



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

Posgrado en Ciencias Ambientales

**Remoción de plomo a través de su precipitación con sulfuro
biogénico empleando un reactor de biopelícula en
membranas**

Tesis que presenta

Ing. Christopher Alejandro Díaz Muñiz

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Ambientales

Directora de tesis

Dra. Aura Virginia Ontiveros Valencia

San Luis Potosí, S.L.P., abril de 2023

Constancia de aprobación de tesis



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. Aura Virginia Ontiveros Valencia.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (1080170) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Acta de examen

“But nature is always more subtle, more intricate, more elegant than what we are able to imagine.”

— Carl Sagan, *The Demon-Haunted World: Science as a Candle in the Dark*

Dedicatorias

A mi familia, por siempre estar.

A mamá, por siempre tener puntos de vista positivos sobre la vida, aun
cuando esta se torna difícil.

A papá, por brindarme todos los días apoyo incondicional y desinteresado.

A Karen, porque esta vida sin hermanos sería muy aburrida.

A Cami, mi ser favorito de cuatro patas.

Agradecimientos

Quiero agradecer infinitamente a la Dra. Aura, por su confianza y apoyo. Sobre todo, por la manera de trabajar, lo que me permitió realizar mi tesis con autonomía. Así mismo, por tener una actitud siempre positiva y afable. Un gran gusto trabajar a tu lado Aura.

También, me gustaría agradecer de manera muy ferviente al Dr. César, cuyo apoyo en la parte fisicoquímica fue invaluable. Muy contento de aprender un poco más de química, equilibrios y termodinámica, lo que sin duda despertó un nuevo interés en mí.

A la Dra. Berenice, por el aporte tan importante que realizó a mi tesis, gracias por compartir tu conocimiento. Igualmente, al Dr. Roberto, cuyos cuestionamientos y contribuciones ayudaron a mejorar el contenido de mi tesis.

A la Mtra. Ma. del Carmen Rocha Medina, por ayudarme a realizar mis análisis y brindarme apoyo cuando lo requería, siempre con una sonrisa, gracias.

Al M. en C. Guillermo Vidriales Escobar, por su apoyo en la realización de análisis químicos.

A mis compañeras de grupo, Aries y Amairani, por los comentarios y gratas discusiones en los seminarios.

A mis compañeros de la “generación pandemia”, cuya amistad forjamos a la distancia, un abrazo a todos ustedes.

A las grandes amistades del “ipi”, que hizo muy ameno mi trabajo experimental: Ivonne, Jess, Francisco, Paola Arjona, Aries, Eno, Mónica, Cristopper, Paola Delgado, Herón, Paloma, Lilia, Chuy y Miguel.

A Malesita, Carmen, Ponchito, Itzel, Arturo, Flor, Lucía, Sandy, Kenia, Georgina, Lupis, Luis y toda la demás gente que me invita de fiesta, a comer o lo que sea.

Contenido

Constancia de aprobación de tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	vi
Agradecimientos	vii
Contenido	viii
Lista de tablas	x
Lista de figuras.....	xi
Lista de anexos.....	xii
Abreviaturas.....	xiii
Resumen	xiv
Abstract.....	xv
1. Introducción	1
1.1 Contaminación del agua por metales	1
1.1.2 Contaminación del agua por plomo.....	1
1.1.3 Contaminación del agua por sulfato.....	2
1.2 Tecnologías para la remoción de plomo y sulfato	3
1.2.1 Uso de bacterias sulfatorreductoras para la remediación de metales	3
1.3 El reactor de biopelícula en membranas	6
1.3.1 Microbiología de los MBfR	7
1.3.2 Crecimiento de bacterias sulfatorreductoras en un MBfR	8
1.3.3 Factores que afectan el desempeño del MBfR	8
2. Hipótesis y objetivos	10
2.1 Hipótesis.....	10
2.2 Objetivos	10
2.2.1 Objetivo general.....	10
2.2.2 Objetivos específicos	10
3. Metodología	10
3.1 Configuración de los reactores	10
3.2 Medio de cultivo e inóculo	11
3.3 Cálculo de las concentraciones en el equilibrio de los componentes químicos en el afluente	12

3.4 Condiciones de operación de los reactores.....	13
3.5 Análisis químicos.....	14
3.6 Remoción de sulfato, plomo y acetato.....	15
3.7 Caracterización de los precipitados formados	15
3.8 Extracción de ADN	15
3.9 Perfiles taxonómicos y análisis de la comunidad microbiana.....	15
4. Resultados y Discusión.....	16
4.1 Actividad sulfatorreductora en los reactores	16
4.2 Remoción de Pb en los reactores.....	19
4.3 Precipitación de Pb en los reactores	22
4.3.1 Reacciones en el equilibrio de los componentes solubles del medio de cultivo y de la solución de Pb	22
4.3.2 Reacciones en el equilibrio entre los componentes solubles del medio de cultivo y de la solución de Pb.....	22
4.3.3 Reacciones en el equilibrio entre el Pb y los componentes solubles en los reactores.....	23
4.5 Análisis de precipitados en la biopelícula	28
4.8 Estructura de las comunidades microbianas	33
5. Conclusiones	41
6. Perspectivas	42
8. Bibliografía	43
9. Anexos.....	52

Lista de tablas

Tabla 1. Remoción de Pb^{2+} y SO_4^{2-} empleando BSR.	4
Tabla 2. Remoción de diferentes contaminantes del agua empleando un MBfR.	7
Tabla 3. Parámetros operativos de los reactores montados en el estudio.	12
Tabla 4. Condiciones experimentales de cada una de las etapas de operación de los reactores.	14
Tabla 5. Componentes iónicos en el medio de cultivo a un pH de 5.	22
Tabla 6. Componentes iónicos de la solución de Pb a un pH de 5 ($[Pb^{2+}] = 200 \text{ mg/L}$; 0.96 mM)..	22
Tabla 7. Precipitados que posiblemente se formaron entre el Pb^{2+} , PO_4^{3-} , Cl^- , OH^- y SO_4^{2-} antes de entrar al reactor R1.	23
Tabla 8. Valores de K_{sp} para los sólidos de Pb e IS calculado para las soluciones de Pb ($[Pb^{2+}] =$ 200 mg/L), medio de cultivo y efluente del reactor.	24
Tabla 9. Cálculo de distribución de especies químicas involucradas en la formación de sólidos de Pb a una concentración de $Pb^{2+} = 200 \text{ mg/L}$ (0.96 mM), $[HS^-] = 73 \text{ mg/L}$ (2.2 mM) y $pH = 9$	26
Tabla 10. Análisis semicuantitativo de los precipitados mostrados en la Figura 8B.	31
Tabla 11. Análisis semicuantitativo de los precipitados mostrados en la Figura 8C.	32
Tabla 12. Análisis semicuantitativo de los precipitados mostrados en la Figura 8D.	32
Tabla 13. Análisis semicuantitativo de los precipitados mostrados en la Figura 9B.	32

Lista de figuras

Figura 1. Esquema del reactor MBfR R2 empleado en el presente estudio.	11
Figura 2. Actividad sulfatorreductora en ambos reactores. A: Remoción de SO_4^{2-} en el R1; B: Flujo volumétrico del afluente del R2; C: Remoción de SO_4^{2-} en el R2.	17
Figura 3. Sulfuro producido en ambos reactores y remoción de acetato en el R2. A: Producción de sulfuro en el R1; B: Producción de sulfuro en el R2; C: Remoción de Acetato durante la Subetapa 2C del R2.	18
Figura 4. Remoción de plomo en ambos reactores. A: Remoción de Pb en el R1; B: Remoción de Pb en el R2.	20
Figura 5. Diagrama de especiación del Plomo en función del pH considerando los componentes principales del efluente en el R2.	25
Figura 6. Contribución a la alcalinidad en el efluente por HS^- , HCO_3^- y AGVs en las distintas etapas de operación del R2.	27
Figura 7. Imagen SEM de los precipitados de PbS acumulados en las biopelículas formadas sobre las membranas.	29
Figura 8. Espectros correspondientes en las regiones señaladas en α , en donde se muestra un corte transversal de la membrana hueca.	30
Figura 9. Espectros correspondientes en las regiones señaladas en β	31
Figura 10. Perfil filogenético de la biopelícula a nivel género en los inóculos y cada una de las etapas de operación del R1 y el R2. Los géneros con abundancias relativas menores al 1 % se agruparon y se muestran en color gris. Las muestras de biopelícula fueron analizadas por duplicado.	37
Figura 11. Índices de diversidad alfa Chao1, Shannon y Simpson calculado para los inóculos y muestras de biopelícula de las diversas etapas de operación en el R1 y el R2. Las muestras de biopelícula fueron analizadas por duplicado.	39
Figura 12. Gráfica del análisis de Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) que señala las diferencias en la comunidad microbiana de los inóculos y la biopelícula bajo diferentes condiciones de operación. Las muestras de biopelícula fueron analizadas por duplicado.	40

Lista de anexos

Anexo 1. Componentes iónicos del medio de cultivo y la solución de Pb	52
Anexo 2. Fases sólidas formadas en el R1.	54
Anexo 3. Ecuaciones varias.....	55
Anexo 4. Comportamiento del pH en el afluente y efluente de ambos reactores.	56
Anexo 5. Fotografías de los reactores R1 y R2.....	57
Anexo 6. Cálculo de la relación metal:sulfuro y azufre:nitrógeno (S/N).....	58
Anexo 7. Estequiometría teórica de la formación de fases de Pb en el EDS e imagen de los precipitados embebidos en la biopelícula.....	59
Anexo 8. Comportamiento del ORP en el afluente y efluente del R2 y valores de OD en el afluente del R1.	60

Abreviaturas

AGV's	Ácidos grasos volátiles
BAP	Productos asociados a la biomasa, del inglés biomass-associated products
BSO	Bacterias sulfuroxidantes
BSR	Bacterias sulfatorreductoras
DAM	Drenaje ácido de mina
DQO	Demanda química de oxígeno
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares, del inglés extracellular polymeric substances
IS	Índice de saturación
MBfR	Reactor de biopelícula en membranas, del inglés membrane biofilm reactor
NMDS	Análisis de escalamiento multidimensional no métrico, del inglés Non-metric multidimensional scaling
ORP	Potencial redox, del inglés oxidation-reduction potential
SEM-EDX	Microscopía electrónica de barrido acoplada a espectroscopía de difracción de rayos X, del inglés Scanning electron microscopy - energy dispersive x-ray spectroscopy.
SMP	Productos solubles microbianos, del inglés soluble microbial products
TRH	Tiempo de retención hidráulico
TRS	Tiempo de retención de sólidos
UAP	Productos asociados a utilización de sustrato, del inglés utilization associated products
UASB	Reactor anaerobio de flujo ascendente, del inglés upflow anaerobic sludge blanket

Resumen

Palabras clave: reactor de biopelícula en membranas, plomo, bacterias sulfatorreductoras, biopelícula, precipitación de metales, sulfuro

La contaminación de agua por metales es uno de los problemas ambientales que ha conducido al desarrollo de una gran cantidad de tecnologías para su tratamiento y reutilización. El reactor de biopelícula en membranas (*membrane biofilm reactor*, MBfR por sus siglas en Inglés) es una alternativa biotecnológica con capacidad para remover contaminantes dada la actividad de una compleja comunidad microbiana que crece en forma de biopelículas que son capaces de transformar diversos contaminantes a sustancias menos nocivas o inertes para el ser humano. El MBfR, utiliza varios sustratos gaseosos como donadores de electrones, entre los que destaca el hidrógeno (H_2). Este reactor se ha utilizado para la remediación de contaminantes de aguas subterráneas; sin embargo, el MBfR tiene el potencial de ser aplicado para el tratamiento de aguas provenientes de procesos industriales, como aquellos efluentes generados en la extracción y/o procesamiento de metales. En la presente investigación, se aplicaron dos MBfR con el fin de determinar su viabilidad en el tratamiento de un agua rica en sulfatos (585 mg/L) y plomo (50, 100 y 200 mg/L), en los cuales, se favoreció el crecimiento de bacterias sulfatorreductoras (BSR). Se montaron dos reactores (R1 y R2) cuya operación entre ambos difirió en la configuración de la alimentación del afluente con el fin de favorecer la precipitación de plomo con el sulfuro producido por las BSR. Así mismo, se calcularon las concentraciones en el equilibrio de diferentes reacciones para determinar las condiciones (concentración de sulfuro, pH), bajo las cuales el plomo precipitó con sulfuro y formó sulfuro de plomo (PbS). Muestras de la biopelícula microbiana fueron analizadas por espectroscopía de rayos x (EDX), con el objetivo de detectar la presencia de Pb en la biopelícula, así mismo se secuenció el gen 16S rRNA de las muestras de biopelícula microbiana para determinar la estructura de la comunidad microbiana. Los resultados muestran que, tanto en el R1 como en el R2, la producción de sulfuro fue suficiente (> 100 mg/L) para poder precipitar el plomo, cuyos valores de remoción alcanzaron valores de hasta 99 %. No obstante, el proceso de precipitación de plomo en el R1, en un inicio se debió a su interacción con compuestos de fósforo, que después, al incrementarse la concentración de sulfuro en el sistema, pudieron estabilizarse como PbS. En cambio, en el R2, con las modificaciones de alimentación del afluente realizadas en el reactor y según los cálculos en el equilibrio, la remoción de Pb fue debido a su precipitación con sulfuro, sin formar otras especies químicas. Para el caso del R2, el análisis de los precipitados atrapados en la biopelícula sugiere ser PbS. Por otra parte, la comunidad microbiana, al final de la operación de ambos reactores, poseyó una muy baja diversidad microbiana, caracterizada por la dominancia de pocos géneros, entre el que destacó el género de BSR *Desulfomicrobium*, el cual, pudo ser el responsable de la producción de la mayor parte del sulfuro en ambos reactores.

Abstract

Key words: MBfR, lead, sulfate reducing bacteria, biofilm, metal precipitation, sulfide

Water contamination by metals is an environmental problem that has promoted the development of several technologies for water treatment and reutilization. The membrane biofilm reactor (MBfR) is a biotechnological approach with proven capacity to remove pollutants by the activity of a complex microbial communities capable of growing as biofilms; these biofilm communities are capable to transform contaminants to less toxic substances for human beings. The MBfR employs several gaseous substrates as electron donors such as hydrogen (H_2). This reactor has mainly been applied to the remediation of underground contaminants; however, the MBfR has great potential for the treatment of several types of industrial waters, metal processing, and mining activities. In this research, two MBfR were applied to treat a synthetic water rich in sulfate (585 mg/L) and lead (50, 100 and 250 mg/L), to allow the establishment of sulfate reducing bacteria (SRB) within the biofilm community. R1 and R2 MBfRs were assembled with different influent's setup to favor the precipitation of lead with the sulfide produced by SRB. Likewise, a speciation model was developed to illustrate the equilibrium concentration of the compounds in the synthetic water under different conditions (i.e., sulfide concentration and pH) to determine the conditions in which lead reacted with sulfide to favor its precipitation as lead sulfide (PbS). Also, biofilm samples were taken to be analyzed by both Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX) to detect the presence of lead in the biofilm's precipitates, and by sequencing the 16S rRNA gene to elucidate the biofilm microbial community structure. The results of R1 and R2 showed that the produced sulfide was enough (> 100 mg/L) to react with lead and precipitate it, achieving a lead removal up to 99 %. Nevertheless, and before entering R1, lead precipitation could be due to interactions with phosphate, but once the concentration of sulfide increased in the system these compounds could stabilize as PbS. In R2, Pb entered the reactor separately, and the equilibrium calculations, pointed out that the removal of lead could be due to its precipitation with sulfide without production of other lead precipitates. For R2, the EDX analysis showed that the chemical composition of the precipitates likely correspond to PbS. Finally, the microbial communities were dominated only by few bacterial genera and showed a very low microbial diversity. *Desulfomicrobium* was the dominant SRB genus, which could be responsible to produce most of the sulfide in both reactors.

1. Introducción

1.1 Contaminación del agua por metales

El agua es uno de los recursos más preciados y explotados por la humanidad, permitiendo que su uso, junto al de otros recursos, haya resultado en un desarrollo vertiginoso de la población humana. A pesar de que el agua representa un recurso clave para el sustento de las sociedades humanas, esta no ha estado exenta de su mal aprovechamiento y contaminación. Con el aumento de la población, diferentes actividades como la agricultura y la minería han provocado la contaminación de un número importante de recursos hídricos. Existe una vasta cantidad de sustancias químicas que son capaces de causar contaminación hídrica, entre los que se encuentran nutrientes, como el nitrógeno y el fósforo, materia orgánica, metales, productos sintéticos, entre los que destacan pesticidas, farmacéuticos y colorantes, así como microorganismos patógenos [1], [2].

Los metales constituyen un grupo de contaminantes del agua muy importante debido a que un gran número de actividades antropogénicas son fuente de contaminación de metales, entre los que se incluyen cadmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), mercurio (Hg), níquel (Ni), plomo (Pb), uranio (U), zinc (Zn), principalmente. La característica más importante de este grupo de contaminantes es que estos no pueden ser degradados, como es el caso de compuestos orgánicos, y su especiación química y biodisponibilidad están fuertemente influenciadas por el pH y las condiciones redox del medio en el que se encuentran [2].

1.1.2 Contaminación del agua por plomo

El Pb es uno de los metales más demandados debido a los múltiples usos que se le da. Por ejemplo, es utilizado en baterías para vehículos, pigmentos, pinturas, varillas para soldadura, vitrales, municiones, esmaltes cerámicos, joyería y como constituyente de algunos cosméticos y medicamentos [3]. Sin embargo, debido a la naturaleza tóxica del Pb, puede generar varias afecciones a la salud humana y es capaz de afectar a casi cualquier órgano, de los cuales, el sistema nervioso puede llegar a ser el más comprometido [4]. En general, el Pb puede suprimir el sistema inmune, volviendo a los individuos expuestos más vulnerables a contraer infecciones, ser tóxico para los riñones, causar algunos tipos de cáncer, aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, reducir la fertilidad en hombres y causar anemia. Además, en mujeres embarazadas, el Pb aumenta la presión arterial del feto e interfiere en su desarrollo neurológico [5]–[8]. Debido a la alta toxicidad del Pb, diferentes legislaciones han establecido límites máximos permisibles de Pb en agua, así por ejemplo, en México se establece un límite máximo permisible de 0.01 mg/L de Pb en agua para consumo humano y 0.5 mg/L y 1 mg/L para aguas tratadas que se descargan en cuerpos receptores propiedad de la Nación y al alcantarillado urbano, respectivamente [9]–[11].

Como se mencionó, diferentes actividades emplean Pb para la fabricación de distintos productos. La manufactura de pinturas y la industria del electrolgalvanizado, pueden llegar a liberar entre 10 y 25 mg/L de Pb [12], [13], causando contaminación en el suelo, aire y agua. La minería de Pb es una de las actividades que mayor cantidad de este elemento libera al ambiente, pues su extracción implica el procesamiento de minerales ricos en este metal, como la galena (PbS), los cuales se someten a un proceso de calcinación, que produce óxido de plomo (PbO) y sulfato de plomo (PbSO₄), a los cuales se les agregan diferentes agentes químicos con el fin de extraer el Pb. En todo el proceso se libera Pb en forma de polvo, así como, escorias ricas en sulfato (SO₄²⁻) y otros metales, como Cd o Zn [3]. Los residuos generados siguen teniendo una importante cantidad de Pb (> 5000 mg/kg de Pb) [14] contenido en minerales como la galena, esfalerita y otros minerales de sulfuro, los cuales, al estar expuestos a determinadas condiciones ambientales (exposición al agua y oxígeno), pueden generar drenaje ácido de mina (DAM), liberando al ambiente sulfatos, movilizándolo metales y disminuyendo el pH. El Pb puede contaminar el suelo, llegar a cuerpos de agua, entrar en contacto con plantas y animales (a través de la red trófica) y/o ser sorbidos por el suelo o sedimentos, los cuales, pueden actuar como una fuente secundaria de contaminación. Además, el agua utilizada en el proceso de extracción de Pb, si no es tratada adecuadamente, también puede llegar a ser una fuente de contaminación importante [3], [15].

La fabricación de baterías ácidas de Pb es otra de las actividades que genera aguas residuales altamente contaminadas con este metal. Típicamente un agua residual proveniente de una planta que fabrica o recicla baterías ácidas está constituida principalmente por ácido sulfúrico (H₂SO₄) a un pH de entre 1.2 y 3 unidades, así como Pb que puede encontrarse en concentraciones que van de 5 a 15 mg/L de Pb [16], incluso alcanzando concentraciones de 50 mg/L [17], [18]. Por otro lado, la manufactura de baterías ácidas es capaz de generar contaminación de cuerpos de agua circundantes a las instalaciones de las fábricas, pudiéndose encontrar Pb en aguas superficiales y subterráneas [19], generando no solo problemas de salud, sino también ambientales.

1.1.3 Contaminación del agua por sulfato

Como se mencionó con anterioridad, la extracción minera de Pb, aparte de liberar al ambiente cantidades apreciables de metales, también, liberan otros compuestos constituyentes de dichos minerales. Uno de estos compuestos es el oxoanión SO₄²⁻ el cual es producido debido a que los residuos de minerales ricos en sulfuro son expuestos a agua y oxígeno. La oxidación de sulfuros metálicos es la principal causa de introducción de iones de SO₄²⁻ en el ambiente dado que, la mayoría de los metales están contenidos en forma de sulfuros metálicos, la contaminación por este ion es bastante común en operaciones mineras [20].

Los sulfuros metálicos son químicamente estables en condiciones donde no están en contacto con H₂O y O₂, sin embargo, una vez que estos se ponen en contacto con

dichos compuestos, la oxidación de sulfuro da lugar a la formación de DAM [21], [22]. De igual manera, las reacciones mediadas por microorganismos juegan también un papel clave en la generación de DAM, pues ciertos grupos microbianos son capaces de oxidar a los minerales de sulfuro y contribuir a la liberación de SO_4^{2-} , metales y disminución del pH, generando un importante impacto en el ambiente [23].

1.2 Tecnologías para la remoción de plomo y sulfato en agua

La remoción de metales pesados y SO_4^{2-} de aguas residuales o contaminadas con estos elementos puede llevarse a cabo por varios métodos, entre los que destacan la precipitación química, intercambio iónico, adsorción, filtración por membranas, coagulación-floculación, flotación, procesos electroquímicos, así como, procesos mediados por organismos como la fitorremediación, biosorción y procesos de oxidoreducción microbianos. Para el caso de SO_4^{2-} , sobresale la precipitación, en la que se emplea principalmente cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) [24], además, el uso de microorganismos capaces de transformar el SO_4^{2-} a sulfuro ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento de este oxoanión. Otros métodos, como la electrocoagulación, filtración por membranas y adsorción, también se han implementado aunque su uso es más reciente [20]. La precipitación química es el método más empleado en la industria para la remoción de metales en agua, debido a que es un proceso simple, efectivo en un amplio rango de temperaturas y económicamente razonable [24]. Algunos compuestos comúnmente utilizados en la precipitación química de Pb incluyen al hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), carbonato de sodio (Na_2CO_3) y sulfuro de sodio (Na_2S) [24], [25]. De estos compuestos, la precipitación de Pb con sulfuro presenta varias ventajas, como la de alcanzar concentraciones residuales muy bajas (<0.01 mg/L), siendo más eficiente que la precipitación con otros agentes precipitantes [26].

1.2.1 Uso de bacterias sulfatorreductoras para la remediación de metales

Una manera práctica y sostenible de precipitar metales con sulfuro es la de utilizar el metabolismo de las bacterias sulfatorreductoras (BSR). Las BSR son un grupo de microorganismos que comprende tanto bacterias como arqueas, los cuales, tienen la capacidad de reducir SO_4^{2-} a sulfuro bajo condiciones anóxicas [27]. Este grupo de microorganismos juega un papel importante en el ciclo del azufre, pues utilizan SO_4^{2-} como aceptor final de electrones para la degradación de compuestos orgánicos en distintos ambientes pobres en O_2 , resultando en la producción de sulfuro el cual, a su vez, puede ser oxidado por bacterias oxidadoras de sulfuro en presencia de O_2 o por bacterias fototróficas del sulfuro en condiciones anóxicas [27]. Una gran diversidad de procariontes son capaces de llevar a cabo la sulfatorreducción y, por lo tanto, una gran variedad de sustratos se puede utilizar para promover este metabolismo, entre los que destacan el formiato, metanol, etanol, lactato, acetato, propionato, butirato, azúcares como la glucosa, hidrocarburos como el etilbenceno, así como materia orgánica compleja, como lodos de aguas residuales, estiércol, hojarasca, aserrín y celulosa, los cuales son ricos en carbono [28]. Así mismo, existen BSR que son capaces de crecer de manera autotrófica, empleando hidrógeno molecular (H_2) como donador de electrones y

dióxido de carbono (CO₂) como fuente de carbono. Las **Ecuaciones 1 y 2** muestran como a partir de diferentes donadores de electrones (hidrógeno y acetato, respectivamente), se puede llevar a cabo el proceso de sulfatorreducción [27].

La aplicación de BSR en el tratamiento de aguas ricas en sulfatos y metales (incluido el Pb) está basado en su capacidad para convertir SO₄²⁻ a sulfuro utilizando alguno de los donadores de electrones antes mencionados. El sulfuro producido reacciona con los metales en solución, generando un precipitado de baja solubilidad fácilmente removible del agua (**Ecuación 3**).



¹Datos tomados de Thauer et al., (1977) [29].

²Donde M²⁺ es un metal como Cd²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, etc.

La **Tabla 1** muestra varios estudios donde se ha demostrado la remoción de Pb y SO₄²⁻ empleando BSR, utilizando diferentes donadores de electrones y tipos de reactor.

Tabla 1. Remoción de Pb²⁺ y SO₄²⁻ empleando BSR.

[Pb ²⁺] ₀ (mg/L)	[SO ₄ ²⁻] ₀ (mg/L)	Remoción de Pb ²⁺ (%)	Remoción de SO ₄ ²⁻ (%)	Donador de electrones	pH	Tipo de reactor*	Referencia
50	200	85-95	50	Etanol	7.5-8.5	UASB	Hoa et al., 2007 [30]
20	8400	99	30-45	H ₂	7-7.5	GLR	Teekayuttasakul & Annachatre, 2008 [31]
20-200	1500	99	60-94	Etanol	7	UASB	Velasco et al., 2008 [32]
10	1000	96-99	17-38	Lactato	7.5	IFBR	Villa-Gomez et al., 2011 [33]
100-200	2170	99-100	75	Lactato	7.5	MBBR	Kieu et al., 2015 [34]
50-90	1000	92	60-65	Lactato	7	DFCR	Kiran et al., 2018 [35]

*UASB: upflow anaerobic sludge blanket reactor; GLR: gas lift reactor; IFBR: inversed fluidized bed reactor; MBBR: moving bed biofilm reactor; DFCR: downflow column reactor.

