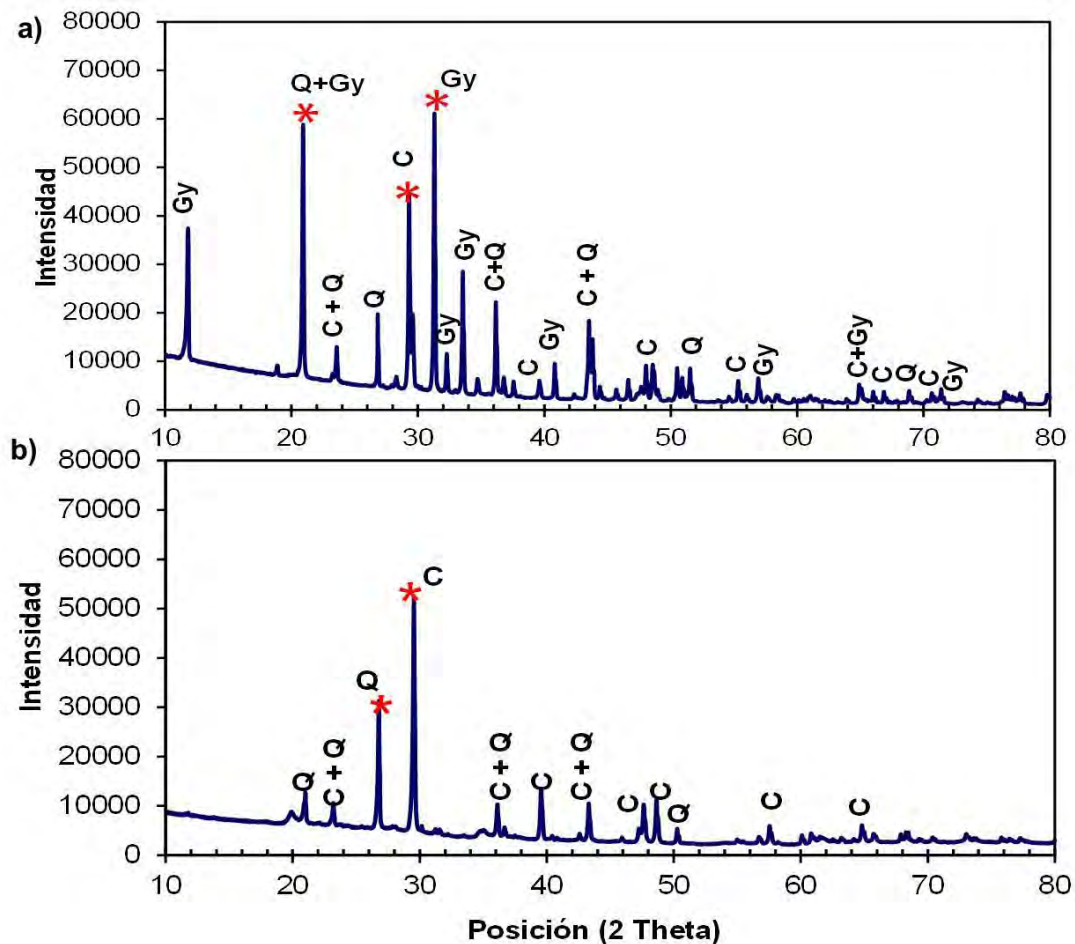


Figura 5.1 Composición mineralógica de los sedimentos: **a)** Cerrito Blanco, **b)** Club de Tiro. C: calcita; Q: cuarzo; Gy: yeso.* picos de difracción de mayor intensidad.

El difractograma del sedimento CB (Fig. 5.1a) muestra los picos de difracción de mayor intensidad en los valores del ángulo 2 theta 20.92, 31.30 y 29.3. Para la muestra CT (Fig. 5.1b) los picos de reflexión de mayor intensidad se localizan en 29.3 y 26.78 (los patrones de difracción fueron comparados con las cartas cristalográficas: 21-0816, 72-0596 yeso, 75-0443 cuarzo, 27-0029 y 72-4582 calcita).

Por otra parte, el análisis morfológico y elemental a partir de EDS-MEB mostró que en CB además de carbono y oxígeno también se encontró azufre y calcio (Fig. 5.2), a diferencia de lo que se obtuvo para la muestra CT en donde los elementos detectados fueron silicio y calcio (Fig. 5.3); ambos resultados son consistentes con la mineralogía determinada por difracción de rayos X, que consiste principalmente de yeso y calcita en CB (Fig. 5.1a) y calcita y cuarzo en CT (Fig 5.1b). Cabe mencionar que en CT se detrmirió la presencia de hierro.

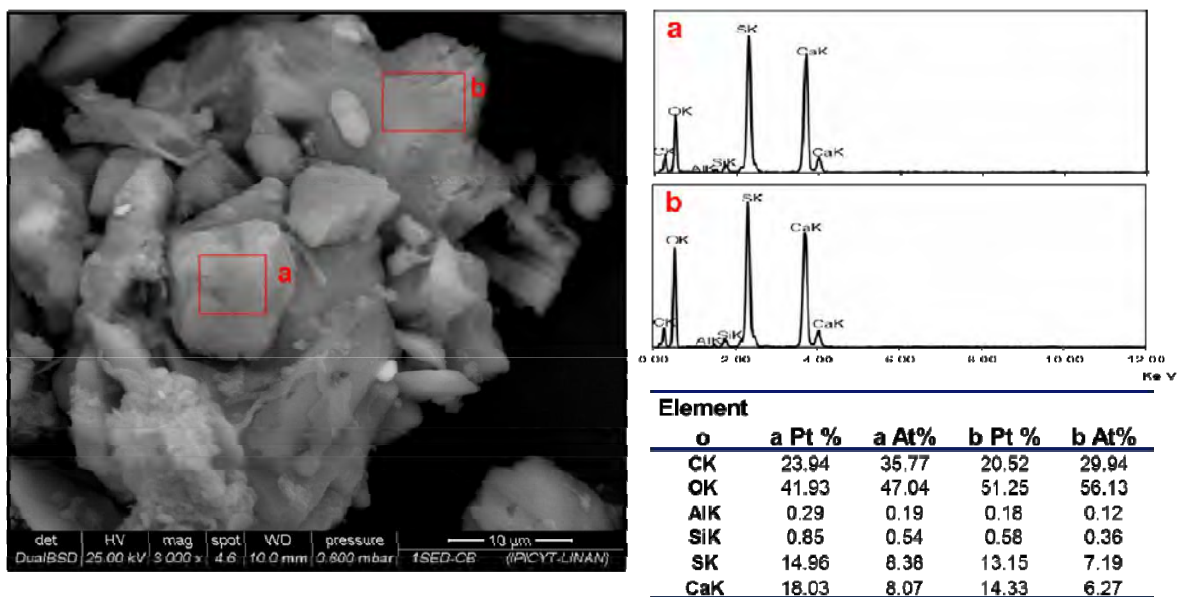


Figura 5.2 Micrografía electrónica de barrido y análisis EDS del sedimento Cerrito Blanco (CB).

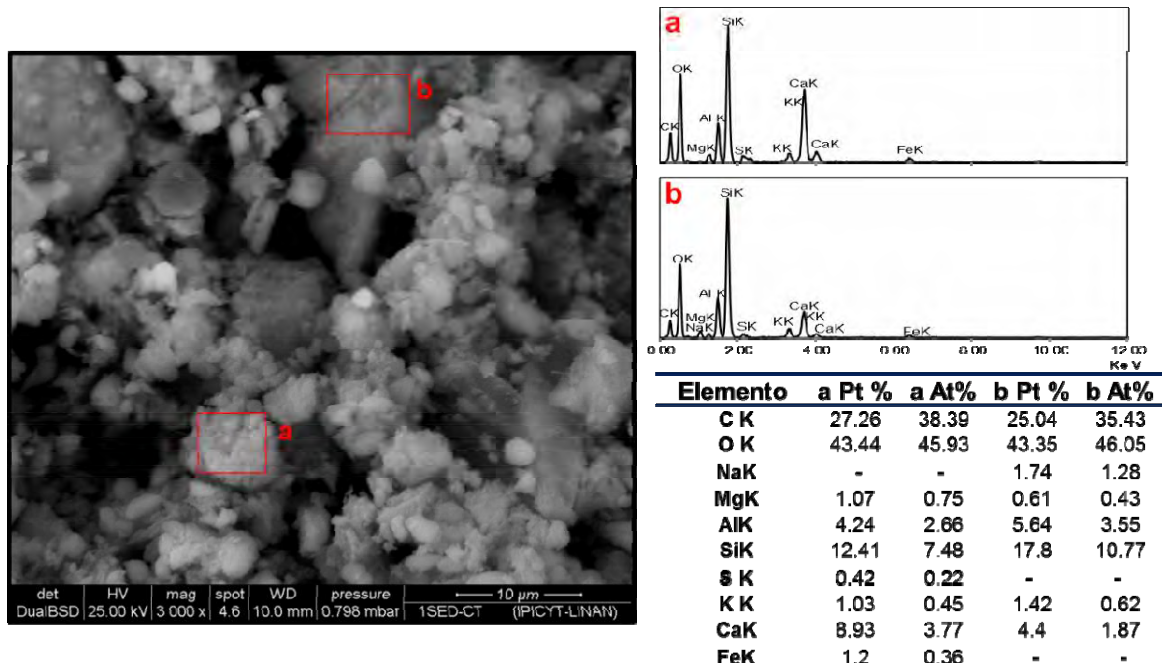


Figura 5.3 Micrografía electrónica de barrido y análisis EDS del sedimento Club de Tiro (CT).

Con el objetivo de respaldar la información anterior y considerando que el análisis EDS-MEB es cualitativo, los sedimentos de CB y CT se sometieron a digestión ácida (HNO_3/HCl 1:3) para realizar un análisis elemental por ICP-OES. En la Figura 5.4 se puede observar que el elemento más abundante, sin considerar el carbono y el oxígeno en ambos sedimentos fue calcio ($6,185.3 \pm 381.6$ y $6,759.0 \pm 154.5$ mg/kg de sedimento para CB y CT respectivamente), el segundo elemento en orden de abundancia en la muestra de sedimento CB fue azufre ($3,264.5 \pm 10.5$ mg/kg de sedimento), mientras que en CT fue el aluminio (4553.4 ± 302.7 mg/kg de sedimento) seguido de hierro ($2,610.1 \pm 140.9$ mg/kg de sedimento). El sedimento CT presenta silicio tanto en el análisis de difracción de rayos X como en el análisis EDS-MEB. De forma contradictoria, no se encontró silicio en el sedimento por el análisis ICP-OES. Sin embargo, sí se encontró en la columna de agua, en CB hubo una concentración de silicio de 116 mg/L y en CT de 188 mg/L; mientras que en el agua de poro en CB hubo 33.55 mg/L y en CT 17.72 mg/L, la presencia de silicio en la fase acuosa podría estar relacionada la disolución de silicatos amorfos.

Adicionalmente en la Figura 5.4 se puede verificar que en menor proporción (<700 mg/kg de sedimento) ambos sedimentos contienen arsénico, magnesio, sodio y manganeso. De tal forma que en estos sedimentos especies oxidadas de S, Fe, Mn y As podrían fungir como potenciales aceptores de electrones. El resto de los elementos que se cuantificaron (P, Pb, K, Cd, Cr, Cu, Zn, Li, Ag, Ni, Sn) presentaban concentraciones por debajo de los 100 mg/kg.

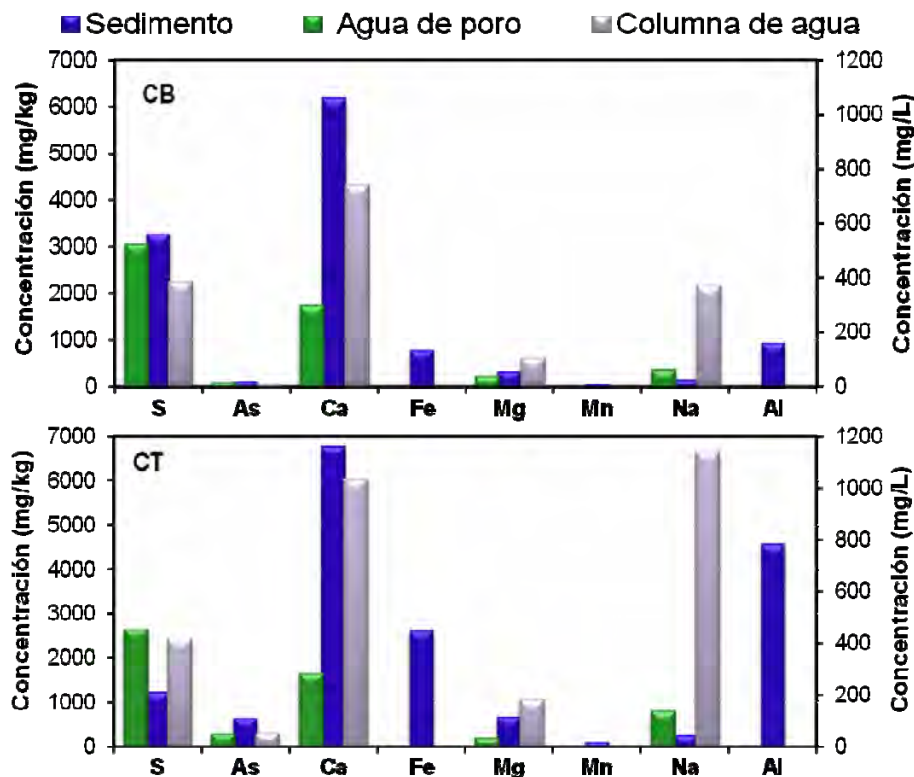


Figura 5.4. Análisis de la composición elemental de columna de agua, sedimentos y agua de poro por ICP-OES

En la Figura 5.4 también se puede observar la composición elemental determinada en la columna de agua y en el agua de poro o agua intersticial, la composición de esta última es importante ya que representa la fracción de elementos que eventualmente están más biodisponibles a los microorganismos, debido a que contiene los componentes que eventualmente se están disolviendo de la fase sólida (Burton *et al.*, 2013). Cabe destacar que la proporción de calcio y sodio fue considerablemente mayor en la columna de agua que en el agua de poro, por otro lado no se encontró hierro disuelto en la fase líquida lo que

coincide con reportes previos, los cuales destacan la pobre presencia de hierro en en los sitios de muestreo (Martínez-Villegas *et al.*, 2013).

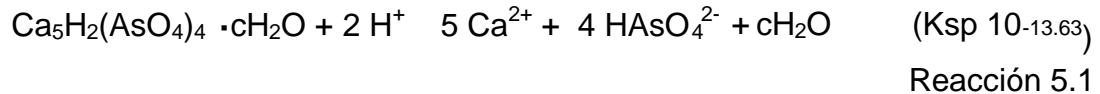
En la Tabla 5.1 se desglosan otros parámetros fisicoquímicos determinados en los sedimentos. Se puede constatar que la concentración de arsénico en el sedimento CB fue de 105.09 ± 5.45 mg/kg y en CT fue de 629.98 ± 30.10 mg/kg; en un estudio y muestreo del complejo hidráulico Cerrito Blanco, Razo y colaboradores (2004) reportan concentraciones de arsénico en sedimentos desde 410 hasta 1,432 mg/kg, el valor encontrado en la muestra de CB fue inferior, no obstante, puede haber fluctuaciones y cambios en la concentración dependiendo del punto específico y la temporada de muestreo. Por su parte Castillo y colaboradores (2015) determinaron concentraciones de arsénico en el sedimento Club de Tiro en un intervalo de 261 a 1753 mg/kg, la concentración determinada en este estudio está dentro de dicho intervalo.

Tabla 5.1 Parámetros fisicoquímicos ensayados en los sedimentos que se usaron como inóculo. Se muestran los valores promedio (^a n = 3 y ^b n=2) y la desviación estándar (\pm).

Parámetro	Cerrito Blanco	Club de Tiro
pH	8.5	8.4
Eh (mV)	-97.4	-81.4
Sólidos totales (ST %)	55.3 ± 0.77^a	44.7 ± 0.26^a
Sólidos volátiles (SV %)	12.4 ± 0.06^a	6.5 ± 0.05^a
Sólidos fijos (SF %)	42.9 ± 0.84^a	38.2 ± 0.22^a
Carbono total (mg/g)	12.25 ± 0.50^a	31.83 ± 3.67^a
Arsénico total (mg/kg)	105.09 ± 5.45^b	629.98 ± 30.11^b
Azufre (mg/kg)	3264.16 ± 10.51^b	1221.27 ± 166.33^b

En la Tabla 5.1 también se puede observar que ambos sedimentos son ligeramente alcalinos (pH 8.5 y 8.4), lo que era de esperarse ya que la geología del sitio consiste de minerales con capacidad neutralizante (p.ej. calcita). Se encontró una proporción alta de carbono total siendo mayor para el sedimento CT; en contraste el porcentaje de sólidos volátiles que representa la materia orgánica fue mayor para CB.

En la Tabla 5.2 se enlistan los parámetros determinados en la columna de agua y el agua de poro. En CB se encontró que la concentración de arsénico es mayor en el agua de poro, lo que podría significar la liberación de arsénico de la fase sólida por lo que se acumula en el agua de poro (Burton *et al.*, 2013). Lo anterior resulta factible ya que eventualmente podría ocurrir la disolución de minerales que contienen arsénico, por ejemplo los arseniatos de calcio. Martínez-Villegas y colaboradores (2013) realizaron un estudio del sistema hidráulico del cual forman parte los sitios de donde se obtuvieron los sedimentos CB y CT y concluyeron que el principal proceso que controla las concentraciones de arsénico en la columna de agua es la precipitación y disolución de arseniatos de calcio, de acuerdo a la siguiente reacción:



Por otro lado en como ya se mencionó dentro de las fases minerales que conforman el sedimento CB esta el yeso el cual es un mineral altamente soluble cuya disolución podría contribuir a las altas concentraciones de arsénico en el agua de poro a través de la disolución de arseniatos de calcio co-precipitados con el yeso (p. ej. Farmacolita) (Rodríguez-Blanco *et al.*, 2007). En el sedimento CT no se observó el mismo efecto pues hay una concentración similar de arsénico tanto en la columna de agua y el agua de poro (~48 mg/L), en CT se identificó calcita con la cual puede estar asociado el arsénico en la fase sólida, y la calcita tiene una menor solubilidad en comparación con el yeso (Romero *et al.*, 2004; Alexandratos *et al.*, 2007).

En ambos sedimentos se encontró una mayor proporción de carbono orgánico total (COT) en el agua de poro. La mayor presencia de COT en el sedimento y agua de poro se puede deber al metabolismo microbiano en el sedimento, principalmente la descomposición de materia orgánica y biomasa (Castelle *et al.*, 2013).

Tabla 5.2 Parámetros fisicoquímicos del agua de poro de los sedimentos y de la columna de agua. Se muestran los valores promedio ($n=2$) y la desviación estándar (\pm). Únicamente la alcalinidad se determinó *in situ*.

Parámetro	Cerrito Blanco		Club de Tiro	
	Columna de agua	Agua de poro	Columna de agua	Agua de poro
pH	8.2	8.2	7.8	7.7
Eh (mV)	-78.4	-80.3	-57.2	-46.8
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	180	-	312	-
ST (mg/L)	2495 \pm 42.4	-	3048.5 \pm 19.09	-
SVT (mg/L)	424 \pm 93.3	-	624 \pm 50.9	-
SFT (mg/L)	286 \pm 156.9	-	2424.5 \pm 31.8	-
COT (mg/L)	2.2 \pm 0.33	16.7 \pm 1.2	4.11 \pm 1.62	18.59 \pm 2.8
Cl (mg/L)	0.99 \pm 0.50	2.7 \pm 0.03	1.5 \pm 0.69	2.0 \pm 0.30
CT (mg/L)	3.2 \pm 0.81	19.3 \pm 1.0	5.6 \pm 0.30	20.6 \pm 3.2
Sulfato disuelto (mg/L)	1594.7 \pm 18.4	1409.0 \pm 76.1	1718.4 \pm 13.3	1215.7 \pm 77.9
Arsénico total (mg/L)	5.0	13.1 \pm 2.2	48.3	47.8 \pm 0.85

Pelallo-Martínez (2006) caracterizó los sitios Cerrito Blanco y Club de Tiro y encontró para CB una concentración de arsénico en agua de poro en un intervalo de 1.5 a 5.2 mg/L y en la columna de agua de 3.3 a 4.3 mg/L; para CT la concentración de arsénico en el agua de poro fue de 21.3 a 60.2 mg/L y en la columna de agua de 25 a 122.9 mg/L. Las concentraciones determinadas en el presente estudio fueron ligeramente mayores para CB, en lo que concierne a CT las concentraciones estuvieron dentro del intervalo reportado por los autores.

Los distintos sistemas geológicos contaminados con arsénico presentan características bastante heterogéneas por lo que no es posible compararlos entre sí. En estudios previos, se han reportado las características fisicoquímicas de sedimentos contaminados con arsénico. Por mencionar un ejemplo, Drahot a y colaboradores (2009) realizaron un estudio en una zona minera en República Checa, tanto de la columna de agua, sedimento y agua de poro, las concentraciones de arsénico fueron 32 a 449 mg/L (pH 8.2 y 7.7), 58 a 1193 mg/kg (pH 8.4 y 6.9) y 49 a 300 mg/L (pH 7.3 y 8.4), respectivamente; también determinaron concentraciones de sulfato en la columna de agua que fueron de 87.7 a 141.9 mg/L (pH 7.6 y 7.7) y en agua de poro de 49.8 a 127.2 mg/L (pH 6.9 y 7.1). Podemos apreciar que el intervalo de concentraciones de arsénico en los sitios

afectados varía ampliamente. De lo anterior se destaca la importancia de considerar las características fisicoquímicas de los sitios cuando se realizan estudios relacionados con procesos microbianos.

5.2 Evaluación de la capacidad sulfato-reductora de la biota microbiana nativa presente en los sedimentos

Para corroborar la existencia de bacterias sulfato-reductoras en los sedimentos estudiados y además comprender los aspectos que limitaban este proceso se realizaron ensayos en microcosmos donde se cuantificó la producción de sulfuro, consumo de sulfato, consumo de lactato, producción de acetato y pH. En la Figura 5.5 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos donde se usó sedimento CB como inóculo. En el panel a, destaca en primer lugar que se obtuvo mayor producción de sulfuro cuando se adicionó una fuente de carbono externa (lactato ~10 mM), como era de esperarse. Además, se corroboró que había una fuente de carbono endógena o propia del sitio ya que la producción de sulfuro no se interrumpió cuando no se adicionó lactato (se produjeron 12.2 mM de H₂S). Por otra parte, la adición de sulfato no limitó el desempeño del proceso biológico de producción de sulfuro, ya que cuando éste se adicionó (ensayo con SO₄²⁻) dicho proceso no se estimuló, comparando con el control endógeno (sin adición de lactato y sin sulfato). Considerando la estequiometría de la reacción de sulfato-reducción (reacción 2.4), sabemos que se produce 1 mol de sulfuro a partir de un mol de sulfato consumido, en estos experimentos no se observó dicha estequiometría, ya que en el tratamiento suplementado únicamente con lactato (10 mM) donde la concentración inicial de sulfato fue de 13.4 mM, se esperaba una producción equivalente de sulfuro, sin embargo esto no se observó, ya que se produjeron 21.8 mM de sulfuro y solo se registró el consumo de 7 mM de sulfato (Figs. 5.5a y b). En el caso del ensayo con lactato y sulfato 10 mM se produjeron 20.1 mM de sulfuro y solo se verificó el consumo 15 mM de sulfato. Lo anterior se podría explicar por la posible liberación de sulfato del sedimento hacia la fase acuosa, esto debido a que el sedimento CB presentó una alta concentración de azufre (3,264.16 ±10.5 mg/kg), además, la mineralogía de este sedimento consta

de yeso como uno de los principales componentes cuya disolución es factible ya que tiene una alta solubilidad (2,600 mg/L en agua a 25 °C), e incluso en sedimentos se ha encontrado que la producción de sulfuro a partir de yeso es comparable con la producción por sales disueltas de sulfato (p. ej. Na_2SO_4); desde luego se supone que la disolución de la fase sólida ocurre previo a la reacción de sulfato-reducción, este proceso incluso se podría acelerar por la producción de sustancias poliméricas extracelulares por los microorganismos (Kijjanapanich *et al.*, 2014).