Para que el tratamiento de aguas ricas en SO₄²⁻ y metales sea exitoso, mediante la formación de sus respectivos sulfuros metálicos, el objetivo más importante que debe establecerse es asegurar el crecimiento de las BSR [36]. A su vez, el diseño de un reactor sulfurogénico apropiado depende de varios parámetros, de los cuales se pueden clasificar en tres categorías según Kiran et al., (2017) [36]: 1) composición microbiana, 2) características fisicoquímicas del afluente y 3) el diseño y operación del reactor. 1) La composición microbiana se refiere al tipo de microorganismos que se establecen en el reactor, depende del inóculo utilizado y de si este se opera con una comunidad mixta o con cepas puras. Este parámetro es esencial para poder operar el reactor de una manera

eficiente. 2) Las características fisicoquímicas del afluente también juegan un papel importante, pues influyen en el establecimiento de los microorganismos en el reactor. Entre estos parámetros se encuentran el pH, concentración de SO_4^{2-} , concentración de metales, presencia de materia orgánica, elementos traza, salinidad y presencia de otros contaminantes. Así, por ejemplo, un bajo pH (<5) puede resultar tóxico para las BSR, pero un pH moderadamente alcalino (>8) puede favorecer su crecimiento [37], [38]. Además, el pH determina la especiación de los iones metálicos, influyendo en su precipitación [26], [36]. 3) En cuanto al diseño del reactor, se destaca el área superficial sobre la cual se pueden establecer los microorganismos; respecto a la operación del reactor, se encuentran parámetros como temperatura, fuente de energía y carbono, cantidad de sulfuro a producir, velocidad de flujo, exposición a O_2 , tiempo de retención hidráulico (TRH), tiempo de retención de sólidos (TRS), condiciones de mezclado, adición de nitrógeno y fósforo o el potencial redox (ORP).

Los parámetros antes mencionados se toman en cuenta para la selección apropiada de cada tipo de reactor, con el fin de asegurar la eficiencia adecuada para la remoción de metales y SO_4^{2-} en aguas residuales.

Aparte de los reactores mencionados en la **Tabla 1**, otro tipo de reactores se han aplicado para promover la sulfatorreducción y así remover metales y SO_4^{2-} del agua, como son los reactores de filtros anaerobios (AFRs, por sus siglas en inglés), reactor de baffles anaerobios (ABR), reactor híbrido anaerobio (AHR), reactor de flujo continuo y tanque agitado (CSTR), reactor anaerobio de película fija, reactor anaerobio de lecho empacado, reactores en columnas, entre otros. Una excelente revisión de los reactores empleados para la remoción, tanto de metales como de SO_4^{2-} , empleando BSR puede encontrarse en Kiran et al., (2017) [36].

Algunos de los reactores antes mencionados han sido aplicados a escala piloto e industrial para el tratamiento de DAM o de aguas contaminadas con SO_4^{2-} y metales. Por ejemplo, Xyngyu et al., (2013) [39], utilizó un reactor UASB de 3 m^3 de volumen para la generación de H_2S empleando lodos activados como fuente de carbono y electrones, a partir de un efluente ácido (pH= 2.34-2.56) rico en SO_4^{2-} (2000-2500 mg/L), para posteriormente utilizarlo en la precipitación de Fe^{2+} y cobre (Cu^{2+}), con concentraciones de 170-200 y 100-120 mg/L, respectivamente, alcanzando remociones de 97.83 % para Fe^{2+} y 60.95 % para Cu^{2+} . En el trabajo de Nielsen et al., (2018) [40], el proceso de sulfatorreducción ($[\text{SO}_4^{2-}]_0=417.6\pm 130.6 \text{ mg/L}$) se llevó a cabo en reactores en lote (200 L) en un clima subártico (5-17 °C), para la precipitación de zinc ($[\text{Zn}^{2+}]_0=0.2-0.9 \text{ mg/L}$) y cadmio ($[\text{Cd}^{2+}]_0=0.004-0.014 \text{ mg/L}$) empleando melaza como fuente de carbono. En dicho estudio se alcanzaron remociones de Zn^{2+} de 20.9-89.3 % y de Cd^{2+} de 39-90.5 %. También, se han aplicado las BSR para el tratamiento de aguas utilizadas en procesos de galvanoplastia, siendo capaces de remover níquel (Ni^{2+}) empleando reactores de flujo continuo (240 L) y lactato como fuente de carbono y energía, alcanzando remociones de Ni^{2+} del 99.9 % ($C_0=441.44 \text{ mg/L}$) [41].

En su mayoría, los reactores empleados en el proceso de sulfatorreducción promueven el crecimiento de microorganismos en forma agregada, específicamente en forma de biopelículas. Una biopelícula puede definirse como un agregado de microorganismos en donde las células están embebidas en una matriz hecha de sustancias poliméricas extracelulares (*extracellular polymeric substances*, EPS por sus siglas en inglés) que mantiene a los microorganismos unidos entre sí y/o a una superficie inerte [42]. Las razones por las que los microorganismos se asocian en biopelículas son varias, entre las que destacan una mejora en la adquisición de nutrientes, la creación de un ambiente más habitable, así mismo, permite el establecimiento de relaciones sinérgicas entre diferentes grupos de microorganismos, además de brindar protección contra el estrés ambiental (depredación, desecación, resistencia a sustancias tóxicas), etc. [43]. Las ventajas del crecimiento microbiano en forma de biopelículas han sido extensamente explotadas biotecnológicamente, pues muchos procesos aprovechan este tipo de asociación para poder no solo remover contaminantes sino, también, para la producción de biocombustibles u otros productos de interés comercial [44]. Por estas múltiples razones, muchos de los reactores antes mencionados favorecen el crecimiento de BSR en forma de biopelículas.

1.3 El reactor de biopelícula en membranas

A diferencia del uso de compuestos orgánicos, un menor número de trabajos se han realizado empleando microorganismos hidrogenotróficos para llevar a cabo la sulfatorreducción, pues suplementar gas H_2 presenta algunas desventajas, como su baja solubilidad en agua (1.6 mg/L a 1 atm de H_2 y 25 °C), o el de ser altamente flamable, lo que ha limitado su aplicación [45]. A pesar de estas desventajas, el H_2 resulta ser un donador de electrones excelente, pues no es tóxico para los humanos, no produce grandes cantidades de biomasa en los reactores a diferencia del uso de compuestos orgánicos, y puede ser utilizado por un gran número de microorganismos. Además, el H_2 posee un costo razonable y recientemente se han desarrollado nuevos sistemas para suplementarlo de manera segura y precisa [46]. El reactor de biopelícula en membranas (MBfR, por sus siglas en inglés), depende del desarrollo de biopelículas que crecen sobre membranas o fibras huecas. El H_2 es suplementado desde el interior de estas fibras hacia la biopelícula, que crece en el lado externo de las fibras, mientras que los contaminantes a eliminar se encuentran en el seno del líquido. Tanto el H_2 como los contaminantes se difunden dentro de la biopelícula creando un gradiente contra-difusional [47]. El MBfR ofrece una solución segura para suplementar H_2 , con la posibilidad de poder alcanzar altas tasas de remoción, así, el H_2 es suministrado a altas concentraciones por membranas presurizadas, el cual es consumido en la biopelícula antes de alcanzar el seno del líquido [46]. Este reactor ha sido evaluado con éxito para la remoción de una gran variedad de contaminantes utilizando H_2 como donador de electrones (**Tabla 2**) [48], [49]. Aparte de H_2 , diferentes sustratos gaseosos pueden suplementarse a través de las membranas, como metano (CH_4) u oxígeno (O_2), para el tratamiento de otros contaminantes [50].

1.3.1 Microbiología de los MBfR

El “centro reactivo” del MBfR es la biopelícula microbiana, la cual se encarga de la remoción de los contaminantes mediante su biodegradación o transformación en sustancias menos tóxicas. Las bacterias consumen el H₂, al mismo tiempo que remueven los contaminantes objetivo. La **Tabla 2** muestra diversos contaminantes tratados exitosamente en reactores MBfR ya sea solos o en mezclas complejas. En las biopelículas microbianas del MBfR se establecen diferentes grupos microbianos (cuando se trabajan con consorcios mixtos), los cuales interactúan de diferente manera, dependiendo de las sustancias a remover y las condiciones de operación del reactor. En un MBfR alimentado con H₂, se pueden categorizar cuatro tipos de biomasa existentes en la biopelícula: 1) Bacterias oxidadoras de H₂, las cuales utilizan el H₂ como donador de electrones, mientras reducen los contaminantes a especies químicas menos peligrosas, produciendo EPS y productos asociados al consumo (*utilization-associated products*, UAP, por sus siglas en inglés) como subproductos; 2) Bacterias oxidadoras de productos solubles microbianos (*soluble microbial products*, SMP por sus siglas en Inglés), los SMP comprenden a los UAP y productos asociados a la biomasa (*biomass-associated products*, BAP, por sus siglas en Inglés), los cuales promueven el crecimiento de bacterias heterótrofas que consumen SMP, ayudando también a remover los contaminantes; 3) EPS, que ayudan a mantener unida a la biopelícula entre sí y con la membrana, conformándose principalmente de proteínas y carbohidratos; 4) biomasa inerte, que aparece debido a que la biomasa activa sufre procesos de respiración endógena [43], [49].

Tabla 2. Remoción de diferentes contaminantes del agua empleando un MBfR.

Contaminante tratado	Referencia
AsO ₄ ³⁻ , CrO ₄ ²⁻ , SeO ₄ ²⁻	Chung et al., 2006 [51];
BrO ₃ ⁻	Downing & Neremberg, 2007 [52]
C ₂ HCl ₃ , C ₂ H ₃ Cl ₃	Chung et al., 2008b [53]
NDMA	Chung et al., 2008 [54]
NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	Tang et al., 2010 [55]
ClO ₄ ⁻	Zhao et al., 2011 [56]; Ontiveros-Valencia et al., 2014 [57]
Pd ²⁺	Zhou et al., 2016 [58]
SeO ₄ ²⁻	Ontiveros-Valencia et al., 2016 [59]; Esquivel-Hernández et al., 2021 [60]
SO ₄ ²⁻	Ontiveros-Valencia et al., 2016 [59]; Suárez et al., 2020 [61]
U ₂ ²⁺	Zhou et al., 2014 [62]; Ontiveros-Valencia et al., 2017 [63]

Manejar las comunidades microbianas que se establecen en una biopelícula puede ser un proceso muy retador, ya que varios factores intervienen en su estructuración, como la capacidad de liberación del sustrato, la carga superficial del aceptor/donador de electrones, la presencia de varios contaminantes a la vez e, incluso, el tipo y cantidad de EPS producidos en la biopelícula durante la operación del reactor [48]. Las biopelículas pueden ser muy complejas en cuanto a su estructuración microbiana, pero el ajuste de

algunos parámetros, como los antes mencionados, pueden asegurar el desarrollo de una adecuada comunidad microbiana [36], [48].

1.3.2 Crecimiento de bacterias sulfatorreductoras en un MBfR

Diferentes estudios han demostrado que las BSR son capaces de crecer en un MBfR cuando se suplementa H_2 , pero solo unos pocos han tenido por objetivo el desarrollo de la sulfatorreducción como tal. Por ejemplo, el trabajo realizado por Suarez et al., (2020) [61], se favoreció el crecimiento de una biopelícula sulfatorreductora para el tratamiento de un efluente minero rico en SO_4^{2-} (1500 mg/L), calcio (600 mg/L) y otros elementos como aluminio (Al), boro (B), cobalto (Co), cobre (Cu), flúor (F) y magnesio (Mg), principalmente. En este estudio se alcanzaron remociones de SO_4^{2-} de hasta 99 %, demostrando la alta eficiencia de este reactor en cuanto a remoción de SO_4^{2-} . Al mismo tiempo, en el análisis de la comunidad microbiana, se encontró una alta diversidad y que las BSR poseían una abundancia relativa de 15 a 20 % en la biopelícula, siendo *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium* los géneros dominantes de BSR. Otros géneros encontrados fueron *Sulfurospirillum*, *Fusibacter* (reductores de tiosulfato y azufre elemental), oxidadores de sulfuro como *Sulfuricurvum* y heterótrofos no BSR como *Paludibacter* y *Tisierella*. Por otro lado, los estudios llevados a cabo por Ontiveros-Valencia et al., (2012) [64] y Xia et al., (2020) [65], se enfocaron en analizar cómo el proceso de sulfatorreducción se afectó por la presencia de otros aceptores de electrones como NO_3^- , debido a que este es utilizado preferencialmente sobre el SO_4^{2-} , dado que produce una mayor cantidad de energía ($\Delta G^\circ = -560.25$ kJ/reacción para NO_3^- vs -151.9 kJ/reacción para SO_4^{2-} , utilizando H_2 como donador de e^-) [29], [43]. En estos trabajos, se encontraron varios géneros involucrados con el ciclo del azufre, como *Desulfotomaculum* (reductor de SO_4^{2-}), *Desulfitibacter* (reductor de sulfito y azufre elemental) y *Dethiobacter* (reductor de tiosulfato y azufre elemental), *Xanthobacter* y *Starkeya*, ambos géneros capaces de oxidar sulfuro. Aún bajo estas condiciones, las BSR fueron capaces de mantenerse en la biopelícula, esto, debido a su conocida plasticidad metabólica, siendo que algunas especies BSR son capaces de respirar O_2 , reducir NO_3^- a NH_4^+ o fermentar compuestos orgánicos [66]–[68].

A pesar de que el MBfR es un reactor que ha ganado popularidad y que, incluso, se ha aplicado a escala piloto e industrial para el tratamiento de varios contaminantes [49], no existe un trabajo reportado en el que se haya aplicado para la precipitación de metales en forma de sulfuros haciendo uso de la capacidad metabólica de las BSR. Precipitar Pb en forma de PbS, podría no solo ser benéfico en cuanto a tratamiento de agua, también, podría ser una forma de recuperar compuestos de valor, como se ha hecho con el selenio y el paladio [58], [59].

1.3.3 Factores que afectan el desempeño del MBfR

Como en otro tipo de reactores, ciertos factores influyen en la capacidad del MBfR para remover contaminantes, por ejemplo, la carga superficial del contaminante es uno de los factores clave en el desempeño de este tipo de reactores, ya que, dependiendo de la concentración del contaminante, este puede ejercer efectos tóxicos sobre la biopelícula y causar su colapso. Sin embargo, este factor es fácilmente manejable, dado que la carga

superficial de un contaminante puede manipularse, de manera tal, que la concentración de los contaminantes a tratar puede ajustarse a una carga superficial apropiada para su tratamiento, ya sea mediante la variación de su concentración o mediante el ajuste del flujo al cual se alimenta el afluente contaminado [48]. Así mismo, la presencia de dos o más contaminantes pueden representar un reto pues, dependiendo del tipo de contaminantes, algunos pueden ser más fácilmente eliminados que otros, lo cual requeriría el ajuste de ciertos parámetros (como el TRH o la carga superficial) para asegurar su eliminación [48], [55]. También, la cantidad de donador de electrones que se hace llegar a la biopelícula, mediante las membranas presurizadas, afecta la capacidad de la biopelícula para tratar contaminantes. Así, una mayor cantidad de H_2 puede favorecer el consumo de contaminantes, aunque se debe tener cuidado al modificar este factor, puesto que a presiones altas el H_2 (> 2.7 atm aplicadas en membranas de polipropileno) podría no consumirse y desperdiciarse, y favorecer metabolismos indeseados que pudieran afectar el tratamiento de agua [48]. Para el caso particular del MBfR, el manejo de la biopelícula es el factor más importante, pues es la acumulación y actividad de la biopelícula lo que determina su capacidad para remover los contaminantes [49]. Por ejemplo, una biopelícula que es demasiado delgada ($< 30 \mu m$) posee biomasa insuficiente para llevar a cabo las reacciones necesarias para reducir los contaminantes y, por otro lado, una biopelícula muy gruesa ($> 450 \mu m$) incrementa la resistencia al transporte de los contaminantes dentro de la misma, provocando una disminución en su actividad y, por ende, disminuyendo su capacidad para remover contaminantes [49]. En varios estudios se han probado diferentes técnicas para manejar biopelículas muy gruesas como, por ejemplo, aplicando esfuerzos cortantes, abrasiones y turbulencia, lo que provoca desprendimiento y erosión de la biomasa. Entre estas técnicas destacan el aumento de la tasa de recirculación, aplicación de burbujeo de algún gas, adición de cilindros plásticos que permitan el desprendimiento de biomasa, así como el uso de sustancias químicas como ácido clorhídrico (HCl) y algunos tipos de surfactantes [69]–[72].

Por otro lado, muchos de los procesos de reducción de contaminantes, sobre todo los que incluyen oxoaniones como el SO_4^{2-} , el pH tiende a aumentar debido a que la reducción de especies oxidadas consume protones. El aumento del pH puede afectar las comunidades microbianas de la biopelícula disminuyendo su actividad, además de favorecer la precipitación de algunos minerales como carbonato de calcio e hidroxiapatita [73]. Este problema puede resolverse controlando el pH automáticamente dentro del reactor añadiendo un ácido o una base, como HCl [74]. También, se ha comprobado que al suplementar CO_2 a través de una mezcla gaseosa H_2/CO_2 , este último es capaz de funcionar como buffer y controlar el pH de manera efectiva [65].

Los MBfR's que se han aplicado hasta el momento se han enfocado en la eliminación de compuestos que pueden ser utilizados por los microorganismos de la biopelícula como aceptores de electrones directamente (ClO_4^- , NO_3^- , SO_4^{2-}) los cuales son transformados a especies químicas fácilmente removibles del agua (N_2 , Cl^- , H_2S). Algunos de estos contaminantes, como el caso del SeO_4^{2-} y el Pd^{2+} , al ser reducidos

químicamente, forman especies químicas en fase sólida (Se^0 y Pd^0) que, a diferencia del NO_3^- o el ClO_4^- , quedan retenidos en la matriz de la biopelícula. Hasta el momento, no se ha explorado la precipitación de metales, en este caso Pb, mediante el sulfuro producido por una biopelícula sulfatorreductora en un MBfR. Este proceso, a diferencia de los anteriormente mencionados, implicaría en un primer paso la formación de sulfuro biogénico por parte de la biopelícula, para que posteriormente en un proceso de precipitación química reaccione con el Pb en solución, formando PbS que pueda quedar retenido en la biopelícula finalmente, siendo tanto el SO_4^{2-} como el Pb removidos total o parcialmente del afluente contaminado.

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

En un reactor MBfR alimentado con H_2 se desarrollará una biopelícula sulfatorreductora capaz de producir sulfuro para precipitar Pb y formar PbS, de manera que este último pueda quedar atrapado en la biopelícula.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Favorecer el crecimiento de bacterias sulfatorreductoras en la biopelícula de un MBfR, con el fin de producir sulfuros y precipitar Pb en forma de PbS, bajo diferentes condiciones de operación.

2.2.2 Objetivos específicos

- Remover Pb^{2+} y SO_4^{2-} de un agua sintética, precipitándolos como PbS, principalmente.
- Determinar las condiciones químicas y de especiación bajo las cuales se favorece la formación de PbS.
- Caracterizar los precipitados formados en la biopelícula, con el fin de constatar la retención de Pb en la biopelícula.
- Describir los cambios en las comunidades microbianas de la biopelícula en cada una de las etapas empleando secuenciación de nueva generación, con el fin de caracterizar la estructura de estas comunidades bajo diferentes condiciones operacionales.

3. Metodología

3.1 Configuración de los reactores

Se utilizaron dos reactores MBfR (R1 y R2) similares al empleado por Ontiveros-Valencia et al., (2012) [64]. Cada reactor constó de dos tubos de vidrio interconectados (27 cm de longitud y 1.9 cm de diámetro c/u) por una manguera de neopreno y aditamentos de plástico. En el tubo primario, en el que existe una mayor actividad biológica debido al mayor número de membranas que contiene, se insertó un set de 50 membranas de polipropileno no poroso (Teijin, Ltd., Japan), fijadas en sus extremos con

pegamento. En el tubo secundario, usado para muestreo de la biopelícula y con un número menor de membranas, se insertó un set de 25 membranas, ajustada con pegamento y sellada en uno de sus extremos. Las fibras de polipropileno tienen un coeficiente de permeación de $0.0014 \text{ cm}^2/\text{d}$ de H_2 [75]. El volumen total del reactor fue de 60 mL. El gas que sirvió como donador de e^- estuvo constituido por 100 % de H_2 y fue suplementado al lumen de las fibras a una presión controlada, el cual se difundió a través de las paredes de las membranas de polipropileno. Se montaron dos experimentos en diferente tiempo, dado que en el reactor 1 (R1) el modo en que este fue operado se favoreció la precipitación abiótica de Pb, por tal motivo, se montó un segundo reactor (R2) con modificaciones en la alimentación de la solución de Pb (**Tablas 3 y 4**), con el objetivo de favorecer la precipitación de Pb con el sulfuro producido por las BSR. En la **Figura 1** se muestra el esquema del R2, la única diferencia con el R1 es que, en este último el medio de cultivo y la solución de Pb entraban al tubo secundario bajo un mismo flujo (una sola manguera para ambas soluciones). Mientras que en el R2 el medio de cultivo entró al tubo primario de manera independiente a la solución de Pb.

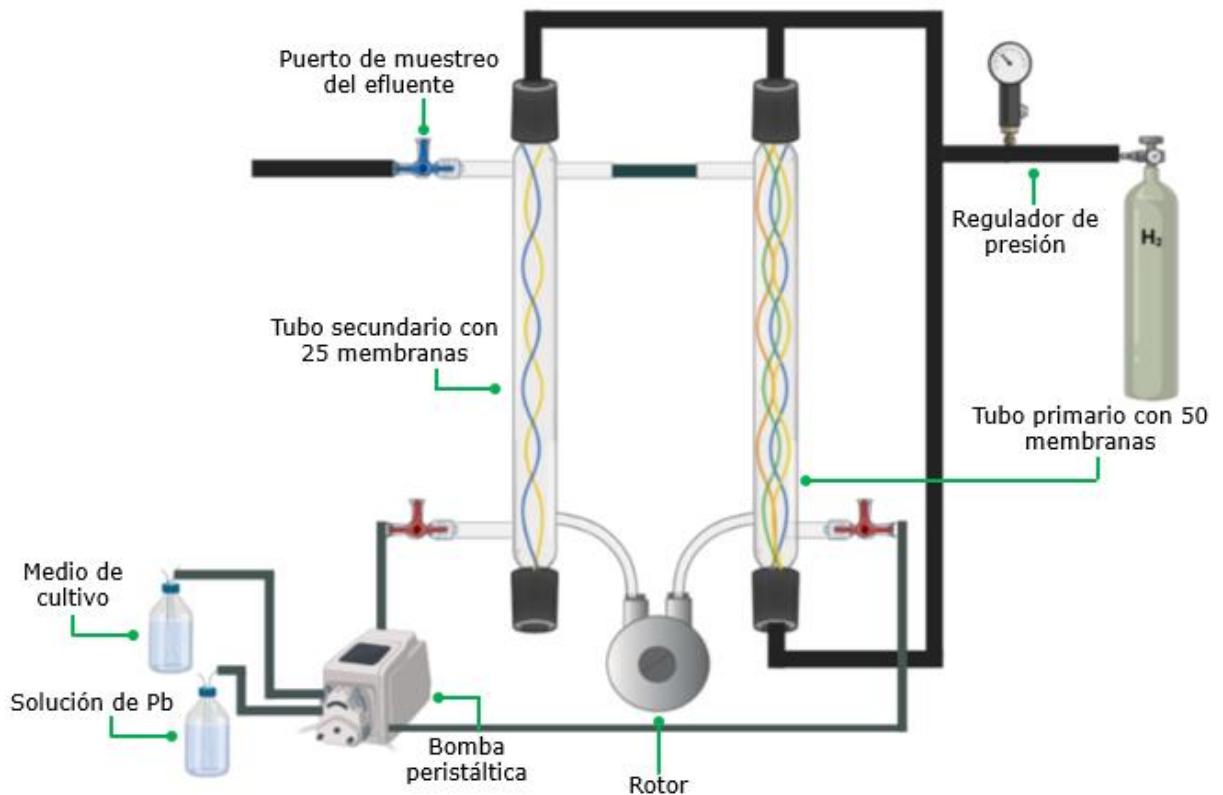


Figura 1. Esquema del reactor MBfR R2 empleado en el presente estudio.

3.2 Medio de cultivo e inóculo

El reactor se alimentó con un medio de cultivo similar al reportado por Chung et al., (2006) [76], disminuyendo las concentraciones de la fuente de fosfatos y NO_3^- . La composición del medio fue la siguiente (mg/L): KH_2PO_4 , 12.8; Na_2HPO_4 , 43.4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 218; NaNO_3 , 6.1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1; MgCl_2 , 3.4; 1 mL de solución de elementos traza. También, se agregaron 40 mg/L (0.656 mM) de bicarbonato

(HCO₃⁻) como fuente de carbono inorgánico, utilizando bicarbonato de sodio (NaHCO₃). El medio se esterilizó en autoclave antes de suplementarlo al reactor.

Ambos reactores, R1 y R2, fueron inoculados con 6 mL y 20 mL, respectivamente, con un lodo activado proveniente de la zona anóxica de la planta de tratamiento Agua Tratada del Potosí, S.A. de C.V., que, para el caso del inóculo del R2 contenía 4.48±0.07 g/L de sólidos suspendidos volátiles (SSV) (al inóculo del R1 no se le midieron los SSV). Los reactores se dejaron en lote por 3 días (R1) o por 8 días (R2) después de la inoculación, para después ponerlos en operación continua de acuerdo con la primera Etapa (**Tabla 3**).

Tabla 3. Parámetros operativos de los reactores montados en el estudio.

Parámetro	Operación	
	Reactor 1 (R1)	Reactor 2 (R2)
Tiempo de operación (d)	200	137
Longitud de membranas (cm)	21	29.5
Área superficial de las membranas (m ²)	0.007	0.01
Presión H ₂ (atm)	P=2.56; periodo: 0-101 d (1A)* P=2.7; periodo: 102-200 d (1B y 2)	P=2.7
pH del medio de cultivo en la entrada del reactor	pH=7; periodo: 0-141 d (1) pH=5; periodo: 142-200 d (2)	pH=7
pH de la solución de Pb en la entrada del reactor	5	5
Suplementación de bicarbonato (mg/L)	0; periodo: 0-73 d (1A) 40; periodo: 74-200 d (1B y 2)	40
Cantidad de inóculo empleado (mL)	6	20
Tipo de operación	Lote; periodo: 0-3 y 69-92 d (1A) Continuo; periodo: 4-17 d (1A) Semicontinuo; periodo: 18-68 y 93-200 d (1B y 2)	Lote; periodo: 0-8 d (1B) Continuo; periodo: 8-137 d (2)
Flujo volumétrico (mL/h)	Q=4; periodo: 4-52 d (1A) Q=2; periodo: 53-64 d(1A) Q=1; periodo: 65-68 y 93-200 d (1 y 2)	Q=1; periodo: 9-23 y 48-137 d (1B y 2) Q=2; periodo: 24-47 d (1B)
Tiempo de retención hidráulico (TRH) (h)	TRH=15; periodo: 4-52 d (1A) TRH=30; periodo: 53-64 d (1A) TRH=60; periodo: 65-38 y 93-200 d (1B y 2)	TRH=60; periodo: 9-23 y 48-137 d (1B y2) TRH=30; periodo: 24-47 d (1B)
Alimentación del medio de cultivo y la solución de Pb	Juntas (ambas soluciones mezcladas)	Independiente
Remoción de O ₂ en el afluente	No	Si (a partir del día 37)
NO ₃ ⁻ suplementado por acidificación del medio (mg/L)	0	73.3

*Indica la Etapa o Subetapa en que se aplicó dicha operación.

3.3 Cálculo de las concentraciones en el equilibrio de los componentes químicos en el afluente

Para determinar si los componentes del medio de cultivo eran capaces de reaccionar con el Pb y evitar la precipitación de éste antes de suplementarse al reactor, se realizaron cálculos de concentración en el equilibrio de los posibles compuestos que podrían formarse entre la solución de Pb y el medio de cultivo. Se utilizó el programa Visual MINTEQ versión 3.1, con el cual, se calcularon las concentraciones en el equilibrio bajo tres escenarios: 1) El primer escenario consistió en el cálculo de concentraciones de

las soluciones por separado, para verificar si los componentes del medio de cultivo no precipitaban entre sí (lo mismo se hizo con la solución de Pb); 2) en el segundo escenario se realizaron los cálculos de concentraciones cuando el medio de cultivo y la solución de Pb se mezclaban; 3) en el tercer escenario, aparte de mezclar el medio de cultivo con la solución de Pb, las concentraciones se calcularon bajo las condiciones predominantes dentro de ambos reactores, es decir a una concentración mínima de 73 mg/L de HS⁻ y un pH de 9 unidades.

Así mismo, se construyó un diagrama de especiación del Pb utilizando la herramienta *Multi-problem/Sweep*, tomando en cuenta todos los constituyentes del medio de cultivo y la solución de Pb a una concentración de sulfuro de 100 mg/L, que fue la concentración promedio teórica que se obtuvo en el R2.

Para los cálculos se tomó en cuenta la cantidad de HCO₃⁻ producido por la mineralización total del acetato (235.6 mg/L; 3.86 mM) que entró en la Subetapa 2C de ambos reactores al cual se le sumó la cantidad añadida al medio de cultivo quedando una concentración final de 275.6 mg/L (4.51 mM), esto, con el fin de constatar que un aumento en la concentración de HCO₃⁻ en el sistema no resultara en la formación de fases carbonatadas de Pb.

3.4 Condiciones de operación de los reactores

Cada experimento consistió en dos etapas. En cada una de las etapas, la presión de H₂ y el TRH fueron constantes (**Tabla 3**). La tasa de recirculación del líquido dentro del reactor fue de 150 mL/min con el fin de mantenerlo completamente mezclado. En la Etapa 1 del R1 se promovió el crecimiento de BSR sin fuente de carbono, ya que estudios previos en MBfR no ocuparon fuente adicional de carbono [51], [64], [76], por tanto, se suministró al reactor solamente medio de cultivo enriquecido con sulfato. El medio de cultivo contiene originalmente 85 mg/L de SO₄²⁻ provenientes del MgSO₄·7H₂O, la cantidad restante necesaria para alcanzar las concentraciones mencionadas de SO₄²⁻ en la **Tabla 4** fueron suplementadas añadiendo Na₂SO₄ al medio de cultivo. Debido al conocimiento generado por el manejo y operación del R1, se acortó el tiempo de operación del R2 y la Subetapa 1A no se llevó a cabo en el R2.

Una vez que se detectó actividad sulfatorreductora (cuantificada por el consumo de SO₄²⁻ y la producción de sulfuro), se procedió con la Etapa 2 en la cual, se realizaron los experimentos para determinar la remoción de Pb. Se utilizó acetato de plomo trihidratado como fuente de plomo (Pb(C₂H₃O₂)₂·3H₂O) y se realizaron tres Subetapas variando la concentración de Pb en el afluente (50, 100 y 200 mg/L). La solución de Pb fue preparada y suplementada en un frasco diferente a la del medio de cultivo, ajustando el pH de ambas soluciones (con HCl 6 M para el R1 y con HNO₃ al 10 % para el R2; **Tabla 3**) con el fin de evitar la precipitación abiótica del Pb [32]. La solución de Pb tuvo el mismo flujo de entrada que el medio de cultivo.

Tabla 4. Condiciones experimentales de cada una de las etapas de operación de los reactores.

Etapa	Sub-etapa	[SO ₄ ²⁻] ₀ (mg/L)	[SO ₄ ²⁻] ₀ (mM)	[Pb ²⁺] ₀ (mg/L)	[Pb ²⁺] ₀ (mol/L)	Duración (d)	
						R1	R2
1	A	255	2.65	0	0	0-112 (112)	—
	B	585	6.09	0	0	112-133 (21)	0-46 (46)
2	A	585	6.09	50	0.24	133-155 (22)	46-76 (29)
	B	585	6.09	100	0.48	155-178 (23)	76-108 (32)
	C	585	6.09	200	0.96	178-200 (22)	108-137 (30)

3.5 Análisis químicos

Para verificar el desempeño de los reactores, se realizó la cuantificación de SO₄²⁻, Pb, sulfuro y alcalinidad. Se tomaron 0.8 mL tanto del afluente como del efluente para el análisis de SO₄²⁻. Las muestras se filtraron utilizando un filtro con membrana de 0.2 µm. El análisis se realizó mediante electroforesis capilar (Agilent G-1600a) [77].

Para el análisis de sulfuro, se empleó el método de Cord-Ruwisch, (1985) [78]. Se tomó una muestra de 0.2 mL del efluente, el cual, se hizo reaccionar con 4 mL de una solución ácida de sulfato de cobre (CuSO₄), para posteriormente medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Spectronic) a una longitud de onda de 480 nm.

Para el análisis de Pb, tanto del afluente como del efluente, se utilizó un analizador de absorción atómica flama (Varian AA240FS). El volumen de las muestras recolectadas fue de 2 mL filtrados a través de filtros de jeringa de 0.2 µm. Así mismo, con el fin de cuantificar la cantidad de Pb total en el efluente, en la Subetapa 2C del R2, se tomaron muestras de 2 mL sin filtrar y se sometieron a un proceso de digestión, en el cual, las muestras se acidificaron con HNO₃ concentrado y se calentaron en baño maría a 95 °C durante 20 minutos [79], para posteriormente ser analizadas por absorción atómica.

El pH del medio de cultivo y la solución de Pb (afluente) y del efluente se midió con un medidor de pH Thermo Scientific Orion VersaStar, cada dos días. El ORP se midió únicamente en la Subetapa 2C del R2 cada dos días con un medidor Applikon AppliSens. El oxígeno disuelto se midió cada cinco días durante las Subetapas 2B y 2C del R1, empleando una sonda ORION 083005MD.

Por último, la alcalinidad del efluente (solo del R2) fue determinada como se describe en los métodos estandarizados para el análisis de agua y aguas residuales [80]. Una muestra de 5 mL fue titulada con HCl 0.1 N hasta llegar a un pH de 5.8 para cuantificar la alcalinidad por bicarbonato (A_{BIC}). Posteriormente, se prosiguió con la titulación de la muestra hasta que esta alcanzó un pH de 4.3 para la cuantificación de la alcalinidad por ácidos grasos volátiles (A_{AGV}). La alcalinidad teórica debido al ion bisulfuro (A_{HS⁻}) fue estimada utilizando la concentración de sulfuro según lo propuesto por Godoi et al., (2017) [81], empleando las **Ecuaciones 4 y 5**.

$$A_{HS^-} (\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}) = [\text{HS}^-] \cdot 50,000 \quad (4)$$

Donde, [HS⁻] está en mol/L.

$$[\text{HS}^-] = \frac{[\text{SDT}]}{1 + 10^{\text{pKa}^1 - \text{pH}}} \quad (5)$$

Donde, SDT es el sulfuro disuelto total cuantificado experimentalmente (mg/L); $\text{pKa}^1 = 6.99$ (primera constante logarítmica de disociación del sulfuro de hidrógeno).

3.6 Remoción de sulfato, plomo y acetato

El porcentaje de remoción (%REM) de SO_4^{2-} , Pb y acetato fue calculado con la **Ecuación 6**:

$$\% \text{REM} = 100\% \cdot \frac{C_0 - C}{C_0} \quad (6)$$

Donde, C_0 y C son las concentraciones en el afluente y efluente de los contaminantes (g/L), respectivamente.

3.7 Caracterización de los precipitados formados

Para la Subetapa 2C del R2, al final del experimento, se muestreó la biopelícula con el fin de visualizar la formación de precipitados de Pb, tales como PbS. Del tubo secundario del reactor, se cortaron tres piezas de fibra de 4-5 cm de longitud, las cuales se analizaron por microscopía electrónica de barrido acoplada a espectroscopía de difracción de rayos X (SEM-EDX, ESEM QUANTA FEG-250).

3.8 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se tomaron muestras de la biopelícula al final de cada etapa, siguiendo el procedimiento realizado por Esquivel-Hernández et al., (2021) [60]. Para cada muestra de biopelícula, se cortaron 10 cm de una de las fibras del tubo secundario del reactor, depositándola en un tubo cónico que contenía 10 mL de agua estéril. Después, la biomasa fue desprendida de las fibras haciendo vórtex sobre los tubos de 15 mL a alta velocidad por 10 minutos, para después centrifugarlos a 13.2 rpm por 10 minutos. Los *pellets* de biomasa se guardaron a -20°C para posteriormente proceder con la extracción de ADN siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor del kit DNeasy® PowerBiofilm® Kit (Qiagen). Las muestras de ADN se refrigeraron a -20°C hasta su secuenciación por Illumina MiSeq en el *Microbiome Analysis Laboratory* del Instituto *BioDesign Swette Center for Environmental Biotechnology*. Se amplificó la región hipervariable V3-V4 del gen ribosomal 16S, utilizando los *primers* 515F GTGCCAGCMGCCGCGGTAA y 806R GGACTACHVGGGTWTCTAAT [82]. Librerías de amplicones (390-400 pares de bases de longitud) fueron construidas siguiendo el protocolo propuesto por *Earth Microbiome Project* [83].

3.9 Perfiles taxonómicos y análisis de la comunidad microbiana

Los amplicones obtenidos fueron procesados utilizando el paquete DADA2 (v.1.18.0) [84], implementado en RStudio (4.1.1). Para el análisis, se removieron los *primers* y las secuencias pareadas fueron alineadas y filtradas para remover las quimeras. La clasificación taxonómica se realizó utilizando la base de datos SILVA 138.1

[85]. La librería *R Phyloseq* [86] de R fue usada para llevar a cabo el análisis de la diversidad alfa y beta en la biopelícula.

4. Resultados y Discusión

4.1 Actividad sulfatorreductora en los reactores

Para la primera etapa, el reactor se alimentó con 255 mg/L de SO_4^{2-} con el fin de favorecer el crecimiento de BSR, sin embargo, a pesar de que hubo consumo de SO_4^{2-} , la cuantificación de SO_4^{2-} en el afluente fue muy variable, debido a que se detectaba una cantidad menor a la dispuesta inicialmente en el medio de cultivo (datos no mostrados). Este comportamiento siguió en toda esta etapa hasta que se modificaron diferentes parámetros. Por ejemplo, el medio fue esterilizado y se comenzó a agitar para mantenerlo completamente mezclado. Además, se subió la presión de H_2 (de 2.56 a 2.7 atm) en el día 102, con el objetivo de que el donador de electrones no fuera limitante. Por otro lado, el reactor fue operado de manera semicontinua y la cantidad de PO_4^{3-} fue disminuida. Así mismo, se añadió HCO_3^- al medio de cultivo, como fuente de carbono inorgánico, dado que el medio empleado por Chung., et al (2006) [76] no contiene este compuesto. Una vez hecho esto, las lecturas estables, tanto del consumo de SO_4^{2-} como de la producción de sulfuro, ocurrieron hasta el día 113, considerando este día como el inicio de la Subetapa 1B.

En la **Figura 2A**, se muestra el consumo de SO_4^{2-} a lo largo de la operación del R1. En promedio, se obtuvo un $\sim 60\%$ de remoción de SO_4^{2-} , siendo su consumo prácticamente el mismo en cada una de las Subetapas. Así mismo, se muestra la concentración del sulfuro en el efluente, la cual disminuye al introducir y aumentar la concentración de Pb en el reactor, detectándose al final de la Subetapa 2C en un valor promedio de sulfuro de 34.37 ± 8.22 mg/L (1.04 mM) (**Figura 3A**). También, se puede observar que la concentración de sulfuro (calculada), sin considerar su precipitación con Pb, no es la misma que el sulfuro teórico producido por el consumo de SO_4^{2-} . Una vez establecida una comunidad sulfatorreductora en el R1, como se observa en la **Figura 2A**, las BSR mantuvieron su actividad a pesar de la entrada del Pb al sistema, siendo capaces de consumir SO_4^{2-} hasta el final de la Subetapa 2C, disminuyendo ligeramente su capacidad de remoción en dicha Subetapa ($57.19 \pm 7.28\%$ en promedio), esto pudo deberse a que el Pb entró precipitado al reactor (*cf.* Sección 4.3), lo que ocasionó que el Pb no estuviera biodisponible y, por lo tanto, no ejerciera toxicidad sobre las BSR.

Debido a que en el afluente del R1 el Pb precipitó abióticamente cuando se alimentaron las soluciones de Pb y el medio de cultivo juntos (*cf.* Sección 4.3), el R1 fue modificado haciendo una incisión en una de las conexiones de neopreno que unían ambos tubos en la parte superior, sin embargo, hecho esto la actividad sulfatorreductora cesó por completo. Se hizo el esfuerzo por reactivar a las BSR operando el reactor en semicontinuo por una semana, en lote por otra más y, finalmente en semicontinuo una última semana. No se volvió a detectar sulfuro en el efluente y el consumo de SO_4^{2-} fue prácticamente nulo. Esto, pudo deberse a que los microorganismos de la biopelícula pudieron ser afectados por la entrada de O_2 al abrir el reactor.

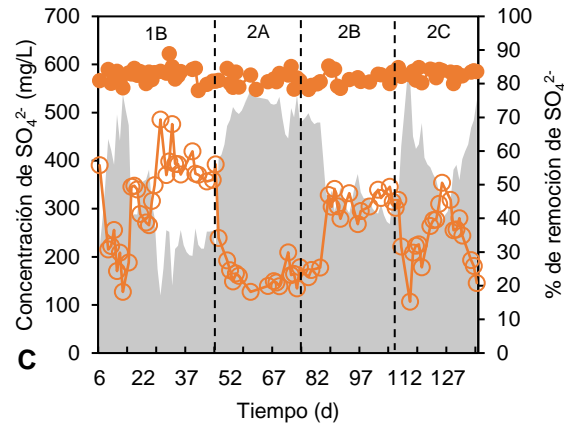
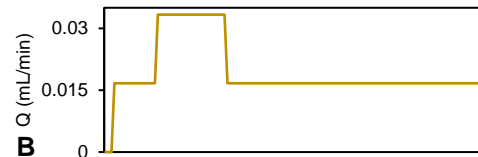
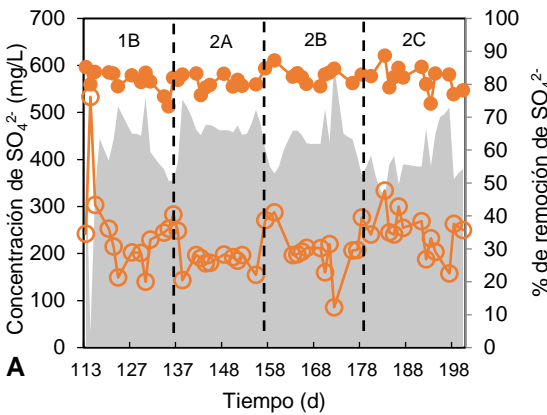
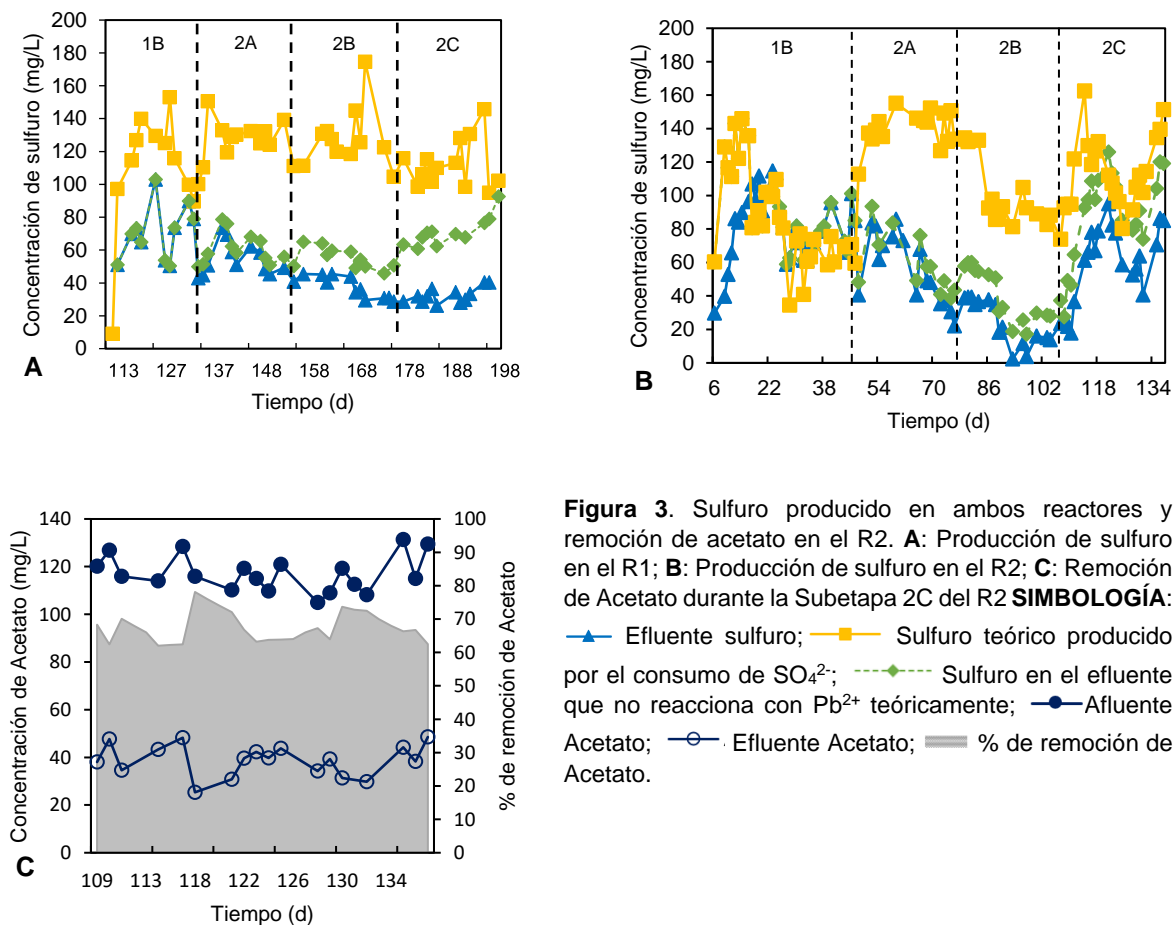


Figura 2. Actividad sulfatorreductora en ambos reactores. **A:** Remoción de SO_4^{2-} en el R1; **B:** Flujo volumétrico del afluente del R2; **C:** Remoción de SO_4^{2-} en el R2. **SIMBOLOGÍA:** ● Afluente SO_4^{2-} ; ○ Efluente SO_4^{2-} ; ■ % de remoción de SO_4^{2-}

Durante la Etapa 2 se inició un nuevo experimento y se montó un nuevo reactor (R2), el cual, poseía las entradas necesarias para suministrar el medio de cultivo y la solución de Pb por afluentes separados (**Figura 1**). Las condiciones de operación para el R2 se muestran en la **Tabla 4**. A diferencia del R1, en el R2 se omitió la Subetapa 1A, ya que desde el inicio el medio de cultivo se suplementó con una fuente de carbono, con el objetivo de acelerar el crecimiento de las BSR. La detección de actividad sulfatorreductora fue mucho más rápida que en el R1, debido a las condiciones iniciales de operación (**Tabla 3**), particularmente, añadir una fuente de C inorgánico desde el día 1 de operación. Además, el reactor fue operado con un TRH de 60 h, alcanzando remociones del SO_4^{2-} del ~ 77 % en 14 días (**Figura 2C**). Una vez constatada la capacidad de la biopelícula para remover SO_4^{2-} y producir HS^- , se aumentó el flujo volumétrico del afluente a 2 mL/h (TRH = 30 h; **Figura 2B**), hecho esto, la remoción de SO_4^{2-} cayó un 10 %, en promedio. Para el día 37 se eliminó el O_2 disuelto en el afluente pues se ha demostrado que puede afectar el consumo de SO_4^{2-} , dado que el O_2 puede inhibir la sulfatorreducción, ya sea porque este puede ser utilizado como aceptor de electrones por algunas BSR, desplazando el consumo de SO_4^{2-} , o porque el O_2 puede llegar a ser tóxico para determinadas especies de BSR [61], [66]. De tal forma que se suministró N_2 por medio de burbujas en el medio por 20 minutos, con el fin de obtener condiciones reductoras favorables para promover el consumo de SO_4^{2-} . Sin embargo, en los diez días próximos no mejoró mucho el consumo de SO_4^{2-} , por lo que, al iniciar la Subetapa 2A, el flujo volumétrico del afluente se volvió a bajar a 1 mL/h (0.015 mL/min), aumentando de manera inmediata la remoción de SO_4^{2-} y, confirmando, que es necesario tener un TRH largo para que las BSR sean capaces de consumir una mayor cantidad de SO_4^{2-} , dado que, este grupo de microorganismos se caracterizan por poseer una tasa específica de crecimiento muy lenta ($\mu = 0.29 \text{ d}^{-1}$, cuando se utiliza H_2 como donador de electrones) en comparación con otros grupos microbianos, como desnitrificadores ($\mu = 1.4 \text{ d}^{-1}$, cuando se

utiliza H_2 como donador de electrones) y fermentadores ($\mu = 1.3 d^{-1}$) [43]. Sin embargo, en la Subetapa 2B la remoción de SO_4^{2-} disminuyó, muy posiblemente por el aumento de Pb en el afluente, lo que resultó en una disminución en la tasa de consumo de SO_4^{2-} y, por ende, de la producción de sulfuro. Para la Etapa 2B (100 mg/L de Pb en el afluente), el consumo de SO_4^{2-} disminuyó aproximadamente 20 %, y los valores de sulfuro en el efluente cayeron hasta casi cero. Finalmente, y en la Subetapa 2C el consumo de SO_4^{2-} aumentó de manera importante hasta situarse en un consumo promedio de 57.86 ± 10.52 %, llegando a remover hasta el 81 % de SO_4^{2-} , al mismo tiempo que la cantidad de sulfuro en el efluente aumentó hasta un valor de 95 mg/L (2.87 mM) (**Figuras 2C y 3B**). Esto, pudo deberse a que el acetato proveniente de la fuente de Pb (~114 mg acetato/L; 1.93 mM) pudo servir como un donador de electrones adicional que favoreció el crecimiento de las BSR. La **Figura 3C** muestra que en el R2 el consumo de acetato se mantuvo entre 60 y 70 % de remoción, el cual, en dicha Subetapa, fue un compuesto que pudo jugar un papel importante que promovió la sulfatorreducción, aunque de manera indirecta, como se discutirá más adelante (*cf.* Sección 4.8).



Como se puede apreciar en las **Figuras 3A** y **3B**, el sulfuro teórico producido correspondiente al consumo de SO_4^{2-} para ambos reactores se encuentra muy por encima de los valores correspondientes al sulfuro detectado en el efluente experimentalmente (línea azul), esto, pudo deberse a que una fracción de dicho sulfuro precipitara con el Pb suplementado en ambos experimentos durante la Etapa 2, sin embargo, al realizar el cálculo del sulfuro del efluente que no precipitó con Pb (línea verde de las **Figuras 3A** y **3B**) en ambos reactores, la cantidad calculada difiere del sulfuro teórico producido teóricamente. Solo hasta la Subetapa 2C del R2 se puede apreciar que la línea amarilla y verde parecen ajustarse un poco. Esta disparidad del sulfuro pudo deberse a que en ambos reactores existió un proceso que consumió el sulfuro producido por la biopelícula, probablemente por el metabolismo de algunos microorganismos (*cf.* Sección 4.8).