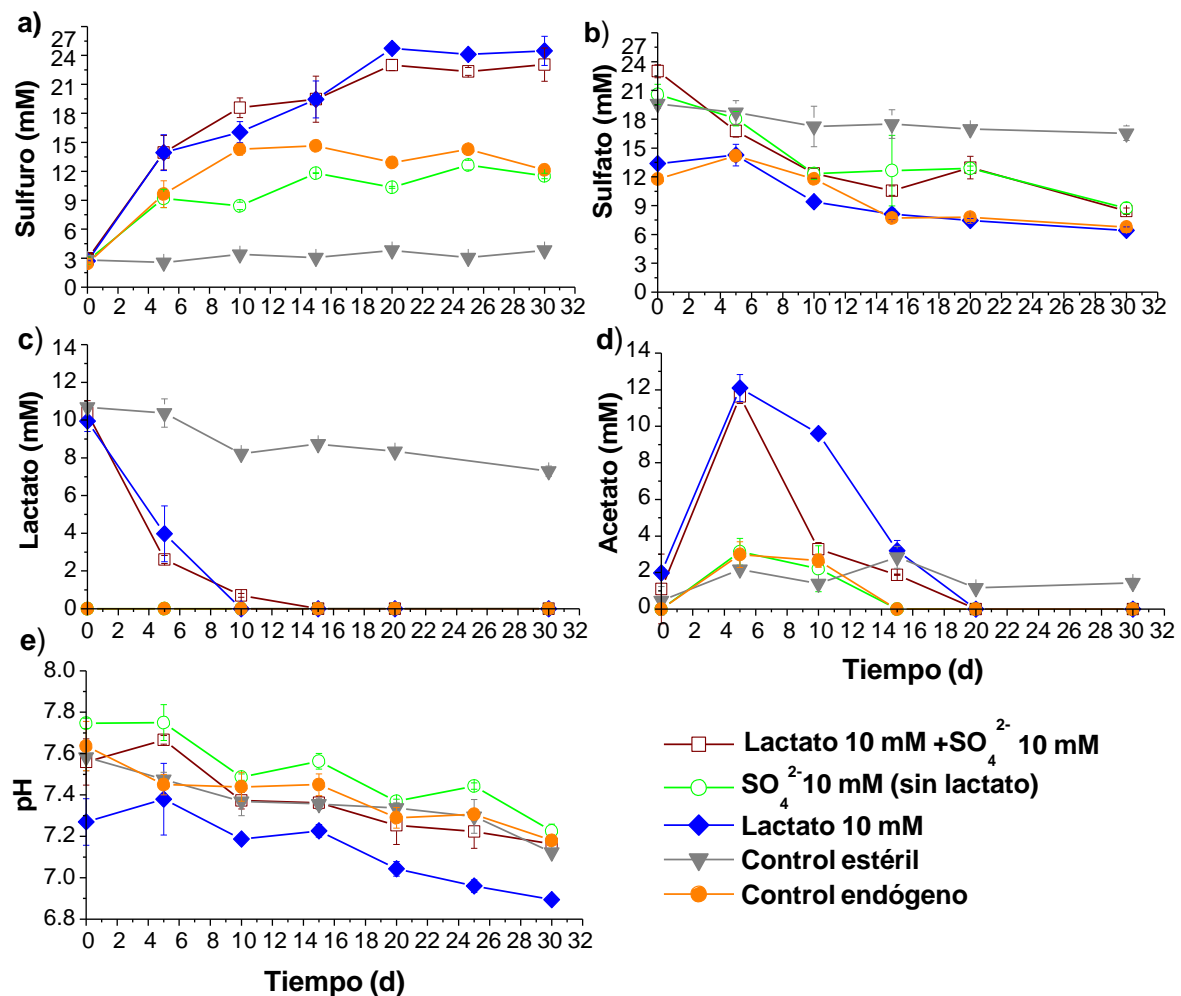


Figura 5.5. Perfiles de **a)** Producción de sulfuro, **b)** Consumo de sulfato, **c)** Consumo de lactato, **d)** Producción de acetato y **e)** pH, obtenidos en los ensayos en lote para evaluar la actividad sulfato-reductora utilizando como inóculo sedimento CB, la leyenda inferior muestra los reactantes suplementados en cada caso.

A partir de la oxidación total de un mol de lactato (12 equivalentes reductores) se pueden obtener 1.5 moles de sulfuro (sulfato S^{6+} a sulfuro S^{2-}), es decir, con el consumo de 10 mM de lactato (Fig. 5.5c) podríamos tener como máximo 15 mM de sulfuro. Sin embargo, por actividad endógena (control endógeno) se obtuvo en promedio una concentración de 12 mM de H_2S , entonces es factible la obtención de concentraciones de sulfuro mayores a 20 mM cuando se adiciona un sustrato externo, que es lo que se observó en los ensayos a los que se les adicionó lactato (Fig. 5.5a). Aunque no se debe perder de vista que gran parte de las bacterias sulfato-reductoras efectúan la oxidación incompleta de lactato dando como resultado la producción de acetato, lo cual disminuye la producción de sulfuro. En la Figura 5.5d, en los ensayos con lactato, se puede apreciar un aumento en la concentración de acetato alrededor de 10 mM (día 5), el acetato posteriormente disminuye hasta su consumo total, lo que apunta a la existencia de bacterias oxidadoras de acetato. Cabe mencionar que múltiples especies de bacterias sulfato-reductoras son metabólicamente incapaces de utilizar el acetato, debido a que la reacción es poco favorable energéticamente, este es el caso de la mayoría de las especies de *Desulfobacterium* (Liamleam & Annachhatre, 2007).

Nótese que en todos los ensayos el pH disminuyó paulatinamente (Fig. 5.5e), aun cuando la reacción de sulfato-reducción produce alcalinidad (HCO_3^-). Como ya se discutió en el sedimento CB hay disolución de yeso y la disolución de este mineral puede causar la disminución del pH debido a que el Ca^{2+} liberado a la fase acuosa reacciona con el bicarbonato (HCO_3^-) y precipita como $CaCO_3$, liberando protones que disminuyen el pH ($Ca^{2+} + HCO_3^- \rightarrow CaCO_3 + H^+$) (Kijjanapanich *et al.*, 2013).

A continuación se presentan los resultados de los ensayos inoculados con sedimento CT. La Figura 5.6a demuestra que de forma contraria a los ensayos con sedimento CB, los ensayos con sedimento CT no presentaron actividad sulfato-reductora endógena y fue necesaria la adición de una fuente de carbono para estimular la sulfato-reducción, aun cuando en este sedimento se encontró una mayor proporción de carbono total (31.83 mg/g) posiblemente dicho carbono

no se encuentra como una forma accesible a los microorganismos, ya que podría estar en forma de sustancias húmicas que resultan complejas para biodegradarse (Anawar *et al.*, 2013). Por otro lado, considerando la alta concentración de arsénico en CT los procesos microbianos de degradación de materia orgánica compleja podrían estar inhibidos (Jackson *et al.*, 2014), limitando con ello la disponibilidad de sustratos simples para la comunidad sulfato-reductora (Liamleam & Annachatre, 2007). Adicionalmente es posible que el sulfato no esté en forma accesible para los microorganismos.

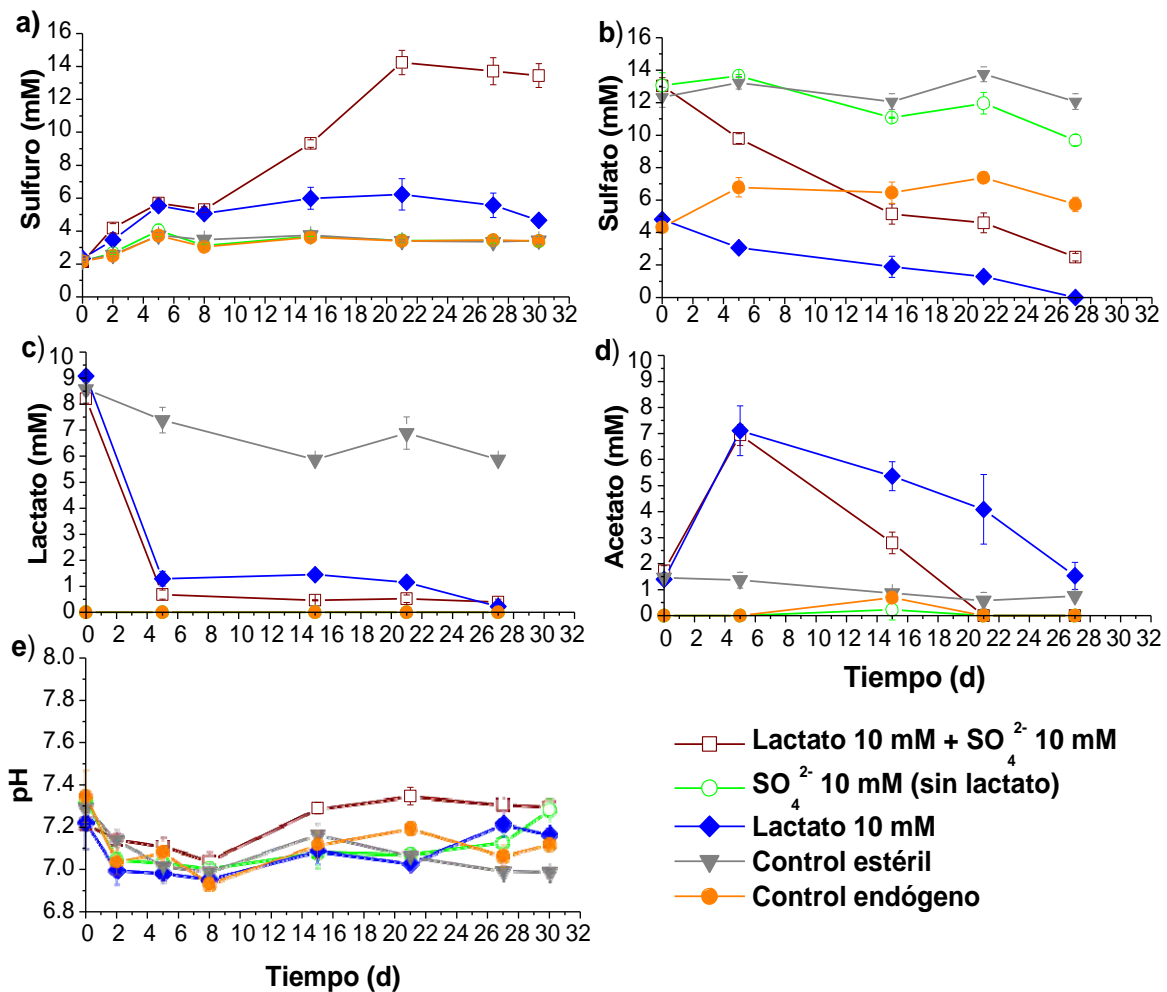


Figura 5.6. Perfiles de **a)** Producción de sulfuro, **b)** Consumo de sulfato, **c)** Consumo de lactato, **d)** Producción de acetato y **e)** pH, obtenidos en los ensayos en lote para evaluar la actividad sulfato-reductora utilizando como inóculo sedimento CT, la leyenda muestra los reactantes suplementados en cada caso.

En el ensayo suplementado sólo con lactato, sin adición de sulfato (Fig. 5.6a) se puede apreciar que se alcanzó una producción de sulfuro de 5.2 mM en el día 5 con el aceptor de electrones endógeno, a diferencia de los ensayos en donde se adicionó lactato y sulfato 10 mM que alcanzaron concentraciones de sulfuro disuelto de hasta 14.2 mM a partir del día 20, en ambos casos la producción de sulfuro fue aproximadamente equivalente al consumo de sulfato (Fig. 5.6b), sin tomar en cuenta la concentración inicial de sulfuro que en promedio fue de 2.1 mM. La eficiencia de remoción de sulfato disuelto medido al inicio del experimento fue en promedio 82% para el ensayo con lactato y sulfato y de 100% para el ensayo sólo con lactato. Entonces se puede decir que en el caso de los ensayos inoculados con sedimentos CT la adición de sulfato resultó necesaria para la comunidad sulfato-reductora. La poca disponibilidad de sulfato en el sedimento CT se justifica si tomamos en cuenta que la concentración de azufre (1221.3 ± 166.33 mg/kg) es ~3 veces menor que la concentración registrada en el sedimento CB, lo que es consistente, ya que en CT no se encontró yeso dentro de las fases minerales identificadas. No obstante, el yeso podría estar presente pero en mucha menor proporción respecto a la calcita y el cuarzo que fueron las fases identificadas en el sedimento CT. De igual manera que en CB en los ensayos que mostraron actividad sulfato-reductora se registró el consumo total de lactato y consumo del acetato producido (Figs. 5.6 c y d).

De lo observado en las Figuras 5.5 y 5.6 se puede concluir que el sedimento CB tiene actividad sulfato-reductora endógena al tener una fuente de carbono intrínseca biodisponible y abundante sulfato. En contraste, el sedimento CT no presenta actividad endógena y requiere de la adición tanto del donador como de aceptor de electrones para que la comunidad microbiana lleve a cabo el proceso de sulfato-reducción. Reportes previos destacan la notable diferencia entre la concentración de arsénico determinada en el sitio Cerrito Blanco respecto al sitio Club de Tiro, ya que la concentración de arsénico en la columna de agua del sitio Club de Tiro es en promedio ~7 veces mayor que en el sitio Cerrito Blanco, aun cuando forman parte del mismo sistema hidráulico (Martínez-Villegas *et al.*, 2013), tal diferencia podría estar asociada a la actividad microbiana. Por

ejemplo, cuando las bacterias sulfato-reductoras están activas el sulfuro producido puede precipitar con arsénico limitando la solubilidad de éste, y cuando dominan procesos como la metanogénesis el arsénico se acumula en la solución (Kirk *et al.*, 2004).

Adicionalmente a estos resultados también se puede destacar el hecho de que en los ensayos con sedimento CB, donde hay una concentración de arsénico de 105.09 ± 5.45 mg/kg de sedimento, se observó una mayor actividad sulfato-reductora que en los ensayos con sedimento CT, que tiene una concentración de arsénico de 629.98 ± 30.11 mg/kg. Esto apunta a que posiblemente las bacterias sulfato-reductoras del sedimento CT podrían estar inhibidas por las altas concentraciones de arsénico.

5.3 Ensayos en lote para evaluar la actividad reductora de sulfato en presencia de As(V)

Este grupo de experimentos tuvo como objetivo examinar el efecto de la disponibilidad de As(V) como aceptor de electrones sobre el proceso de sulfato-reducción (ensayos Tabla 4.2). En la Figura 5.7 se muestran los resultados para el sedimento CB y en la Figura 5.8 para sedimento CT.

En la Figura 5.7a, se puede confirmar que en los ensayos inoculados con CB hubo producción de sulfuro apreciable únicamente cuando se adicionó lactato y sulfato o en su defecto solo sulfato. Cuando se añadió As(V) no se detectó sulfato-reducción. Sin embargo, podemos apreciar que en el ensayo con lactato, As(V) y SO_4^{2-} también hubo consumo de lactato (Fig. 5.7c y d). Es más favorable la reducción de As(V) (Eh de As(V)/As(III)= +135 mV) que la reducción de sulfato (Eh de $\text{SO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{S}$ = -222 mV), en presencia de ambos aceptores se efectuaría primero la reducción de As(V) (Niggemyer *et al.*, 2001; Oremland & Stolz, 2003). En el metabolismo sulfato-reductor por la oxidación incompleta de un mol de lactato se produce un mol de acetato (reacción 2.4), esto también ocurre cuando las bacterias sulfato-reductoras utilizan As(V) como aceptor final de electrones (reacción 2.2) (Newman *et al.*, 1997a). En la Figura 5.7c y d podemos corroborar que hay consumo de lactato y producción de acetato en los tratamientos que contienen lactato y sulfato o bien lactato, sulfato y arseniato. En la Figura 5.7d se

registró el consumo total de acetato producido en el ensayo con lactato y SO_4^{2-} a diferencia del ensayo con lactato, SO_4^{2-} y As(V) que presentó acetato residual al final del experimento (día 30), en este mismo ensayo se observó un retraso en la producción inicial de acetato respecto al consumo de lactato (día 5, Figs. 5.7c y d). Fue hasta después del día 5, cuando ya se había consumido 7.4 mM de lactato, que se verificó un incremento en la concentración de acetato. Una posible explicación sería que el acetato haya sido consumido por otros microorganismos conforme se producía. Además nótese que en el ensayo con lactato y SO_4^{2-} a partir del día 15 se empieza a consumir el acetato (Fig. 5.7d). Sin embargo, no se observó un incremento en la producción de sulfuro (Fig. 5.7a), este hecho apunta a que el acetato no fue consumido por bacterias sulfato-reductoras.

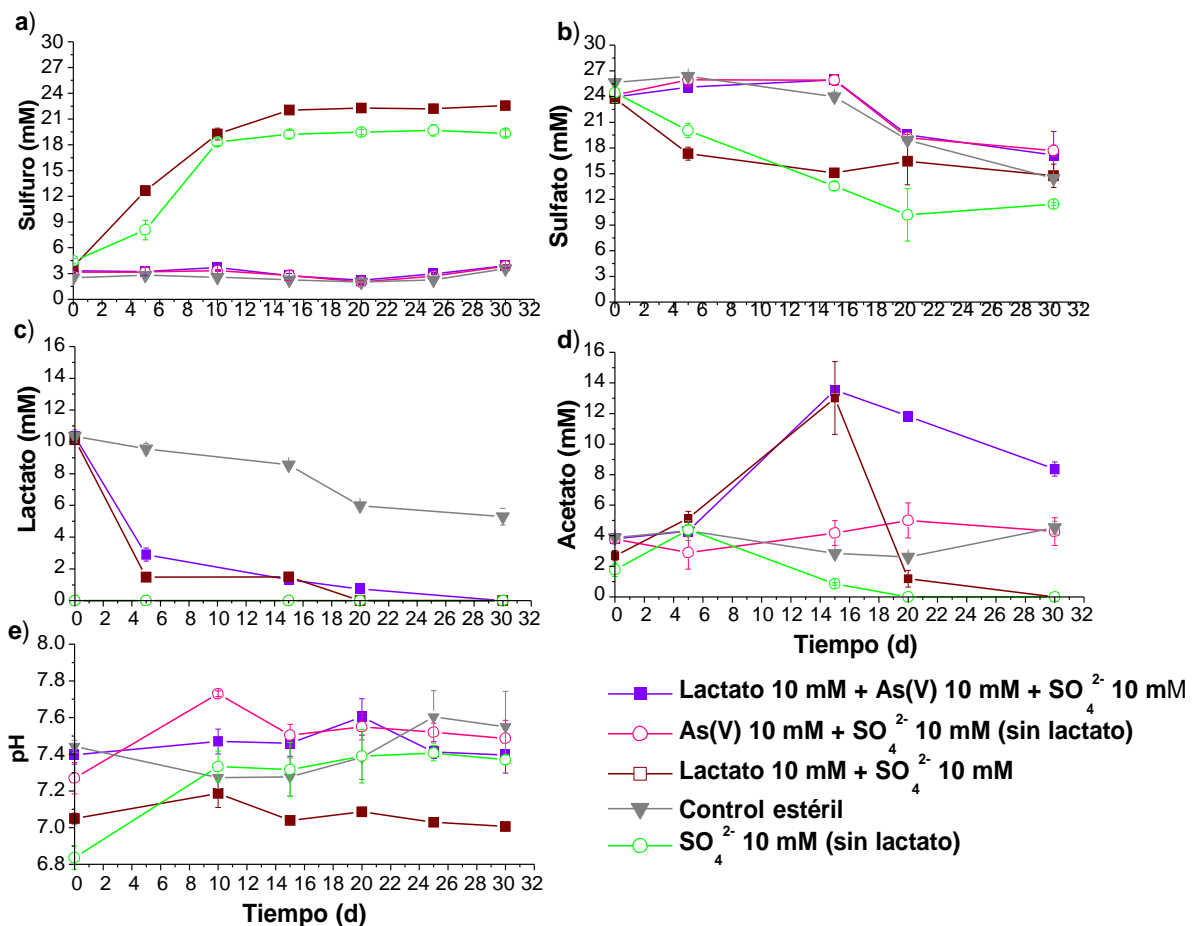


Figura 5.7. Perfiles de **a)** Producción de sulfuro, **b)** Consumo de sulfato, **c)** Consumo de lactato, **d)** Producción de acetato y **e)** pH, obtenidos en los ensayos en lote para evaluar la actividad sulfato-reductora en presencia de As(V) utilizando como inóculo sedimento CB, la leyenda muestra los reactantes suplementados en cada caso.

A continuación en la Figura 5.8 se ilustran los resultados para CT, en los paneles *a* y *b* de esta Figura, se puede verificar que en el ensayo con lactato y sulfato se produjeron aproximadamente 11.8 mM de sulfuro y a su vez se consumieron 12.6 mM de sulfato lo que cumple de forma cercana con la estequiometría de la reacción de sulfato-reducción, nótese que en este mismo ensayo para el día 5 se consumieron 9 mM de lactato y se alcanzó la máxima producción de acetato (7.8 mM) (Figs. 5.8c y d). El consumo total de lactato fue de 10.6 mM que no corresponde exactamente con la producción de acetato esto se puede deber a que ~3 mM de lactato se utilizaron en la síntesis celular (Macy *et al.*, 2000) además, en este ensayo se registró consumo de acetato.

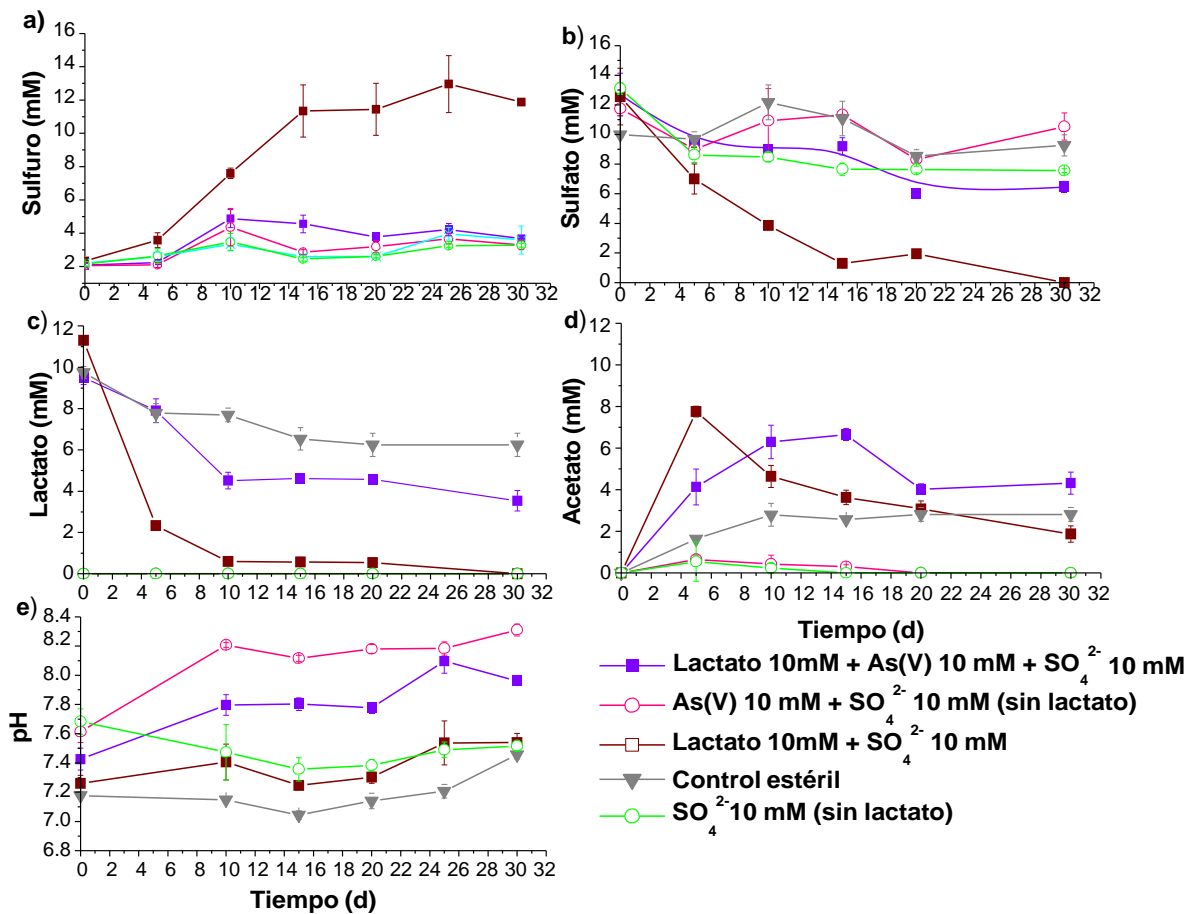


Figura 5.8. Perfiles de **a)** Producción de sulfuro, **b)** Consumo de sulfato, **c)** Consumo de lactato, **d)** Producción de acetato y **e)** pH, obtenidos en los ensayos en lote para evaluar la actividad sulfato-reductora en presencia de As(V) utilizando como inóculo sedimento CT, la leyenda muestra los reactantes suplementados en cada caso.