En otros estudios empleando MBfR's, se ha demostrado que las BSR pueden alcanzar tasas de remoción de SO_4^{2-} bastante aceptables. Por ejemplo, en el estudio llevado a cabo por Suárez et al., (2020) [61], se logró la remoción de 99 % del SO_4^{2-} ($C_0 = 1500 \text{ mg/L}$; 15.6 mM) de un afluente proveniente de un proceso de flotación para la obtención de cobre, el cual, también poseía una alta concentración de calcio (641 mg/L ; 16 mM) así como trazas de otros elementos (Al, Co, Cu, F, Fe y Zn). La actividad sulfatorreductora en este estudio comenzó después de 59 días y, aunque se alcanzó la remoción casi total de SO_4^{2-} ($> 95 \%$), no fue por mucho tiempo ya que se formaron precipitados de carbonato de calcio (CaCO_3) sobre las membranas, restringiendo el paso de H_2 y CO_2 hacia la biopelícula. Utilizando el mismo sistema para tratar el mismo afluente, Schwarz et al., (2022) [87] reportaron que la mejor tasa de remoción de SO_4^{2-} (97 %) se obtuvo cuando el reactor se operó a una presión de H_2/CO_2 de 1.48-1.54 atm. Cabe recalcar que, en dicho trabajo, emplearon membranas de polidimetilsiloxano (PDMS) las cuales poseen una alta permeabilidad y una alta resistencia química y mecánica, empleadas principalmente en reactores de biopelículas aireadas [88].

4.2 Remoción de Pb en los reactores

La remoción de Pb dentro del reactor R1 fue alta, pues en las tres Subetapas, se alcanzaron valores promedio de remoción superiores a 96 % (**Figura 4A**). En tanto, en el R2 se alcanzaron remociones promedio de $89.39 \pm 4.97 \%$, $98.43 \pm 0.89 \%$ y $99.38 \pm 0.53 \%$ para las Subetapas 2A, 2B y 2C, respectivamente (**Figura 4B**). La eficiencia en la remoción de Pb en la Subetapa 2A del R2 fue inferior que, en el R1, esto pudo ser ocasionado por la manera en que se alimentó la solución de Pb al reactor R2, puesto que en el R2 el Pb precipitó preferentemente con el HS^- directamente, como se discutirá más posteriormente (*cf.* Sección 4.3). El modo de alimentación en el R1 pudo propiciar la precipitación de Pb con otras especies químicas antes de entrar al reactor (*cf.* Sección 4.3.2). Por otro lado, la eficiencia de remoción en las Subetapas 2B y 2C fue un 10 % mejor en comparación con 2A, es decir, que a una mayor concentración de Pb la remoción de este fue mejor. Esto, pudo deberse a que, al haber una mayor cantidad de Pb, se favoreció la nucleación y, por lo tanto, la precipitación de Pb como PbS [24]. Por último, en la Subetapa 2C del R2 se cuantificó el Pb total en el efluente, mostrado que este se

encontró con un valor promedio de 14.65 ± 4.71 mg/L (0.7 mM), por lo que, entre 5 y 10 % del Pb suplementado fue expulsado como partículas muy finas de PbS que no lograron sedimentar y/o adherirse a la biopelícula, este fenómeno se discutirá más adelante (cf. Sección 4.5).

Como se puede apreciar en las **Figuras 3A y 3B**, una vez que se alimentó ambos reactores con Pb, la concentración de HS^- disminuyó, como resultado de su consumo en la precipitación con Pb, pero sin llegar a agotarlo.

En la literatura pueden encontrarse dos grandes configuraciones en la que los reactores sulfatorreductores pueden montarse para el tratamiento simultáneo de SO_4^{2-} y metales. La primera, es empleando un biorreactor en una sola etapa, en el cual, tanto la reducción de SO_4^{2-} y la precipitación de metales ocurre en el mismo reactor. La segunda consta de reactores en dos etapas, donde en un biorreactor ocurre solamente la sulfurogénesis, el efluente de dicho biorreactor es utilizado para precipitar los metales en un segundo reactor, para posteriormente removerlos por sedimentación. Ejemplos de ambos sistemas hay muchos y, como los reactores que se emplearon en el presente estudio fueron de una sola etapa, la discusión se centrará en ese tipo de configuración.

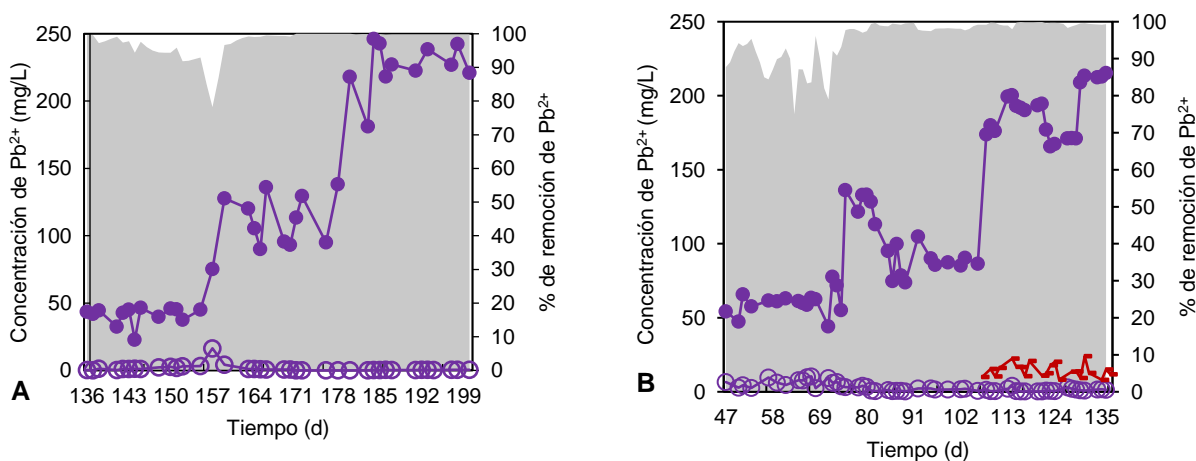


Figura 4. Remoción de plomo en ambos reactores. **A:** Remoción de Pb en el R1; **B:** Remoción de Pb en el R2. **SIMBOLOGÍA:** ● Afluente Pb²⁺; ○ Efluente Pb²⁺; ■ % remoción de Pb²⁺; — Efluente Pb total.

En el estudio llevado a cabo por Villa-Gomez et al., (2011) [33], se utilizó un reactor de lecho fluidizado inverso (IFBR, por sus siglas en inglés), en el cual, emplearon lactato como donador de electrones para la remoción de 1000 mg/L (10.4 mM) de SO_4^{2-} y 10 mg/L (0.048 mM) de metales como Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} . Para el caso del Pb, se logró la remoción de 99.2 % y de SO_4^{2-} de 38 %. Debido a que la concentración de Pb fue baja, en comparación con otros estudios, la actividad de las BSR no se afectó. Kiran et al., (2018) [35] emplearon un reactor de columna de lecho descendente (DFCR, por sus siglas en inglés) para tratar hasta 90 mg/L (0.43 mM) de Pb, en el cual, lograron una remoción de 92 %. Para el caso de SO_4^{2-} , alcanzaron una remoción de 65 % ($C_0 = 1000$

mg/L; 1.04 mM). Así mismo, Velasco et al., (2008) [32] demostraron que las BSR empleadas en un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés) lograron precipitar hasta 200 mg/L (0.96 mM) del Pb en el afluente, presentando una remoción casi de 100 %. En dicho estudio aclimataron a las BSR al Pb exponiéndolas a concentraciones cada vez más altas, partiendo de una concentración inicial de Pb de 20 mg/L hasta alcanzar 200 mg/L (en incrementos de 20 mg/L de Pb cada 40 días). La remoción de SO_4^{2-} y de etanol alcanzaron valores promedio de 68 % y de 98 % ($C_0 \text{SO}_4^{2-} = 1500 \text{ mg/L}$; 15.61 mM y $C_0 \text{ etanol} = 1080 \text{ mg/L}$; 22.44 mM), sin embargo, la oxidación de etanol fue incompleta encontrándose en el efluente una alta concentración de acetato.

En otros estudios se ha demostrado la habilidad de las BSR para resistir los efectos deletéreos que ejerce el Pb sobre este grupo de procariontes, por supuesto que el principal mecanismo por la que las BSR son capaces de vivir en ambientes con una alta concentración de metales pesados es que, el sulfuro producto de su metabolismo, ayuda a la inmovilización de metales como el Pb, previniendo que estos permanezcan en solución y, por lo tanto, disminuyendo su toxicidad de manera considerable. Otros mecanismos por los cuales las BSR pueden hacer frente a los metales es por la precipitación con carbonato (CO_3^{2-}), producido por las BSR. El HCO_3^- es resultado del metabolismo heterótrofo al utilizar materia orgánica como donador de electrones proveniente de los microorganismos autótrofos (biomasa en decaimiento, EPS) [49]. También, se ha demostrado que las BSR pueden remover Pb por biosorción en la biomasa e, incluso, otros mecanismos, como los mediados por proteínas excretadoras de Pb, complejación con sideróforos o la acumulación intracelular pueden jugar un rol importante en la resistencia de las BSR al Pb [89], [90].

A pesar de que en los trabajos mencionados con anterioridad lograron remover Pb sin que las BSR resultaran afectadas, algunos reactores de una sola etapa suelen presentar problemas cuando la concentración del Pb es tan alta que compromete el metabolismo de las BSR. Varios estudios han demostrado la inhibición completa o parcial de BSR a altas concentraciones de Pb ($> 150 \text{ mg/L}$). En el trabajo llevado por Kieu et al., (2015) [34], se determinaron las condiciones óptimas para que las BSR fueran capaces de generar una mayor cantidad de sulfuros en reactores en lote, de tal forma que al agregar 2169 mg/L (22.58 mM) de SO_4^{2-} , 4752 mg/L (52.75 mM) de lactato y a un pH de 7.5, las BSR producían alrededor de 454 mg/L (13.32 mM) de sulfuros. Después, evaluaron las mismas condiciones, pero ahora en reactores de biopelícula de lecho móvil (MBBR, por sus siglas en inglés) con el fin de comprobar si las BSR eran capaces de eliminar Pb en tres concentraciones: 100, 150 y 200 mg/L. De estas tres concentraciones, en la etapa de 200 mg/L (0.96 mM) de Pb se registró el menor porcentaje de remoción (91 %) dado que a la mitad del experimento (día 15) el Pb en el efluente comenzó a subir y la producción de sulfuros fue prácticamente nula al final de este experimento, inhibiendo por completo a las BSR.

Por otro lado, pocos son los estudios que se han llevado a cabo para la precipitación de metales utilizando H_2 como donador de electrones en reactores de una sola etapa. Por ejemplo, se ha reportado que el níquel (Ni^{2+}) puede ser exitosamente

removido del agua (99 %) como sulfuro de níquel (NiS) (35-450 mg/L·d) empleando un *gas lift reactor* y alimentándolo con H₂ y CO₂ para favorecer la sulfatorreducción a diferentes cargas de SO₄²⁻ (345-1300 mg/L·d) a un pH de 5.5 [91]. También, empleando el mismo tipo de reactor y utilizando H₂ como donador de electrones y CO₂ como fuente de carbono, se logró eliminar el 99 % del Zn²⁺ (C₀ = 471 mg/L; 7.2 mM) que entraba al reactor en forma de ZnS, mientras que la remoción de SO₄²⁻ varió entre el 77 y 99 % (C₀ = 1000 mg/L; 10.4 mM) [92].

4.3 Precipitación de Pb en los reactores

Uno de los problemas que se tuvieron con el R1 fue que, en el afluente se detectó visualmente la formación de un precipitado blanco cuando los afluentes del medio de cultivo y la solución de Pb se juntaban para entrar al reactor bajo un mismo flujo. Esto, motivó a realizar un cálculo de concentraciones en el equilibrio de las posibles interacciones químicas que pudieran ocurrir entre los componentes de ambas soluciones empleando el programa Visual MINTEQ bajo tres escenarios, los cuales se mencionan a continuación.

4.3.1 Reacciones en el equilibrio de los componentes solubles del medio de cultivo y de la solución de Pb

Para este escenario se tomó en cuenta cada uno de los constituyentes de ambas soluciones, así como las condiciones de pH a las cuales fueron alimentadas al reactor. Como se observa en la **Tabla 5**, de acuerdo con los cálculos de equilibrio químico, solo precipita el fosfato (PO₄³⁻) y el manganeso (Mn²⁺) en el medio de cultivo, sin embargo, el consumo de PO₄³⁻ sería insignificante y alrededor de un tercio del Mn²⁺ precipitaría. Según los cálculos realizado en Visual MINTEQ, mantener la solución de Pb a un pH menor a 5.5 previene que el Pb precipite como Pb(OH)₂, manteniéndolo completamente soluble antes de que entrara al reactor (**Tabla 6**).

Tabla 5. Componentes iónicos en el medio de cultivo a un pH de 5.

Componente	Disuelto (mM)	% disuelto	Precipitado (mol/kg)	% precipitado
Mn ²⁺	1.02X10 ⁻⁴	67.6	4.89E-08	32.39
PO ₄ ³⁻	0.4	99.98	4.89E-08	0.012

Tabla 6. Componentes iónicos de la solución de Pb a un pH de 5 ([Pb²⁺] = 200 mg/L; 0.96 mM).

Componente	Disuelto (mM)	% disuelto	Precipitado (mol/kg)	% precipitado
Acetato ⁻	1.93	100	0	0
Pb ²⁺	0.965	100	0	0

4.3.2 Reacciones en el equilibrio entre los componentes solubles del medio de cultivo y de la solución de Pb

Por otra parte, y al realizar los cálculos de concentraciones en el equilibrio cuando el medio de cultivo y la solución de Pb se mezclan se detectó que el Pb es capaz de

interactuar con varios iones del medio favoreciendo que pueda llevarse a cabo una precipitación abiótica, la cual posiblemente explique el precipitado blanco observado al alimentar el R1. La **Tabla 7** muestra los cálculos de equilibrio químico para la formación de sólidos de Pb al mezclar las soluciones. Se incluye el valor del fósforo en solución y su distribución en distintos sólidos a diferentes concentraciones iniciales de Pb.

Tabla 7. Precipitados que posiblemente se formaron entre el Pb^{2+} , PO_4^{3-} , Cl^- , OH^- y SO_4^{2-} antes de entrar al reactor R1.

$[Pb^{2+}]_0$	$[Pb^{2+}]_0$	Pb disuelto	Pb Precipitado	[CPM] ¹	$[PbMoO_4]$	$[Pb_3(PO_4)_2]$	[HPM] ²	$[PbSO_4]$
mg/L	mM	mM	%	mM	mM	mM	mM	mM
50	0.24	4.83×10^{-5}	99.99	0.0482	5.83×10^{-5}	0	0	0
100	0.48	0.012	97.37	0.0936	1.24×10^{-4}	5.31×10^{-4}	0	0
200	0.96	0.01	97.91	0.0936	1.24×10^{-4}	0.0284	0.016	0.39

¹CPM = cloropiromorfita ($Pb_5(PO_4)_3Cl$)

²HPM = hidropiromorfita ($Pb_5(PO_4)_3OH$)

Con los resultados anteriores, en teoría la mayoría del Pb que fue suplementando al R1 en la Etapa 2 precipitó antes de entrar al reactor y posiblemente debido a la formación de precipitados con fosfato, principalmente.

4.3.3 Reacciones en el equilibrio entre el Pb y los componentes solubles en los reactores

Para este escenario, se realizaron cálculos de concentración en equilibrio químico para identificar las posibles reacciones de formación de sólidos al alimentar la solución de Pb al reactor R1, considerando la química de la solución dentro del reactor. Esto, con el fin de identificar los precipitados de Pb que termodinámicamente se pueden formar.

Para el cálculo de concentraciones en el equilibrio, se utilizó una concentración de 73 mg/L (2.2 mM) de sulfuro, pues en ambos reactores esta fue la concentración teórica (calculada a partir de la transformación de SO_4^{2-}) más baja que se tuvo en ambos reactores. Además, dichos cálculos se realizaron a un pH 9 y con todas las especies químicas presentes en el afluente y la máxima concentración de Pb utilizada en los experimentos (200 mg/L; 0.96 mM) (**Anexo 4**).

Como se puede ver en la **Tabla 8**, tomando en cuenta la composición inicial del reactor R1, el Pb pudo precipitar en forma de piromorfitas y otros compuestos con fosfato. Sin embargo, una vez que la concentración de sulfuro aumenta a 73 mg/L, el índice de saturación (IS) del PbS incrementa, haciendo posible la solubilización de sólidos como piromorfitas, y la formación de PbS. El IS se utilizó como parámetro de respuesta, el cual, nos indica si una solución se encuentra saturada, en equilibrio o no saturada respecto a un ion determinado y pueda dar paso a la formación (precipitación) de una o varias especies químicas. Es decir, nos permite saber si un sólido puede o no formarse dadas las concentraciones de los diferentes iones en el sistema. La **Tabla 8** muestra los valores de K_{sp} para los sólidos de plomo que posiblemente se puedan formar y valores de IS de los compuestos más insolubles que el PbS mencionados en la **Tabla 7**, los cuales al exponerse a las condiciones dentro del reactor pasan de tener un valor de IS de cero (en

equilibrio) a negativo. Así mismo, los cálculos realizados en Visual MINTEQ nos muestran que cuando la solución que contiene 200 mg/L de Pb se pone en contacto directo con el líquido dentro del reactor, se favorece la formación de PbS sobre otros precipitados de Pb (**Tabla 9**).

Tabla 8. Valores de K_{sp} para los sólidos de Pb e IS calculado para las soluciones de Pb ($[Pb^{2+}] = 200 \text{ mg/L}$), medio de cultivo y efluente del reactor.

Compuesto	Log(K_{sp})	Antes de entrar al reactor ¹		Después de entrar al reactor ²	
		Valor de IS calculado sin permitir la formación de precipitados	Valor de IS calculado permitiendo la formación de los precipitados termodinámicamente más estables	Valor de IS calculado sin permitir la formación de precipitados	Valor de IS calculado permitiendo la formación de los precipitados termodinámicamente más estables
Cloropiromorfita	-84.43	23.2	0	3.95	-45.76
Hidroxiopiromorfita	-62.79	10.7	0	-4.57	-54.28
Pb ₃ (PO ₄) ₂	-45.53	6.6	0	-3.71	-33.53
PbMoO ₄	-15.62	4.7	0	-2.63	-12.57
PbHPO ₄	-23.8	2.2	-0.32	-3.31	-13.25
PbSO ₄	-7.79	1.7	0	-5.71	-15.65
PbCO ₃	-13.2	-0.28	-1.9	-1.64	-11.52
Pb ₃ (CO ₃) ₂ (OH) ₂	-18.76	-1.8	-6.8	-3.93	-33.62
PbS	-14.92	-	-	9.27	0

¹Cálculos sin sulfuro y pH = 5; ²Cálculos realizados en presencia de 73 mg/L de sulfuro, 275.6 mg/L de HCO₃⁻ y pH = 9.

*Los valores fueron tomados de la base de datos del software Visual MINTEQ.

Los cálculos de equilibrio químico indican que, al mezclar el medio de cultivo con la solución de Pb, este se haya precipitado en forma de piromorfitas, las cuales, son compuestos de fosfato de baja solubilidad. En nuestro caso, de acuerdo a los cálculos de equilibrio químico obtenidos en Visual MINTEQ, la precipitación del Pb es termodinámicamente posible en el afluente como cloropiromorfita (Pb₅(PO₄)₃Cl; $K_{sp} = 10^{-84.4}$) e hidroxipiromorfita (Pb₅(PO₄)₃OH; $K_{sp} = 10^{-76.9}$), las cuales poseen una solubilidad más baja que la del PbS ($K_{sp} = 10^{-28.3}$) [93]–[95]. Bajo esta consideración, casi todo el Pb en la Etapa 2 precipitó antes de entrar al R1 (**Tabla 7**), sin embargo, debido al alto pH y concentraciones de sulfuro (pH > 9; [HS⁻] ~ 114 mg/L; 1.9 mM) es termodinámicamente posible que el equilibrio de solubilidad de las piromorfitas se desplace a la formación del sólido con el mayor valor de IS, formando de esta manera PbS. Así que, puede decirse que en el R1 el Pb precipitó de manera abiótica y formó diferentes precipitados, pero una vez que estos precipitados entraron al reactor y se depositaron en la biopelícula y dado que el TRH del reactor fue muy alto (60h h) es probable que las otras fases de Pb hallan dado paso a la formación de PbS. Lo anterior se debe a que cuando existen dos o más precipitados se puede establecer una competencia de equilibrio químicos, prevaleciendo la forma más estable termodinámicamente [96], es decir, el equilibrio de precipitación de la piromorfita (así como otras fases de Pb) se desplace y da paso a su solubilización para

compensar la falta de Pb en la solución debido a la precipitación de este como PbS. Sin embargo, es importante considerar que los equilibrios de solubilidad involucrados dependen de la velocidad con que se logran dichos equilibrios, y estos dependen de factores como el tamaño de partícula del sólido, el pH, composición de la solución, hidrodinámica del reactor, entre otros [97].

En la **Tabla A2-1 (Anexo 2)** se muestra un listado de las fases sólidas de posible formación de acuerdo con la composición de la solución dentro del R1. Desde el punto de vista termodinámico, una fase sólida se puede formar cuando el IS tiene un valor superior o igual a cero. El IS se calcula de acuerdo con la **Ecuación 7 (Anexo 3)**.

Por otro lado, en el R2, como el medio de cultivo y la solución de Pb entraron por separado al reactor, y según los resultados obtenidos en la **Tabla 8**, el Pb precipitó directamente con el sulfuro del sistema, dado que el IS para este compuesto era muy alto, termodinámicamente la formación de otras fases de Pb no fue favorable. Por lo anterior, el principal mecanismo de remoción de Pb en el R2 se debió a su precipitación como PbS. Así mismo, el diagrama de especiación (**Figura 5**) muestra que el PbS fue la especie química predominante a una concentración de 73 mg/L de sulfuro y 200 mg/L de Pb, así como diferentes valores de pH. El Pb que no logró precipitar (< 0.01 mg/L) formó compuestos como el $\text{Pb}(\text{HS})_2$ y el $\text{Pb}(\text{HS})_3^-$, los cuales son compuestos que pudieron dar paso a la formación de PbS, preferentemente. También, en la **Tabla 9**, se muestran los componentes envueltos en la formación de fases insolubles de Pb antes de entrar al reactor. Como se observa, al realizarse los cálculos en el equilibrio bajo las condiciones que prevalecen dentro del reactor R2 (concentraciones iguales o mayores a 73 mg/L de sulfuro y $\text{pH} = 9$), dichos compuestos permanecen solubles, es decir, no son capaces de formar otras fases de Pb. La única especie química que precipita es el sulfuro (HS^-) que, como se observa en la **Figura 5**, precipita con Pb para formar al PbS.

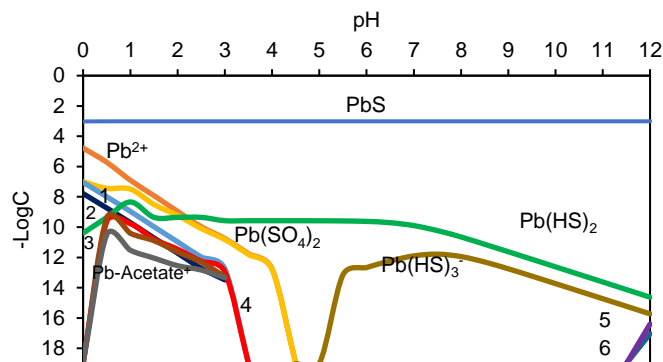


Figura 5. Diagrama de especiación del Plomo en función del pH considerando los componentes principales del efluente en el R2. Se consideró la formación del precipitado PbS debido a que presentó el mayor valor de índice de saturación. 1 (azul claro): PbNO_3^+ ; 2 (azul rey): PbCl^+ ; 3 (marrón) $\text{Pb}(\text{SO}_4)_2^{2-}$; 4 (rojo) $\text{PbH}_2\text{PO}_4^+$; 5 (morado) $\text{Pb}(\text{OH})_3^-$; 6 (azul)

Tabla 9. Cálculo de distribución de especies químicas involucradas en la formación de sólidos de Pb a una concentración de $Pb^{2+} = 200$ mg/L (0.96 mM), $[HS^-] = 73$ mg/L (2.2 mM) y $pH = 9$.

Componente	Disuelto (mM)	% disuelto	Precipitado (mM)	% precipitado
Cl ⁻	0.087	100	0	0
HS ⁻	1.24	71.99	0.965	28.01
Pb ²⁺	2.42×10^{-9}	0	0.965	100
PO ₄ ³⁻	0.4	100	0	0
SO ₄ ²⁻	6.01	100	0	0

4.4 pH y alcalinidad

Dado que en los efluentes del R1 y el R2 los valores de pH (**Anexo 4**) fueron muy altos (hasta 9.9 y 10.4 unidades para el R1 y el R2, respectivamente) se estimó la alcalinidad con el fin de visualizar la contribución del ion bisulfuro (HS⁻) a la misma, además de verificar si otras especies químicas, como el bicarbonato (HCO₃⁻) o los ácidos grasos volátiles (AGV), coadyuvaban a aumentar la alcalinidad en el reactor y, por ende, a incrementar el pH. El metabolismo de las BSR naturalmente tiende a subir el pH por el consumo de protones (**Ecuación 1**) y por la generación de HS⁻, el cual, puede contribuir a la alcalinidad del sistema. La **Figura 6** muestra la contribución a la alcalinidad por HS⁻ (A_{HS^-}), HCO₃⁻ (A_{BIC}) y AGV (A_{AGV}), la suma de las tres da como resultado la alcalinidad total (A_T). También, se cuantificó la alcalinidad de ambas soluciones del afluente, pues tanto el HCO₃⁻ que se suplementó al medio de cultivo como el acetato de la solución de Pb pueden contribuir a la alcalinidad en el efluente. El valor fue de 35.5 mg CaCO₃/L para el medio de cultivo y 11.8 mg CaCO₃/L para la solución de Pb. La **Figura 6** muestra que la contribución del HS⁻ a la alcalinidad resulta más importante debido a la producción de este en el R2. A partir de la alimentación con 50 mg/L de Pb, la A_T alcanzó su punto máximo de concentración (280 mg CaCO₃/L), no obstante, la A_{HS^-} fue menor que en la Etapa 1, como consecuencia de la precipitación del HS⁻ con el Pb. Así, la A_T disminuyó a un nivel mínimo de 94.67 mg CaCO₃/L durante la Subetapa 2B del R2, para finalmente volver a subir en la Subetapa 2C. La disminución de A_T en la Subetapa 2B pudo deberse a que una mayor concentración de Pb (100 mg/L) consumió el HS⁻ del sistema, y que se reflejó en la disminución de la A_{HS^-} durante toda esta subetapa. El aumento de la A_T , específicamente la A_{HS^-} y en menor medida de A_{BIC} , durante la Subetapa 2C, pudo deberse a que el acetato que entró en el sistema promovió la sulfatorreducción, como se mencionó con anterioridad, produciendo una mayor cantidad de sulfuro, así como de HCO₃⁻, como consecuencia de la oxidación de acetato por las BSR heterótrofas.

En comparación con los reactores que emplean la sulfatorreducción heterotrófica, la alcalinidad determinada en el R2 es baja, ya que al no tener un metabolismo heterotrófico dominante que genere HCO₃⁻ al mineralizar la materia orgánica, la alcalinidad depende principalmente del HS⁻ producido por las BSR.

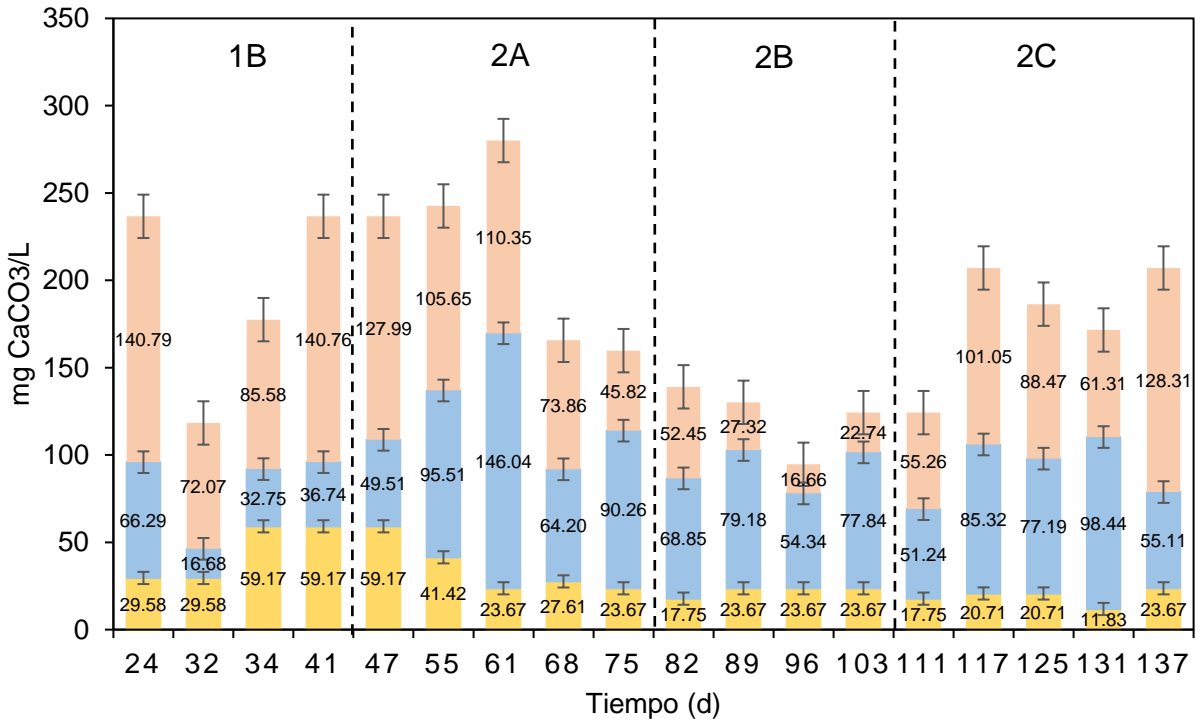


Figura 6. Contribución a la alcalinidad en el efluente por HS⁻ (●), HCO₃⁻ (●) y AGVs (●). En las distintas etapas de operación del R2.

Por otra parte, en reactores sulfatorreductores, es bien conocida la capacidad de este grupo de procariontes de aumentar los niveles de pH dentro del reactor, de manera tal, que una gran cantidad de ellos emplean controladores automáticos de pH. En el MBfR que Suarez et al., (2020) [61] diseñó y operó, el pH del efluente incrementó de 7.7 a 8.4 en 64 días. Una vez reestablecida la alimentación del reactor con una mezcla H₂/CO₂ (80/20 v/v) en las membranas, el pH se reestableció en 7.8 unidades.

En general, la reducción de oxoaniones consume protones y tiende a aumentar el pH en el efluente. Otros estudios empleando MBfR's, muestran que la reducción de uranilo (UO₂²⁺) (110 mg/L) a dióxido de uranio (UO₂) incrementó el pH de 7 en el afluente a 8.7 en el efluente, además, una vez que se agregó al sistema SO₄²⁻ (200 mg/L) como aceptor concomitante, el pH alcanzó las 9 unidades [63]. Así mismo, Xia et al., (2020) [65], también aplicando un MBfR para remover nitrato (30 mg/L) en una primera fase, suplementaron C inorgánico como HCO₃⁻ (80 mg/L) por 30 días, en los cuales, el pH del efluente se mantuvo en 10.5 unidades aproximadamente (pH afluente = 7.1), solo después de suplementar C inorgánico como CO₂ (1.8 atm), el pH en el efluente se mantuvo en ~ 7.5 durante el tiempo de operación restante.

Un punto importante que hay que señalar es que, la sulfatorreducción llevada a cabo en ambos reactores se produjo en un ambiente con un pH muy elevado. En varios estudios se ha señalado la capacidad de las BSR para reducir sulfato en condiciones

alcalinas, por ejemplo, principalmente se han descrito especies del género *Desulfonatronum*, capaces de crecer en ambientes con intervalos de pH que varían entre 9 y 10 unidades y capaces de utilizar varios donadores de electrones, como lactato, etanol e H_2 [98], [99]. Otros géneros reportados que pueden crecer en ambientes con valores de pH superiores a 9 unidades son *Desulfonatronobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfonatospira*, entre otros [100], [101]. El estudio llevado a cabo por Zeng et al., (2017) [102], muestra que la sulfatorreducción puede llevarse a cabo en un reactor UASB para el tratamiento de colorantes azo (HE-7B) con una alta concentración de almidón (3000 mg/L como DQO) provenientes de un proceso textil. En dicho estudio, la concentración de SO_4^{2-} a tratar fue de ~ 3280 mg/L removiendo 48 % de este oxoanión y removiendo 93 % el colorante HE-7B bajo un pH de 9.2. Al ser un proceso heterotrófico, el pH del sistema disminuyó hasta alcanzar un valor cercano a las 7 unidades, así mismo aumentando la alcalinidad de 300 a 800 mg $CaCO_3/L$. Este estudio a diferencia del nuestro comienza con un pH elevado, que al producir ácidos grasos volátiles debido a la degradación del almidón finalmente disminuyó el pH. Al estudiar las comunidades microbianas de los flóculos, los géneros de BSR dominantes fueron *Desulfobacter* y *Desulfomicrobium* con una abundancia relativa de 19 y 24 %, respectivamente.

A pesar de que la sulfatorreducción puede llevarse a cabo en ambientes alcalinos, se ha reportado que la actividad de las BSR puede disminuir entre 30 y 50 % cuando el pH se eleva de 7 a 9 unidades. Esto se debe a que se pueden inhibir reacciones enzimáticas específicas, así como afectar la homeostasis celular (p.e. alcalinización del citoplasma), lo que requería invertir energía para adaptarse al nuevo ambiente alcalino [103], [104].

4.5 Análisis de precipitados en la biopelícula

En la **Figura 7** se muestran los precipitados de PbS acumulados sobre la biopelícula al final de la Etapa 2 del R2. En las **Figuras 8 y 9** se presentan los espectros correspondientes de las zonas señaladas. Como se observa, las áreas seleccionadas en donde hay sólidos blancos poseen una composición química diferente a la de las áreas oscuras (sin partículas de precipitados). En el análisis con SEM-EDX se aprecia que los precipitados formados (zonas blancas; **Figuras 6-8**) se formaron en la biopelícula, no siendo uniformes en su distribución. La acumulación de los precipitados en la biopelícula puede deberse a que ésta puede actuar como semillas de nucleación, favoreciendo el crecimiento de cristales de los sulfuros metálicos [91], encontrándose que, en varios estudios, dichos precipitados se hallan comúnmente en la biopelícula [33], [105]. Además, se sabe que la biomasa, en específico los EPS, juega un papel importante en la retención de varios tipos de partículas, incluyendo los sulfuros metálicos, ya que son capaces de adsorber dichos precipitados [106]. Un indicio visual de que existió acumulación de PbS en la biopelícula fue que esta pasó de un color blanco-grisáceo, cuando el reactor solo se alimentó con SO_4^{2-} , a un color negro, cuando ambos reactores se alimentaron con Pb (**Figura A5-1; Anexo 5**). Como es sabido, algunos precipitados de sulfuros metálicos tienden a presentar un color muy oscuro o negro, entre los que encuentra el PbS. Dicho lo anterior, se puede decir que la mayoría de las partículas de PbS quedaron atrapadas

en la biopelícula (**Figura 8**) pues, según el análisis de Pb total en el efluente, aproximadamente 10 % del Pb se detectó en el efluente (**Figura 4B**), es decir, hubo partículas de PbS que no lograron quedar atrapadas en la biopelícula. Este fenómeno se ha observado en otros estudios, en los cuales, altas concentraciones de sulfuro favorecen la precipitación de metales en el seno del líquido. A relaciones molares metal:sulfuro mayores que 1:1 se favorece la formación de precipitados de pequeño tamaño (también llamados finos, $< 0.45 \mu\text{m}$), lo que no permite que sedimenten, provocando que estos salgan en el efluente del reactor [24], [33], [106]. En el R2, la relación molar metal:sulfuro fue aproximadamente de 1:2 (para la concentración mínima teórica de sulfuro, que fue de 73 mg/L, cf. **Anexo 6**), por lo que es de esperarse que algunas partículas de PbS no pudieran quedar atrapadas en la biopelícula.

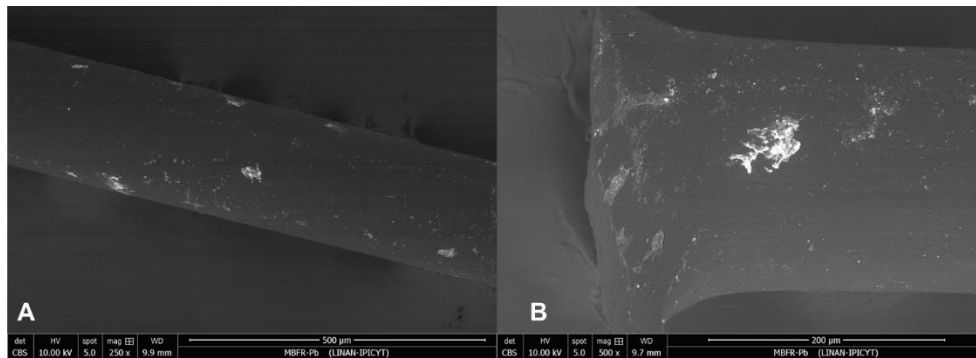


Figura 7. Imagen SEM de los precipitados de PbS acumulados en las biopelículas formadas sobre las membranas.

Las **Figura 8B-D** y **9B** muestran las zonas con precipitados y sin precipitados en la biopelícula, apreciándose que las zonas blancas están constituidas principalmente por Pb y S mostrando en el diagrama picos altos de ambos elementos, no presentándose estos picos en los diagramas de las zonas sin precipitados (zonas oscuras).

El análisis semicuantitativo correspondiente a las imágenes SEM de las **Figuras 8B-D** se muestra en las **Tablas 10, 11** y **12**, respectivamente. Si se contrastan los resultados con la **Tabla A7-1** del **Anexo 7**, podemos inferir que para el PbS por cada mol de Pb le correspondería 1 mol de S (relación molar 1:1). Analizando los resultados reportados en la **Tabla 10** tenemos que esta relación no se cumple, pues por cada 0.27 moles de Pb hay 0.073 moles de S en 100 g de la muestra, por lo que se puede inferir que, en este precipitado existen otras fases además de PbS. Así mismo, al apreciar la imagen de la zona analizada, esta presenta una coloración oscura, por lo que es factible que este precipitado se haya encontrado embebido en la biopelícula.

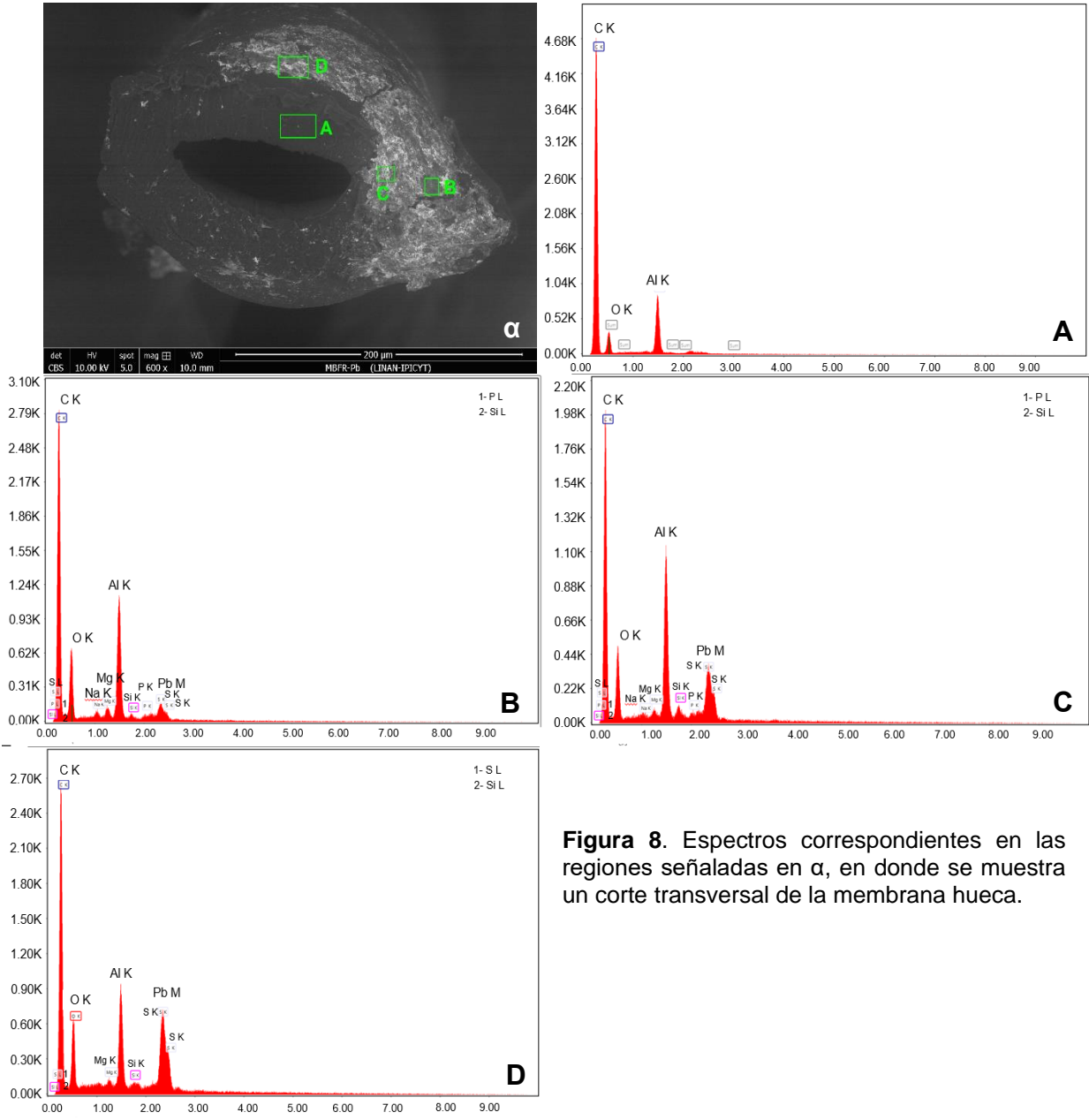


Figura 8. Espectros correspondientes en las regiones señaladas en α , en donde se muestra un corte transversal de la membrana hueca.

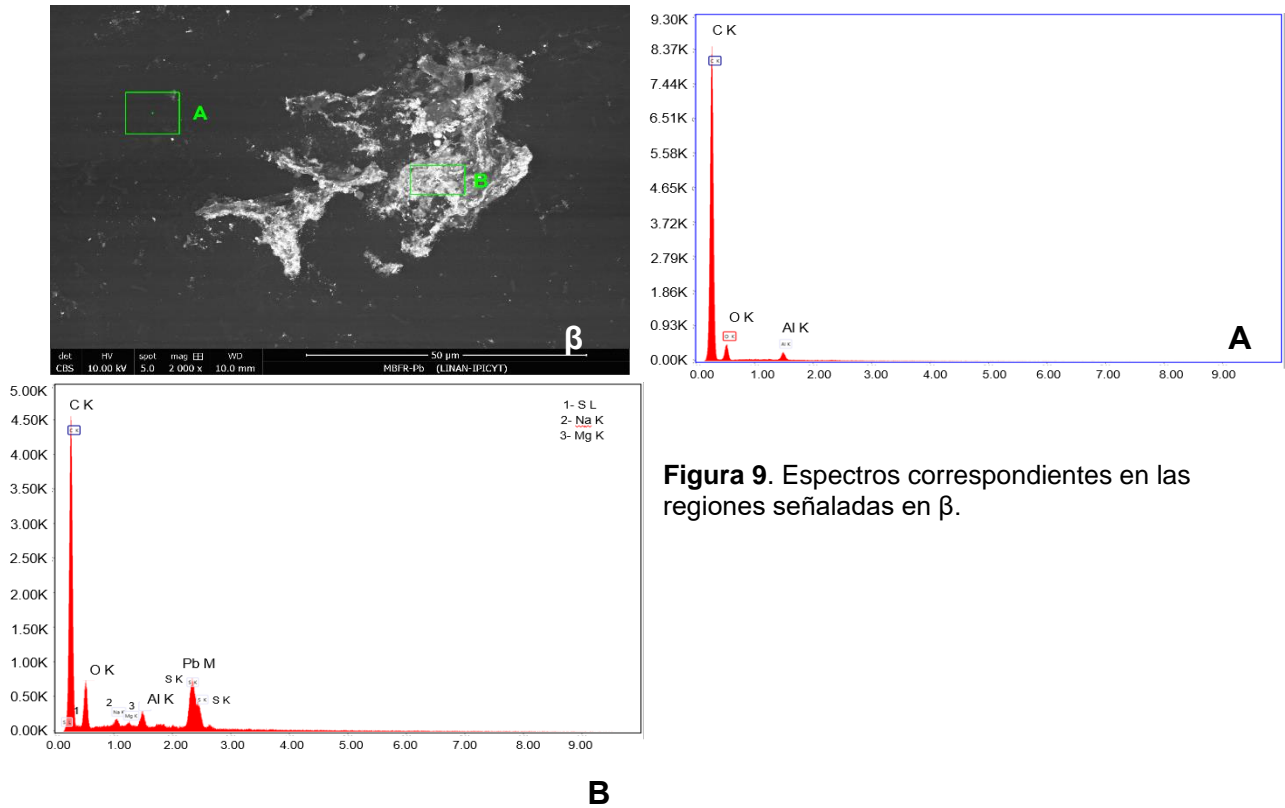


Figura 9. Espectros correspondientes en las regiones señaladas en β .

Tabla 10. Análisis semicuantitativo de los precipitados mostrados en la Figura 8B.

Elemento	Peso (%)	masa (g)	Moles
C	69.12	69.12	5.76
O	19.37	19.37	1.21
Na	1.06	1.06	0.046
Mg	1.48	1.48	0.061
Si	0.07	0.07	0.0025
P	0.94	0.94	0.03
S	2.33	2.33	0.073
Pb	5.62	5.62	0.027
Total	100	100	—

Para el caso del análisis del precipitado mostrado en la Figura 8C, se puede observar en la Tabla 11 que la relación molar Pb:S es casi igual a 1:1, pues por cada 0.071 moles de Pb hay 0.079 moles de S en 100 g de la muestra analizada. De igual forma, puede inferirse lo mismo de los precipitados de las Figuras 8D y 9B, cuyos resultados del análisis semicuantitativo se muestran en las Tablas 12 y 13, respectivamente. Como observa en la Tabla 12, la relación molar Pb:S es de 0.11:0.10, mientras que en la Tabla 13 es de 0.084:0.107. En ambos resultados, la relación molar Pb:S es \sim 1:1. Por otro lado y a pesar de que la relación 1:1 de Pb:S se cumple también para el PbSO_4 , la formación de este precipitado puede descartarse ya que con base en los cálculos realizados con Visual MINTEQ, el PbSO_4 no se forma bajo las condiciones

de operación del reactor. Lo mismo se puede decir del carbonato de plomo (PbCO_3), pues este compuesto tampoco se vio favorecido termodinámicamente. Además de lo anterior, se observa un exceso en los moles de O_2 los cuales pueden provenir de la oxidación de la materia orgánica presente en la biopelícula, cuando estas se sometieron al análisis en SEM-EDX.

Tabla 11. Análisis semicuantitativo de los precipitados mostrados en la **Figura 8C**.

Elemento	Peso (%)	masa (g)	Moles
C	55.18	55.18	4.6
O	12.09	12.09	0.76
Na	0.4	0.4	0.017
Mg	0.5	0.5	0.021
Al	13.02	13.02	0.483
Si	0.67	0.67	0.024
P	0.96	0.96	0.03
S	2.53	2.53	0.079
Pb	14.64	14.64	0.071
Total	100	100	—

Tabla 12. Análisis semicuantitativo de los precipitados mostrados en la **Figura 8D**.

Elemento	Peso (%)	masa (g)	Moles
C	52.73	52.73	4.39
O	12.46	12.46	0.78
Mg	0.43	0.43	0.018
Al	8.24	8.24	0.305
Si	0.09	0.09	0.003
S	3.55	3.55	0.111
Pb	22.5	22.5	0.109
Total	100	100	—

Tabla 13. Análisis semicuantitativo de los precipitados mostrados en la **Figura 9B**.

Elemento	Peso (%)	masa (g)	Moles
C	62.36	62.36	5.2
O	11.49	11.49	0.72
Na	1.01	1.01	0.044
Mg	0.26	0.26	0.011
S	2.69	2.69	0.084
Pb	22.18	22.18	0.107
Total	100	100	—

Por último, la cantidad tan alta de C y O, en comparación con los demás elementos, en todas las muestras pudo deberse a que los precipitados se encontraban adheridos a

la biopelícula misma que está compuesta principalmente de materia orgánica (**Figura A7-1, Anexo 7**).

4.8 Estructura de las comunidades microbianas

La **Figura 10** muestra la abundancia relativa de los géneros abundantes en las biopelículas microbianas de los reactores R1 y R2 bajo diferentes condiciones de operación. Como se aprecia, la diversidad de los inóculos es muy alta respecto a la diversidad de las biopelículas tomadas en el reactor, las cuales muestran una reducción en la diversidad microbiana y aumento en la abundancia de los géneros como *Hydrogenophaga*, *Thauera* y *Desulfomicrobium*.

La estructura de las comunidades microbianas en la biopelícula estuvo fuertemente influenciada por la manera en cómo se operaron los reactores. Por ejemplo, en el R1 la Subetapa 1B estuvo dominada por los géneros *Hydrogenophaga*, *Fusibacter*, *Thiovirga*, *Leptothrix*, *Dechloromonas* y *Desulfomicrobium*. *Hydrogenophaga* es un género que comúnmente se ha detectado en las biopelículas de distintos MBfR's que tratan diferentes contaminantes. Resulta ser un género muy versátil del cual su principal característica metabólica es que puede crecer autotróficamente al oxidar H_2 para la generación de energía utilizando diferentes aceptores de electrones, como O_2 y NO_3^- y utilizando CO_2 como fuente de carbono, aunque también se ha reportado su capacidad para crecer de manera heterotrófica [107]. Así mismo, los géneros *Fusibacter* y *Desulfomicrobium*, fueron los géneros dominantes pertenecientes al grupo de BSR, pues se ha reportado su capacidad para reducir hidrogenotróficamente SO_4^{2-} , tiosulfato y azufre elemental a sulfuro [108], [109]. Por otro lado, las especies del género *Thiovirga* son capaces de oxidar sulfuro, azufre y tiosulfato a sulfato [110]. Para el caso de heterótrofos, solo *Leptothrix* y *Thauera* se encontraron en abundancias mayores al 1 %; el género *Leptothrix* se caracteriza por crecer en ambientes libres de contaminantes con bajas concentraciones de compuestos orgánicos de fácil degradación como acetato, glutamato o prolina [111], [112], mientras que *Thauera* es un género con la capacidad de emplear O_2 , NO_3^- , NO_2^- y N_2O como aceptores finales de electrones para la degradación de diferentes compuestos orgánicos, particularmente compuestos aromáticos como fenol, tolueno, benzoato, fenilacetato, entre otros. [113]. *Thauera* también es capaz de reducir NO_3^- autotróficamente utilizando H_2 y sulfuro como donadores de electrones [114], [115]. *Dechloromonas* fue otro de los géneros dominantes en esta etapa, del cual, se han descrito especies capaces de utilizar O_2 , NO_3^- , NO_2^- y perclorato (ClO_4^-) como aceptores de electrones [116], [117]. Así mismo, se ha establecido la posibilidad de que especies de este género sean capaces de oxidar especies químicas reducidas de azufre, como tiosulfato, a SO_4^{2-} [118].

Para el caso de la Subetapa 2C, todos los géneros disminuyen en su abundancia, excepto *Desulfomicrobium*, el cual, en caso contrario, aumenta. Este género ha sido reportado en otros trabajos en los cuales se emplean reactores para el tratamiento de agua contaminada con Pb. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Nguyen et al., 2016 [105], este género fue dominante en un principio en el tratamiento de aguas contaminadas con Pb siendo completamente inhibido posteriormente a una concentración de 200 mg/L

de Pb. En el presente estudio, el género *Desulfomicrobium* fue uno de los géneros dominantes en la Subetapa 2C en ambos reactores, lo que demuestra su capacidad para hacer frente a la toxicidad del Pb. Así mismo, se ha demostrado la capacidad de varias cepas de este género para resistir la toxicidad por otros metales como Cu, Zn, Al, entre otros [119]. También, en esta Subetapa, el género *Erysipelothrix* aumentó su abundancia en ambos reactores, sobre todo en el R2. En este género se encuentran bacterias comensales y patógenas con la capacidad de generar infecciones en animales y humanos [120], sin embargo, se ha reportado su presencia en reactores aerobios [121], aunque no se ha descrito la función que cumplen dentro del tratamiento de agua. Por último, la presencia de *Acholeplasma*, (aunque no fue en alta abundancia, menor al 2 %), en las Subetapas 2C de ambos reactores parece ser debido a su característica de ser un anaerobio facultativo y heterótrofo que se ha encontrado en sistemas de tratamiento por lodos activados, sin determinar la función que cumplen concretamente [117], [122].