De igual forma que en los ensayos con CB, en el ensayo CT con lactato, sulfato y As(V) no hubo una producción de sulfuro significativa, no obstante, se observó actividad microbiana lo cual se sustenta con el consumo de lactato y la producción de acetato (Figs. 5.8c y d), solamente se consumieron 6 mM de lactato y también se produjeron alrededor de 6 mM de acetato. En la Figura 5.8b se puede corroborar además que para el ensayo con lactato, sulfato y As(V) hubo una remoción de 49% de la concentración inicial de sulfato lo que posiblemente significa que éste también se utilizó como aceptor de electrones y tuvieron lugar tanto el proceso de arseniato-reducción como el proceso de sulfato-reducción. Sin embargo, en este set de experimentos no se cuantificó la reducción de arsénico.

Con base en otros trabajos (Liu *et al.*, 2004; Saalfield and Bostick, 2009), para los ensayos anteriores se planteó una concentración de 10 mM de lactato, 10 mM de sulfato y 10 mM de arseniato, pensando en proveer una cantidad limitada de electrones. Si se parte de que teóricamente por la oxidación de 1 mol de lactato se obtiene un total de 12 equivalentes reductores, con 10 mM de lactato se tendrían 120 miliequivalentes reductores (meqv e⁻), por su parte la producción de un mol de acetato requiere 8 equivalentes reductores entonces, cuando la oxidación incompleta del lactato produce una concentración de 10 mM de acetato se consumen 80 meqv e⁻ (10 mM x 8 meqv e⁻). Para la reducción de 10 mM de As(V) a As(III) (As⁵⁺ a As³⁺) se requieren 20 meqv e⁻ (10 mM x 2 meqv e⁻). Finalmente solo quedan disponibles 20 meqv e⁻ para la reducción de SO₄²⁻ a H₂S (S⁶⁺ a S²⁻), por lo que únicamente se podría reducir una concentración aproximada de 2.5 mM de SO₄²⁻ (2.5 mM x 8 meqv e⁻) lo que redundaría en la producción de 2.5 mM de sulfuro (Rittmann & McCarty, 2001). En conclusión el número de equivalentes reductores obtenidos de la oxidación de 10 mM de lactato no es suficiente para efectuar la reducción de 10 mM de As V y de 10 mM de SO₄²⁻, lo que explicaría que no se observó una producción significativa de sulfuro en los microcosmos con ambos aceptores. Sin embargo en el ensayo con CT quedo un remanente de lactato al final del experimento.

Por último cabe mencionar que en los controles estériles tanto con sedimento CB como CT se registró un consumo de lactato y producción de

acetato, a este respecto se puede decir que en dichos experimentos solo se realizó un ciclo de esterilización en autoclave y no se contempló la posibilidad de que los sedimentos sirven como barrera de protección para los microorganismos lo que les permite sobrevivir al proceso de esterilización por autoclave (20 min, 121 °C y 103 kPa). Además también podrían existir bacterias formadoras de esporas en los sedimentos (Castelle *et al.*, 2013; Aullo *et al.*, 2013). Cuando se trabaja con sedimentos se recomiendan dos o más ciclos de esterilización (O'Sullivan *et al.*, 2015).

Al finalizar los experimentos descritos anteriormente se determinó el potencial redox de los cultivos, encontrando potenciales negativos en casi todos los casos, excepto para los tratamientos con SO_4^{2-} y As(V) sin adición de lactato con ambos sedimentos (Tabla 5.3). Posiblemente esto se relacione con la menor actividad microbiana, ya que el control estéril inoculado con CT también presenta un potencia redox positivo. Es importante señalar que en el control estéril inoculado con sedimento CB se obtuvo un potencial negativo, lo cual se puede atribuir a que el sedimento CB tiene actividad sulfato-reductora endógena y el sulfuro inicial (presente en el sedimento) pudo actuar como agente reductor. En la Tabla 5.3 se puede notar que en los ensayos con sedimento CB se obtuvieron potenciales menores, lo que concuerda con que también en CB se alcanzaron mayores producciones de sulfuro y a diferencia de lo observado en CT, el ensayo sin lactato (con sulfato) produjo sulfuro.

Tabla 5.3 Potenciales redox de los ensayos en lote determinados al final de los experimentos (30 días de incubación) para en sayos inoculados con CB y CT (sección 5.3).

Ensayos	Eh (mV)	
	CB	CT
Lactato 10 mM + As(V) 10 mM + SO_4^{2-} 10 mM	-258.9	-57.3
Lactato 10 mM + SO_4^{2-} 10 mM	-196.6	-164.3
As(V) 10 mM + SO_4^{2-} 10 mM	48.8	60.5
SO_4^{2-} 10 mM	-232.4	-42.7
Control estéril	-89.9	64.4

Se ha reportado que los potenciales negativos se atribuyen a procesos de reducción, por ejemplo la reducción de sulfato ocurre a valores de Eh de -200 mV (pH 7, 25°C) y la reducción de arseniato a valores de Eh menores a 60 mV (Hoeft *et al.*, 2004; Sánchez-Andrea *et al.*, 2014; Gorny *et al.*, 2015).

5.3.1 Remoción de arsénico disuelto

Al evaluar la actividad sulfato-reductora en presencia de arsénico (sección 5.3), se encontró que los tratamientos con lactato, As(V) y SO_4^{2-} inoculados ya fuera con sedimento CB o CT (ensayos bióticos) desarrollaron un precipitado amarillo. Se tomó muestra tanto del precipitado como de la fase líquida después de 15 días de incubación para los ensayos con sedimento CB y después de 30 días para los ensayos que contenían sedimento CT. También se tomó muestra de los controles estériles (ensayos abióticos) correspondientes a este grupo de ensayos (Tabla 4.2), estos tenían los mismos reactantes que los ensayos bióticos, en este caso solo se muestreó la fase líquida ya que no presentaban formación de precipitados. Se encontró que en los ensayos bióticos la concentración de arsénico total disuelto disminuyó comparada con la concentración al inicio de experimento (~10 mM) (Fig. 5.9), la remoción fue de 64% para CB y de 65% para CT (Figs 5.9 a y c), en cambio para los controles estériles fue de 12% y 15% respectivamente, (Figs. 5.9b y d). La remoción de arsénico en los controles estériles se podría explicar debido a que pueden existir procesos de precipitación en el sedimento, y en sedimentos que contienen concentraciones elevadas de calcio, como es el caso (>6000 mg/kg), se puede remover una porción de As(V) de la solución debido a la precipitación de arseniatos de calcio o inclusive el As(V) podría co-precipitar con el yeso (Rodríguez-Blanco *et al.*, 2007; Martínez-Villegas *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015).

En la Figura 5.9 también se puede observar que en los ensayos bióticos hubo consumo de lactato y producción de acetato, lo cual como ya se mencionó es una característica del metabolismo microbiano durante la oxidación incompleta de lactato y la reducción de sulfato o arseniato (Niggemyer *et al.*, 2001; Sánchez-Andrea *et al.*, 2014). Es importante precisar que en los controles estériles del

experimento discutido se registró consumo de sustrato, después de 30 días de incubación se consumió 49% de lactato con sedimento CB y 36% con sedimento CT respecto a la concentración inicial, lo que explica la producción de acetato (Fig. 5.9d).

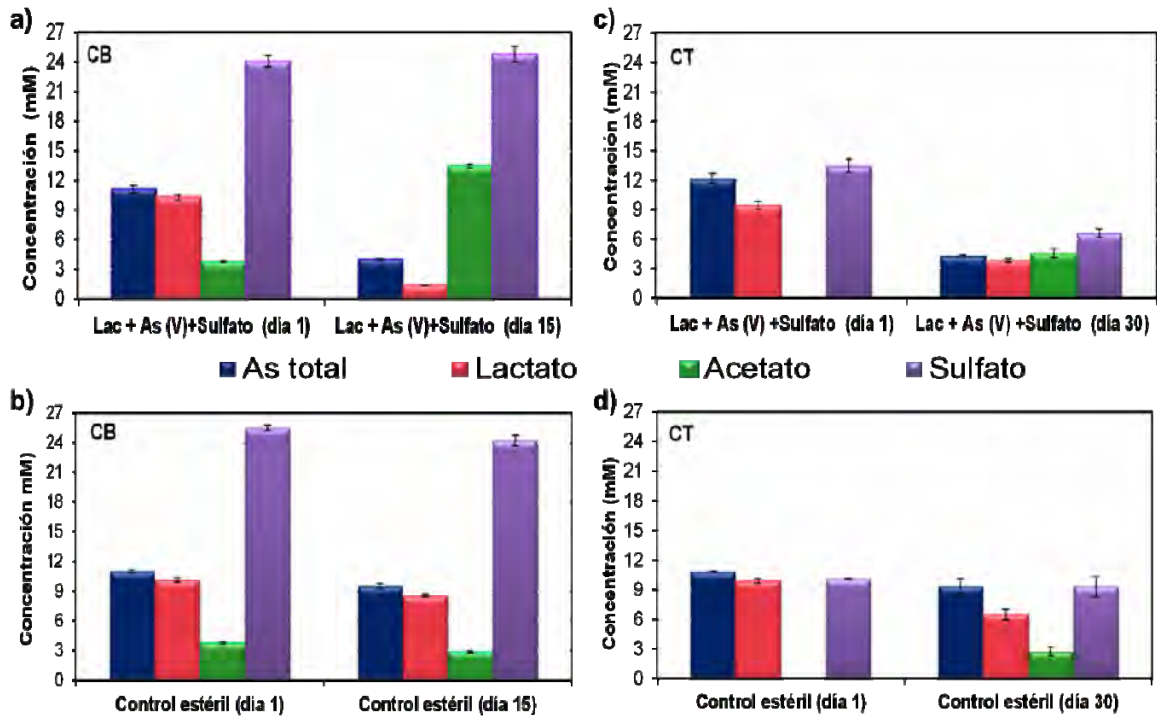


Figura 5.9 Concentración de arsénico, sulfato, lactato y acetato en los ensayos bióticos (a y c) comparados con los ensayos esterilizados (b y d) con los sedimentos de CB y CT. Muestras tomadas al día 1 y 15 de incubación para CB y al día 1 y 30 para CT.

5.4 Velocidades de reducción de sulfato

En la Tabla 5.4 se muestra un resumen de las velocidades de reducción de sulfato obtenidas a partir de los experimentos en lote para evaluar la capacidad sulfato-reductora de los sedimentos. Se comparan las velocidades obtenidas en el primer set de experimentos para evaluar la actividad sulfato-reductora de los sedimentos (sección 5.2) y en el segundo set que fue en presencia de arsénico (sección 5.3). La velocidad de reducción de sulfato o sulfuro se obtuvo de la pendiente máxima de la gráfica de concentración de SO_4^{2-} o de H_2S contra el tiempo.

Tabla 5.4 Velocidades máximas de reducción de sulfato de ensayos en lote con muestras de sedimento de Cerrito Blanco y Club de Tiro.

Ensayos	CB		CT	
	*Velocidad de reducción de SO ₄ ²⁻ (mmol/L-h)		Velocidad de reducción de SO ₄ ²⁻ (mmol/L-h)	
	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2
Lactato 10 mM + SO ₄ ²⁻ 10 mM	0.09	0.07	0.03	0.04
SO ₄ ²⁻ 10 mM	0.05	0.03	N.D.	N.D.
Lactato 10 mM	0.09	ENR	0.01	ENR
Control endógeno	0.06	ENR	N.D.	ENR

ENR: ensayo no realizado, N.D.: no se detectó reducción de sulfato

* calculada a partir de la producción de sulfuro

Para los experimentos con sedimento CB, las velocidades de reducción de sulfato se calcularon a partir de las velocidades de producción de sulfuro debido a que, como se mencionó anteriormente, en los ensayos inoculados con CB, hay liberación de sulfato del sedimento al medio de reacción, lo que hace difícil estimar una tasa de reducción de sulfato correctamente. En el caso de los experimentos con sedimento CT fue necesario el cálculo de las velocidades de reducción de sulfato, ya que en este sedimento ocurre una rápida precipitación de sulfuro (precipitado negro), debido a que presenta una concentración de hierro (2610.12 ± 140.9 mg/kg). De la estequiometría de la reacción de sulfato-reducción (Reacción 2.4) se sabe que para la producción de un mol de sulfuro se debe consumir un mol de sulfato, por lo que las velocidades de reducción de sulfato son equivalentes a las velocidades de producción de sulfuro reportadas en mmol/L-h.

A partir de los datos mostrados en la Tabla 5.4, se observa que en los experimentos inoculados con CB en ausencia de arsénico (set 1), se obtuvo la misma velocidad de reducción de sulfato en el ensayo con lactato cuando se adicionó sulfato y cuando no se adicionó, dicha velocidad fue 0.09 mmol SO₄²⁻ /L-h. En contraste, los ensayos con sedimento CT sí mostraron diferencia, la velocidad de reducción de sulfato en el ensayo con lactato fue de 0.01 mmol de SO₄²⁻ /L-h y en el ensayo con lactato y sulfato fue de 0.03 mmol de SO₄²⁻ /L-h. Estos resultados respaldan que en los ensayos con sedimento CB no fue necesaria la adición

externa de sulfato para observar el proceso de sulfato-reducción, ya que el sedimento contiene yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

Hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer reporte que documenta la actividad biológica sulfato-reductora de sedimentos de los sitios Cerrito Blanco y Club de Tiro. La importancia de dicha actividad biológica radica en que muchas bacterias sulfato-reductoras tienen la capacidad de usar As(V) como aceptor final de electrones (Macy *et al.*, 2000). Como ha sido reportado en los ambientes contaminados con arsénico que son pobres en hierro es importante considerar la actividad sulfato-reductora, aunado a esto se sabe relativamente poco del impacto de las transformaciones microbianas en la movilización de arsénico en sistemas dominados por sulfato (Burton *et al.*, 2013b; Rodriguez-Freire *et al.*, 2014).

En otros sitios contaminados con arsénico se han reportado velocidades de reducción de sulfato utilizando como inóculo sedimentos, por ejemplo en un estudio con columnas inoculadas con sedimentos del lago hipersalino Mono en California, que presenta una concentración de arsénico en la columna de agua de 0.2 mM, se determinó una velocidad máxima de 0.06 mmol de SO_4^{2-} /L·h en el control endógeno y de 0.18 mmol de SO_4^{2-} /L·h cuando se adicionó lactato y sulfato 10 mM (Stam *et al.*, 2010). La velocidad de sulfato-reducción endógena reportada por dichos autores fue igual a la determinada en los ensayos con sedimento CB, que presenta una concentración de arsénico en la columna de agua de 0.06 mM; en CT no se detectó actividad sulfato-reductora en dicho control, CT presentó una concentración de arsénico de 0.6 mM. La velocidad de sulfato-reducción cuando se adicionó lactato y sulfato 10 mM resultó ser mayor que las velocidades determinadas con los sedimentos CB y CT.

5.5 Procesos biológicos de sulfato/arseniato-reducción

5.5.1 Cinéticas de especiación de arsénico con sedimento Cerrito Blanco

A continuación se muestran los resultados de los ensayos en lote para evaluar la interacción entre los procesos de sulfato-reducción y arseniato-reducción, para corroborar que efectivamente el As(V) se usaba como aceptor terminal de electrones se dio seguimiento al arsénico total y a las especies de As(III) y As(V) como se indicó en la sección 4.3.4.

En la Figura 5.10 se exponen los resultados obtenidos para CB. Nótese que se registró producción de sulfuro únicamente en el tratamiento con lactato (10 mM) que no contenía arsénico, aunado a esto se encontró que el sulfato en la fase acuosa presenta fluctuaciones y no estuvo acoplado estequiométricamente a la producción de sulfuro (Figs. 5.10 a y b), ya que como se mencionó anteriormente el sulfato puede disolverse del sedimento si existen fases minerales como el yeso (Kijjanapanich *et al.*, 2014). Los tratamientos con lactato, As(V) y sulfato no presentaron producción de sulfuro apreciable. Sin embargo, en dichos tratamientos si se observó arseniato reducción (Figs. 5.10c y d). La reducción completa de ~10 mM de As(V) ocurrió en 4 días, después de 5 días de incubación se aprecia que la concentración de As(III) disminuye gradualmente hasta el final del ensayo (Fig. 5.10d) y esto coincide con la formación de precipitados minerales en los cultivos. Se ha reportado que la reducción biológica de As(V) ocurre en periodos de tiempo relativamente cortos. Niggemyer y colaboradores (2001) encontraron una reducción completa de 5 mM de As(V) en 40 horas (1.6 días) con una cepa de *Desulfitobacterium frappieri*, usando formiato 4 mM como donador de electrones. Por su parte Liu y colaboradores (2004) reportaron la reducción de 10 mM de As(V) en 14 días con cultivos inoculados con sedimento y usando como donador lactato 10 mM.

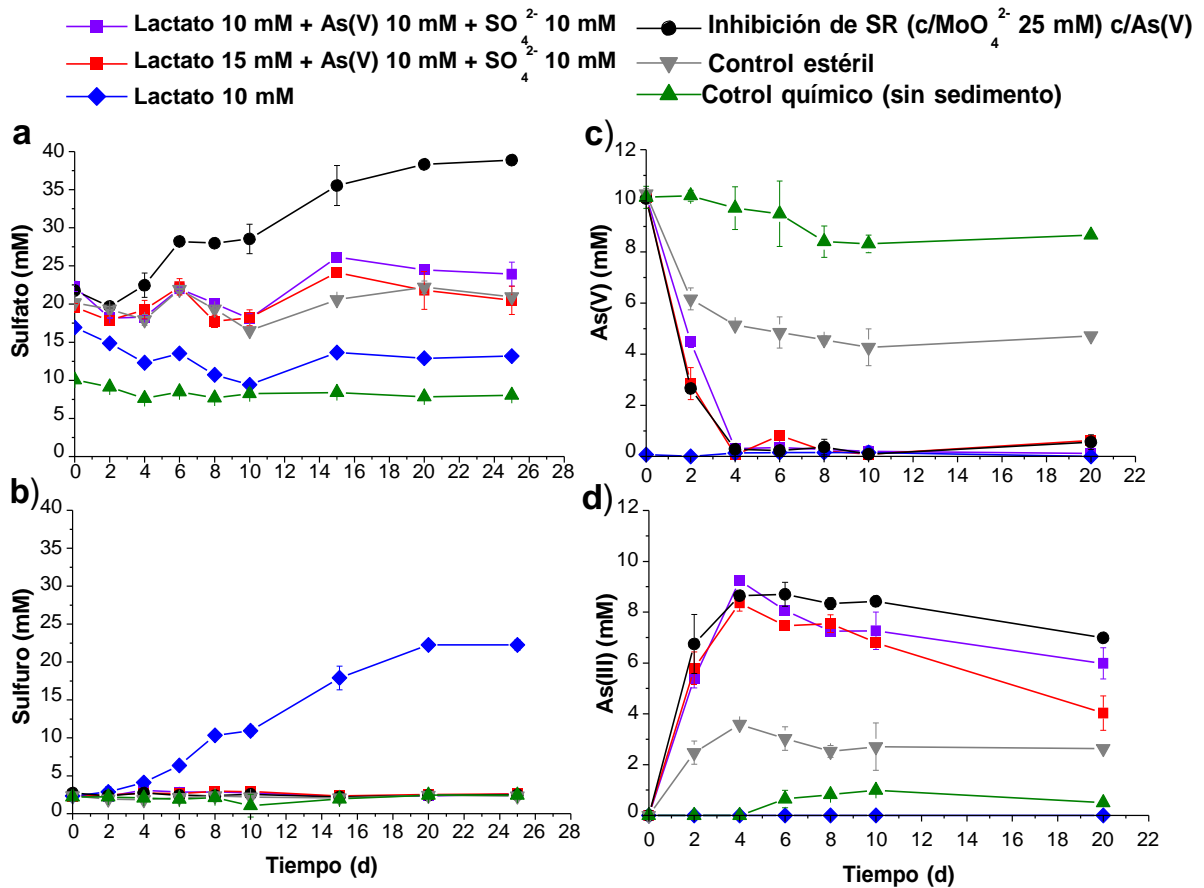


Figura 5.10. Ensayos en lote para evaluar los procesos arseniato/sulfato respiratorios utilizando como inóculo sedimento CB: **a)** Consumo de sulfato, **b)** Producción de sulfuro, **c)** Consumo de As(V), **d)** Producción de As(III). La leyenda superior muestra los reactantes suplementados en cada caso.

En el panel d) de la Figura 5.10 también se puede observar que hubo producción de As(III) en el control estéril (3.6 mM), esto se explica si se considera que el sedimento presenta actividad sulfato-reductora endógena e inicialmente contiene una concentración de sulfuro disuelto (2.4 mM) el cual químicamente podría reducir el As(V) de acuerdo a la siguiente reacción: $\text{H}_2\text{AsO}_4^- + \text{H}_2\text{S} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_3\text{AsO}_3 + 1/8 \text{S}_8 + \text{H}_2\text{O}$, el $\Delta G^\circ_{\text{rxn}}$ es de -100.5 kJ/mol, lo que indica que dicha reacción es bastante favorable, no obstante, la reacción se favorece a pHs ácidos (pH 4) (Rochette *et al.*, 2000). Otra posible explicación, es que existen bacterias formadoras de esporas capaces de reducir As(V), como *Bacillus arsenicoselenatis* y miembros del género *Desulfotomaculum*, estos microorganismos podrían sobrevivir al proceso de esterilización. Se encontró que bacterias

Desulfotomaculum spp. Gram-positivas que esporulan pueden sobrevivir hasta tres ciclos de autoclave. Dichas especies se encuentran comúnmente en sedimentos (Aullo *et al.*, 2013; Huang, 2014; O'Sullivan *et al.*, 2015), por lo que no se descarta la posibilidad de que el control estéril no era 100% abiótico, ya que solo se sometió a dos ciclos de esterilización. Aunque no se observó consumo de lactato (Fig. 5.11a), la reducción de As(V) pudo llevarse a cabo solo mediante el consumo de donador endógeno como lo sugieren Rodriguez-Freire y colaboradores (2014).

Pese a la actividad registrada en el control estéril (reducción de As(V) y producción de As(III)) existe una diferencia significativa si se compara con los tratamientos que contienen una fuente de carbono y presentan actividad microbiana (consumo de lactato y producción de acetato, Fig. 5.11). En promedio en los ensayos bióticos se obtuvo una remoción de As(V) de 9.6 mM y una producción de As(III) de 9 mM. Mientras que en el ensayo estéril la remoción de As(V) fue de 5.5 mM y la concentración de As(III) fue de 3.6 mM. Por otro lado la reducción de As(V) en el control químico (sin microorganismos) fue mínima, alrededor de 15% esto es cercano a reportes previos en donde en el control abiótico (sin inóculo) detectaron una reducción de 12% de As(V) a causa de las condiciones reducidas en los microcosmos con atmosfera anaerobia (Rodriguez-Freire *et al.*, 2014).

Para descartar que la reducción de As(V) fuera meramente química, es decir, producto del sulfuro originado por la reacción de sulfato-reducción se evaluó un tratamiento con lactato, As(V) y sulfato pero con adición de MoO_4^{2-} (25 mM). El molibdato, a esa concentración, es un inhibidor específico de la actividad sulfato-reductora ya que compite con el sistema de transporte de sulfato interfiriendo con la formación de adenosin fosfosulfato (APS), de esta forma impide que el sulfato se pueda utilizar como aceptor final de electrones (Patidar & Tare, 2005). En el ensayo con molibdato se observó que aun cuando se suprimió la reacción de sulfato-reducción se llevó a cabo la arseniato reducción mediada por microorganismos, es decir, se utilizó As(V) como aceptor final de electrones (Fig.

5.10y el comportamiento cinético fue similar al perfil de reducción de As(V) presentado por el tratamiento análogo sin adición de MoO_4^{2-} .

En la Figura 5.10a también se puede ver que en el tratamiento con molibdato 25 mM hubo un incremento considerable en la concentración de sulfato, para explicarlo se realizaron pruebas incubando botellas serológicas con sedimento y agua desionizada y botellas con sedimento, agua desionizada y molibdato 25 mM. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 5.5, se encontró que en presencia de molibdato hubo un aumento en la concentración de sulfato disuelto del sedimento y que se cuantificó por electroforesis capilar. Probablemente el molibdato influyó en la liberación de sulfato del sedimento al medio líquido.

Tabla 5.5 Efecto del molibdato en la concentración de sulfato liberado del sedimento Cerrito Blanco a la fase líquida.

Tratamiento	Sulfato mM
Sedimento CB + agua + Molibdato 25 mM (día 1)	12.8 ±0.32
Sedimento CB + agua + Molibdato 25 mM (día 15)	27.85 ±1.13
Sedimento CB + agua (día 1)	12.44 ±0.46
Sedimento CB + agua (día 15)	13.16 ±0.09

En cuanto a los perfiles de consumo de lactato y producción de acetato (Fig. 5.11) es importante mencionar que en los ensayos adicionados con As(V) no se encontró una relación equimolar entre el consumo de lactato y la producción de acetato como lo señalan las reacciones de arseniato y sulfato reducción (reacciones 2.2 y 2.4). Como ejemplo en los ensayos con 10 mM de lactato + 10 mM As(V) + 10 mM SO_4^{2-} se consumieron 6.5 mM de lactato y solo se cuantificaron 3 mM de acetato. Sin embargo la relación mol a mol de lactato/acetato no necesariamente se cumple ya que hay inversión de donador en la síntesis de material celular e inclusive puede haber consumo de acetato por otros microorganismos (p. ej. Metanógenos) (Macy *et al.*, 2000a; Sánchez-Andrea *et al.*, 2014).

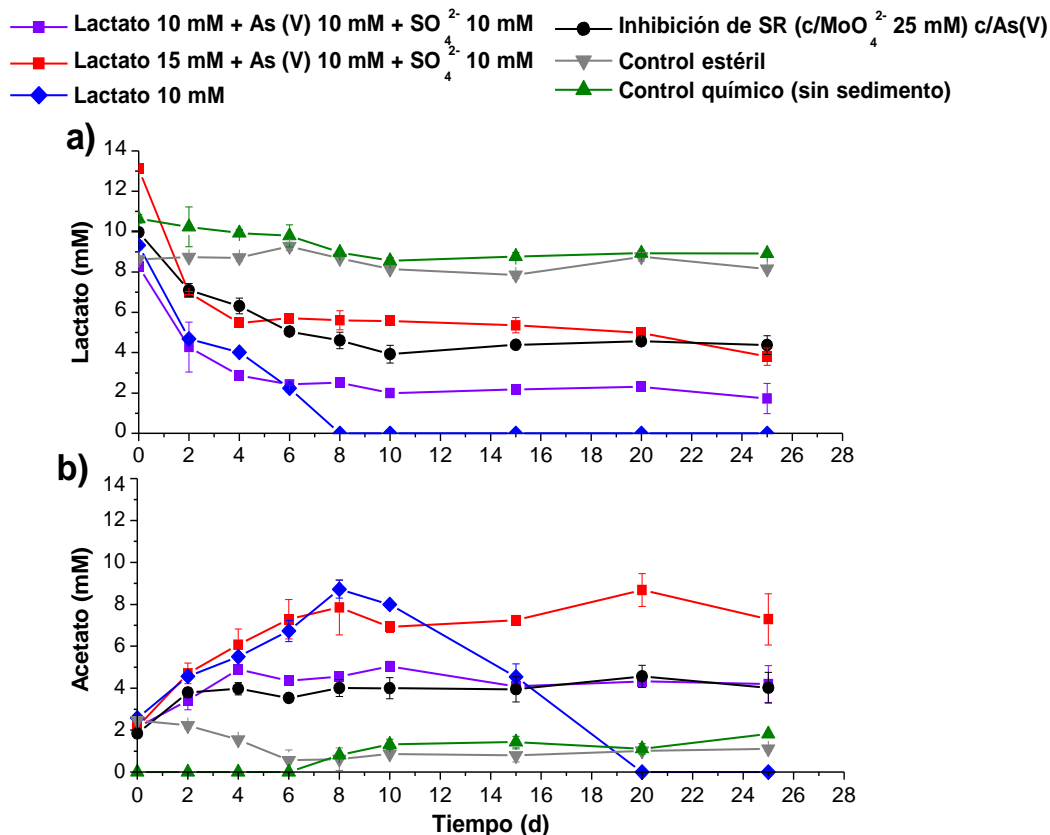


Figura 5.11. Perfiles de consumo de lactato **a)** y producción de acetato **b)**, en cultivos en lote utilizando como inoculo sedimento CB.

Por otra parte en los ensayos con As(V) se observa lactato residual (Fig. 5.11a). Por lo que no se descarta que haya cierto grado de inhibición de la reacción de sulfato-reducción al adicionar 10 mM de As(V) equivalente a 749.2 mg/L, ya que el remanente de lactato no se invirtió en la reducción microbiana de sulfato aún cuando este último estaba disponible. Dowdle y colaboradores (1996) observaron una inhibición completa de la actividad sulfato-reductora en cultivos a partir de sedimentos anóxicos en presencia de As(III) y As(V) en un intervalo de 8 a 10 mM (entre 599.4 y 749.2 mg/L) que es una concentración muy cercana a la que se usó en esta tesis (~10 mM). Sin embargo, Escot-Espinoza (2014) reportó que conforme aumenta la concentración de As(III) en un intervalo entre 1 a 100 mM la producción de sulfuro fue notablemente disminuida, sin llegar a inhibir por completo el proceso de sulfato-reducción; los experimentos se efectuaron con un consorcio sulfato-reductor aislado de suelo contaminado con arsénico en Matehuala, S.L.P. Por su parte Macy y colaboradores (2000) encontraron que

cepas de *Desulfovibrio* pueden crecer en 20 mM de sulfato y concentraciones de arseniato de 10 a 30 mM. El tiempo de duplicación incrementa conforme aumenta la concentración de As(V), pero la actividad sulfato-reductora no se suprime completamente. Por ejemplo *Desulfovibrio* creció con un tiempo de duplicación de 6 horas solo con SO_4^{2-} 20 mM, en cambio cuando se utilizó As(V) 9.2 mM y sulfato 16.9 mM el tiempo de duplicación fue de 8 horas, los autores encontraron que al cabo de 60 horas se consumieron 21 mM de lactato, 8.3 mM de sulfato y 3.1 mM de As(V).

5.5.2 Cinética de especiación de arsénico con sedimento Club de Tiro

En la Figura 5.12 se pueden observar los resultados obtenidos en los experimentos de arseniato y sulfato reducción inoculados con sedimento CT. En el tratamiento con lactato (Fig. 5.12b) se registró una producción casi nula de sulfuro (0.9 mM) esto debido a que en ensayos con sedimento CT la adición de sulfato es necesaria. Por otro lado, en el ensayo con lactato se observó la formación de un precipitado negro alrededor de los 6 días de incubación, tras la formación del precipitado el sulfuro en solución ya no incrementó su concentración (Fig. 5.12b), aunque se observó el consumo total de sulfato (Fig. 5.12a). Recordemos que el sedimento CT no presenta actividad endógena, es decir ni el carbono ni el sulfato intrínsecos en el sedimento son suficientes para sustentar la reacción de sulfato-reducción.

De igual manera que para los ensayos con sedimento CB, los tratamientos adicionados con As(V) presentaron actividad arseniato-reductora (Figs. 5.12c y d) acoplada al consumo de lactato y producción de acetato (Fig. 5.13); el ensayo donde se suprimió la actividad sulfato-reductora (con MoO_4^{2-}) también presentó arseniato-reducción. Se observó que aún cuando se inhibió la sulfato-reducción pudo ocurrir la arseniato-reducción biológica. De hecho se puede observar que en el ensayo con lactato, As(V) y sulfato 10 mM y en el ensayo con molibdato se alcanzaron las mismas concentraciones de As(III), esto se debe a que ambos ensayos tenían concentraciones similares de lactato y As(V) al inicio del experimento. En el ensayo con lactato, As(V) y sulfato a partir del día 10 se

observó una notable disminución del As(III) disuelto (Fig. 5.12d), lo cual está relacionado con la formación del precipitado amarillo, mientras que en el tratamiento con molibdato no se aprecia tal disminución lo que es lógico ya que en estos ensayos no presentaron ningún precipitado, entonces la formación de este último involucra tanto la reacción de arseniato-reducción como la de sulfato-reducción. Una vez más se detectó reducción de As(V) en el control estéril el cual fue esterilizado 2 veces, como ya se mencionó muy posiblemente estos controles abióticos no estaban completamente estériles.

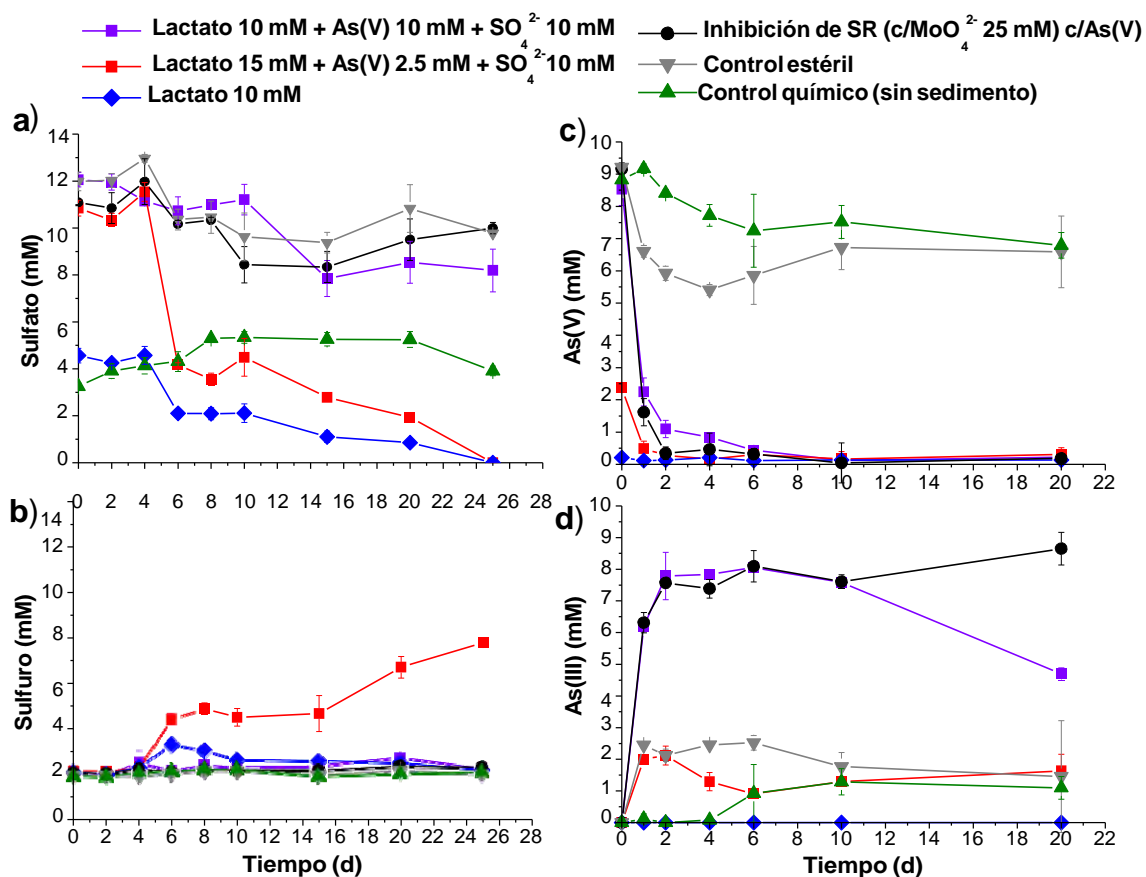


Figura 5.12. Ensayos en lote para evaluar los procesos arseniato/sulfato respiratorios utilizando como inóculo sedimento CT: **a)** Reducción de sulfato, **b)** Producción de sulfuro, **c)** Consumo de As(V), **d)** Reducción de As(III). La leyenda superior muestra los reactantes suplementados en cada caso.

Para determinar si los cultivos microbianos a partir de sedimentos tenían capacidad de utilizar tanto As(V) como sulfato, en presencia de una fuente de carbono disponible se evaluó un tratamiento en el cual se adicionó lactato 15 mM,

As(V) 2.5 mM y sulfato 10 mM, de esta forma los equivalentes reductores del donador permitirían la reducción tanto de As(V) como de sulfato. La reducción completa de 2.5 mM de As(V) ocurrió en 2 días y posteriormente se llevó a cabo la reducción de sulfato alcanzándose una concentración de sulfuro de ~8 mM para el día 25 (Figs. 5.12a y b). Esto sugiere que en presencia de los dos aceptores de electrones, se lleva a cabo primero la arseniato reducción y posteriormente la sulfato-reducción.

En la Figura 5.13 se presentan los perfiles de consumo de lactato y de producción de acetato. De los tratamientos bióticos, únicamente el tratamiento con MoO_4^{2-} presentó un remanente de lactato (2 mM), lo cual se debe a que el lactato se adicionó en exceso (8.5 mM), es decir, excedía 5 veces lo necesario para la reducción completa de 9.2 mM de As(V). En la sección 5.4.3, se hace una discusión más amplia al respecto.

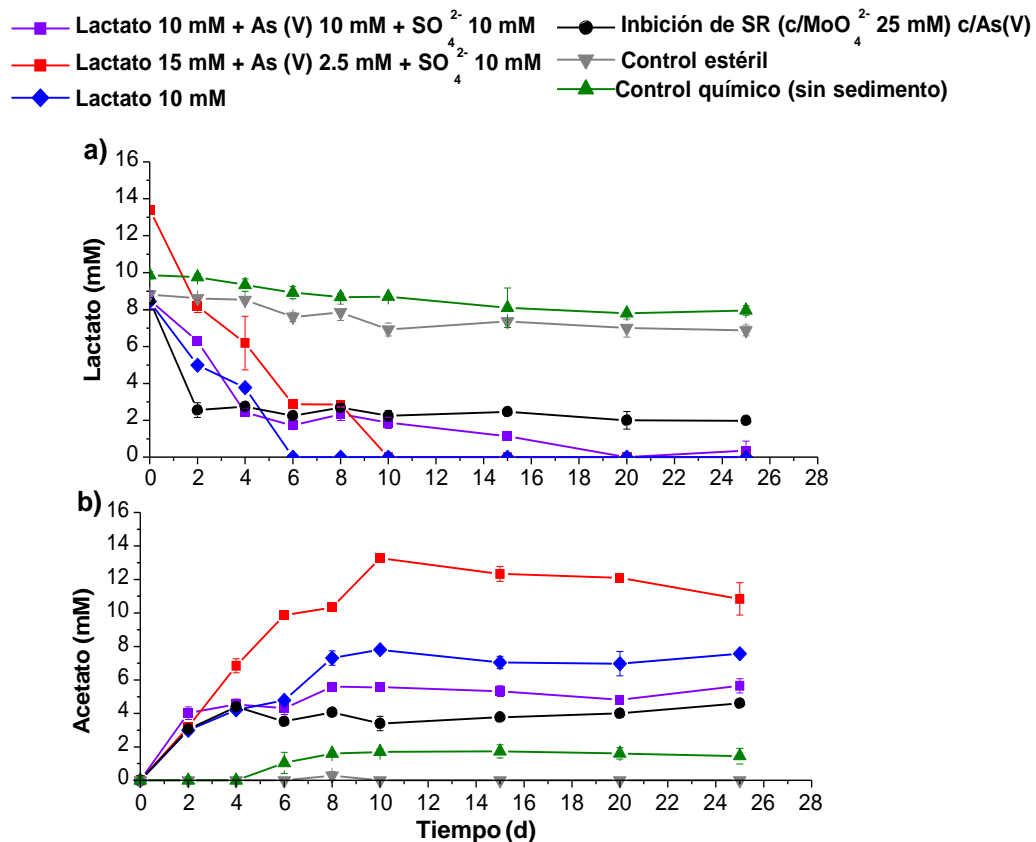
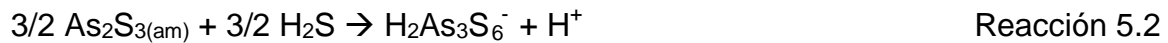


Figura 5.13. Perfiles de consumo de lactato a) y producción de acetato b) en cultivos en lote utilizando como inoculo sedimento CT.

Nótese que el tratamiento con lactato a una concentración de 15 mM, sulfato 10 mM y As(V) 2.5 mM no presentó remanente de sustrato (Fig. 5.13a), lo que indica que se invirtieron los equivalentes reductores requeridos en el proceso de arseniato-reducción y posteriormente los equivalentes restantes se utilizaron en sulfato-reducción.

Múltiples estudios respaldan la existencia de bacterias fisiológicamente capaces de reducir As(V) y SO_4^{2-} , por un lado discuten que son procesos separados, que ciertas especies pueden realizar arseniato-reducción (*Geobacter*, *Shewanella*) y otras especies sulfato-reducción. Por otro lado argumentan que existen especies que pueden utilizar ambos aceptores (*Desulfotomaculum*, *delsufomicrobium*) (Huang, 2014), siguiendo los principios termodinámicos utilizan en primer lugar al As(V) como aceptor de electrones en la respiración y una vez que lo agotan empiezan a utilizar SO_4^{2-} (Macy *et al.*, 2000; Newman *et al.*, 1997b). Para discutir lo anterior, en la Figura 5.14 se hace una comparación del perfil de actividad arseniato/sulfato reductora en el sedimento CT a partir del ensayo con 10 mM de lactato + 10 mM As(V) + 10 mM SO_4^{2-} (Fig. 5.14a) y del ensayo con 15 mM de lactato + 2.5 mM As(V) + 10 mM SO_4^{2-} (Fig. 5.14b), con el propósito de analizar el efecto de las diferentes concentraciones de aceptor y donador de electrones. En la Figura 5.14a, se puede corroborar que en el día 2 se alcanza la máxima concentración de As(III) disuelto y a partir de este día comienza a disminuir paulatinamente, lo que coincide con el desarrollo del precipitado amarillo. Adicionalmente, no se observó aumento en la concentración de sulfuro, este permaneció más o menos constante (2.3 mM). En la Figura 5.14b, en donde se usó más donador de electrones (15 mM de lactato) y menos As(V) (2.5 mM) se observa que inicialmente ocurre la reducción de As(V), el As(III) presente en solución disminuye (se empieza a apreciar la formación del precipitado amarillo), posteriormente se acumula sulfuro disuelto (~8 mM de H_2S) esto resulta en el aumento gradual de As(III) en solución a partir del día 6 (el medio se observa completamente negro). En dicho tratamiento se midió la concentración de arsénico total en solución después de 30 días de incubación y se encontró que correspondía a la concentración inicial (2.5 mM). Lo anterior sugiere que la

acumulación de sulfuro inhibe el secuestro de arsénico por bio-precipitación. Por ejemplo se ha reportado que el $\text{As}_2\text{S}_3(\text{amorfo})$ puede disolverse cuando existen altas concentraciones de sulfuro de acuerdo con la reacción 5.2, dicha disolución se ha observado a pH mayores a 5 (Altun *et al.*, 2014):



Newman y colaboradores (1997a) examinaron el crecimiento de *D. auripigmentum* con 1 mM de As(V), 10 mM de SO_4^{2-} y 20 mM de lactato y no percibieron el efecto observado en esta tesis, ya que encontraron que el As(V) se redujo a As(III), después observaron un ligero aumento en la concentración de sulfuro y posteriormente su disminución con la formación de As_2S_3 . Dichos autores argumentan una baja velocidad de sulfato-reducción, lo que hace suponer que la formación del precipitado no solo se ve impactada por la disponibilidad de sustrato sino también por la velocidad de sulfato-reducción del cultivo en cuestión.

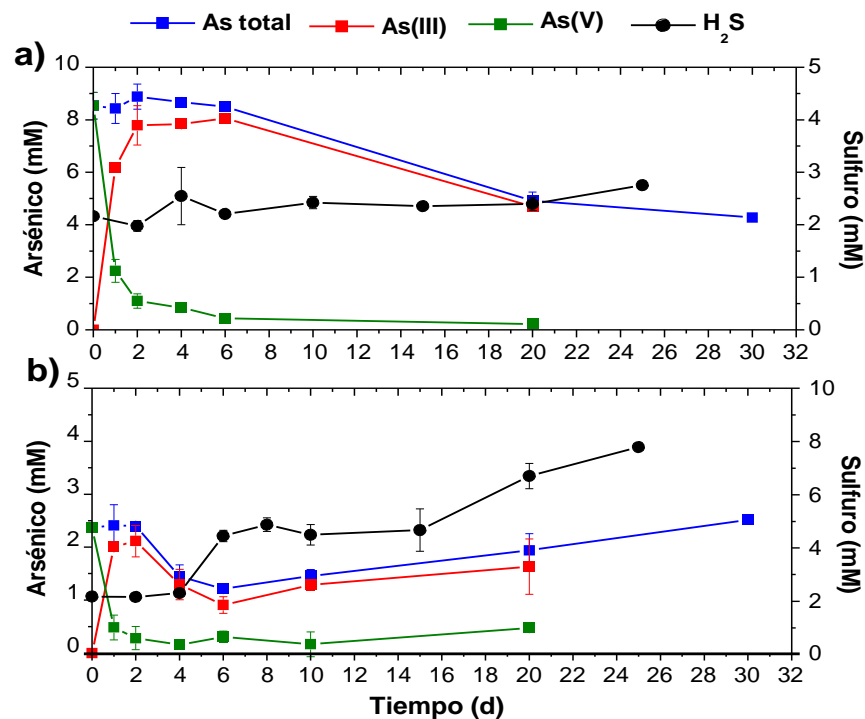


Figura 5.14 Efecto de distintas concentraciones de donador y aceptor de electrones en los procesos de sulfato/arsenito reducción con sedimento CT: **a)** Tratamiento con lactato 10 mM, As(V) 10 mM y SO_4^{2-} 10 mM, **b)** Tratamiento con lactato 15 mM, As(V) 2.5 mM y SO_4^{2-} 10 mM.

Algunos estudios proponen que la estimulación de la sulfato-reducción puede ser una estrategia de remediación de acuíferos contaminados con arsénico, bajo condiciones reductoras (Kirk *et al.*, 2004). No obstante, con base en los resultados mostrados en la Figura 5.14 tal estrategia podría favorecer la movilización de arsénico. Es decir, se tendrían que conocer y controlar estrictamente las concentraciones de donadores y aceptores de electrones disponibles en el sitio de interés, además evaluar la actividad microbiana.

Para implementar una tecnología de biorremediación en un sistema hidráulico es necesaria la caracterización del sitio, ya que factores como la geología, hidrogeología y procesos microbianos favorables determinarán el éxito de la estrategia (Fazi *et al.*, 2015). Por ejemplo en los sitios de muestreo una barrera permeable reactiva con actividad sulfato-reductora no sería recomendable ya que, en un inicio, si bien se podría favorecer la inmovilización de arsénico por la formación de sulfuros, también cabría la posibilidad de que el proceso de precipitación se revirtiera y ocurriera una disolución de los precipitados amorfos liberando altas concentraciones de arsénico en un punto específico, esto debido a un aumento de la actividad sulfato-reductora ya sea por disponibilidad de una fuente de carbono o incluso por la disminución del arsénico en solución.

5.5.3 Velocidades de reducción de As(V)

Las velocidades máximas de reducción de As(V) y reducción de sulfato para las cinéticas de especiación de arsénico con sedimento CB y CT se muestran en la Tabla 5.6 y 5.7, respectivamente. La tasa de reducción biológica de As(V) resultó ser mayor en los ensayos con sedimento CT, que en los ensayos inoculados con CB. Si recordamos, el sedimento CT posee una concentración mayor de arsénico (630.0 ± 30.1 mg/kg y en agua de poro 47.8 mg/mL) en comparación con el sedimento CB (105.1 ± 5.5 mg/kg y en agua de poro 13.1 mg/mL) por lo que es lógico que la biota microbiana de CT tenga una mayor aclimatación a la presencia de arsénico y por ende la capacidad de metabolizar de forma más acelerada el As(V) (Xiong *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). Se ha reportado que la reducción de

As(V) se registra en la fase exponencial y la tasa de crecimiento microbiano es es proporcional a la tasa de reducción de As(V) (Lukasz *et al.*, 2014).

Tabla. 5.6 Velocidades máximas de reducción de As(V) y sulfato en ensayos con sedimento CB.