Debido a que en el R1 no se removió el O₂ del medio de cultivo ni de la solución de Pb y, aunado a la entrada de una mayor cantidad de acetato (~ 114 mg/L) en la Subetapa 2C, esto pudo permitir el crecimiento de bacterias facultativas que aprovecharon el acetato como fuente de energía y carbono (**Ecuación 8, Anexo 3**). *Dechloromonas* y *Thauera* fueron géneros con mayor abundancia que tienen la capacidad para utilizar acetato como donador de e- en presencia de O₂ [113], [123], por lo tanto, puede suponerse que dichos géneros fueron capaces de degradar una parte del acetato entrante hasta CO₂ utilizando una parte del O₂ como aceptor de electrones. Así mismo, a ambos géneros (*Dechloromonas* y *Thauera*) junto a *Thiovirga* se les ha demostrado la capacidad de oxidar sulfuro. Por tanto, se puede suponer que, una parte del sulfuro fuera re-oxidado por los géneros antes mencionados, lo que pudo dar como resultado el establecimiento de un “ciclo del azufre” dentro del reactor, en el cual, las BSR reducían el SO₄²⁻ a sulfuro, mientras que las BSO re-oxidaban nuevamente el sulfuro producido a otras especies de azufre con mayor estado de oxidación, como tiosulfato o azufre elemental. Dicho fenómeno se ha observado en otros MBfR’s, en los cuales, en presencia de O₂, NO₃⁻, SeO₄²⁻ y SO₄²⁻, se ha detectado la presencia de BSO y BSR en la biopelícula [59], [61], [65]. A pesar de que el crecimiento de BSO se da preferentemente en ambientes ácidos, también se ha encontrado que este grupo de microorganismos puede crecer en condiciones con un pH elevado. Por ejemplo, está demostrado que *Thiovirga sulfuroxydans* pueden crecer en un pH de hasta 9 unidades [110], además, este género se ha descubierto en sedimentos de un drenaje de una mina de cobre, cuyos valores de pH se encontraban arriba de 9 unidades [124]. También, se ha demostrado que la oxidación de sulfuro puede ocurrir en reactores que tratan afluentes alcalinos (pH > 10) por dos procesos, un proceso abiótico, en el cual, el O₂ puede oxidar espontáneamente el sulfuro a polisulfuro, tiosulfato y sulfito con una concentración de ~ 5 mg/L de oxígeno disuelto (OD) (**Ecuaciones 10-12, Anexo 3**) [125], [126]. La oxidación biológica de sulfuro se dio una vez que las reacciones abióticas ocurrieron, resultando en especies químicas de azufre con un mayor estado de oxidación (S⁰ o SO₄²⁻), dependiendo de la cantidad de O₂ disponible (**Ecuaciones 13 y 14, Anexo 3**). En la biopelícula del MBfR, al tener una cantidad de OD limitada, es probable que las BSO oxidaran solo una

parte de los intermediarios producidos por la reacción abiótica, dado que no se midieron dichos intermediarios, es de suponerse que el O_2 que entró en el R1 fue consumido en su totalidad ya sea por el consumo en la degradación de acetato o su uso en otros metabolismos (como la oxidación de sulfuro o H_2). Aunque, la oxidación de sulfuro suele ser un proceso más complejo que, por ejemplo, la sulfatorreducción, no debe descartarse la posibilidad de que la presencia de *Thiovirga*, *Dechloromonas* y *Thauera* hubieran consumido una parte del sulfuro producido por la sulfatorreducción.

Por otra parte, la introducción de Pb en el R1 produjo cambios en la comunidad microbiana del R1. Una vez que se alimentó al R1 con Pb, este modificó de manera importante la estructura de la comunidad microbiana. Por ejemplo, de manera drástica disminuyeron las abundancias de *Hydrogenophaga*, *Thiovirga* y *Fusibacter*, mientras que *Dechloromonas*, *Erysipelothrix* y *Desulfomicrobium* aumentaron.

Para el caso del R2, remover el O_2 en el día 37, pudo haber influido en la estructura de la comunidad microbiana en la biopelícula. Así mismo, la acidificación de los afluentes hecha con HNO_3 , añadió NO_3^- al sistema (73.3 mg/L). Dado lo anterior, la presencia de NO_3^- influyó en que el género *Thauera* estuviese en una abundancia superior a 14 %, pues al ser un desnitrificante, la presencia de NO_3^- estimuló su crecimiento en la biopelícula, dando como resultado la aparición de un “ciclo del azufre” que, a diferencia del R1, este pudo establecerse debido a una desnitrificación mixotrófica (al utilizar el sulfuro, H_2 y acetato como donadores de electrones). La desnitrificación autotrófica en la en el R2 pudo darse en las Subetapas 2A y 2B, dado que, la diferencia entre el sulfuro teórico y el sulfuro que no reaccionó con el Pb no coincidieron (**Figura 3B**), se puede especular que una parte del sulfuro pudo ser utilizado como donador de e^- por *Thauera* para reducir NO_3^- . En estas Subetapas, la concentración de sulfuro teórico osciló entre 74 y 155 mg/L que, al compararlo molarmente con el NO_3^- que entraba en el afluente la relación molar S/N osciló entre 1.9 y 4.2. Se ha establecido que una relación molar S/N mayor a 0.5, es decir, con una cantidad en exceso de sulfuro y una limitada de NO_3^- , la desnitrificación oxidaría al sulfuro parcialmente a azufre elemental (**Ecuación 15, Anexo 3**) [65], [127]. Dado que el azufre elemental puede ser utilizado por las BSR como aceptor de e^- [128], este, no se acumuló en la biopelícula y probablemente fue reducido a sulfuro de nuevo. Por otro lado, durante la Subetapa 2C, al entrar una mayor cantidad de acetato, este fue utilizado por *Thauera* como fuente de energía en lugar del sulfuro (**Ecuación 9, Anexo 3**). En la **Figura 3B**, se aprecia que en dicha Subetapa los valores del sulfuro teórico y el sulfuro que no reaccionó con Pb siguen la misma tendencia y en ciertos puntos se traslapan, a diferencia de las subetapas anteriores, esto pudo deberse probablemente a que existió consumo de sulfuro, como se expuso con anterioridad. Por tanto, se puede teorizar que el acetato fue utilizado preferentemente sobre el sulfuro por *Thauera* para reducir el NO_3^- a N_2 .

Especies del género *Thauera* se han encontrado en reactores desnitrificadores operados a un pH de 8.5, en los cuales el crecimiento de estos microorganismos fue del tipo mixotrófico [129]. Así mismo, *Thauera* es capaz de eliminar NO_3^- en ambientes con pH de entre 9 y 12 unidades utilizando acetato como donador de electrones [130]. Por

otro lado, *Erysipelothrix* tuvo una abundancia relativa superior a 18 %, aunque, como se mencionó anteriormente, su función dentro en el tratamiento de agua no se ha identificado todavía.

Por último, *Desulfomicrobium* fue la BSR predominante del sistema, así como el género más abundante de la biopelícula (abundancia relativa mayor a 30 %), lo que pudo implicar que fuera el microorganismo responsable de la mayor parte de la reducción de SO_4^{2-} en el reactor. Puede decirse que el crecimiento de *Desulfomicrobium* en ambos reactores estuvo promovido por la entrada de acetato, sin embargo, este sustrato promovió el crecimiento de este género de manera indirecta. En la literatura se menciona que este género pertenece al grupo de BSR de oxidación incompleta, es decir, no es capaz de utilizar al acetato como fuente de electrones, pues está metabólicamente impedido para obtener energía de este compuesto [131]. El aumento en la abundancia de *Desulfomicrobium* pudo deberse a que el género *Thauera*, al oxidar una parte del acetato utilizando O_2 en el R1 o NO_3^- en el R2, produjo HCO_3^- dentro de la biopelícula, el cual fue utilizado como una fuente de carbono adicional por *Desulfomicrobium*, favoreciendo su crecimiento.

Por lo tanto, se puede suponer que en ambos reactores se desarrolló una biopelícula sulfatorreducotra hidrogenotrófica, dado que no hubo otro género de BSR detectado en la biopelícula de ambos reactores con una abundancia superior a 1 % capaz de utilizar acetato, el H_2 sustentó a las BSR que, al producir sulfuro y, elevar los niveles de pH dentro de los reactores, se creó el ambiente adecuado para permitir la formación de PbS . Así mismo, el género *Thauera* promovió el crecimiento de *Desulfomicrobium* por las siguientes razones: 1) consumir O_2 o NO_3^- , aceptores de electrones que pueden afectar el crecimiento de las BSR, “protegiendo” a este grupo de microorganismos de sus efectos negativos; 2) Al consumir el acetato, *Thauera* produjo HCO_3^- debido a la mineralización de este compuesto, el cual fue utilizado por *Desulfomicrobium* como una fuente de carbono adicional al suplementado en el medio de cultivo. Es de suponer que las BSR se encontraran en lo profundo de dichas biopelículas consumiendo el H_2 directamente de la membrana y aprovechando el HCO_3^- producido por el metabolismo heterotrófico, como se ha visto en otros MBfR's y otro tipo de reactores de biopelícula [132], [133]. *Thauera* y otros géneros como *Erysipelothrix* e *Hydrogenophaga*, pudieron establecerse del lado más próximo al seno de líquido, aprovechando el O_2 o NO_3^- y acetato, así mismo probablemente pudieron consumir una fracción de sulfuro producido por las BSR mediante desnitrificación autotrófica (en el caso de *Thauera*).

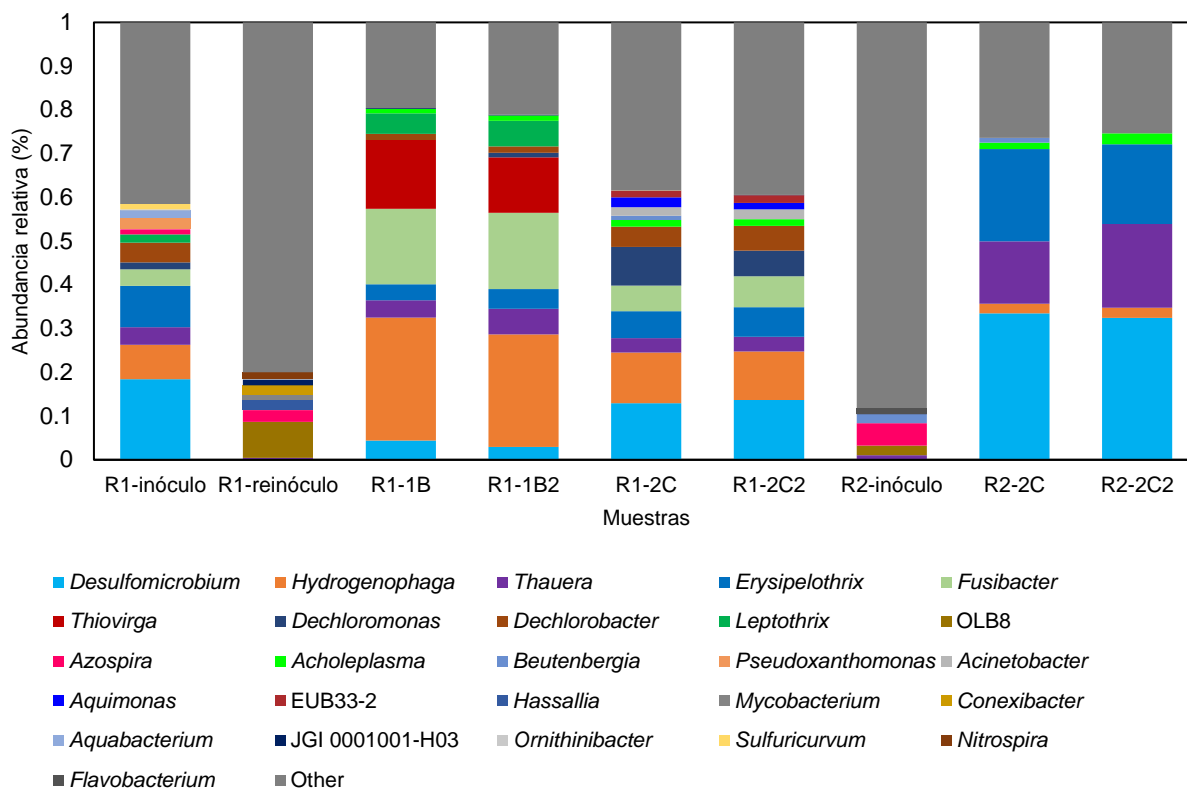


Figura 10. Perfil filogenético de la biopelícula a nivel género en los inóculos y cada una de las etapas de operación del R1 y el R2. Los géneros con abundancias relativas menores al 1 % se agruparon y se muestran en color gris. Las muestras de biopelícula fueron analizadas por duplicado.

Los índices de diversidad alfa (Chao1, Shannon y Simpson; **Figura 11**), muestran que la diversidad de los inóculos es mucho más alta respecto a la diversidad que presentan las biopelículas del R1 y el R2. Dichos índices se seleccionaron dado que los índices de Chao1 determina la riqueza de especies, mientras que los índices de Shannon y Simpson determinan la diversidad a partir de la riqueza de especies y su abundancia relativa [134]. Como se muestra en la **Figura 11**, los inóculos resultaron ser los más diversos, en los cuales, todos los géneros agrupados en la biósfera rara (géneros con abundancias relativas menores al 1 %) dominaron en el reinóculo del R1 y el inóculo del R2. Un caso interesante fue el del primer inóculo del R1, pues la diversidad de este se encontró por debajo de los otros dos inóculos. Una vez que en el R1 se alimentó el reactor con SO_4^{2-} , la diversidad disminuyó drásticamente; sin embargo, una vez que el reactor R1 se alimentó con Pb, la biósfera rara aumentó y, por tal motivo, la diversidad microbiana también lo hizo en esta subetapa. El aumento en la diversidad en dicha subetapa, pudo ser consecuencia del modo en que el Pb se alimentó al reactor, pues como se expuso con anterioridad, el Pb pudo entrar “precipitado” evitando que estuviera disponible y “protegiendo” a los microorganismos de su toxicidad. Además, el acetato suministrado en la solución de Pb promovió el crecimiento de microorganismos heterótrofos y/o mixótrofos y, en consecuencia, aumentado la diversidad en la biopelícula. Por otra parte, en la

Subetapa 2C del R2 la biopelícula mostró poseer una diversidad muy baja en comparación con la misma Subetapa del R1. Esto pudo deberse a la forma en cómo se operó el reactor, es decir, la alimentación independiente de la solución de Pb pudo provocar que este estuviera una mayor biodisponibilidad, ejerciendo algún efecto tóxico sobre los microorganismos. Además, la eliminación de O₂ en el afluente restringió el metabolismo aerobio y favoreció el crecimiento de microorganismos anaerobios, como las BSR. Así mismo, es muy clara la dominancia de muy pocos géneros (*Desulfomicrobium*, *Thauera*, *Erysipelothrix*, *Hydrogenophaga* y *Acholeplasma*) en comparación con la Subetapa 2C del R1. La disminución de la diversidad en los reactores una vez que estos tratan contaminantes tiende a disminuir, característica vista en otro tipo de reactores que tratan contaminantes después de un periodo de aclimatación [135].

También, en la **Figura 12** se pueden apreciar los resultados del análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, por sus siglas en inglés), el cual muestra que operar los reactores bajo diferentes condiciones promovieron el desarrollo de diferentes comunidades microbianas en la biopelícula. Para el caso de los inóculos, el primer inóculo del R1 es muy diferente al reinóculo que se utilizó en el R1 y al inóculo del R2. Es importante señalar que el modo de operación entre el R1 y el R2 influyó sobre la identidad de la comunidad microbiana, dado que los diferentes cambios realizados sobre R2 muestran una marcada diferencia en la estructura de la comunidad microbiana al final de la Subetapa 2C, algo que también puede apreciarse en la **Figura 10**. En general, las comunidades microbianas del R1 parecen mantener una comunidad distinta al R2, en el que el Pb tuvo un fuerte efecto selectivo sobre los microorganismos de la biopelícula, de los cuales, algunos géneros se les ha reportado su capacidad para resistir la toxicidad por metales pesados.

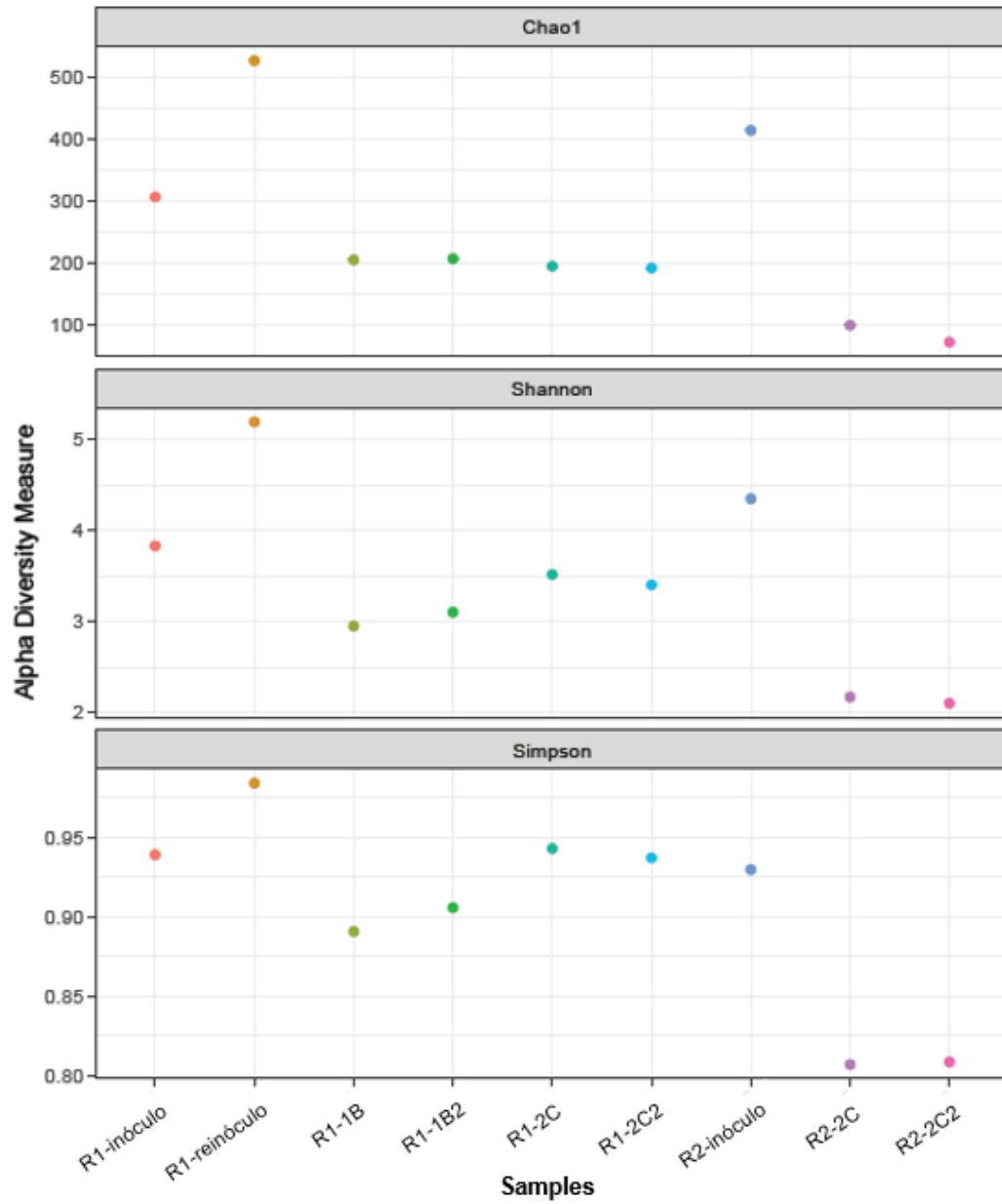


Figura 11. Índices de diversidad alfa Chao1, Shannon y Simpson calculado para los inóculos y muestras de biopelícula de las diversas etapas de operación en el R1 y el R2. Las muestras de biopelícula fueron analizadas por duplicado.

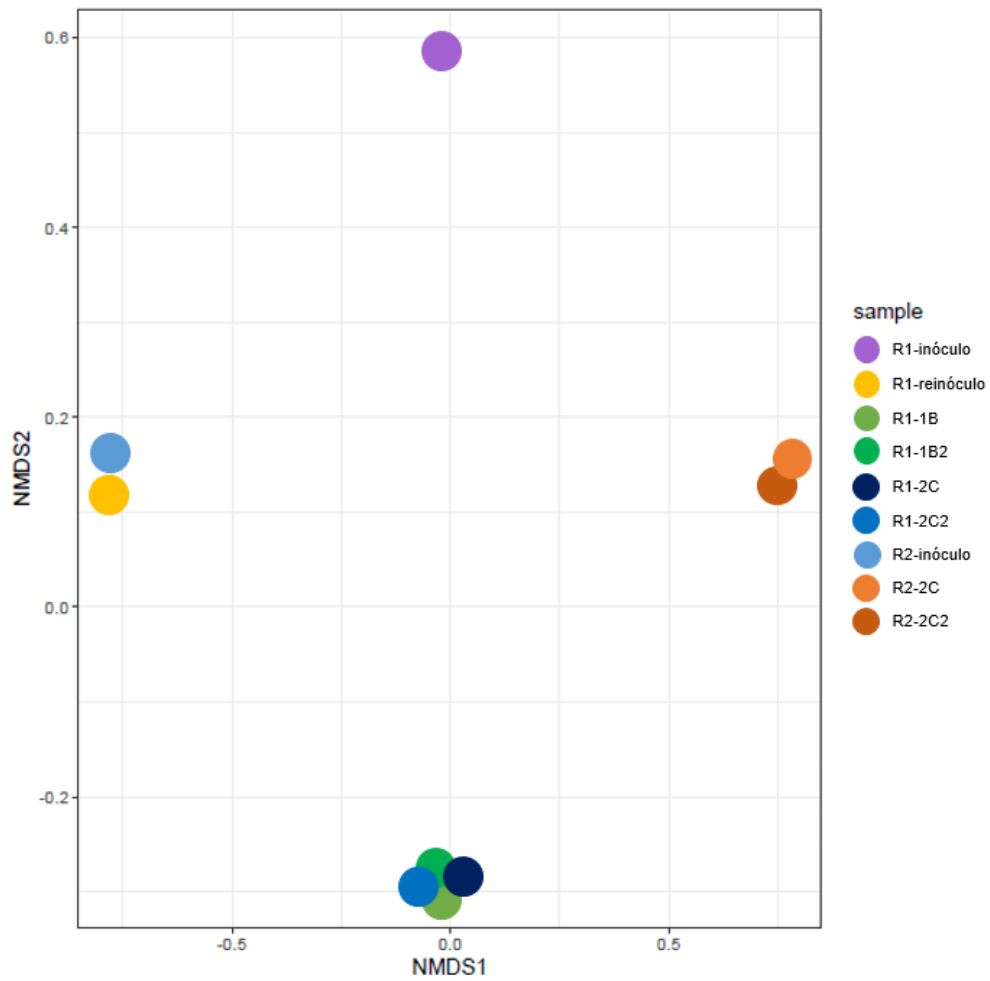


Figura 12. Gráfica del análisis de Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) que señala las diferencias en la comunidad microbiana de los inóculos y la biopelícula bajo diferentes condiciones de operación. Las muestras de biopelícula fueron analizadas por duplicado.

5. Conclusiones

En el presente trabajo se demostró la capacidad de que en un MBfR se desarrollara una biopelícula capaz de consumir SO_4^{2-} y generar sulfuro en cantidad suficiente para precipitar Pb. La reducción hidrogenotrófica del SO_4^{2-} , a diferencia de otros oxoaniones como el NO_3^- , resultó ser un proceso lento, pues las BSR necesitaron un TRH largo (60 h) para poder generar sulfuro en cantidad suficiente y constante. Una vez que se produjo sulfuro en el reactor (100 mg/L en promedio), este facilitó la precipitación de Pb siendo capaz de precipitarlo hasta en un 99 %. Sin embargo, y debido al modo en que se alimentó el Pb al reactor algunas partículas de PbS no lograron sedimentar o quedar atrapadas en la biopelícula, lo que provocó que un 10 % aproximadamente del Pb total saliera en el efluente en forma de PbS. Por otra parte, se detectó que el Pb era capaz de formar varios precipitados con fosfato antes de entrar al reactor en el R1, lo que motivó a realizar cálculos de los equilibrios químicos que podían darse entre las soluciones de alimentación y el efluente del reactor. Hecho esto, se determinó que para que el Pb se estabilizara directamente como PbS dentro del reactor, era necesario alimentar la solución de Pb de manera independiente a la del medio de cultivo, lo que favorecía termodinámicamente su precipitación con sulfuro en el MBfR. Por tanto, en el R2 se hicieron modificaciones en el sistema de alimentación, y al término de su operación, varias muestras de biopelícula se analizaron con EDX, confirmando que los precipitados encontrados eran potencialmente PbS.

También, la modificación del modo de operación entre el R1 y el R2, permitió una estructuración diferente de las comunidades microbianas en las biopelículas de ambos reactores. En particular, la eliminación del O_2 y la forma en que se alimentó el Pb, así como, la introducción de NO_3^- en el R2 tuvo como consecuencia que algunos géneros fueran altamente dominantes, esto se confirma con los índices de diversidad alfa, los cuales muestran una menor diversidad microbiana en las biopelículas en comparación de la diversidad microbiana del inóculo. La presencia de O_2 en el R1 y de NO_3^- en el R2, pudo propiciar la aparición de un “ciclo del azufre”, en el cual, el sulfuro producido por las BSR se re-oxidaba por BSO o microorganismos capaces de desnitrificar autotróficamente, lo que pudo causar una baja eficiencia en la remoción de SO_4^{2-} . De manera interesante, pocos fueron los géneros de BSR que se encontraron en una abundancia relativa superior a 1 % en ambos reactores, destacándose el género *Desulfomicrobium* (con abundancias relativas aproximadas de 3 a 30%), que pudo jugar un papel clave en el desempeño de los reactores, al poder ser el responsable de la generación de la mayor parte del sulfuro en el R2.