Ensayo	Velocidad de reducción de As(V) (mmol/L·h)	*Velocidad de reducción de SO ₄ ²⁻ (mmol/L·h)
Lactato 10 mM + As(V) 10 mM + SO ₄ ²⁻ 10 mM	0.10	-
Lactato 15 mM + As(V) 10 mM + SO ₄ ²⁻ 10 mM	0.15	-
Lactato 10 mM	NA	0.04
Lactato 10 mM + As(V) 10 mM + SO ₄ ²⁻ 10 mM (c/ MoO ₄ 25 mM)	0.15	-

NA: no aplica, - no se detectó reducción de sulfato

* calculada a partir de la producción de sulfuro

Tabla. 5.7 Velocidades máximas de reducción de As(V) y sulfato en ensayos con sedimento CT

Ensayo	Velocidad de reducción de As(V) (mmol/L·h)	Velocidad de reducción de SO ₄ ²⁻ (mmol/L·h)
Lactato 10 mM + As(V) 10 mM + SO ₄ ²⁻ 10 mM	0.26	-
Lactato 15 mM + As(V) 2.5 mM + SO ₄ ²⁻ 10 mM	0.25	0.05
Lactato 10 mM	Na	0.02
Lactato 10 mM + As(V) 10 mM + SO ₄ ²⁻ 10 mM (c/ MoO ₄ 25 mM)	0.31	-

NA: no aplica, - no se detectó reducción de sulfato

Lukasz y colaboradores (2014) aislaron una cepa de *Serratia sp.OM17* de desechos de una mina de oro, con una concentración de 2.5 mM de As(V) encontraron una velocidad máxima de reducción de As(V) de 7.81 mg As(V)/L·h (0.10 mmol/L·h), la reducción completa ocurrió en 48 horas. Por su parte Oremland y colaboradores (2000) en un estudio con aguas anóxicas del lago Mono, California, en ensayos inoculados con *Bacillus selenitireducens* determinaron una velocidad de reducción de As(V) de 0.64 mmol/L·h y una tasa

una tasa de presencia de As(III) en solución de 0.50 mmol/L·h cuando la concentración inicial de As(V) fue 5 mM, la reducción completa de arsénico ocurrió en un periodo de 21 horas. Los mismos autores encontraron que cuando la concentración inicial de As(V) fue 0.2 mM la velocidad de reducción de As(V) fue de 0.04 mmol/L·h y una tasa de presencia de As(III) en solución de 0.05 mmol/L·h, la reducción total de As(V) se alcanzó en 18 h. Cabe mencionar que estas tasas de reducción de As(V) se lograron en cultivos de alta densidad celular (10^8 células/mL). Das y colaboradores (2015), en un estudio con aguas subterráneas enriquecidas con arsénico y siendo éstas la fuente de inóculo, determinaron tasas de reducción de As(V) de 0.011 mmol/L·h sin adición de donador de electrones (lactato) y de 0.020 mmol/L·h con adición de lactato (1 mM), ambos ensayos con una concentración de As(V) 5 mM. En este mismo estudio encontraron que a diferencia del lactato el uso acetato como donador de electrones no favorece las velocidades de arseniato-reducción comparado con los tratamientos sin adición de donador. En el presente estudio en los distintos tratamientos evaluados las velocidades máximas de reducción de As(V) encontradas en los ensayos con CB fueron de 0.10 a 0.15 mmol de As(V)/L·h y en CT de 0.25 a 0.31 mmol de As(V)/L·h que corresponden a velocidades de producción de As(III) para CB de 0.11 a 0.14 mmol de As(III)/L·h y en CT de 0.26 a 0.27 mmol de As(III)/L·h, se puede notar que las tasas de reducción de As(V) y producción de As(III) son más o menos consistentes, lo que sugiere que no hay pérdidas de As(V) por procesos de adsorción en sedimentos. Las mayores velocidades de reducción de As(V) se obtuvieron en el ensayo adicionado con molibdato (25 mM), anteriormente se reportó que el molibdato favorece la reducción de As(V) (Oremland *et al.*, 2000).

Las velocidades obtenidas en este trabajo se encuentran dentro del mismo orden de magnitud que las reportadas para cultivos puros, aunque en la literatura existen estudios de reducción microbiana de As(V) a partir de sedimentos éstos no reportan las velocidades de reducción de As(V).

5.5.4 Balance general de electrones

A continuación se presentan los resultados de los balances de electrones obtenidos para los ensayos donde se evaluó la capacidad arseniato/sulfato reductora ya sea para sedimento CB (Tabla 5.8) o sedimento CT (Tabla 5.9). En la sección 4.5.1 se describen a detalle las reacciones y cálculos considerados para estos balances. Es importante mencionar que se utilizaron las concentraciones de reactantes consumidos o producidos durante los experimentos en lote y se promediaron los triplicados correspondientes a cada ensayo.

Analizando los datos presentados en la Tabla 5.8 se puede inferir que el balance de electrones (electrones aceptados/electrones donados) en los ensayos con sedimento CB es deficiente (55% a 58%), esto puede involucrar múltiples factores. Por una parte, en los ensayos se observó que la relación lactato/acetato no concuerda estequiométricamente, lo que puede atribuirse al consumo de acetato por parte de otros microorganismos, que oxidan acetato pero no son sulfato-reductores (Fig. 5.10). Es importante aclarar que en estos balances no se consideró la formación de biomasa y así mismo hay que tener en cuenta que se tendrán pérdidas de sulfuro ya sea por precipitación y en menor medida por equilibrio en fase gas. Se trata de un sistema complejo donde están involucrados dos aceptores de electrones (SO_4^{2-} y As(V)), además existen procesos de precipitación por lo que resulta bastante difícil la cuantificación de los productos de las reacciones biogeoquímicas involucradas.

Tabla 5.8. Balance de miliequivalentes de electrones (meqv e-) de ensayos en lote para evaluar capacidad reductora de sulfato y arseniato en sedimento CB.

Ensayo	meqv. e-		meqv. e- aceptados o recuperados		meqv. e- recuperados totales	Balance de electrones ^a
	donados					
CB	Lactato	Acetato	As(III)	H ₂ S		Fracción
Lactato 10 mM + As(V) 10 mM + SO ₄ ²⁻ 10 mM	78.4	23.3	19.0	1.3	43.5	0.55
Lactato 15 mM + As(V) 10 mM + SO ₄ ²⁻ 10 mM	111.7	45.6	16.7	2.4	64.7	0.58
Lactato 10 mM + As(V) 10 mM $\frac{1}{2}$ SO ₄ ²⁻ 10 mM (c/ MoO ₄ 25 Mm)	67.0	21.7	17.4	0.0	39.2	0.58

a) meqv. e- recuperados/meqv. e- donados

Tabla 5.9. Balance de miliequivalentes de electrones (meqv e⁻) de ensayos en lote para evaluar capacidad reductora de sulfato y arseniato en sedimento CT.

Tratamiento	meqv. e- donados	meqv. e- aceptados o recuperados			meqv. e- recuperados totales	Balance de electrones ^a
		Lactato	Acetato	As(III)		
CT						Fracción
Lactato 10 mM + As(V) 10 mM + SO ₄ ²⁻ 10 mM	97.7	45.2	16.9	2.1	64.2	0.66
Lactato 15 mM + As(V) 2.5 mM + SO ₄ ²⁻ 10 mM	160.9	106.2	4.4	44.0	154.5	0.96
Lactato 10 mM + As(V)	77.7	36.9	17.4	0.0	57.0	0.70

(c/ MoO₄²⁻ 25 mM)

a) meqv. e- recuperados/meqv. e- donados

En el caso de CT la recuperación de electrones fue mayor (Tabla 5.9), para el tratamiento que presentó arseniato y sulfato reducción (Lactato 15 mM + As(V) 2.5 mM + SO₄²⁻ 10 mM) se obtuvo 96% de recuperación de miliequivalentes de electrones invertidos. Tal como se presentó en la Figura 5.13, el consumo de lactato y producción de acetato en los ensayos con CT tuvo una relación estequiométrica cercana y no hubo consumo aparente de acetato, esto coincide con una mayor fracción de recuperación de electrones. Usando como ejemplo ilustrativo el ensayo con MoO₄²⁻ 25 mM, en primer lugar se partió de una concentración inicial de 8.5 mM lactato pero al final del experimento se consumió solo 6.5 mM de sustrato y aparentemente se alcanzó una producción de 4.6 mM de acetato al día 25 (Fig. 5.13), de acuerdo a la estequiometría de la reacción de arseniato-reducción solo ocurrió la oxidación incompleta de 4.6 mM de lactato, partiendo de esto se tenían 55.2 meqv e⁻ de los cuales se consumieron 36.8 meqv e⁻ en la producción de acetato (8 meqv e⁻ x 4.6 mM) y quedaron disponibles 18.4 meqv e⁻ que son suficientes para reducir 9.2 mM de As(V), entonces de la concentración de lactato inicial 1.9 mM pudo ser destinado a síntesis celular y por tal razón los balances de electrones no cierran completamente (Macy *et al.*, 2000).

Cabe mencionar que se determinó la concentración de arsénico total disuelto en los controles endógenos para CB la concentración determinada fue de 0.7 mM (52.4 mg/L) mientras que en CT dicha concentración fue de 0.6 mM (45 mg/L). En el caso de CB la disolución de yeso (CaSO₄·2H₂O) puede arrastrar fases de arseniatos de calcio que también se disolverán dando como resultado As(V) en

solución, el cual está disponible como aceptor de electrones. Cabe aclarar que no se dio seguimiento a la reducción de arsénico en estos controles. Sin embargo, en CB es factible que haya ocurrido la arseniato-reducción previo a la sulfato-reducción observada, pues el sedimento contiene un donador de electrones endógeno. Tentativamente, en los balances de electrones puede haber una contribución por la reducción de As(V) endógeno (en CB $0.7 \text{ mM} \times 2 = 1.4 \text{ meqv e}^-$ y en CT $0.6 \text{ mM} \times 2 \text{ e}^- = 1.2 \text{ meqv e}^-$). Debido a que en los ensayos se adicionaron concentraciones iniciales de As(V) muy altas (10 mM ó 749.2 mg/L) la aportación de la arseniato-reducción endógena no parece tan importante, no obstante, si nos trasladamos a los escenarios reales el impacto sería bastante importante.

5.6 Caracterización de precipitados biogénicos formados en los cultivos en lote

Los cultivos en lote con lactato, As(V) y SO_4^{2-} 10 mM tanto para sedimentos CB como CT presentaron la formación de un precipitado amarillo, la evidencia se muestra en la Figura 5.15. En el ensayo con lactato 15 mM, As(V) 2.5 mM y sulfato 10 mM se registró acumulación de sulfuro (7.8 mM) y aunado a esto no hubo remoción de arsénico disuelto, ni se desarrolló el precipitado amarillo. Es importante mencionar que la formación del precipitado amarillo está sujeta a la disponibilidad de una fuente de carbono y a la actividad microbiana, en los tratamientos sin lactato aun en presencia de As(V) y SO_4^{2-} no se observó dicho precipitado y tampoco en el control estéril y ni en el control químico (sin sedimento). Por otra parte en el tratamiento con molibdato (donde se suprimió la sulfato-reducción) no se encontró una disminución de arsénico total en la fase acuosa, ni se observó precipitado alguno, esto respalda que en los presentes ensayos tanto el proceso de arseniato-reducción como el proceso de sulfato-reducción están ligados en la bio-mineralización de arsénico. Es decir, los procesos biológicos responsables de la producción de As(III) y de la producción de sulfuro favorecen las condiciones adecuadas (potencial redox y concentraciones molares de As(III) y H_2S) para que se lleve a cabo el proceso fisicoquímico de precipitación. En otras palabras, la precipitación de arsénico con sulfuro está condicionada biológicamente.

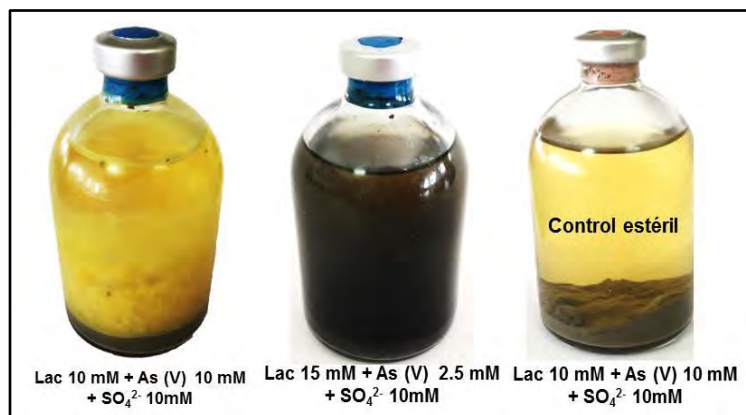
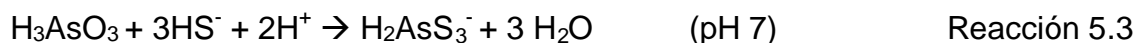


Figura 5.15. Evidencia de la formación de precipitados en ensayos inoculados con sedimento CT.

La reducción microbiana de As(V) y sulfato puede promover la formación de sulfuros de arsénico biogénicos como puede ser el oropimente y rejalgar, desde luego dependiendo de las condiciones redox y la concentración As(III) y sulfuro. Como se mencionó en el marco referencial la formación de oropimente (As_2S_3) y rejalgar (AsS) obedece las estequiometrias de las reacciones 2.5 y 2.6, respectivamente. De dichas reacciones puede decirse que la bio-mineralización conduce al secuestro o retención de arsénico en forma de sulfuros de arsénico (Newman *et al.*, 1997a; Macy *et al.*, 2000; Rodríguez-Freire *et al.*, 2014).

En los ensayos con lactato, arsénico y sulfato no se detectó un aumento en la concentración de sulfuro disuelto (Figs. 5.7a, 5.8a 5.10b, 5.12b) muy probablemente debido a la precipitación inmediata de éste con el As(III) disuelto. Tomando en consideración el planteamiento efectuado para los balances de electrones (sección 5.5.4) con la oxidación incompleta de 10 mM de lactato se podrían reducir 10 mM de As(V) y quedarían miliequivalentes reductores disponibles para reducir hasta 2.5 mM SO_4^{2-} . Cabe resaltar que la mineralización de sulfuros de arsénico es factible únicamente a bajas concentraciones de H_2S disuelto. Por mencionar un intervalo de concentración, Newman y colaboradores (1997b) proponen que si se tiene una concentración de 1 mM de As(III) la concentración de H_2S debe ser menor que 1 mM. Con base en reportes previos, se ha observado que las concentraciones elevadas de sulfuro propician la rápida tiolación de arsénico, que se refiere a formación de tioarsenitos que permanecen

en solución (Reacción 5.3) o como se mencionó anteriormente el $\text{As}_2\text{S}_3(\text{amorfo})$ puede disolverse si existen concentraciones altas de sulfuro (Reacción 5.2) (Kirk *et al.*, 2010; Altun *et al.*, 2014)



Para identificar la composición de los precipitados y elucidar la presencia de arsénico en ellos, de las cinéticas donde se determinaron las especies de As(III) y As(V) se recuperaron tres muestras del precipitado amarillo después de 30 días de incubación correspondientes a los ensayos de CB con lactato 10 y 15 mM + As(V) 10 mM + SO_4^{2-} 10 mM, CT con lactato 10 mM + As(V) 10 mM + SO_4^{2-} 10 mM y una muestra del precipitado negro formado en el ensayo CT con lactato 10 mM. Las muestras de precipitados fueron sometidas a digestión ácida para determinar su composición elemental por ICP-OES. Los elementos encontrados en mayor proporción se pueden apreciar en la Figura 5.16, además en menor cantidad se encontraron Al, Si, Cu, Li, K, Mg, Mn, P, Pb, Sb, Sn y Zn. En general los precipitados obtenidos tienen un elevado contenido de calcio, esto puede ser debido a la composición mineralógica del sedimento (calcita y yeso, sección 5.1).

Las muestras de precipitado formados en los ensayos con sedimento CB presentan una mayor concentración de arsénico que las muestras de precipitados formados en los ensayos con sedimento CT. Por ejemplo, en los ensayos con lactato 10 mM + As(V) 10 mM + SO_4^{2-} 10 mM la concentración de arsénico en el precipitado de CB fue 50.9 mg/g y para CT 18.84 mg/g. El ensayo con sedimento CT en el que se suplementó solo con lactato, y en el que se formó un precipitado negro, mostró como principales componentes calcio y hierro, pero también contiene en menor concentración arsénico y azufre (2.5 y 5.1 mg/g de precipitado respectivamente).

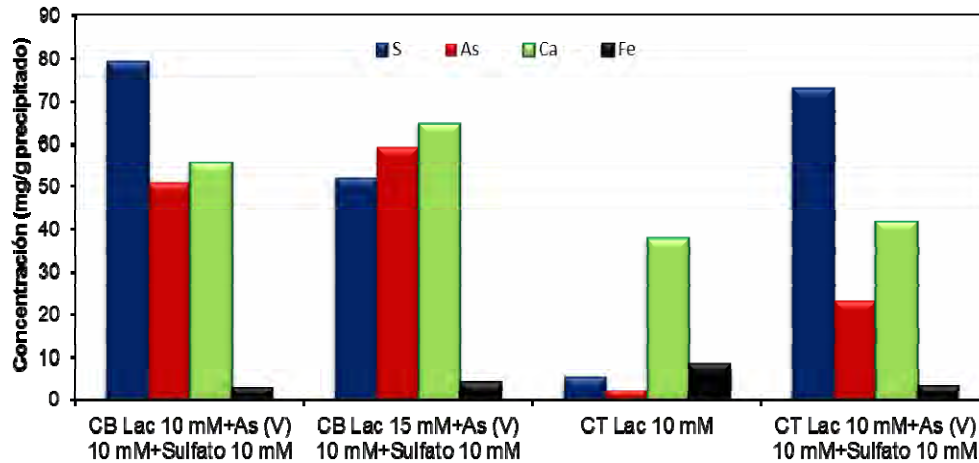


Figura 5.16 Composición elemental de los precipitados minerales recuperados de los cultivos en lote. Concentraciones determinadas en ICP-OES.

Cuando se extrajeron los precipitados (después de 30 días de incubación) se analizó el arsénico total en la fase acuosa; respecto a la concentración inicial para los dos ensayos inoculados con CB adicionados con lactato 10 y 15 mM, As(V) y sulfato 10 mM, se encontró una remoción de arsénico de 90% y 93% respectivamente mientras que para el ensayo con sedimento CT con lactato, As(V) y sulfato 10 mM se determinó una remoción de 52%, cabe destacar que en el ensayo CT adicionado solo con lactato (precipitado negro) presentó una concentración inicial de arsénico de 0.2 mM (15 mg/L), de la cual se removió 100% de la solución. Lo anterior explica porque en el análisis elemental (Fig. 5.16) se obtuvieron concentraciones mayores de arsénico en los precipitados recuperados de los ensayos con CB.

En el marco de lo anterior, la remoción de arsénico disuelto por precipitación ha sido ampliamente reportada. Martínez-Villegas y colaboradores (2013), en un estudio efectuado en el sistema hidráulico de donde se colectaron los sedimentos CB y CT, reportan la precipitación de arseniatos de calcio, los cuales controlan la solubilidad del arsénico en la columna de agua de dicho sistema; recordemos que los sitios de muestreo además de arsénico presentan un alta concentración de calcio disuelto (CB 738.7 mg/L y CT 1031.2 mg/L). Por otra parte bajo condiciones anóxicas y potenciales redox negativos, que son las condiciones bajo las que se realizaron los ensayos de esta tesis, se ha

documentado la precipitación de As(III) como sulfuros de arsénico biogénicos, este proceso se favorece por la reducción microbiana de As(V) y sulfato. Bajo esta premisa Rodríguez-Freire y colaboradores reportan una remoción de 100% de arsénico en 9 días, a partir de una concentración inicial de As(V) de 0.5 mM y usando como inóculo un lodo metanogénico. Demergasso y colaboradores (2007) encontraron que el arsénico soluble disminuyó de 77.8 a 33.1 mg/L (1.04 mM a 0.44 mM) en solo tres días de incubación en cultivos enriquecidos, recuperados de sedimentos de un salar. Es importante destacar que usualmente se reportan remociones de concentraciones bajas de arsénico (<1 mM); a partir de los sedimentos CB se consiguió una remoción de 9.2 mM de As(V) que equivale a 689.3 mg/L en un periodo no mayor a 30 días y a pesar de las concentraciones de arsénico potencialmente inhibitorias la biota microbiana nativa no se inhibió.

Físicamente en los ensayos con sedimento CB se observó una mayor cantidad de precipitado que en los ensayos con CT, y el precipitado fue visible en un menor periodo de tiempo, una vez iniciada la incubación en CB se comenzó a apreciar la formación del precipitado a partir del día 5 y en CT a partir del día 9. En la Figura 5.17 se ilustra la cinética de remoción de arsénico en solución para CB y CT y queda claro que la formación del precipitado ocurre de forma más rápida en los ensayos con sedimento CB. Esto podría estar relacionado con que el sedimento CB presentó una mayor concentración inicial de sulfuro y las tasas de sulfato-reducción fueron también mayores, esto redundó en que el sistema alcanzó potenciales redox negativos en un corto periodo de tiempo, lo que favorece la precipitación de fases tipo sulfuros (Gorny *et al.*, 2015). El ensayo con sedimento CB mostró inclusive diferentes pendientes que implican diferentes etapas de remoción de arsénico. En contraste los ensayos con sedimento CT requirieron más tiempo para modificar las condiciones redox. El ensayo inoculado con sedimento CT mostró una fase de latencia (de aproximadamente 6 días) antes de que se observara la disminución de arsénico disuelto, lo cual puede estar relacionado con la menor actividad sulfato-reductora. También puede estar relacionado con la mayor concentración de arsénico que presenta dicho sedimento, respecto a CB. Además, no hay que perder de vista la disponibilidad

de un donador de electrones endógeno en CB, que puede mantener activa la biota microbiana nativa, mientras que el sedimento CT no presentó actividad endógena por lo que es de esperarse que la biota microbiana presente una mayor fase de latencia.

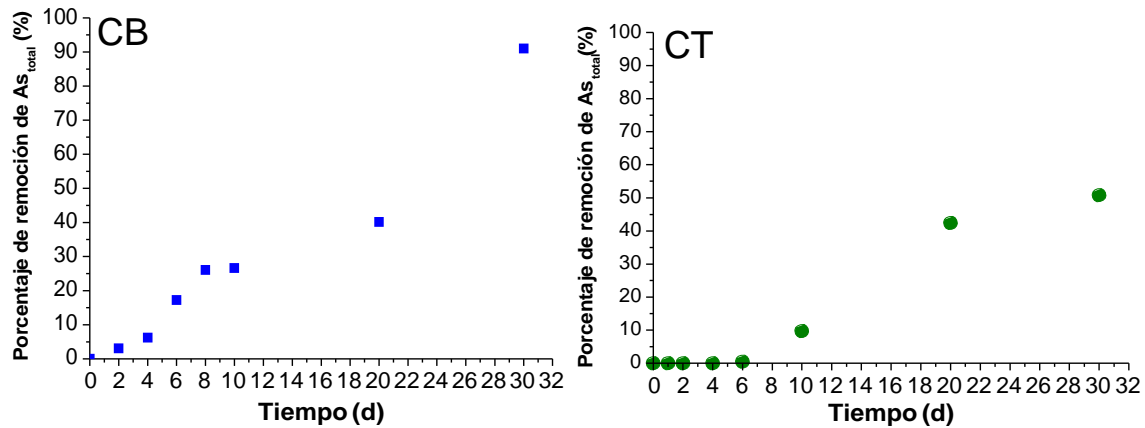


Figura 5.17. Porcentaje de remoción de arsénico disuelto en función del tiempo para sedimentos CB y CT a partir del ensayo con lactato 10 mM, As(V) 10 mM y SO_4^{2-} 10 mM.

Como ya se mencionó anteriormente, en el sistema hidráulico del que se obtuvieron los sedimentos se efectuó un estudio de modelación hidrogeoquímica considerando una escala espacial (diferentes puntos) y temporal, para explicar las altas concentraciones de arsénico en la columna de agua (hasta 158 mg/L). En primer lugar se determinó una relación lineal entre el calcio y el arsénico disuelto y se concluyó que la precipitación y disolución de arseniatos de calcio funge como principal mecanismo de control de movilidad de arsénico, en ese caso bajo condiciones óxicas (Martínez-Villegas *et al.*, 2013). Haciendo una relación con dicho reporte, en el punto que corresponde al sitio donde se colectó el sedimento CT, los autores citados, encontraron la mayor concentración de arsénico en la columna de agua (en promedio 91 mg/L). Se reportó también que dicha concentración disminuye alrededor de 90% en el punto que corresponde al sitio de donde se obtuvo el sedimento CB (en promedio 13 mg/L) (Martínez-Villegas *et al.*, 2013). En concordancia con el reporte citado, en la presente tesis se encontró una mayor remoción de arsénico disuelto en los ensayos inoculados con sedimento CB (90%) respecto a los ensayos con CT (52%). Los resultados sugieren que el

proceso microbiano de arseniato-reducción acoplado al de sulfato-reducción puede desempeñar un papel importante en el control de la movilización de arsénico bajo condiciones anóxicas. Aun cuando los ensayos en microcosmos no simulan las condiciones de los sitios de muestreo, eventualmente en los sedimentos *in situ* se podrían alcanzar condiciones anóxicas y los procesos microbianos, discutidos, podrían ocurrir y tener un efecto significativo en la distribución del arsénico; además dichos procesos podrían estar implicados en la menor concentración de arsénico observada en el sitio CB.

5.6.1 Mineralogía de precipitados biogénicos

Las muestras de precipitados descritas en la sección anterior se analizaron por difracción de rayos X, para conocer la naturaleza mineral del precipitado. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 5.18 y 5.19 para los ensayos con sedimentos CB y CT respectivamente, este análisis indica una mezcla dominante de los minerales calcita, cuarzo y yeso que son parte primordial de la mineralogía de los sedimentos (sección 5.1). Castillo y colaboradores (2015) realizaron un estudio en muestras de sedimento del acuífero donde se colectaron los sedimentos CB y CT para identificar arseniatos de calcio; por difracción de rayos X no lograron identificar los arseniatos de calcio y al respecto discuten que se encuentran en una matriz de calcita, yeso y cuarzo lo que impide detectar la señal de los arseniatos. Cabe destacar que los análisis de difracción rayos X en sincrotrón sí les permitieron identificar picos de fases de arseniatos de calcio.

El difractograma del ensayo CB con 10 mM de lactato, As(V) y SO_4^{2-} (Fig. 5.21a) confirma la similitud con los patrones de difracción del sedimento CB puro (Fig. 5.1a), eventualmente el precipitado se integra al sedimento por lo que posiblemente la composición mineralógica de éste se enmascara con la composición original del sedimento, debido a que la intensidad de la señal de las fases cristalinas presentes en el sedimento es mucho mayor, en contraste con la señal emitida por el precipitado. En este caso el patrón de difracción de rayos X muestra los picos de reflexión de mayor intensidad en valores del ángulo 2 theta alrededor de 20.98, 29.66 y 31.34 (el patrón de difracción fue comparado con las

en gran medida con el que se obtuvo para el ensayo preparado de la misma forma pero inoculado con sedimento CB. Los picos de reflexión de mayor intensidad se encuentran en los valores del ángulo 2θ de 21.0, 29.34 y 31.34. La mineralogía del precipitado amarillo formado en ensayos con uno u otro sedimento indica que tienen una composición similar. En el sedimento CT se pudieron identificar las señales correspondientes a calcita y cuarzo pero no se identificó yeso (Fig. 5.1). Se ha reportado que si se tiene calcio y sulfato en solución, como es el caso de estos ensayos, puede ocurrir la cristalización de yeso (Zhang *et al.*, 2015).

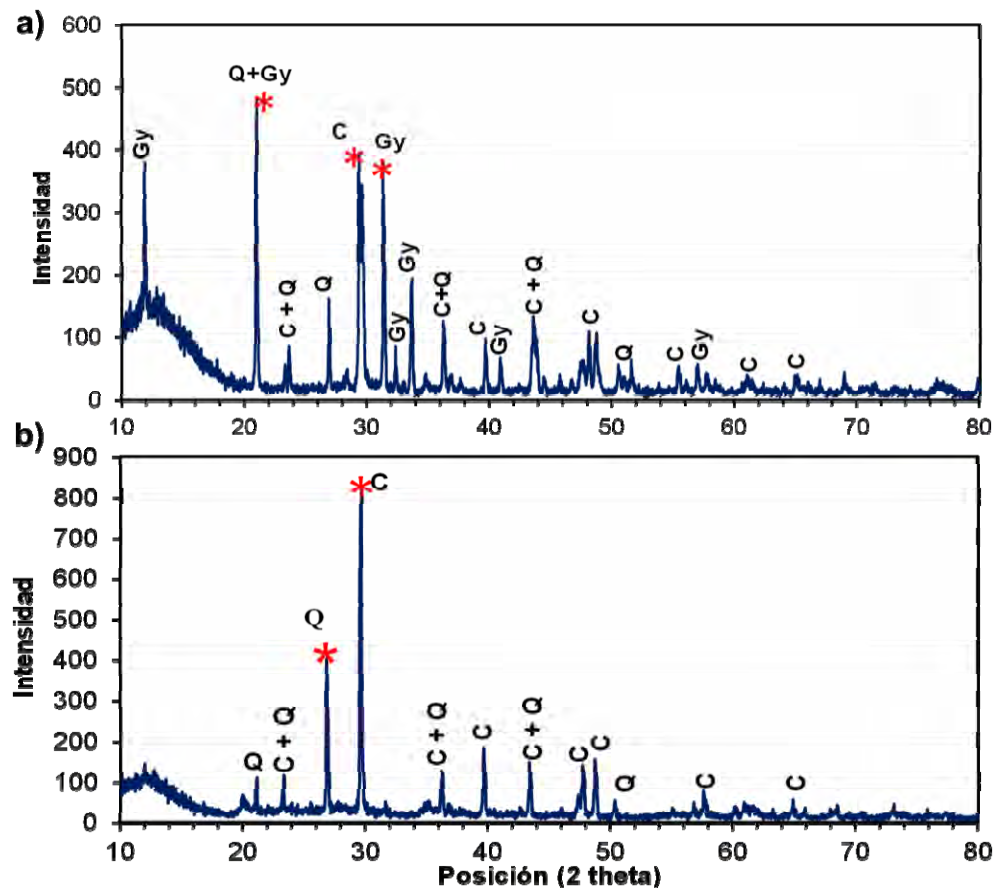


Figura 5.19. Patrones de difracción de rayos X de precipitados de los cultivos en lote con sedimento CT: a) ensayo con lactato (10 mM), AsV (10 mM) y SO_4 (10 mM); b) ensayo con lactato (10 mM). Muestras tomadas después de 30 días de incubación. C: calcita; Q: cuarzo; Gy: yeso. * Picos de difracción de mayor intensidad.

En la Figura 5.19b se presenta el análisis del precipitado negro (CT únicamente con lactato 10 mM) se puede corroborar la existencia de calcita y

cuarzo, el difractograma coincide con el obtenido para el sedimento CT (Fig. 5.1), lo que es lógico ya que en este ensayo únicamente se adicionó lactato.

Con el análisis de difracción de rayos X, efectuado para las muestras de los precipitados, no fue posible identificar la presencia de fases minerales de sulfuros de arsénico.

5.6.2 Análisis de la morfología y la composición elemental

Los precipitados obtenidos en las cinéticas de especiación de arsénico y cuyo análisis de difracción de rayos X se mostró anteriormente también (Figs. 5.18 y 5.19) fueron sometidos a un microanálisis químico por EDS-MEB para poder identificar de forma más fina su composición elemental y corroborar la presencia de arsénico y azufre en ellos. A continuación se presenta la morfología y la distribución de los elementos que conforman los precipitados (Figs. 5.20, 5.21, 5.22 y 5.23).

En las Figuras 5.20 y 5.21 se desglosan los resultados de los precipitados formados en los ensayos inoculados con CB. Primero se presenta el ensayo con lactato 10 mM, As(V) y SO_4^{2-} 10 mM (precipitado amarillo, Fig. 5.20) y segundo el precipitado con lactato 15 mM y arsénico y sulfato 10 mM (precipitado amarillo-negro, Fig. 5.21). Sin considerar el carbono y el oxígeno el microanálisis revela una mayor proporción másica porcentual (Pt%) de arsénico, azufre, calcio y silicio. En general la composición elemental de los puntos analizados (*a* y *b*) está relacionada con la naturaleza del sedimento.

En la micrografía se pueden visualizar la presencia abundante de microorganismos rodeados por el precipitado mineral, esto muestra la asociación entre los microorganismos y la formación del precipitado.

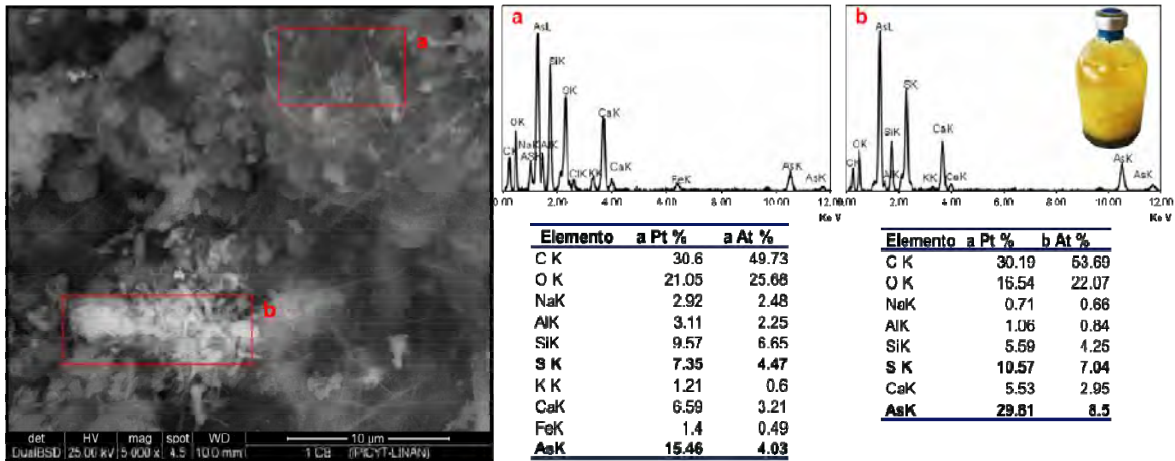


Figura 5.20. Análisis EDS-MEB de precipitados recuperados de la cinética de sulfato-arseniato reducción con sedimento CB: Ensayo con lactato (10 mM), As(V) (10 mM) y SO_4^{2-} (10 mM).

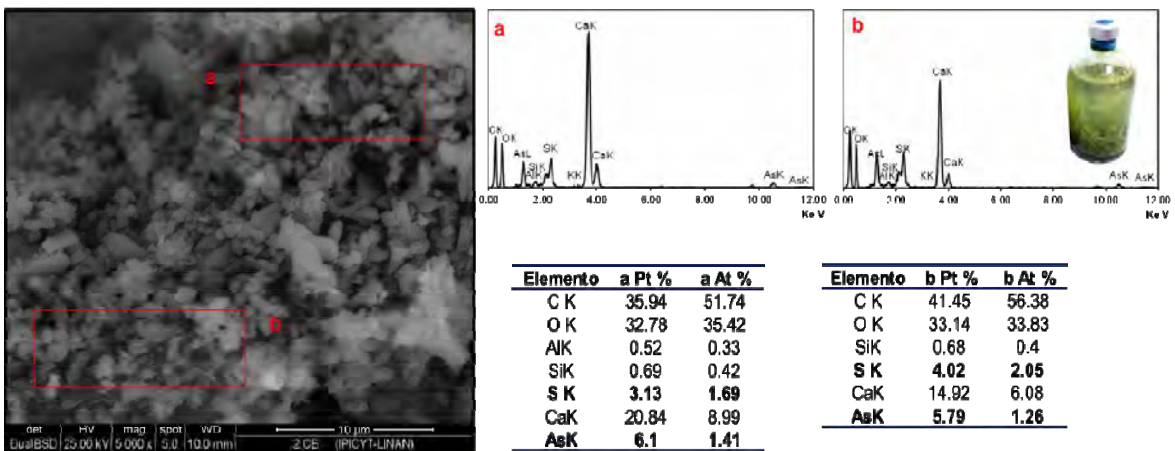


Figura 5.21 Análisis EDS-MEB de precipitados recuperados de la cinética de sulfato-arseniato reducción con sedimento CB: Ensayo con lactato (15 mM), As(V) (10 mM) y SO_4^{2-} (10 mM).

A continuación se muestran los análisis de los precipitados recuperados de los experimentos con sedimento CT. En la Figura 5.22 podemos notar que el precipitado que se formó en el ensayo con 10 mM de lactato, As(V) y sulfato era de color amarillo dorado y de acuerdo con el análisis EDS-MEB la distribución elemental resultó bastante heterogénea en los puntos analizados (a y b), se determinó que el precipitado contiene azufre, arsénico, calcio, silicio y aluminio, a excepción del azufre y el arsénico los elementos encontrados también se determinaron en el análisis del sedimento puro.

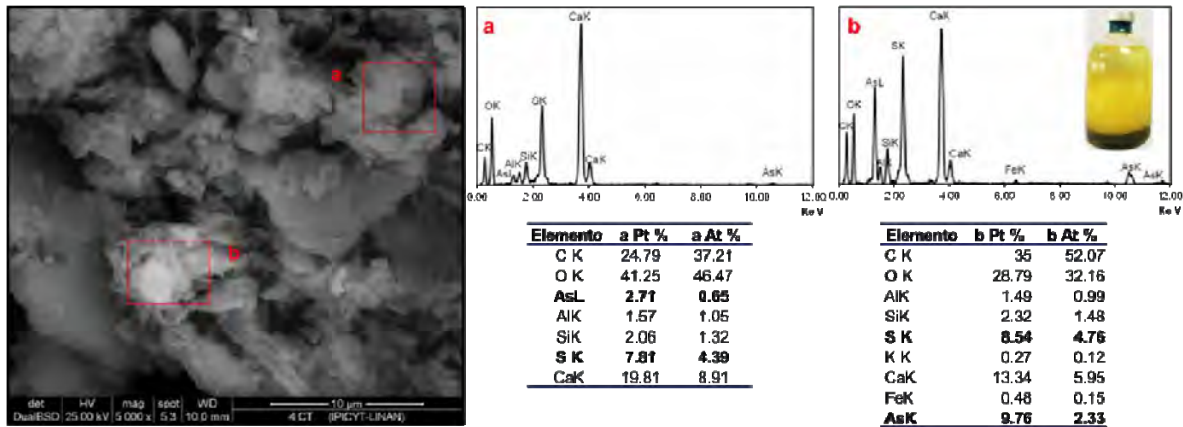


Figura 5.22 Análisis EDS-MEB de precipitados recuperados de cinética de sulfato-arseniato reducción con sedimento CT: Ensayo con lactato (10 mM), As(V) (10 mM) y SO₄²⁻ (10 mM).

En la Figura 5.23, se muestra la composición del precipitado negro formado en el tratamiento inoculado con sedimento CT, adicionado con lactato, sin As(V) y sin SO₄²⁻, este precipitado no tuvo lugar en el tratamiento preparado de la misma forma pero inoculado con sedimento CB, posiblemente debido a la menor proporción de hierro comparado con CT. Recordemos que en el sedimento CT se determinó una concentración de hierro de 2610.12 ±140.9 mg/kg, entonces la presencia de hierro podría descompensar el balance atómico de As-S, y el precipitado negro que se observó podría deberse a la formación de un sulfuro de hierro.

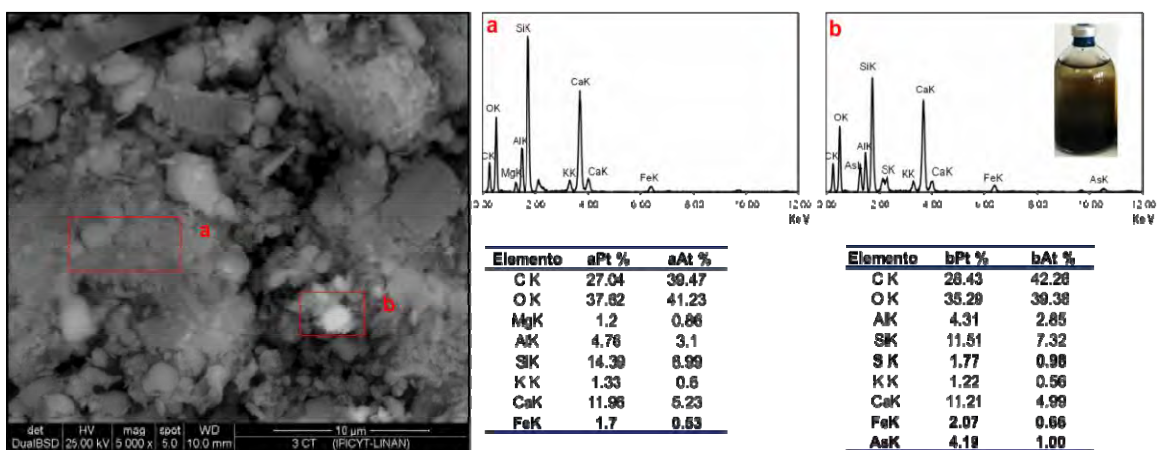


Figura 5.23 Análisis EDS-MEB de precipitados recuperados de cinética de sulfato-arseniato reducción con sedimento CT: Ensayo con lactato (10 mM).

Los sulfuros de hierro precipitan a una mayor velocidad que los sulfuros de arsénico debido a su menor solubilidad, por lo que altas concentraciones de hierro evitan la precipitación de sulfuros de arsénico (O'Day *et al.*, 2004). Se puede ver que el análisis del Punto *a* no contiene arsénico, ni azufre. Sin embargo, el Punto *b* sí presentó una proporción de arsénico y azufre (Fig. 5.23).

Se hizo el esfuerzo de identificar los precipitados amarillos formados en los ensayos con lactato, As(V) y sulfato, y a cuya formación se atribuye la remoción de arsénico disuelto. Sin embargo, los análisis de difracción de rayos X y EDS-MEB mostraron que la composición del sedimento interfirió de forma importante. Los difractogramas obtenidos por difracción de rayos X esencialmente corresponden a fases minerales de yeso, calcita y cuarzo, las cuales son la matriz principal de los sedimentos. Respecto a los análisis EDS-MED, efectivamente se identificaron entre los componentes principales de los precipitados el arsénico y el azufre. Sin embargo también se encontró calcio, silicio y en menor proporción hierro, aluminio, sodio e incluso magnesio y potasio, todos estos elementos forman parte de la composición elemental del sedimento (Sección 5.1). Estos resultados no se esperaban ya que el sedimento y el precipitado no estaban mezclados dentro de los microcosmos y aparentemente se recuperó solamente el precipitado amarillo.

5.7 Caracterización microbiológica de los sedimentos

5.7.1 Estimación del número más probable de bacterias arseniato reductoras

El arsenito es un producto del metabolismo arseniato-reductor y puede ser detectado fácilmente por la adición de sulfuro que conlleva a la formación de trisulfuro de arsénico, el cual es un precipitado amarillo cuya cinética de formación es inmediata en medios ácidos al estar disponible As(III) y sulfuro. La formación de precipitado se consideró como un resultado positivo para poder cuantificar el número más probable (NMP) de bacterias arseniato-reductoras en los sedimentos. Es decir, la formación de un precipitado amarillo indicó la presencia de

microorganismos con capacidad reductora de As(V), cuando este último se encontraba en el medio como único aceptor de electrones.

A partir de los cultivos de las diluciones seriadas de sedimento CB se obtuvo un NMP de bacterias arseniato-reductoras de 4.3×10^7 células/g de sedimento y en el caso de CT de 21×10^7 células/g de sedimento. El NMP de microorganismos reductores de As(V) fue ligeramente mayor en el sedimento CT, lo que coincide con que dicho sedimento presentó mayores velocidades de reducción de As(V); aunque de acuerdo a los límites de confianza de las tablas para NMP la diferencia en el NMP de ambos sedimentos no es estadísticamente significativa. Tal como se mencionó en la sección 4.3.4 se evaluó un control negativo (sin microorganismos) y en este no hubo formación del precipitado tras la adición de sulfuro (~ 1.5 mM), como tampoco la hubo en los cultivos de las diluciones mayores (10^{-8} - 10^{-10}), los cuales dieron un resultado negativo. En la Figura 5.24 se muestra la evidencia de la prueba.

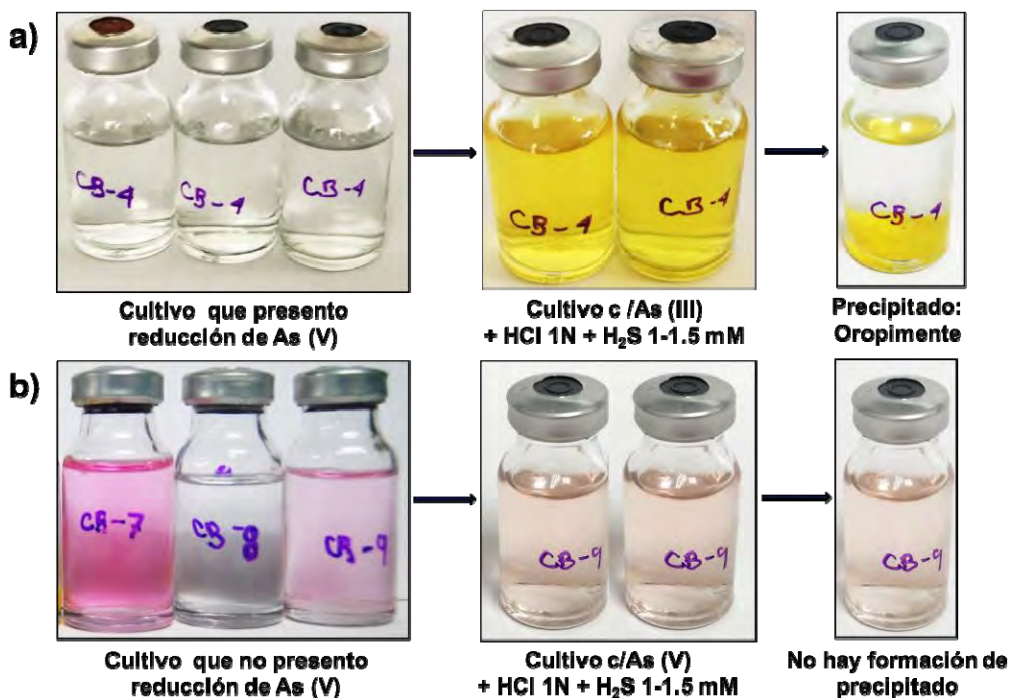


Figura 5.24. Determinación de NMP: **a)** Aspecto de las botellas en las que se detectó reducción de arsénico, **b)** Aspecto de las botellas donde no hubo crecimiento o presencia de microorganismos reductores de arsénico.

Los experimentos para estimar NMP se realizaron conforme a lo reportado por Kuai y colaboradores (2001), estos autores evaluaron el NMP en sedimentos de un estanque y en sedimentos de un humedal en sitios contaminados con arsénico en Massachusetts, encontrando un NMP 7.6×10^3 y 7.6×10^4 células/g de sedimento de estanque y 3.1×10^4 y 13.1×10^4 células/g de sedimento humedal. Los resultados aquí obtenidos fueron mayores entre tres y cuatro órdenes de magnitud, esto habla de que la comunidad arseniato reductora podría tener un rol importante en los sedimentos estudiados. En el salar Ascotán, Chile, se determinó un NMP 1.6×10^6 células/g en sedimentos que tenían concentración de arsénico de 781 mg/kg, la cual es una concentración cercana a la cuantificada en el sedimento CT (Demergasso *et al.*, 2007).

5.7.2 Morfología celular

De los cultivos preparados para la determinación del número más probable se seleccionaron las diluciones mayores que dieron un resultado positivo en la cuantificación de NMP y se prepararon frotis que se tiñeron para determinar el Gram de los microorganismos. Posteriormente estos cultivos se transfirieron a medio basal con lactato, As(V) y SO_4^{2-} en una concentración de 10 mM para de cierta manera seleccionar microorganismos arseniato-reductores y una vez que los cultivos mostraron crecimiento también se prepararon frotis con tinción Gram. Finalmente los frotis se observaron al microscopio. En la micrografía (Fig. 5.25) se observa que la morfología celular corresponde principalmente a bacilos, se presentan cocos en mucha menor abundancia y se trata de bacterias Gram positivas ya que se tiñeron de color morado. *Desulfotomaculum auripigmentum* y *Desulfitobacterium frappieri* son bacterias Gram positivas que se han reportado con capacidad de reducir de forma no asimilativa arsénico y sulfato, como aceptores finales de electrones. Dado que el As(V) se reduce extracelularmente se podría observar un gradiente de formación de As(III) desde los microorganismos al seno de la solución, permitiendo la precipitación extracelular de arsénico y sulfuro (Newman *et al.*, 1997b; Niggemyer *et al.*, 2001).