Finalmente, el presente trabajo demuestra la capacidad de un MBfR para la remoción de Pb por medio de su precipitación como sulfuro metálico. A diferencia de otros trabajos en los que se emplean MBfR's, en los cuales los contaminantes quedan atrapados directamente en la matriz de la biopelícula al ser utilizados como aceptores de electrones, el Pb primero debió precipitar con sulfuro para quedar inmovilizado en la biopelícula. Realizadas las distintas modificaciones en el R2 (separación de los afluentes, eliminación de O_2 en el afluente, entre otros), se demostró que el MBfR tiene la capacidad

de remover metales del agua mediante el crecimiento de BSR que, a pesar de ser microorganismos de lento crecimiento, estas pueden establecerse en un MBfR y poder ser utilizadas para el tratamiento de aguas con alto contenido de Pb y SO_4^{2-} .

6. Perspectivas

Con base en los resultados y discusión de la presente tesis, existen varias perspectivas que podrían explorarse con el fin de mejorar el proceso por el cual, el MBfR pueda ser aplicado exitosamente para el tratamiento de aguas con alto contenido en SO_4^{2-} y Pb por medio de la actividad de BSR.

- Utilizar un agua “real”, ya sea de un efluente que contenga Pb, como los provenientes de fábricas de baterías ácidas o de un DAM, los cuales se caracterizan por poseer bajos valores de pH, altas concentraciones de SO_4^{2-} y la presencia de otros metales esto, con el fin de verificar el desempeño del reactor bajo dichas condiciones.
- Tomar en cuenta cómo la presencia de otros aceptores de electrones, por ejemplo, el NO_3^- , pueden interferir en el proceso de sulfurogénesis en el MBfR.
- Emplear un sistema de dos etapas, en el cual, exista un reactor en el que crezcan las BSR y produzcan sulfuro (como el MBfR), el efluente de este reactor pasará a un segundo reactor en el cual se llevará a cabo el proceso de precipitación y sedimentación del Pb, con la finalidad de evitar la toxicidad por Pb en el reactor sulfurogénico y de poder recuperar los precipitados de manera más sencilla.
- Mantener el pH en una escala neutra, pues es sabido que las BSR crecen de manera óptima a una escala de pH entre 7 y 8 unidades, lo cual podría optimizar el consumo de SO_4^{2-} , como se ha visto en otros MBfR's.
- Utilizar una mezcla H_2/CO_2 (80 %/20 %) como sustrato en las membranas, pues el CO_2 aparte de funcionar como fuente de carbono inorgánico, ayudaría a regular el pH de manera efectiva y poco costosa.

8. Bibliografía

- [1] D. H. Kumar Reddy and S. M. Lee, "Water Pollution and Treatment Technologies," *J. Environ. Anal. Toxicol.*, vol. 02, no. 05, pp. 5–6, 2012, doi: 10.4172/2161-0525.1000e103.
- [2] R. P. Schwarzenbach, T. Egli, T. B. Hofstetter, U. Von Gunten, and B. Wehrli, "Global water pollution and human health," *Annu. Rev. Environ. Resour.*, vol. 35, pp. 109–136, 2010, doi: 10.1146/annurev-environ-100809-125342.
- [3] N. Singh and J. H. Li, "Environmental impacts of lead ore mining and smelting," *Adv. Mater. Res.*, vol. 878, pp. 338–347, 2014, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.878.338.
- [4] A. L. Wani, A. Ara, and J. A. Usmani, "Lead toxicity: A review," *Interdiscip. Toxicol.*, vol. 8, no. 2, pp. 55–64, 2015, doi: 10.1515/intox-2015-0009.
- [5] J. Schwartz, P. J. Landrigan, J. E L Baker, W. A. Orenstein, and I. H. von Lindern, "Lead-induced anemia: dose-response relationships and evidence for a threshold.," <https://doi.org/10.2105/AJPH.80.2.165>, vol. 80, no. 2, pp. 165–168, Aug. 2011, doi: 10.2105/AJPH.80.2.165.
- [6] R. Z. Sokol and N. Berman, "The effect of age of exposure on lead-induced testicular toxicity," *Toxicology*, vol. 69, no. 3, pp. 269–278, Jan. 1991, doi: 10.1016/0300-483X(91)90186-5.
- [7] C. D. Klaassen, "Toxicology: The Basic Science of Poisons, Ninth Edition," p. 1696, 2018, Accessed: Oct. 10, 2021. [Online]. Available: <https://mhebooklibrary.com/doi/book/10.1036/9781259863752>.
- [8] M. J. Brown and S. Margolis, "Lead in drinking water and human blood lead levels in the United States.," *MMWR. Surveill. Summ.*, vol. 61 Suppl, pp. 1–9, 2012.
- [9] NOM-127-SSA1-1994, *Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización*. 1994.
- [10] NOM-001-SEMARNAT-2021, *NOM-001-SEMARNAT-2021, Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales*. 2021.
- [11] NOM-002-SEMARNAT-1996, *NOM-002-SEMARNAT-1996 Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal*. 1996.
- [12] V. Kumar and S. K. Dwivedi, "Toxicity potential of electroplating wastewater and its bioremediation approaches: a review," <https://doi.org/10.1080/21622515.2021.1983030>, vol. 10, no. 1, pp. 238–254, 2021, doi: 10.1080/21622515.2021.1983030.
- [13] O. I. Nwachukwu, L. E. Odoemelam, and C. O. Muoneke, "Contaminants in selected industrial effluents and their effect on groundwater quality near factories in two cities of South East Nigeria," 2015. [Online]. Available: <http://www.journalijar.com>.
- [14] T. Chen, C. Lei, B. Yan, L. li Li, D. mao Xu, and G. G. Ying, "Spatial distribution and environmental implications of heavy metals in typical lead (Pb)-zinc (Zn) mine tailings impoundments in Guangdong Province, South China," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 25, no. 36, pp. 36702–36711, Dec. 2018, doi: 10.1007/S11356-018-3493-X/METRICS.
- [15] M. I. Naikoo, M. I. Dar, F. A. Khan, F. Raghieb, and N. Rajakaruna, "Trophic transfer and bioaccumulation of lead along soil–plant–aphid–ladybird food chain," *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2019 2623, vol. 26, no. 23, pp. 23460–23470, Jun. 2019, doi: 10.1007/S11356-019-05624-X.
- [16] K. Dermentzis, E. Valsamidou, and D. Marmanis, "Simultaneous removal of acidity and lead from acid lead battery wastewater by aluminum and iron electrocoagulation," *J. Eng. Sci. Technol. Rev.*, vol. 5, no. 2, pp. 1–5, 2012.
- [17] Y. Zhou, *Waste Discharge into the Marine Environment: Principles and Guidelines for ... - Yong Zhou - Google Libros*, 1st ed. England: Pergamont Press Ltd, 2015.
- [18] V. Kumar, S. K. Dwivedi, and S. Oh, "A critical review on lead removal from industrial wastewater: Recent advances and future outlook," *J. Water Process Eng.*, vol. 45, no. October 2021, 2022, doi: 10.1016/j.jwpe.2021.102518.

- [19] S. Kumar, M. A. Rahman, M. R. Islam, M. A. Hashem, and M. M. Rahman, "Lead and other elements-based pollution in soil, crops and water near a lead-acid battery recycling factory in Bangladesh," *Chemosphere*, vol. 290, no. November 2021, p. 133288, 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.133288.
- [20] W. A. M. Fernando, I. M. S. K. Ilankoon, T. H. Syed, and M. Yellishetty, "Challenges and opportunities in the removal of sulphate ions in contaminated mine water: A review," *Miner. Eng.*, vol. 117, no. November 2017, pp. 74–90, 2018, doi: 10.1016/j.mineng.2017.12.004.
- [21] A. Akcil and S. Koldas, "Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies," *J. Clean. Prod.*, vol. 14, no. 12-13 SPEC. ISS., pp. 1139–1145, 2006, doi: 10.1016/j.jclepro.2004.09.006.
- [22] C. Blodau, "A review of acidity generation and consumption in acidic coal mine lakes and their watersheds," *Sci. Total Environ.*, vol. 369, no. 1–3, pp. 307–332, Oct. 2006, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2006.05.004.
- [23] L. xing Chen *et al.*, "Microbial communities, processes and functions in acid mine drainage ecosystems," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 38, pp. 150–158, 2016, doi: 10.1016/j.copbio.2016.01.013.
- [24] Q. Chen, Y. Yao, X. Li, J. Lu, J. Zhou, and Z. Huang, "Comparison of heavy metal removals from aqueous solutions by chemical precipitation and characteristics of precipitates," *J. Water Process Eng.*, vol. 26, no. October, pp. 289–300, 2018, doi: 10.1016/j.jwpe.2018.11.003.
- [25] D. Kavak, "Removal of lead from aqueous solutions by precipitation: statistical analysis and modeling," *New pub Balaban*, vol. 51, no. 7–9, pp. 1720–1726, 2013, doi: 10.1080/19443994.2012.714652.
- [26] H. Prokkola, E. T. Nurmesniemi, and U. Lassi, "Removal of metals by sulphide precipitation using Na_2S and HS^- -solution," *ChemEngineering*, vol. 4, no. 3, pp. 1–10, 2020, doi: 10.3390/chemengineering4030051.
- [27] G. Muyzer and A. J. M. Stams, "The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 6, pp. 441–454, 2008, doi: 10.1038/nrmicro1892.
- [28] W. Liamleam and A. P. Annachhatre, "Electron donors for biological sulfate reduction," *Biotechnol. Adv.*, vol. 25, no. 5, pp. 452–463, 2007, doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.05.002.
- [29] R. K. Thauer, K. Jungermann, and K. Decker, "Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria," *Bacteriol. Rev.*, vol. 41, no. 1, pp. 100–180, 1977, doi: 10.1128/mmbr.41.1.100-180.1977.
- [30] T. T. Hien Hoa, W. Liamleam, and A. P. Annachhatre, "Lead removal through biological sulfate reduction process," *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 13, pp. 2538–2548, 2007, doi: 10.1016/j.biortech.2006.09.060.
- [31] P. Teekayuttasakul and A. P. Annachhatre, "Lead removal and toxicity reduction from industrial wastewater through biological sulfate reduction process," *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.*, vol. 43, no. 12, pp. 1424–1430, 2008, doi: 10.1080/10934520802232147.
- [32] A. Velasco, M. Ramírez, T. Volke-Sepúlveda, A. González-Sánchez, and S. Revah, "Evaluation of feed COD/sulfate ratio as a control criterion for the biological hydrogen sulfide production and lead precipitation," *J. Hazard. Mater.*, vol. 151, no. 2–3, pp. 407–413, 2008, doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.06.004.
- [33] D. Villa-Gomez, H. Ababneh, S. Papirio, D. P. L. Rousseau, and P. N. L. Lens, "Effect of sulfide concentration on the location of the metal precipitates in inversed fluidized bed reactors," *J. Hazard. Mater.*, vol. 192, no. 1, pp. 200–207, Aug. 2011, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2011.05.002.
- [34] T. Q. H. Kieu, T. Y. Nguyen, T. Y. Dang, T. B. Nguyen, T. N. Vuong, and H. Horn, "Optimization of sulfide production by an indigenous consortium of sulfate-reducing bacteria for the treatment of lead-contaminated wastewater," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 38, no. 10, pp. 2003–2011, 2015, doi: 10.1007/s00449-015-1441-4.

- [35] M. Gopi Kiran, K. Pakshirajan, and G. Das, "Heavy metal removal from aqueous solution using sodium alginate immobilized sulfate reducing bacteria: Mechanism and process optimization," *J. Environ. Manage.*, vol. 218, pp. 486–496, 2018, doi: 10.1016/j.jenvman.2018.03.020.
- [36] M. Gopi Kiran, K. Pakshirajan, and G. Das, "An overview of sulfidogenic biological reactors for the simultaneous treatment of sulfate and heavy metal rich wastewater," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 158, no. June 2016, pp. 606–620, 2017, doi: 10.1016/j.ces.2016.11.002.
- [37] C. García, D. A. Moreno, A. Ballester, M. L. Blázquez, and F. González, "Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria," *Miner. Eng.*, vol. 14, no. 9, pp. 997–1008, Sep. 2001, doi: 10.1016/S0892-6875(01)00107-8.
- [38] Q. Zeng, T. Hao, H. R. Mackey, L. Wei, G. Guo, and G. Chen, "Alkaline textile wastewater biotreatment: A sulfate-reducing granular sludge based lab-scale study," *J. Hazard. Mater.*, vol. 332, pp. 104–111, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2017.03.005.
- [39] L. Xingyu *et al.*, "A novel low pH sulfidogenic bioreactor using activated sludge as carbon source to treat acid mine drainage (AMD) and recovery metal sulfides: Pilot scale study," *Miner. Eng.*, vol. 48, pp. 51–55, 2013, doi: 10.1016/j.mineng.2012.11.004.
- [40] G. Nielsen *et al.*, "Semi-passive in-situ pilot scale bioreactor successfully removed sulfate and metals from mine impacted water under subarctic climatic conditions," *Water Res.*, vol. 140, pp. 268–279, 2018, doi: 10.1016/j.watres.2018.04.035.
- [41] K. Hu, D. Xu, and Y. Chen, "An assessment of sulfate reducing bacteria on treating sulfate-rich metal-laden wastewater from electroplating plant," *J. Hazard. Mater.*, vol. 393, no. February, 2020, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122376.
- [42] M. Vert *et al.*, "Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 84, no. 2, pp. 377–410, 2012, doi: 10.1351/PAC-REC-10-12-04/HTML.
- [43] B. E. Rittmann and P. L. McCarty, *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. McGraw-Hill Education, 2001.
- [44] B. Halan, K. Buehler, and A. Schmid, "Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 9, pp. 453–465, 2012, doi: 10.1016/j.tibtech.2012.05.003.
- [45] K. A. Karanasios, I. A. Vasiliadou, S. Pavlou, and D. V. Vayenas, "Hydrogenotrophic denitrification of potable water: A review," *J. Hazard. Mater.*, vol. 180, no. 1–3, pp. 20–37, 2010, doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.04.090.
- [46] K. J. Martin and R. Nerenberg, "The membrane biofilm reactor (MBfR) for water and wastewater treatment: Principles, applications, and recent developments," *Bioresour. Technol.*, vol. 122, pp. 83–94, 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.02.110.
- [47] B. E. Rittmann, "Biofilms, active substrata, and me," *Water Res.*, vol. 132, pp. 135–145, 2018, doi: 10.1016/j.watres.2017.12.043.
- [48] A. Ontiveros-Valencia, C. Zhou, H. P. Zhao, R. Krajmalnik-Brown, Y. Tang, and B. E. Rittmann, "Managing microbial communities in membrane biofilm reactors," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, no. 21, pp. 9003–9014, 2018, doi: 10.1007/s00253-018-9293-x.
- [49] C. Zhou *et al.*, "Hydrogenotrophic microbial reduction of oxyanions with the membrane biofilm reactor," *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. January, pp. 1–14, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2018.03268.
- [50] R. Nerenberg, "The membrane-biofilm reactor (MBfR) as a counter-diffusional biofilm process," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 38, no. April, pp. 131–136, 2016, doi: 10.1016/j.copbio.2016.01.015.
- [51] J. Chung, B. E. Rittmann, W. F. Wright, and R. H. Bowman, "Simultaneous Bio-reduction of Nitrate, Perchlorate, Selenate, Chromate, Arsenate, and Dibromochloropropane Using a Hydrogen-based Membrane Biofilm Reactor," *Biodegrad. 2006 182*, vol. 18, no. 2, pp. 199–209, Jul. 2006, doi: 10.1007/S10532-006-9055-9.

- [52] L. S. Downing and R. Nerenberg, "Kinetics of microbial bromate reduction in a hydrogen-oxidizing, denitrifying biofilm reactor," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 98, no. 3, pp. 543–550, Oct. 2007, doi: 10.1002/BIT.21442.
- [53] J. Chung and B. E. Rittmann, "Simultaneous bio-reduction of trichloroethene, trichloroethane, and chloroform using a hydrogen-based membrane biofilm reactor," *Water Sci. Technol.*, vol. 58, no. 3, pp. 495–501, Aug. 2008, doi: 10.2166/WST.2008.432.
- [54] J. Chung, C. H. Ahn, Z. Chen, and B. E. Rittmann, "Bio-reduction of N-nitrosodimethylamine (NDMA) using a hydrogen-based membrane biofilm reactor," *Chemosphere*, vol. 70, no. 3, pp. 516–520, Jan. 2008, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2007.07.016.
- [55] Y. Tang *et al.*, "Bioreduction of nitrate in groundwater using a pilot-scale hydrogen-based membrane biofilm reactor," *Front. Environ. Sci. Eng. China* 2010 43, vol. 4, no. 3, pp. 280–285, Aug. 2010, doi: 10.1007/S11783-010-0235-9.
- [56] H.-P. Zhao, S. Van Ginkel, Y. Tang, D.-W. Kang, B. Rittmann, and R. Krajmalnik-Brown, "Interactions between Perchlorate and Nitrate Reductions in the Biofilm of a Hydrogen-Based Membrane Biofilm Reactor," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, no. 23, pp. 10155–10162, Dec. 2011, doi: 10.1021/ES202569B.
- [57] A. Ontiveros-Valencia *et al.*, "Pyrosequencing analysis yields comprehensive assessment of microbial communities in pilot-scale two-stage membrane biofilm reactors," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 48, no. 13, pp. 7511–7518, 2014, doi: 10.1021/es5012466.
- [58] C. Zhou *et al.*, "Palladium Recovery in a H₂-Based Membrane Biofilm Reactor: Formation of Pd(0) Nanoparticles through Enzymatic and Autocatalytic Reductions," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 50, no. 5, pp. 2546–2555, 2016, doi: 10.1021/acs.est.5b05318.
- [59] A. Ontiveros-Valencia, C. R. Penton, R. Krajmalnik-Brown, and B. E. Rittmann, "Hydrogen-fed biofilm reactors reducing selenate and sulfate: Community structure and capture of elemental selenium within the biofilm," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 113, no. 8, pp. 1736–1744, 2016, doi: 10.1002/bit.25945.
- [60] D. A. Esquivel-Hernández *et al.*, "Microbial ecology in selenate-reducing biofilm communities: Rare biosphere and their interactions with abundant phylotypes," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 118, no. 7, pp. 2460–2471, 2021, doi: 10.1002/bit.27754.
- [61] J. I. Suárez *et al.*, "Influence of operating conditions on sulfate reduction from real mining process water by membrane biofilm reactors," *Chemosphere*, vol. 244, p. 125508, 2020, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125508.
- [62] C. Zhou *et al.*, "Uranium removal and microbial community in a H₂-based membrane biofilm reactor," *Water Res.*, vol. 64, pp. 255–264, 2014, doi: 10.1016/j.watres.2014.07.013.
- [63] A. Ontiveros-Valencia, C. Zhou, Z. E. Ilhan, L. C. de Saint Cyr, R. Krajmalnik-Brown, and B. E. Rittmann, "Total electron acceptor loading and composition affect hexavalent uranium reduction and microbial community structure in a membrane biofilm reactor," *Water Res.*, vol. 125, pp. 341–349, 2017, doi: 10.1016/j.watres.2017.08.060.
- [64] A. Ontiveros-Valencia, M. Ziv-El, H. P. Zhao, L. Feng, B. E. Rittmann, and R. Krajmalnik-Brown, "Interactions between nitrate-reducing and sulfate-reducing bacteria coexisting in a hydrogen-fed biofilm," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 20, pp. 11289–11298, 2012, doi: 10.1021/es302370t.
- [65] S. Xia *et al.*, "Bioreduction of nitrate in high-sulfate water using a hydrogen-based membrane biofilm reactor equipped with a separate carbon dioxide module," *Chem. Eng. J.*, vol. 385, no. December 2019, p. 123831, 2020, doi: 10.1016/j.cej.2019.123831.
- [66] W. Dilling and H. Cypionka, "Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 71, no. 1–2, pp. 123–127, Sep. 1990, doi: 10.1111/J.1574-6968.1990.TB03809.X.

- [67] T. Dalsgaard and F. Bak, "Nitrate reduction in a sulfate-reducing bacterium, *Desulfovibrio desulfuricans*, isolated from rice paddy soil: Sulfide inhibition, kinetics, and regulation," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 60, no. 1, pp. 291–297, 1994, doi: 10.1128/AEM.60.1.291-297.1994.
- [68] S. Baena, M. L. Fardeau, M. Labat, B. Ollivier, J. L. Garcia, and B. K. C. Patel, "Desulfovibrio aminophilus sp. nov., a Novel Amino Acid Degrading and Sulfate Reducing Bacterium from an Anaerobic Dairy Wastewater Lagoon," *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 21, no. 4, pp. 498–504, Dec. 1998, doi: 10.1016/S0723-2020(98)80061-1.
- [69] D. Celmer, J. A. Oleszkiewicz, and N. Cicek, "Impact of shear force on the biofilm structure and performance of a membrane biofilm reactor for tertiary hydrogen-driven denitrification of municipal wastewater," *Water Res.*, vol. 42, no. 12, pp. 3057–3065, Jun. 2008, doi: 10.1016/J.WATRES.2008.02.031.
- [70] L. M. F. dos Santos and A. G. Livingston, "Membrane-attached biofilms for VOC wastewater treatment. II: Effect of biofilm thickness on performance," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 47, no. 1, pp. 90–95, Jul. 1995, doi: 10.1002/BIT.260470111.
- [71] A. Splendiani, A. G. Livingston, and C. Nicolella, "Control of membrane-attached biofilms using surfactants," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 94, no. 1, pp. 15–23, May 2006, doi: 10.1002/BIT.20752.
- [72] A.-E. Stricker, H. Lossing, J. H. Gibson, Y. Hong, and J. C. Urbanic, "Pilot Scale Testing of A New Configuration of The Membrane Aerated Biofilm Reactor (MABR) to Treat High-Strength Industrial Sewage," *Water Environ. Res.*, vol. 83, no. 1, pp. 3–14, Jan. 2011, doi: 10.2175/106143009X12487095236991.
- [73] K. C. Lee and B. E. Rittmann, "Effects of pH and precipitation on autohydrogenotrophic denitrification using the hollow-fiber membrane-biofilm reactor," *Water Res.*, vol. 37, no. 7, pp. 1551–1556, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0043-1354(02)00519-5.
- [74] C. M. Ho, S. K. Tseng, and Y. J. Chang, "Autotrophic denitrification via a novel membrane-attached biofilm reactor," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 33, no. 3, pp. 201–205, Sep. 2001, doi: 10.1046/J.1472-765X.2001.00984.X.
- [75] Y. Tang, C. Zhou, S. W. Van Ginkel, A. Ontiveros-Valencia, J. Shin, and B. E. Rittmann, "Hydrogen permeability of the hollow fibers used in H₂-based membrane biofilm reactors," *J. Memb. Sci.*, vol. 407–408, pp. 176–183, 2012, doi: 10.1016/j.memsci.2012.03.040.
- [76] J. Chung, R. Nerenberg, and B. E. Rittmann, "Bio-reduction of soluble chromate using a hydrogen-based membrane biofilm reactor," *Water Res.*, vol. 40, no. 8, pp. 1634–1642, 2006, doi: 10.1016/j.watres.2006.01.049.
- [77] T. Soga and G. A. Ross, "Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis," *J. Chromatogr. A*, vol. 837, no. 1–2, pp. 231–239, Apr. 1999, doi: 10.1016/S0021-9673(99)00092-8.
- [78] R. Cord-Ruwisch, "A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria," *J. Microbiol. Methods*, vol. 4, no. 1, pp. 33–36, Jun. 1985, doi: 10.1016/0167-7012(85)90005-3.
- [79] Secretaría de Economía, "Norma Mexicana NMX-AA-051-SCFI-2001. Análisis de agua - Determinación de metales por absorción atómica," *D. Of. la Fed.*, 2001, [Online]. Available: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166785/NMX-AA-051-SCFI-2001.pdf>.
- [80] American Public Health Association, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. 1999.
- [81] L. A. G. de Godoi, C. E. D. dos Santos, E. Foresti, and M. H. R. Z. Damianovic, "Evaluating and Refining Alkalinity Calculations Due to Sulfide and Bicarbonate Accessed by Titration in Anaerobic Sulfate-Reducing Bioreactors," *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 228, no. 9, pp. 1–12, 2017, doi: 10.1007/s11270-017-3518-y.
- [82] J. G. Caporaso *et al.*, "Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. Supplement 1, pp. 4516–4522, Mar. 2011, doi: 10.1073/PNAS.1000080107.