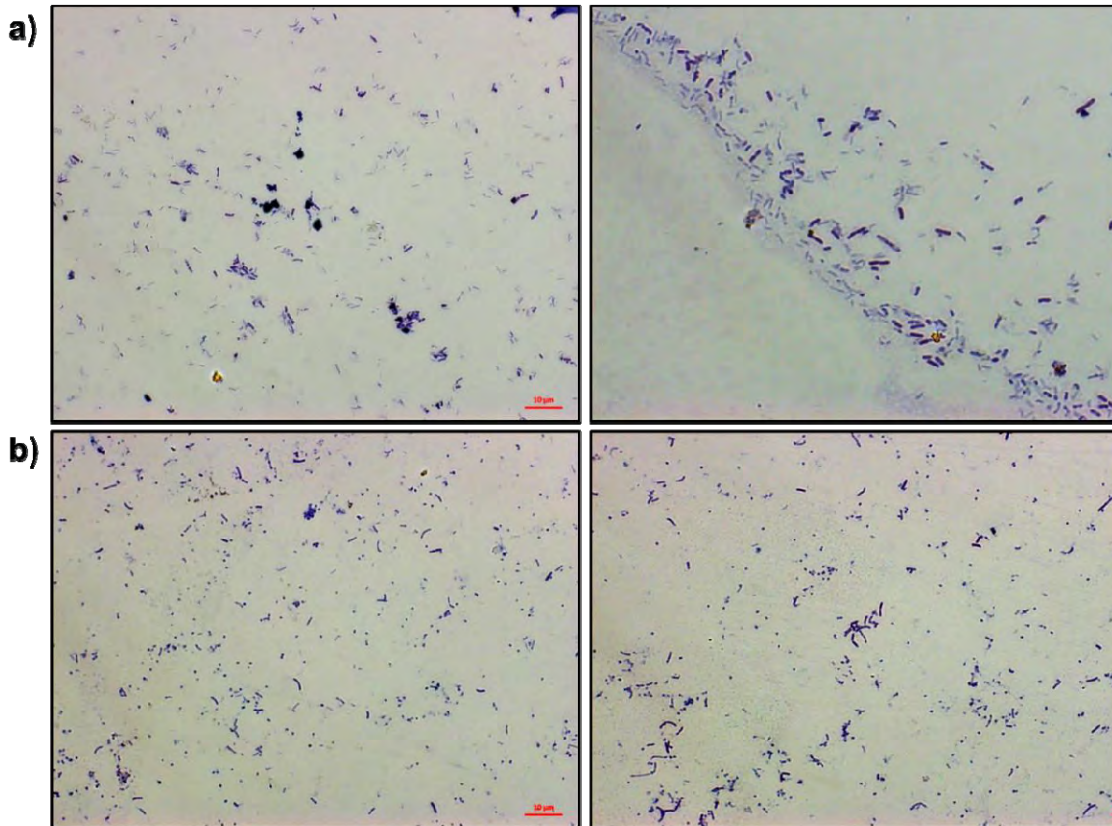


Figura 5.25. Micrografías de frotis con tinción Gram de un cultivo correspondiente a una dilución de 1×10^{-6} de sedimento CB: **a)** Cultivo en medio NMP **b)** Cultivo con medio basal, lactato, As(V) y SO_4^{2-} 10mM. Imagen obtenida con un microscopio óptico ZEISS Axiostar Plus, con un lente de inmersión Neofluar 60x y una cámara Zeiss Axion-MR3.

5.7.3 Comparación del precipitado favorecido por actividad microbiana y el obtenido en la prueba de NMP

Como se explicó anteriormente al determinar el número más probable se indujo la formación de oropimente en los cultivos con la adición de sulfuro, el precipitado obtenido (Fig. 5.26a) se comparó con una muestra de precipitado desarrollado en por actividad biológica sulfato/arseniato reductora un cultivo correspondiente a una dilución de 1×10^{-6} de sedimento CB (Fig. 5.26b). En la Figura 5.26a se puede apreciar que la relación másica porcentual entre arsénico y azufre en del precipitado sintético coincidió con una fase oropimente *a* mientras tanto en la Figura 5.26b se puede advertir que relación másica del precipitado biogénico fue más cercana a una fase tipo rejalgar. La apariencia física de uno y otro precipitado muestra diferencias, la morfología superficial del precipitado biogénico (Fig. 5.26b)

deja ver que se trata de una fase amorfa, no se observan cristales definidos a diferencia del precipitado sintético, inducido por adición de sulfuro, en el cual se pudieron observar cristales (ver anexo 3).

Es importante mencionar que los precipitados biogénicos, cuya formación está sujeta a actividad microbiana, normalmente presentan diferencias comparados con los minerales sintetizados químicamente. Esto se debe a que los primeros son de menor tamaño, menos cristalinos (se presentan como fases amorfas), cuando precipitan arrastran consigo materia orgánica, exhiben gran área superficial y presentan carga negativa a pH neutro (Muehe *et al.*, 2013).

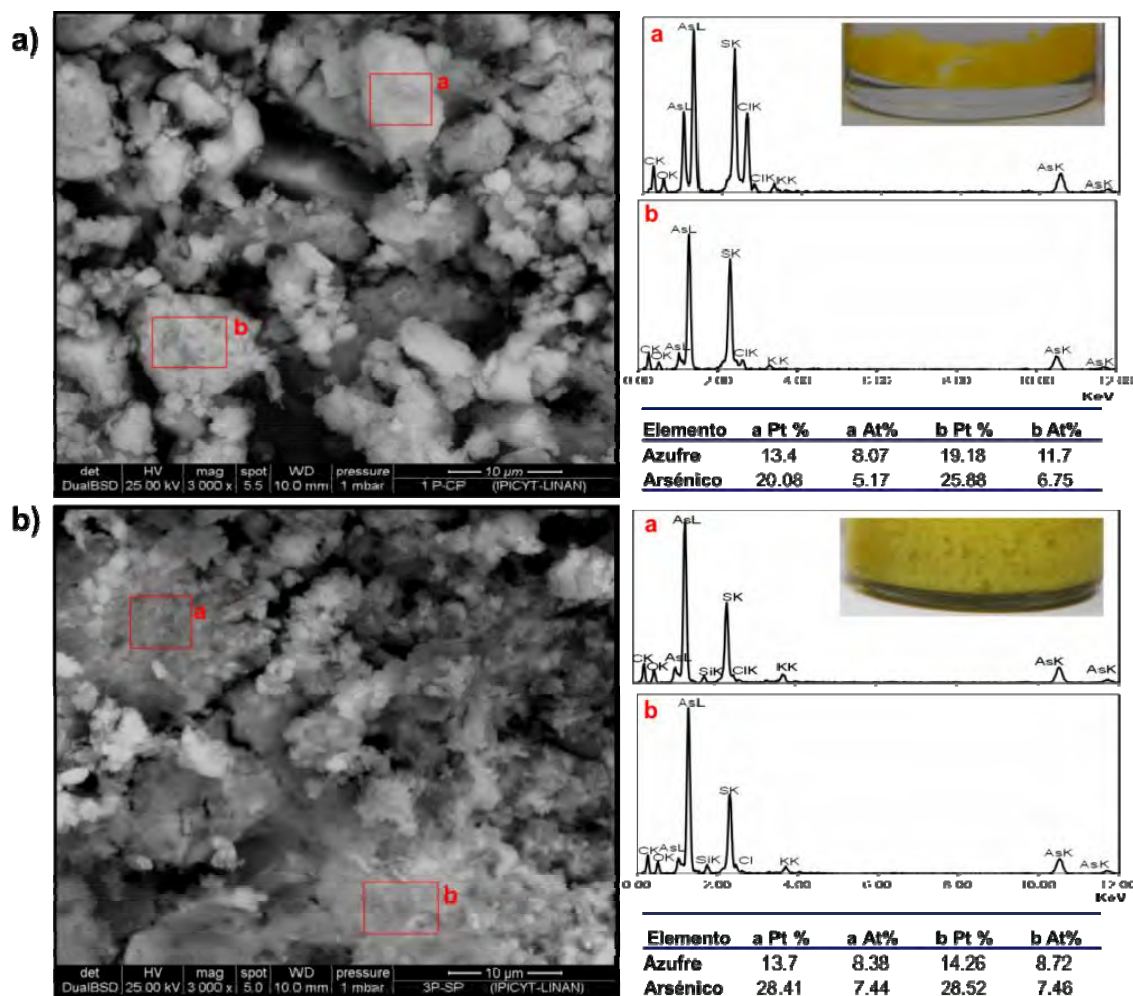


Figura 5.26 Análisis EDS-MED de precipitados recuperados de cultivos de sedimento CB: **a)** Precipitado cuya síntesis fue inducida por la adición de sulfuro en una concentración final de $1\text{-}1.5\text{ mM}$, **b)** Precipitado favorecido por actividad microbiana reductora de As(V) y SO_4 .

6. Conclusiones y perspectivas

6.1 Conclusiones

La caracterización de los sedimentos hizo patente que la composición química de éstos es un factor primordial para los procesos microbianos, desde la disponibilidad de carbono orgánico hasta la presencia de potenciales aceptores de electrones. En este estudio se trabajó con el sedimento Cerrito Blanco y Club de Tiro, los cuales mostraron diferencias fisicoquímicas entre sí que finalmente se reflejaron en los procesos microbianos observados en los ensayos de microcosmos.

Uno de los propósitos del trabajo fue establecer si la biota microbiana de los sedimentos Cerrito Blanco y Club de Tiro tenía capacidad para realizar los procesos de arseniato y sulfato reducción, y se encontró que las comunidades presentes en ambos sedimentos son capaces de realizar estos dos procesos y no requieren un periodo de aclimatación o enriquecimiento aun cuando se adicionaron concentraciones de As(V) potencialmente inhibitorias para los microorganismos (~750 mg/L). El proceso más favorecido en los ensayos de microcosmos fue arseniato-reducción, esto se esperaba ya termodinámicamente es más favorable. No obstante, si hay una fuente de carbono disponible, como puede ser lactato también se realiza sulfato-reducción, aunque no se descarta que exista cierto grado de inhibición sobre la reacción de sulfato-reducción en presencia de altas concentraciones de As(III).

De acuerdo con los experimentos de especiación de arsénico en promedio para Cerrito Blanco se alcanzaron velocidades máximas de reducción de 0.13 mmol de As(V)/L·h, siendo mayores las velocidades determinadas para Club de Tiro en promedio 0.27 mmol de As(V)/L·h. En contraste las velocidades de reducción de sulfato o producción de sulfuro fueron ligeramente mayores para Cerrito Blanco de 0.04 a 0.09 mmol de H₂S/L·h y para Club de Tiro de 0.02-05 mmol SO₄²⁻/L·h. Los resultados son congruentes con la composición química de los sedimentos.

La bio-precipitación de sulfuros de arsénico en sistemas anaerobios ocurre a partir de especies de As(III) y H₂S, es decir va ligada tanto al proceso de arseniato-reducción como al de sulfato-reducción. En los experimentos en lote en presencia de microorganismos, así como de una fuente de carbono y de aceptores de electrones en este caso As(V) y SO₄²⁻, se desarrollaron precipitados minerales de color amarillo. Una baja velocidad de sulfato-reducción pudo sustentar la bio-mineralización de arsénico. En ensayos con sedimento CT cuando se tiene una menor concentración de As(V) (2.5 mM) aunado a una mayor concentración de lactato (~15 mM) se favorece la acumulación de sulfuro disuelto pues se alcanzan mayores velocidades de reducción de sulfato y esto conduce a la inhibición del proceso de mineralización de arsénico, manteniéndolo en solución.

Con base en el análisis elemental se determinó que el precipitado amarillo contiene azufre y arsénico entre otros elementos característicos de la mineralogía del sedimento. Las relaciones másicas entre azufre y arsénico de los precipitados encontrados en los ensayos de microcosmos, sugieren que se podría tratar de fases tipo rejalgar y oropimente. Sin embargo, no se confirmó la existencia de estas fases minerales por difracción de rayos X.

Por último la estimación del número más probable de microorganismos reductores de As(V) indicó que en los sedimentos CB y CT la comunidad arseniato-reductora tiene una proporción importante y por ende potencial para interferir en el ciclo biogeoquímico del arsénico.

Con base en lo observado en el control endógeno, la sulfato-reducción y arseniato-reducción biológica podrían desempeñar un papel importante en la movilización e inmovilización de arsénico en los sedimentos del sistema hidráulico Matehuala-Cerrito Blanco, ya que dichos procesos microbianos potencialmente interfieren en las condiciones redox del sistema así como en procesos de disolución y precipitación.

6.2 Perspectivas

Para enriquecer los resultados obtenidos sería recomendable evaluar los siguientes aspectos en trabajos futuros:

- ✓ Efectuar ensayos en lote donde se evalúen concentraciones diferentes del donador de electrones así como de As(V) y sulfato para valorar su efecto en la mineralización de arsénico. Por ejemplo la velocidad de sulfato-reducción limita la bio-mineralización de arsénico cuando hay disponibilidad de carbono entonces, examinar concentraciones de molibdato que no inhiban completamente a las BSR puede ser una herramienta para controlar la concentración de sulfuro en sistemas con bajas concentraciones de As y alto contenido de carbono orgánico.
- ✓ Otra alternativa interesante es el estudio de otros donadores (glucosa, formiato) así como otros aceptores (NO_3^- , FeIII, MnIV)) de electrones para evaluar su influencia en las velocidades de reducción de As(V) y en las distintas transformaciones del arsénico. Un donador o aceptor puede inducir el dominio de determinados géneros bacterianos, favorecer distintos procesos microbianos por lo que a su vez tendrán un efecto significativo en la especiación y estabilización del arsénico.
- ✓ Identificar por técnicas de biología molecular los microorganismos presentes en los sedimentos estudiados para determinar si se trata de microorganismos que se han descrito con anterioridad y poder investigar de forma más precisa su participación en el ciclo biogeoquímico del azufre y arsénico.

7. Referencias bibliográficas

- Aguilar-Barajas, E., Díaz-Pérez, C., Ramírez-Díaz, M.I., Riveros-Rosas, H., Cervantes, C., 2011. Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions. *BioMetals*, 24: 687-707.
- Alarcón-Herrera M. T., Bundschuh J., Nath b., Nicolli H.B., Gutiérrez M., Reyes-Gómez V.M., Nuñez D., Martín-Dominguez I. R. and Sracek O. (2012). Co-occurrence of arsenic and fluoride in groundwater of semi-arid regions in Latin America: Genesis, mobility and remediation. *Journal Hazardous Materials*, 262: 960-969.
- Alexandratos, V.G., Elzinga, E.J., Reeder, R.J. (2007). Arsenate uptake by calcite: Macroscopic and spectroscopic characterization of adsorption and incorporation mechanisms. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 71: 4172-4187.
- Altun, M., Sahinkaya, E., Durukan, I., Bektas, S., Komnitsas, K. (2014). Arsenic removal in a sulfidogenic fixed-bed column bioreactor. *Journal Hazardous Materials*, 269: 31-37.
- Anawar, H.M., Tareq, S.M., Ahmed, G. (2013). Is organic matter a source or redox driver or both for arsenic release in groundwater? *Physis and Chemistry of the Earth Parts ABC, Contamination in Water*, 58-60, 49-56.
- APHA. (1998). Total, fixed and volatile solids in solid and semisolid samples. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. (20a. ed., pp. 2-59).
- Armienta, M.A., Villaseñor, G., Rodriguez, R., Ongley, L.K., Mango, H. (2001). The role of arsenic-bearing rocks in groundwater pollution at Zimapán Valley, México. *Environmental Geology*, 40: 571-581.
- Aullo, T., Ranchou-Peyruse, A., Ollivier, B., Magot, M. (2013). Desulfotomaculum spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments. *Extreme Microbiology*, 4: 362.
- Bowell RJ, Parshley J (2001). Arsenic cycling in the mining environment. Characterization of waste, chemistry, and treatment and disposal,

- proceedings and summary report on U.S. EPA workshop on managing arsenic risks to the environment, May 1–3, Denver, Colorado, USA.
- Britton L.J and Greeson P.E, (eds.) (1989). Methods for collection and analysis of aquatic biological and microbiological samples. Techniques of Water-Resources Investigations of the United States Geological Survey, Capítulo A4. USGS.
- Burton, E.D., Johnston, S.G., Kraal, P., Bush, R.T., Claff, S. (2013a). Sulfate Availability Drives Divergent Evolution of Arsenic Speciation during Microbially Mediated Reductive Transformation of Schwertmannite. *Environmental Science and Technology*, 47: 2221-2229.
- Burton, E.D., Johnston, S.G., Planer-Friedrich, B. (2013b). Coupling of arsenic mobility to sulfur transformations during microbial sulfate reduction in the presence and absence of humic acid. *Chemical Geology*, 343: 12-24.
- Buzek, F., Cejkova, B., Dousova, B., Jackova, I., Kadlecova, R., Lnenickova, Z. (2013). Mobilization of arsenic from acid deposition – The Elbe River catchment, Czech Republic. *Applied Geochemistry*. 33, 281–293.
- Carrillo-Chávez, A., Drever, J.I., Martínez, M. (2000). Arsenic content and groundwater geochemistry of the San Antonio-El Triunfo, Carrizal and Los Planes aquifers in southernmost Baja California, Mexico. *Environmental Geology*, 39: 1295-1303.
- Castillo F., Avalos-Borja M., Villalobos M., Jamieson H , Hernández-Barcenas G., and Martínez-Villegas N. (2015). Identification of diagenetic calcium arsenates using synchrotron-based micro X-ray diffraction. *Boletín Sociedad Geológica Mexicana*, artículo aceptado.
- Castelle, C.J., Hug, L.A., Wrighton, K.C., Thomas, B.C., Williams, K.H., Wu, D., Tringe, S.G., Singer, S.W., Eisen, J.A., Banfield, J.F. (2013). Extraordinary phylogenetic diversity and metabolic versatility in aquifer sediment. *Nature Communications* 4.
- Castro-Larragoitia, J., Kramar, U., Puchelt, H. (1997). 200 years of mining activities at La Paz/San Luis Potosí/Mexico-Consequences for environment and

- geochemical exploration. *Journal of Geochemical Exploration.*, *Geochemical Exploration 1995, II* 58: 81-91.
- Cheng, H., Hu, Y., Luo, J., Xu, B., Zhao, J. (2009). Geochemical processes controlling fate and transport of arsenic in acid mine drainage (AMD) and natural systems. *Journal Hazardous Materials*, 165: 13-26.
- Colin, V.L., Villegas, L.B., Abate, C.M. (2012). Indigenous microorganisms as potential bioremediators for environments contaminated with heavy metals. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 69: 28-37.
- Cord-Ruwisch, R. (1985). Cord-Ruwisch R.. A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 4: 33-36.
- Corkhill, C.L., Vaughan, D.J. (2009). Arsenopyrite oxidation-A review. *Applied Geochemistry.*, *Geochemistry and Mineralogy of Metalliferous Mine wastes: An Issue in Honor of John Jambor*, 24: 2342-2361.
- Cornelis, R., Caruso, J.A., Crews, H., Heumann, K.G. (2005). Handbook of Elemental Speciation, Handbook of Elemental Speciation II: Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health. John Wiley & Sons.
- Demergasso, C.S., Guillermo, C.D., Lorena, E.G., Mur, J.J.P., Pedrós-Alió, C. (2007). Microbial Precipitation of Arsenic Sulfides in Andean Salt Flats. *Geomicrobiology Journal*, 24: 111-123.
- DOF, 1996. NOM-001-SEMARNAT-1996 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación, México.
- Dowdle, P.R., Laverman, A.M., Oremland, R.S. (1996). Bacterial Dissimilatory Reduction of Arsenic(V) to Arsenic(III) in Anoxic Sediments. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 1664-1669.
- Drahota, P., Rohovec, J., Filippi, M., Mihaljevič, M., Rychlovský, P., Červený, V., Pertold, Z. (2009). Mineralogical and geochemical controls of arsenic speciation and mobility under different redox conditions in soil, sediment and water at the Mokrsko-West gold deposit, Czech Republic. *Science of the Total Environment*, 407: 3372-3384.

- Drahota, P., Filippi, M. (2009). Secondary arsenic minerals in the environment: A review. *Environment International Journal*, 35: 1243–1255.
- Escot-Espinoza VM. Dinámica de la diversidad microbiana con actividad sulfato reductora durante la bioestabilización de As en sistemas batch (2014). Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias ambientales en la Universidad Autónoma de San Luis potosí, México.
- Fazi, S., Amalfitano, S., Casentini, B., Davolos, D., Pietrangeli, B., Crognale, S., Lotti, F., Rossetti, S. (2015). Arsenic removal from naturally contaminated waters: a review of methods combining chemical and biological treatments. *Rendiconti Lincei* 1–8.
- Ficklin, W.H., 1983. Separation of arsenic(III) and arsenic(V) in ground waters by ion-exchange. *Talanta*, 30: 371-373.
- Gorny, J., Billon, G., Lesven, L., Dumoulin, D., Madé, B., Noiriel, C., 2015. Arsenic behavior in river sediments under redox gradient: A review. *Science of the Total Environment*, 505: 423-434.
- Guo, H., Zhang, B., Li, Y., Berner, Z., Tang, X., Norra, S., Stüben, D. (2011). Hydrogeological and biogeochemical constrains of arsenic mobilization in shallow aquifers from the Hetao basin, Inner Mongolia. *Environmental Pollution*, 159: 876-883.
- Hettick, B.E., Cañas-Carrell, J.E., French, A.D., Klein, D.M. (2015). Arsenic: A Review of the Element's Toxicity, Plant Interactions, and Potential Methods of Remediation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 7097-7107.
- Higashidani, N., Kaneta, T., Takeyasu, N., Motomizu, S., Okibe, N., Sasaki, K. (2014). Speciation of arsenic in a thermoacidophilic iron-oxidizing archaeon, *Acidianus brierleyi*, and its culture medium by inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy combined with flow injection pretreatment using an anion-exchange mini-column. *Talanta*, 122: 240-245.
- Hoef, S.E., Kulp, T.R., Stolz, J.F., Hollibaugh, J.T., Oremland, R.S. (2004). Dissimilatory Arsenate Reduction with Sulfide as Electron Donor: Experiments with Mono Lake Water and Isolation of Strain MLMS-1, a

- Chemoautotrophic Arsenate Respirer. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2741-2747.
- Huang, J.-H. (2014). Impact of Microorganisms on Arsenic Biogeochemistry: A Review. *Water, Air and Soil Pollution*, 225: 1-25.
- Jackson, T.A., Vlaar, S., Nguyen, N., Leppard, G.G., Finan, T.M. (2014). Effects of Bioavailable Heavy Metal Species, Arsenic, and Acid Drainage from Mine Tailings on a Microbial Community Sampled Along a Pollution Gradient in a Freshwater Ecosystem. *Geomicrobiology Journal*, 32: 724–750.
- International Agency for Research on Cancer, Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 84 (2004).
[http:// monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol84/volume84.pdf](http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol84/volume84.pdf)
- Jiang, Z., Li, P., Wang, Y., Li, B., Deng, Y., Wang, Y. (2014). Vertical distribution of bacterial populations associated with arsenic mobilization in aquifer sediments from the Hetao plain, Inner Mongolia. *Environmental Earth Sciences*, 71: 311-318.
- Jong, T., Parry, D.L., 2005. Evaluation of the stability of arsenic immobilized by microbial sulfate reduction using TCLP extractions and long-term leaching techniques. *Chemosphere*, 60: 254-265.
- Kijjanapanich, P., Annachatre, A.P., Lens, P.N.L. (2014). Biological Sulfate Reduction for Treatment of Gypsum Contaminated Soils, Sediments, and Solid Wastes. *Crit. Rev. Environmental Sciences and Technology*, 44: 1037-1070.
- Kijjanapanich, P., Annachatre, A.P., Esposito, G., van Hullebusch, E.D., Lens, P.N.L. (2013). Biological sulfate removal from gypsum contaminated construction and demolition debris. *Journal of Environmental Management*. 131: 82–91.
- Kirk, M.F., Holm, T.R., Park, J., Jin, Q., Sanford, R.A., Fouke, B.W., Bethke, C.M. (2004). Bacterial sulfate reduction limits natural arsenic contamination in groundwater. *Geology*, 32: 953-956.

- Kirk, M.F., Roden, E.E., Crossey, L.J., Brealey, A.J., Spilde, M.N. (2010). Experimental analysis of arsenic precipitation during microbial sulfate and iron reduction in model aquifer sediment reactors. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 74: 2538-2555.
- Koning, E., Gehlen, M., Flank, A.-M., Calas, G., Epping, E. (2007). Rapid post-mortem incorporation of aluminum in diatom frustules: Evidence from chemical and structural analyses. *Marine Chemistry*, Special issue: Dedicated to the memory of Professor Roland Wollast 106: 208–222.
- Kruger, M.C., Bertin, P.N., Heipieper, H.J., Arsène-Ploetze, F., 2013. Bacterial metabolism of environmental arsenic—mechanisms and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 3827-3841.
- Kuai, L., Nair, A.A., Polz, M.F. (2001). Rapid and Simple Method for the Most-Probable-Number Estimation of Arsenic-Reducing Bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 3168-3173.
- Lawati, W.M. Al, Jean, J.-S., Kulp, T.R., Lee, M.-K., Polya, D.A., Liu, C.-C., van Dongen, B.E., (2013). Characterisation of organic matter associated with groundwater arsenic in reducing aquifers of southwestern Taiwan. *Journal Hazardous Materials*, 262: 970-979.
- Liamleam, W., Annachatre, A.P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances*, 25: 452-463.
- Lièvreumont, D., Bertin, P.N., Lett, M.-C. (2009). Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie, Metals in health: From cell to soil, a multiscale approach*, 91: 1229-1237.
- Li, J., Takii, S., Kotakemori, R., Hayashi, H. (1996). Sulfate reduction in profundal sediments in Lake Kizaki, Japan. *Hydrobiology*, 333: 201-208.
- Litter M.I., Armienta M.A., Farias S.S. (eds.) (2009). Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos. (p.pp 19-28). CYTED.

- Liu, A., Garcia-Dominguez, E., Rhine, E., Young, L. (2004). A novel arsenate respiring isolate that can utilize aromatic substrates. *FEMS Microbiology Ecology*, 48: 323-332.
- Liu, Q., Guo, H., Li, Y., Xiang, H., 2013. Acclimation of arsenic-resistant Fe(II)-oxidizing bacteria in aqueous environment. *International Biodeterioration and Biodegradation, Geomicrobial Ecotoxicology*, 76: 86-91.
- Lukasz, D., Liwia, R., Aleksandra, M., Aleksandra, S. (2014). Dissolution of Arsenic Minerals Mediated by Dissimilatory Arsenate Reducing Bacteria: Estimation of the Physiological Potential for Arsenic Mobilization. *BioMed Research International*, e841892.
- Ma, J., Sengupta, M.K., Yuan, D., Dasgupta, P.K. (2014). Speciation and detection of arsenic in aqueous samples: A review of recent progress in non-atomic spectrometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 831: 1–23.
- Macy, J.M., Santini, J.M., Pauling, B.V., O'Neill, A.H., Sly, L.I., (2000). Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Archives of Microbiology*, 173: 49-57.
- Martínez-Villegas, N., Briones-Gallardo, R., Ramos-Leal, J.A., Avalos-Borja, M., Castañón-Sandoval, A.D., Razo-Flores, E., Villalobos, M. (2013). Arsenic mobility controlled by solid calcium arsenates: A case study in Mexico showcasing a potentially widespread environmental problem. *Environmental Pollution*, 176: 114-122.
- McArthur, J.M., Banerjee, D.M., Hudson-Edwards, K.A., Mishra, R., Purohit, R., Ravenscroft, P., Cronin, A., Howarth, R.J., Chatterjee, A., Talukder, T., Lowry, D., Houghton, S., Chadha, D.K. (2004). Natural organic matter in sedimentary basins and its relation to arsenic in anoxic ground water: the example of West Bengal and its worldwide implications. *Applied Geochemistry*, 19: 1255-1293.
- Mirza, B.S., Muruganandam, S., Meng, X., Sorensen, D.L., Dupont, R.R., McLean, J.E. (2014). Arsenic(V) Reduction in Relation to Iron(III) Transformation and Molecular Characterization of the Structural and Functional Microbial

- Community in Sediments of a Basin-Fill Aquifer in Northern Utah. *Applied Environmental Microbiology*, 80: 3198-3208.
- Moriarty, M.M., Lai, V.W.-M., Koch, I., Cui, L., Combs, C., Krupp, E.M., Feldmann, J., Cullen, W.R., Reimer, K.J., 2014. Speciation and toxicity of arsenic in mining-affected lake sediments in the Quinsam watershed, British Columbia. *Science of the Total Environment*, 466-467: 90-99.
- Muehe, E.M., Scheer, L., Daus, B., Kappler, A., 2013. Fate of Arsenic during Microbial Reduction of Biogenic versus Abiogenic As-Fe(III)-Mineral Coprecipitates. *Environmental Science and Technology*, 47: 8297-8307.
- Neidhardt, H., Berner, Z.A., Freikowski, D., Biswas, A., Majumder, S., Winter, J., Gallert, C., Chatterjee, D., Norra, S. (2014). Organic carbon induced mobilization of iron and manganese in a West Bengal aquifer and the muted response of groundwater arsenic concentrations. *Chemical Geology*, 367: 51-62.
- Newman, D.K., Kennedy, E.K., Coates, J.D., Ahmann, D., Ellis, D.J., Lovley, D.R., Morel, F.M.M., (1997a). Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Archives Microbiology*, 168: 380-388.
- Newman, D.K., Beveridge, T.J., Morel, F. (1997b). Precipitation of Arsenic Trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2022-2028.
- Niggemyer, A., Spring, S., Stackebrandt, E., Rosenzweig, R.F. (2001). Isolation and Characterization of a Novel As(V)-Reducing Bacterium: Implications for Arsenic Mobilization and the Genus *Desulfitobacterium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 5568-5580.
- O'Day, P.A., Vlassopoulos, D., Root, R., Rivera, N. (2004). The influence of sulfur and iron on dissolved arsenic concentrations in the shallow subsurface under changing redox conditions. *Proceedings of the National Academic of Sciences, U. S. A.* 101: 13703-13708.
- Ohtsuka, T., Yamaguchi, N., Makino, T., Sakurai, K., Kimura, K., Kudo, K., Homma, E., Dong, D.T., Amachi, S. (2013). Arsenic Dissolution from

- Japanese Paddy Soil by a Dissimilatory Arsenate-Reducing Bacterium *Geobacter* sp. OR-1. *Environmental Science and Technology*, 47: 6263-6271.
- Oremland, R.S., Dowdle, P.R., Hoefl, S., Sharp, J.O., Schaefer, J.K., Miller, L.G., Switzer Blum, J., Smith, R.L., Bloom, N.S., Wallschlaeger, D. (2000). Bacterial dissimilatory reduction of arsenate and sulfate in meromictic Mono Lake, California. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 64: 3073-3084.
- Oremland, R.S., Stolz, J.F. (2003). The Ecology of Arsenic. *Science*, 300: 939-944.
- Osborne, T.H., McArthur, J.M., Sikdar, P.K., Santini, J.M. (2015). Isolation of an Arsenate-Respiring Bacterium from a Redox Front in an Arsenic-Polluted Aquifer in West Bengal, Bengal Basin. *Environmental Science and Technology*, 49: 4193-4199.
- O'Sullivan, L.A., Roussel, E.G., Weightman, A.J., Webster, G., Hubert, C.R., Bell, E., Head, I., Sass, H., Parkes, R.J. (2015). Survival of *Desulfotomaculum* spores from estuarine sediments after serial autoclaving and high-temperature exposure. *ISME Journal*, 9: 922-933.
- Ozkan, E.Y., Buyukisik, H.B., Kontas, A. (2014). Biogeochemical behavior and distribution of biogenic silica in marine sediments from Izmir Bay, Aegean Sea (Turkey). *Marine Chemistry*, 164: 1-8.
- Pelallo-Martínez n. a. Comportamiento químico del arsénico en sedimentos de sistemas acuáticos contaminados (2006). Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias ambientales en la Universidad Autónoma de San Luis potosí, México.
- Peng Lu, C.Z. (2011). Arsenic Eh–pH diagrams at 25°C and 1 bar. *Environmental Earth Sciences*. 62, 1673–1683.
- Rabus, R., Hansen, T.A., Widdel, F. (2006). Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes, in: Dr, M.D.P., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryote Springer New York*, pp. 659-768.

- Razo, I., Carrizales, L., Castro, J., Díaz-Barriga, F., 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 S. 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, S.L.P. (México)", Tesis para obtener el grado de M. C. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.
- Reisinger, H.J., Burris, D.R., Hering, J.G. (2005). Remediating subsurface arsenic contamination with monitored natural attenuation. *Environmental Science and Technology*, 39: 458A-464A.
- Reyes-Gómez, V.M., Alarcón-Herrera, M.T., Gutiérrez, M., López, D.N., 2013. Fluoride and Arsenic in an Alluvial Aquifer System in Chihuahua, Mexico: Contaminant Levels, Potential Sources, and Co-occurrence. *Water, Air and Soil Pollution*, 224: 1-15.
- Rittmann, B. E., y McCarty, P. L. (2001). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. (Chapter 2, p. pp 135-145). McGraw-Hill.
- Rochette, E.A., Bostick, B.C., Li, G., Fendorf, S. (2000). Kinetics of Arsenate Reduction by Dissolved Sulfide. *Environmental Science and Technology*, 34: 4714-4720.
- Rodríguez-Blanco, J.D., Jiménez, A., Prieto, M. (2007). Oriented Overgrowth of Pharmacolite ($\text{CaHAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) on Gypsum ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). *Crystal Growth Des.* 7: 2756-2763.
- Rodríguez-Freire, L., Sierra-Alvarez, R., Root, R., Chorover, J., Field, J.A. (2014). Biomineralization of arsenate to arsenic sulfides is greatly enhanced at mildly acidic conditions. *Water Research*, 66: 242-253.
- Romero, F.M., Armienta, M.A., Carrillo-Chavez, A. (2004). Arsenic Sorption by Carbonate-Rich Aquifer Material, a Control on Arsenic Mobility at Zimapán, México. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47: 1-13.
- Ruiz-Agudo, E., Putnis, C.V., Hövelmann, J., Álvarez-Lloret, P., Ibáñez-Velasco, A., Putnis, A. (2015). Experimental study of the replacement of calcite by calcium sulphates. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 156: 75-93.

- Saalfeld, S.L., Bostick, B.C. (2009). Changes in Iron, Sulfur, and Arsenic Speciation Associated with Bacterial Sulfate Reduction in Ferrihydrite-Rich Systems. *Environmental Science and Technology*, 43: 8787-8793.
- Sánchez-Andrea, I., Sanz, J.L., Bijmans, M.F.M., Stams, A.J.M. (2014). Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. *Journal Hazardous Materials*, 269: 98-109.
- Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Singh, V.P., Prasad, S.M. (2015). Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 112: 247–270.
- Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17: 517-568.
- Stam, M.C., Mason, P.R.D., Pallud, C., Van Cappellen, P. (2010). Sulfate reducing activity and sulfur isotope fractionation by natural microbial communities in sediments of a hypersaline soda lake (Mono Lake, California). *Chemical Geology*, 278: 23-30.
- USEPA 2014 treatment technology arsenic removal.
- Wang, Y., Li, P., Li, B., Webster, G., Weightman, A.J., Jiang, Z., Jiang, D., Deng, Y., Wang, Y. (2014). Bacterial Diversity and Community Structure in High Arsenic Aquifers in Hetao Plain of Inner Mongolia, China. *Geomicrobiology Journal*, 31: 338-349.
- Xie, X., Johnson, T.M., Wang, Y., Lundstrom, C.C., Ellis, A., Wang, X., Duan, M., Li, J. (2014). Pathways of arsenic from sediments to groundwater in the hyporheic zone: Evidence from an iron isotope study. *Journal Hydrology*, 511: 509-517.
- Xiong, J., He, Z., Van Nostrand, J.D., Luo, G., Tu, S., Zhou, J., Wang, G. (2012). Assessing the Microbial Community and Functional Genes in a Vertical Soil Profile with Long-Term Arsenic Contamination. *PLoS ONE* 7, e50507.
- Zhang, D., Yuan, Z., Wang, S., Jia, Y., Demopoulos, G.P. (2015). Incorporation of arsenic into gypsum: Relevant to arsenic removal and immobilization process in hydrometallurgical industry. *Journal Hazardous Materials*, 300: 272-280.

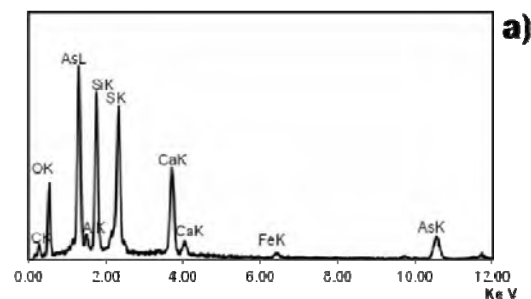
Anexos

Anexo 1. Solución mineral Wolfe's

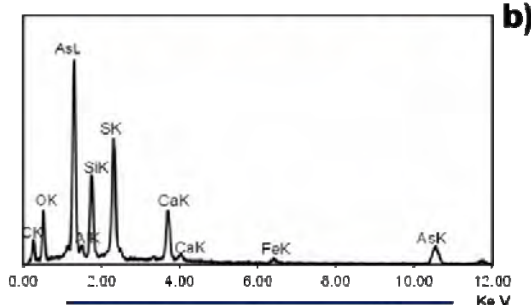
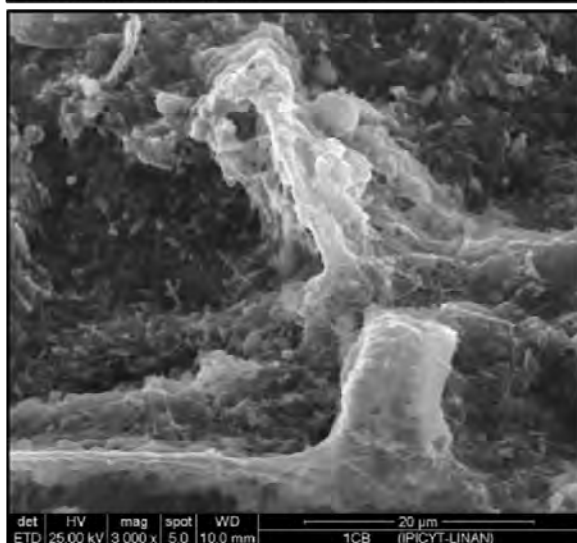
Solución mineral Wolfe's (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3), Acido nitriloacético (1.5), NaCl (0.1), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.5), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1), CaCl_2 (0.1), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.01), $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (0.01), H_3BO_3 (0.01), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (0.01). Preparación: adicionar el ácido nitriloacético a 500 mL de agua desionizada; disolver ajustando el pH con KOH; adicionar los componentes restantes y aforar a 1 L.

Anexo 2. Precipitados biogénicos recuperados de ensayos en lote para evaluar capacidad reductora de sulfato en presencia de As(V)

Precipitado amarillo obtenido del ensayo con sedimento CB con 10 mM de cada uno: lactato, As(V) y SO_4^{2-} después de 15 días de incubación.

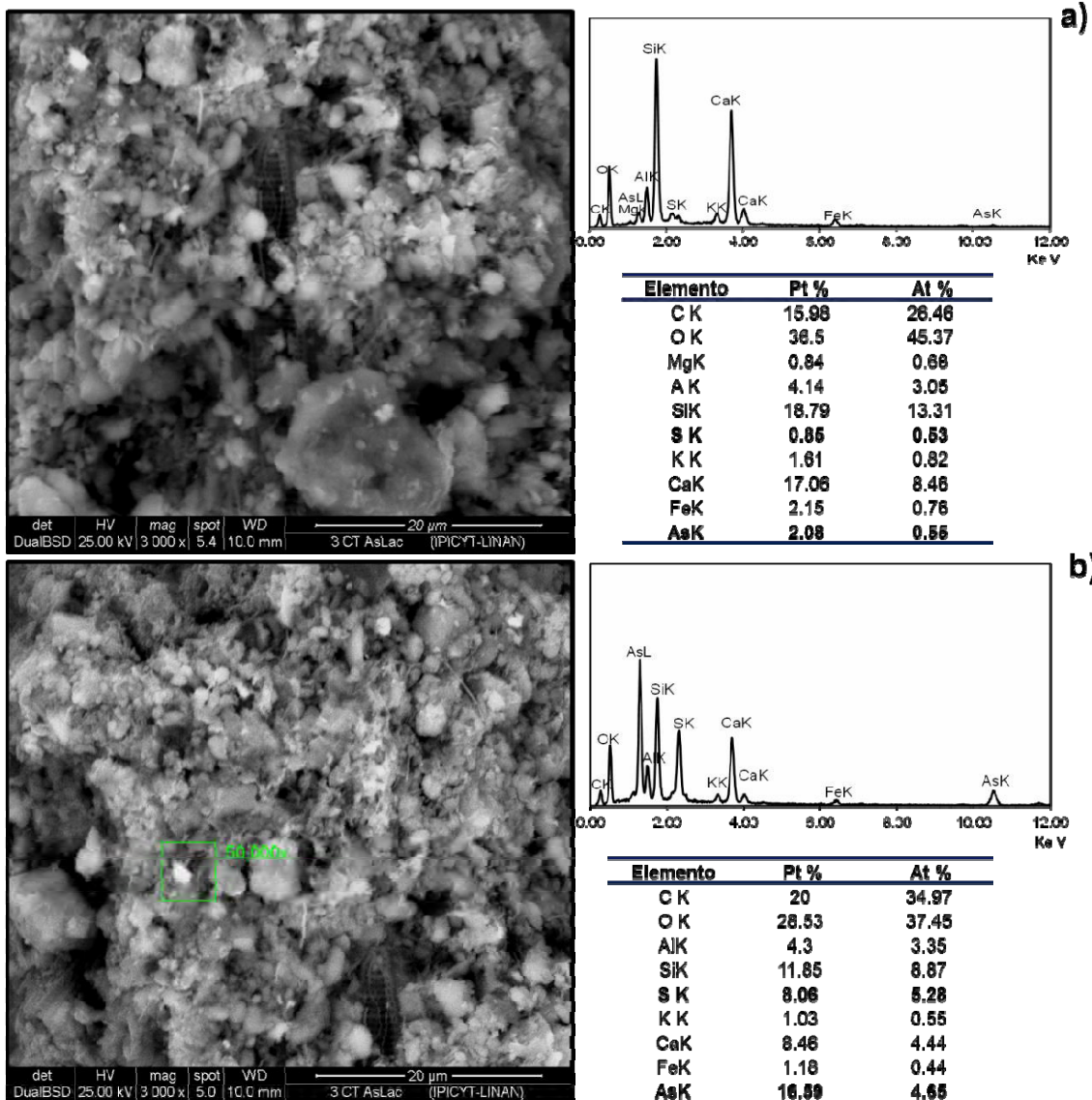


Elemento	Pt %	At %
C K	18.18	33.24
O K	26.28	36.07
AlK	1.51	1.23
SiK	13.34	10.44
S K	12.34	8.45
CaK	8.51	4.66
FeK	0.94	0.37
AsK	18.9	5.54

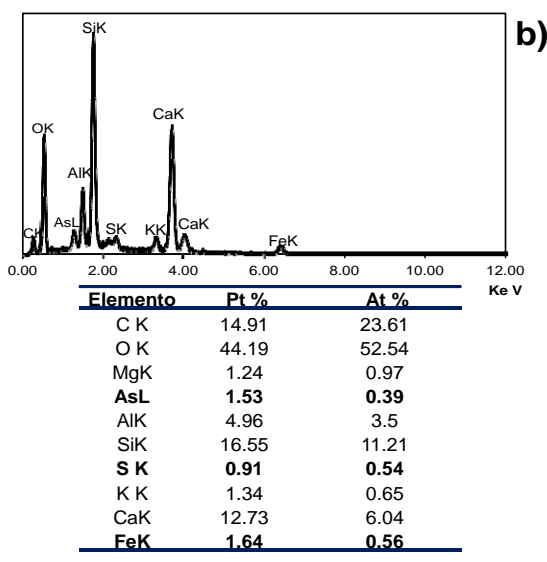
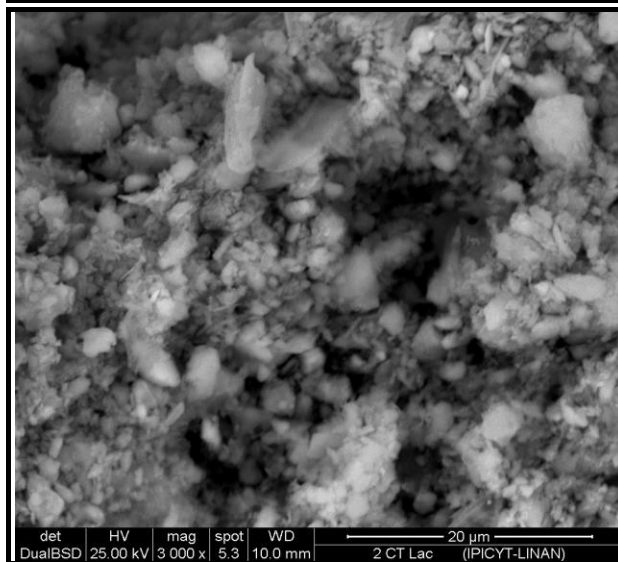
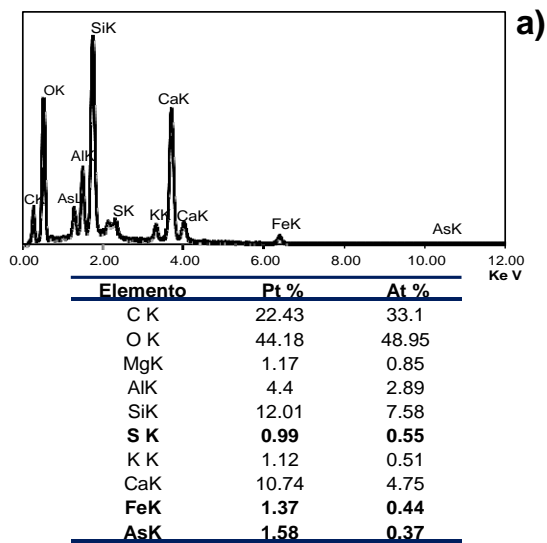
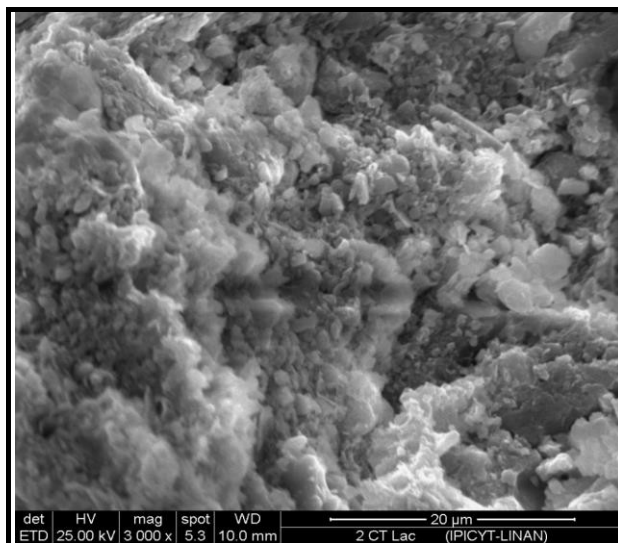


Elemento	Pt %	At %
C K	30.16	49.39
O K	23.32	28.67
AlK	1.32	0.96
SiK	8.24	5.77
S K	11.6	7.12
CaK	5.89	2.89
FeK	0.95	0.34
AsK	18.52	4.86

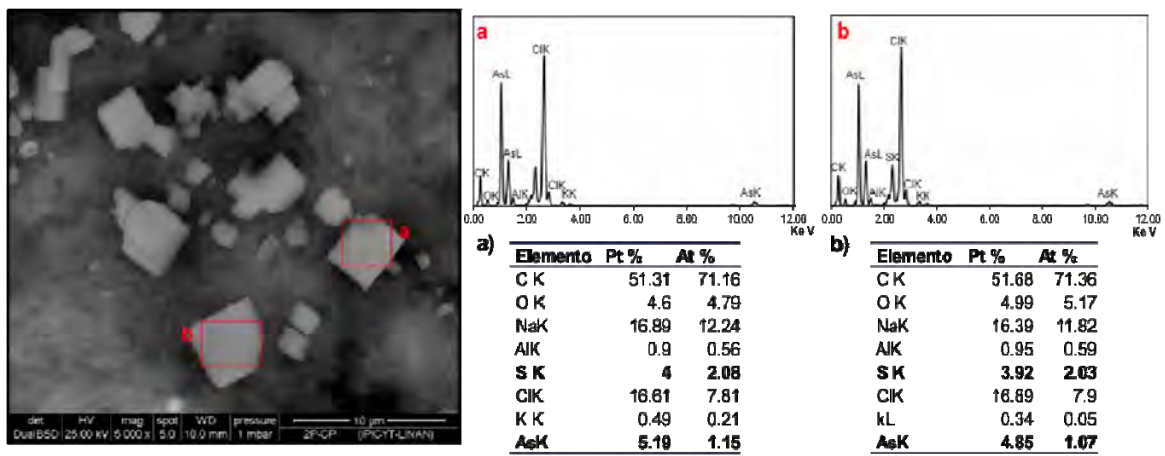
Precipitado amarillo obtenido del ensayo con sedimento CT con 10 mM de cada uno: lactato, As(V) y SO_4^{2-} después de 30 días de incubación.



Precipitado negro obtenido del ensayo con sedimento CT con 10 mM de lactato después de 30 días de incubación.



Anexo 3. Cristales de precipitado amarillo formado en cultivos NMP por adición de sulfuro ~1.5 mM



Anexo 4. Mineralogía de los sedimentos mezclados con el precipitado biogénico formado en los cultivos microbianos: a) CB y b) CT