- [83] "16S Illumina Amplicon Protocol : earthmicrobiome." <https://earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/16s/> (accessed Mar. 25, 2023).
- [84] B. J. Callahan, P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson, and S. P. Holmes, "DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data," *Nat. Methods* 2016 137, vol. 13, no. 7, pp. 581–583, May 2016, doi: 10.1038/nmeth.3869.
- [85] M. R. McLaren and B. J. Callahan, "Silva 138.1 prokaryotic SSU taxonomic training data formatted for DADA2," Mar. 2021, doi: 10.5281/ZENODO.4587955.
- [86] P. J. McMurdie and S. Holmes, "phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e61217, Apr. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0061217.
- [87] A. Schwarz, M. Gaete, I. Nancucheo, D. Villa-Gomez, M. Aybar, and D. Sbarbaro, "High-Rate Sulfate Removal Coupled to Elemental Sulfur Production in Mining Process Waters Based on Membrane-Biofilm Technology," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 10, no. March, pp. 1–14, 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.805712.
- [88] H. He, B. M. Wagner, A. L. Carlson, C. Yang, and G. T. Daigger, "Recent progress using membrane aerated biofilm reactors for wastewater treatment," *Water Sci. Technol.*, vol. 84, p. 2131, 2021, doi: 10.2166/wst.2021.443.
- [89] M. A. El Bayoumy, J. K. Bewtra, H. I. Ali, and N. Biswas, "Biosorption of lead by biomass of sulfate reducing bacteria," *Can. J. Civ. Eng.*, vol. 24, no. 5, pp. 840–843, 1997, doi: 10.1139/I97-019.
- [90] M. M. Naik and S. K. Dubey, "Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 98, pp. 1–7, 2013, doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.09.039.
- [91] M. F. M. Bijmans, P.-J. Van Helvoort, S. A. Dar, M. Dopson, P. N. L. Lens, and C. J. N. Buisman, "Selective recovery of nickel over iron from a nickel-iron solution using microbial sulfate reduction in a gas-lift bioreactor," 2008, doi: 10.1016/j.watres.2008.11.023.
- [92] M. F. M. Bijmans, P. J. van Helvoort, C. J. N. Buisman, and P. N. L. Lens, "Effect of the sulfide concentration on zinc bio-precipitation in a single stage sulfidogenic bioreactor at pH 5.5," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 69, no. 3, pp. 243–248, Oct. 2009, doi: 10.1016/J.SEPPUR.2009.07.023.
- [93] W. E. Baker, "Mineral equilibrium studies of the pseudomorphism of pyromorphite by hinsdalite | American Mineralogist | GeoScienceWorld," 1964. <https://pubs.geoscienceworld.org/msa/ammin/article-abstract/49/5-6/607/539904/Mineral-equilibrium-studies-of-the-pseudomorphism> (accessed May 18, 2022).
- [94] J. O. Nriagu, "Lead Orthophosphates. I Solubility and Hydrolysis of Secondary Lead Orthophosphate," *Inorg. Chem.*, vol. 11, no. 10, pp. 2499–2503, Oct. 1972, doi: 10.1021/IC50116A041/ASSET/IC50116A041.FP.PNG_V03.
- [95] A. B. Walczak, F. C. A. Kafantaris, G. K. Druschel, N. Yee, and L. Y. Young, "Transformation of galena to pyromorphite produces bioavailable sulfur for neutrophilic chemoautotrophy," *Geobiology*, vol. 14, no. 6, pp. 599–606, 2016, doi: 10.1111/gbi.12199.
- [96] W. Stumm and J. J. Morgan, *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters, 3rd Edition* | Wiley, 3rd ed. 1995.
- [97] P. L. Brezonik, *Chemical kinetics and process dynamics in aquatic systems*. Lewis, 1994.
- [98] E. V. Pikuta, R. B. Hoover, and D. Marsic, "Desulfonatronum thiodismutans sp. nov., a novel alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium capable of lithoautotrophic growth," *Artic. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, doi: 10.1099/ijms.0.02598-0.
- [99] M. Fernanda, P. Bernal, E. Margareth, S. Brito, and M. Joseph, "Desulfonatronum parangueonense sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from sediment of an alkaline crater lake," *Artic. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2017, doi: 10.1099/ijsem.0.002399.
- [100] D. Y. Sorokin, T. P. Tourova, A. N. Panteleeva, and G. Muyzer, "Desulfonatronobacter acidivorans gen. nov., sp. nov. and desulfobulbus alkaliphilus sp. nov., haloalkaliphilic

heterotrophic sulfate-reducing bacteria from soda lakes,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 62, no. 9, pp. 2107–2113, 2012, doi: 10.1099/ijs.0.029777-0.

[101] D. Y. Sorokin, T. P. Tourova, A. M. Henstra, A. J. M. Stams, E. A. Galinski, and G. Muyzer, “Sulfidogenesis under extremely haloalkaline conditions by *Desulfonatronospira thiodismutans* gen. nov., sp. nov., and *Desulfonatronospira delicat* sp. nov. - A novel lineage of Deltaproteobacteria from hypersaline soda lakes,” *Microbiology*, vol. 154, no. 5, pp. 1444–1453, 2008, doi: 10.1099/mic.0.2007/015628-0.

[102] Q. Zeng, T. Hao, H. R. Mackey, L. Wei, G. Guo, and G. Chen, “Alkaline textile wastewater biotreatment: A sulfate-reducing granular sludge based lab-scale study,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 332, pp. 104–111, 2017, doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.03.005.

[103] O. Gutierrez, D. Park, K. R. Sharma, and Z. Yuan, “Effects of long-term pH elevation on the sulfate-reducing and methanogenic activities of anaerobic sewer biofilms,” *Water Res.*, vol. 43, no. 9, pp. 2549–2557, May 2009, doi: 10.1016/J.WATRES.2009.03.008.

[104] Z. Qian, H. Tianwei, H. R. Mackey, M. C. M. van Loosdrecht, and C. Guanghao, “Recent advances in dissimilatory sulfate reduction: From metabolic study to application,” *Water Res.*, vol. 150, pp. 162–181, 2019, doi: 10.1016/j.watres.2018.11.018.

[105] Y. T. Nguyen, H. T. Q. Kieu, S. West, Y. T. Dang, and H. Horn, “Community structure of a sulfate-reducing consortium in lead-contaminated wastewater treatment process,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 33, no. 1, 2017, doi: 10.1007/s11274-016-2180-7.

[106] S. Paul, A. K. Shakya, and P. K. Ghosh, “Bacterially-assisted recovery of cadmium and nickel as their metal sulfide nanoparticles from spent Ni–Cd battery via hydrometallurgical route,” *J. Environ. Manage.*, vol. 261, p. 110113, May 2020, doi: 10.1016/J.JENVMAN.2020.110113.

[107] A. Willems and M. Gillis, “Hydrogenophaga,” *Bergey’s Man. Syst. Archaea Bact.*, pp. 1–15, Sep. 2015, doi: 10.1002/9781118960608.GBM00947.

[108] B. R. S. Genthner and R. Devereux, “Desulfomicrobium,” *Bergey’s Man. Syst. Archaea Bact.*, pp. 1–9, Sep. 2015, doi: 10.1002/9781118960608.GBM01032.

[109] G. Ravot, J.-L. Garcia, M. Magot, and B. Ollivier, “Fusibacter,” *Bergey’s Man. Syst. Archaea Bact.*, pp. 1–5, Sep. 2015, doi: 10.1002/9781118960608.GBM00723.

[110] T. Ito, K. Sugita, I. Yumoto, Y. Nodasaka, and S. Okabe, “Thiovirga sulfuroxydans gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a microaerobic waste-water biofilm,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 55, no. Pt 3, pp. 1059–1064, May 2005, doi: 10.1099/IJS.0.63467-0.

[111] “Midas field guide - Leptothrix.” <https://www.midasfieldguide.org/guide/fieldguide/genus/leptothrix> (accessed Oct. 15, 2022).

[112] S. Spring, P. Kämpfer, W. Ludwig, and K. H. Schleifer, “Polyphasic Characterization of the Genus *Leptothrix*: New Descriptions of *Leptothrix mobilis* sp. nov. and *Leptothrix discophora* sp. nov. nom. rev. and Emended Description of *Leptothrix cholodnii* emend.,” *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 19, no. 4, pp. 634–643, Dec. 1996, doi: 10.1016/S0723-2020(96)80036-1.

[113] J. Heider and G. Fuchs, “Thauera,” *Bergey’s Man. Syst. Archaea Bact.*, pp. 1–11, Sep. 2015, doi: 10.1002/9781118960608.GBM01004.

[114] Y. Mao, Y. Xia, and T. Zhang, “Characterization of *Thauera*-dominated hydrogen-oxidizing autotrophic denitrifying microbial communities by using high-throughput sequencing,” *Bioresour. Technol.*, vol. 128, pp. 703–710, Jan. 2013, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2012.10.106.

[115] C. Liu *et al.*, “Nitrite accumulation in continuous-flow partial autotrophic denitrification reactor using sulfide as electron donor,” *Bioresour. Technol.*, vol. 243, pp. 1237–1240, Nov. 2017, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2017.07.030.

[116] J. D. Coates and L. A. Achenbach, “Microbial perchlorate reduction: rocket-fuelled metabolism,” *Nat. Rev. Microbiol.* 2004 27, vol. 2, no. 7, pp. 569–580, Jul. 2004, doi: 10.1038/nrmicro926.

- [117] M. K. D. Dueholm *et al.*, “MiDAS 4: A global catalogue of full-length 16S rRNA gene sequences and taxonomy for studies of bacterial communities in wastewater treatment plants,” *Nat. Commun.*, vol. 13, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/S41467-022-29438-7.
- [118] K. K. Salinero *et al.*, “Metabolic analysis of the soil microbe *Dechloromonas aromatica* str. RCB: Indications of a surprisingly complex life-style and cryptic anaerobic pathways for aromatic degradation,” *BMC Genomics*, vol. 10, no. 1, pp. 1–23, Aug. 2009, doi: 10.1186/1471-2164-10-351/TABLES/3.
- [119] S. Azabou, T. Mechichi, B. K. C. Patel, and S. Sayadi, “Isolation and characterization of a mesophilic heavy-metals-tolerant sulfate-reducing bacterium *Desulfomicrobium* sp. from an enrichment culture using phosphogypsum as a sulfate source,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 140, no. 1–2, pp. 264–270, Feb. 2007, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2006.07.073.
- [120] Q. Wang, B. J. Chang, and T. V. Riley, “*Erysipelothrix rhusiopathiae*,” *Vet. Microbiol.*, vol. 140, no. 3–4, pp. 405–417, Jan. 2010, doi: 10.1016/J.VETMIC.2009.08.012.
- [121] G. K. Matar, M. Ali, S. Bagchi, S. Nunes, W. T. Liu, and P. E. Saikaly, “Relative Importance of Stochastic Assembly Process of Membrane Biofilm Increased as Biofilm Aged,” *Front. Microbiol.*, vol. 12, p. 708531, Sep. 2021, doi: 10.3389/FMICB.2021.708531/FULL.
- [122] D. R. Brown, J. M. Bradbury, and K. Johansson, “*Acholeplasma*,” *Bergey’s Man. Syst. Archaea Bact.*, pp. 1–13, Sep. 2015, doi: 10.1002/9781118960608.GBM01256.
- [123] R. A. Bruce, L. A. Achenbach, and J. D. Coates, “Reduction of (per)chlorate by a novel organism isolated from paper mill waste,” *Environ. Microbiol.*, vol. 1, no. 4, pp. 319–329, Aug. 1999, doi: 10.1046/J.1462-2920.1999.00042.X.
- [124] Q. Yuan, P. Wang, C. Wang, J. Chen, X. Wang, and S. Liu, “Indicator species and co-occurrence pattern of sediment bacterial community in relation to alkaline copper mine drainage contamination,” *Ecol. Indic.*, vol. 120, p. 106884, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.ECOLIND.2020.106884.
- [125] A. González-Sánchez and S. Revah, “The effect of chemical oxidation on the biological sulfide oxidation by an alkaliphilic sulfoxidizing bacterial consortium,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 40, no. 2, pp. 292–298, 2007, doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.04.017.
- [126] B. B. Jørgensen, “A Thiosulfate Shunt in the Sulfur Cycle of Marine Sediments,” *Science (80-.)*, vol. 249, no. 4965, pp. 152–154, Jul. 1990, doi: 10.1126/SCIENCE.249.4965.152.
- [127] R. Beristain Cardoso, R. Sierra-Alvarez, P. Rowlet, E. Razo Flores, J. Gomez, and J. A. Field, “Sulfide Oxidation Under Chemolithoautotrophic Denitrifying Conditions,” *Biotechnol. Bioeng.*, no. 95(6), pp. 1148–1157, Dec. 2006, doi: 10.1002/bit.
- [128] R. Rabus, T. A. Hansen, and F. Widdel, “Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes,” *Prokaryotes Prokaryotic Physiol. Biochem.*, pp. 309–404, Nov. 2013, doi: 10.1007/978-3-642-30141-4_70/COVER.
- [129] Z. Liang, J. Sun, C. Zhan, S. Wu, L. Zhang, and F. Jiang, “Effects of sulfide on mixotrophic denitrification by *Thauera*-dominated denitrifying sludge,” *Environ. Sci. Water Res. Technol.*, vol. 6, no. 4, pp. 1186–1195, Apr. 2020, doi: 10.1039/C9EW01014A.
- [130] N. Durban *et al.*, “Nitrate and nitrite reduction activity of activated sludge microcosm in a highly alkaline environment with solid cementitious material,” *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 151, p. 104971, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.IBIOD.2020.104971.
- [131] T. wei Hao *et al.*, “A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment,” *Water Res.*, vol. 65, pp. 1–21, 2014, doi: 10.1016/j.watres.2014.06.043.
- [132] T. Ito and H. Satoh, “Successional Development of Sulfate-Reducing Bacterial Populations and Their Activities in a Wastewater Biofilm Growing under Microaerophilic Conditions Sensors Special Issue: Recent Advances in Fluorescent Sensors View project Genotype-dependent behaviors of human noroviruses in water-related environments View project,” 2002, doi: 10.1128/AEM.68.3.1392-1402.2002.

- [133] K. J. Martin, C. Picioreanu, and R. Nerenberg, "Assessing microbial competition in a hydrogen-based membrane biofilm reactor (MBfR) using multidimensional modeling," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 112, no. 9, pp. 1843–1853, 2015, doi: 10.1002/bit.25607.
- [134] V. D. Carmona-Galindo and T. Carmona V., "La diversidad de los análisis de diversidad," *Bioma*, vol. 14, no. November, pp. 54–71, 2015.
- [135] A. Zambrano-Romero *et al.*, "Dynamics of Microbial Communities during the Removal of Copper and Zinc in a Sulfate-Reducing Bioreactor with a Limestone Pre-Column System," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 19, no. 3, 2022, doi: 10.3390/ijerph19031484.

9. Anexos

Anexo 1. Componentes iónicos del medio de cultivo y la solución de Pb

Tabla A1-1. Componentes solubles del medio de cultivo y solución de Pb ($[Pb^{2+}] = 200 \text{ mg/L}$; 0.96 mM) y un pH = 5 una vez que han reaccionado.

Componente	Disuelto (M)	% disuelto	Precipitado (M)	% precipitado
Acetato-1	1.93E-03	100	0	0
Ca+2	6.74E-06	100	0	0
Cl-1	2.65E-17	0	9.36E-05	100
Co+2	8.40E-07	100	0	0
CO3-2	6.55E-04	100	0	0
Cu+2	5.82E-08	100	0	0
Fe+2	3.58E-06	100	0	0
H+1	1.91E-03	100	0	0
K+1	9.41E-05	100	0	0
Mg+2	9.20E-04	100	0	0
Mn+2	1.02E-07	100	0	0
MoO4-2	7.34E-12	0.006	1.24E-07	99.994
Na+1	1.24E-02	100	0	0
Ni+2	4.26E-08	100	0	0
NO3-1	7.14E-04	100	0	0
Pb+2	2.02E-05	2.095	9.45E-04	97.905
PO4-3	6.20E-05	15.5	3.38E-04	84.5
SO4-2	5.70E-03	93.574	3.92E-04	6.426
Zn+2	3.47E-07	100	0	0

Tabla A2-2. Componentes solubles del medio de cultivo y la solución de Pb ($[Pb^{2+}] = 200 \text{ mg/L}$; 0.96 M) en presencia de 73 mg/L (2.2 mM) de HS^- y un $pH = 9$ una vez que han reaccionado.

Componente	Disuelto (M)	% disuelto	Precipitado (M)	% precipitado
Acetato-1	1.93E-03	100	0	0
Ca+2	6.74E-06	100	0	0
Cl-1	8.72E-05	100	0	0
Co+2	8.40E-07	100	0	0
CO3-2	6.55E-04	100	0	0
Cu+2	5.82E-08	100	0	0
Fe+2	3.58E-06	100	0	0
H+1	1.01E-03	100	0	0
HS-1	1.24E-03	56.27	9.65E-04	43.73
K+1	9.41E-05	100	0	0
Mg+2	9.20E-04	100	0	0
Mn+2	1.02E-07	100	0	0
MoO4-2	1.24E-07	100	0	0
Na+1	1.24E-02	100	0	0
Ni+2	4.26E-08	100	0	0
NO3-1	7.14E-04	100	0	0
Pb+2	4.17E-12	0	9.65E-04	100
PO4-3	4.00E-04	100	0	0
SO4-2	2.44E-03	100	0	0
Zn+2	3.47E-07	100	0	0

Anexo 2. Fases sólidas formadas en el R1.

La **Tabla A2-1** muestra las fases sólidas formadas dentro del R1, bajo las cuales se considera la formación de todos los sólidos mostrados. En los cálculos se tomaron en cuenta las condiciones promedio en las que se mantuvo el reactor en cuanto a concentración de HS^- y pH.

Tabla A2-1. Fases sólidas formadas dentro del reactor R1. Condiciones para el cálculo: $[\text{HS}^-] = 100 \text{ mg/L (3 mM)}$, $[\text{Pb}^{2+}] = 200 \text{ mg/L (0.96 mM)}$, $\text{pH} = 9$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0.016 \text{ M}$.

Compuesto	Concentración (mg/L)
Anglesita	0
Cloropiomorfita	0
Galena	22.19
Hidroxiptomorfita	0
$\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2(\text{s})$	0
$\text{PbMoO}_4(\text{s})$	0

Anexo 3. Ecuaciones varias

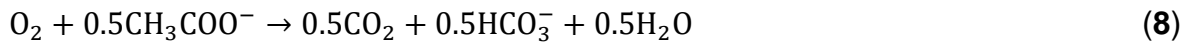
$$IS = \text{Log} \left(\frac{\text{PAI}}{K_{sp}} \right) \quad (7)$$

Donde, IS: índice de saturación.

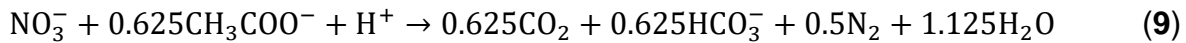
PAI: producto de la actividad de los iones que forman el sólido a las concentraciones del medio.

K_{sp} : constante de solubilidad.

Reacciones de oxidación de acetato



$$(\Delta G^\circ = -421.6 \text{ kJ/reacción})$$



$$(\Delta G^\circ = -498 \text{ kJ/reacción})$$

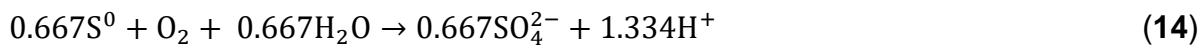
Reacciones abióticas de oxidación de sulfuro por O_2 :



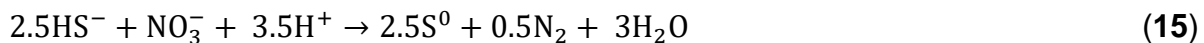
Reacciones bióticas de oxidación de sulfuro:



$$(\Delta G^\circ = -498.86 \text{ KJ/reacción})$$



$$(\Delta G^\circ = -391.65 \text{ kJ/reacción})$$



$$(\Delta G^\circ = -630.32 \text{ kJ/reacción})$$

Para los cálculos de ΔG° se utilizaron los valores de energía libre de Gibbs de formación, tomados de Rittmann & McCarthy, (2001) [43].

Anexo 4. Comportamiento del pH en el afluente y efluente de ambos reactores.

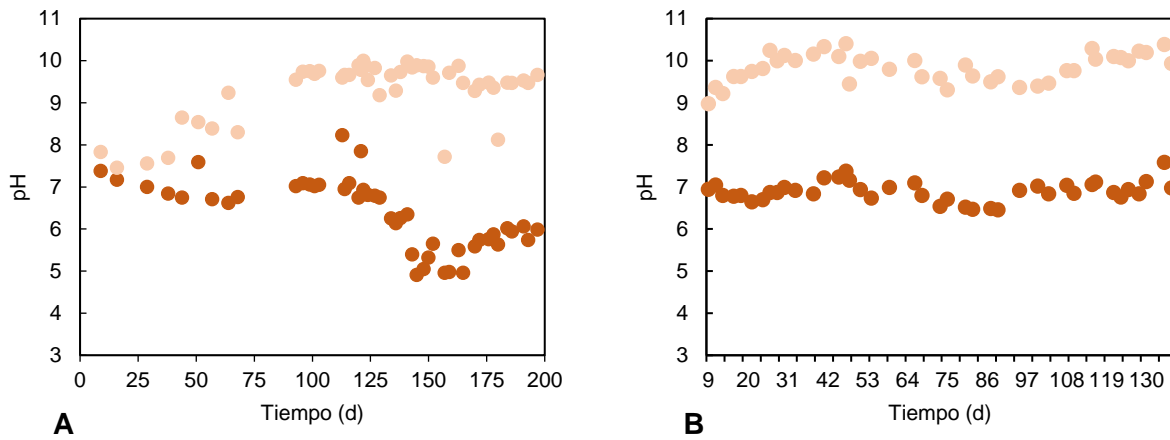


Figura A4-1. A: Comportamiento del pH en el afluente (●) y efluente (●) en el R1. **B:** Comportamiento del pH en el afluente (●) y efluente (●) en el R2.

Anexo 5. Fotografías de los reactores R1 y R2

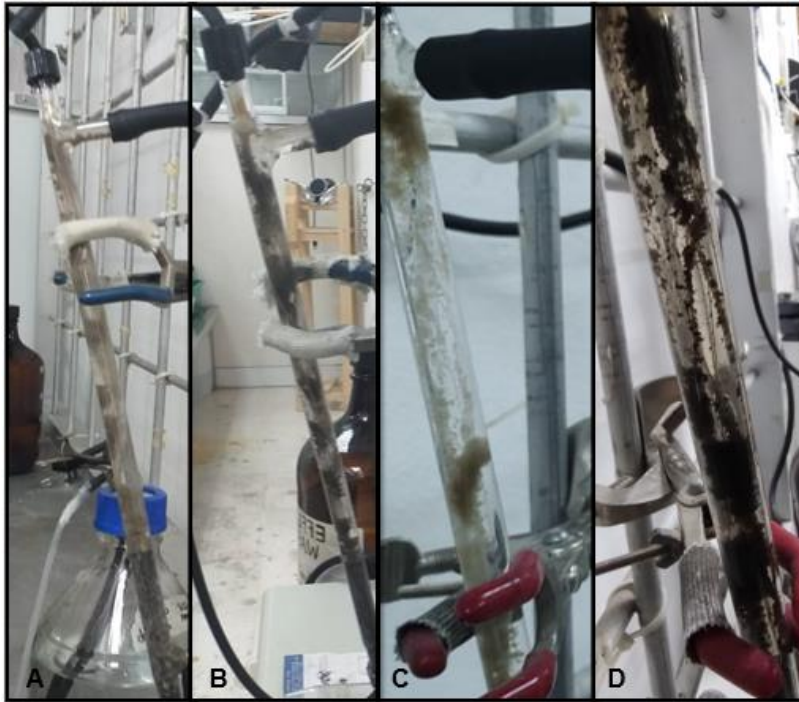


Figura A5-1. Imágenes de la biopelícula de los reactores R1 y R2. **A:** imagen tomada a los 100 días de operación del R1. **B:** Imagen tomada a los 200 días de operación del R1 en presencia de Pb (final de la Subetapa 2C). **C:** Imagen tomada a los 6 días de operación del R2. **D:** Imagen tomada a los 137 días de operación del R2 en presencia de Pb (final de la Subetapa 2C).



Figura A5-2. Imagen del reactor R2.

Anexo 6. Cálculo de la relación metal:sulfuro y azufre:nitrógeno (S/N)

La relación metal:sulfuro se calculó empleando la concentración teórica mínima que se tuvo de sulfuro, calculada a partir del SO_4^{2-} consumido. Esta concentración fue de 73 mg/L (2.2 M). Para la Subetapa 2C del R2, la concentración de Pb^{2+} fue de 200 mg/L (0.96 M), por lo que se tuvo una relación mol-mol Pb:sulfuro de 0.96:2.2, aproximadamente igual a 1:2.

Para el cálculo de la relación azufre:nitrógeno (S/N), se empleó la concentración más baja de sulfuro producido teóricamente por el consumo de SO_4^{2-} en la Etapa 2, siendo este de 73 mg/L (2.2 mM) así como, la concentración más alta, que correspondió a 162.49 mg/L (4.9 mM). Para el NO_3^- , se utilizó la concentración teórica dispuesta en el afluente, que fue de 73.3 mg/L (1.18 mM). Por lo tanto, la relación molar S/N osciló entre 1.87 y 4.16.

Anexo 7. Estequiometría teórica de la formación de fases de Pb en el EDS e imagen de los precipitados embebidos en la biopelícula.

Tabla A7-1. Estequiometría teórica de las fases de Pb que pueden formarse entre el medio de cultivo, la solución de Pb y el efluente del reactor.

Elemento	PbS	CPM ¹	HPM ²	Pb ₃ (PO ₄) ₂	PbMoO ₄	PbHPO ₄	PbSO ₄	PbCO ₃	Pb ₃ (CO ₃) ₂ (OH) ₂
C								1	2
O		12	13	8	4	4	4	3	8
S	1						1		
Pb	1	5	5	3	1	1	1	1	3
Cl		1							
Mo					1	1			
P		3	3	2					

¹CPM = cloropiromorfita (Pb₅(PO₄)₃Cl)

²HPM = hidroxipiromorfita (Pb₅(PO₄)₃OH)

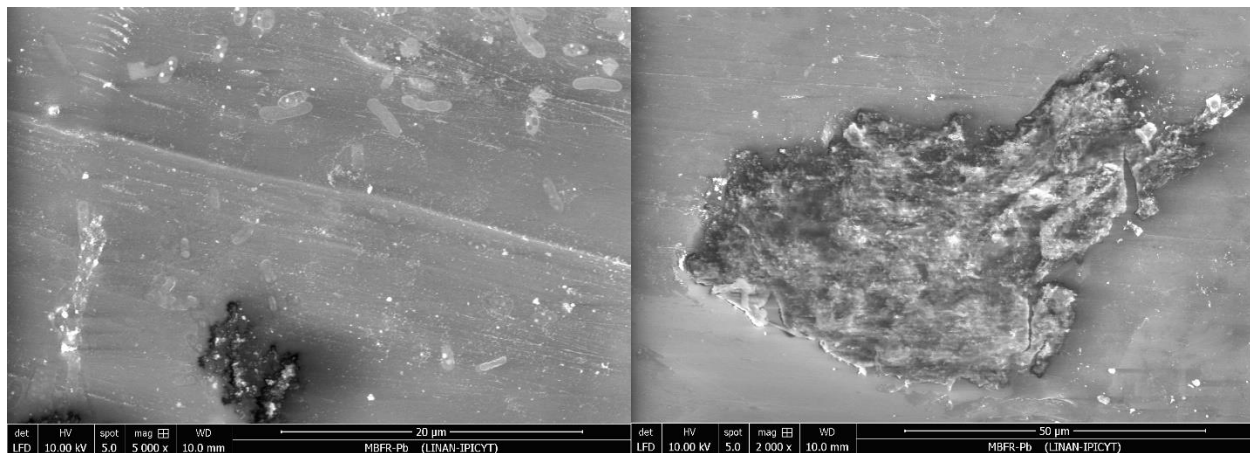


Figura A7-1. Imágenes de la biopelícula que muestran los precipitados de Pb embebidos o rodeados de biopelícula.

Anexo 8. Comportamiento del ORP en el afluente y efluente del R2 y valores de OD en el afluente del R1.

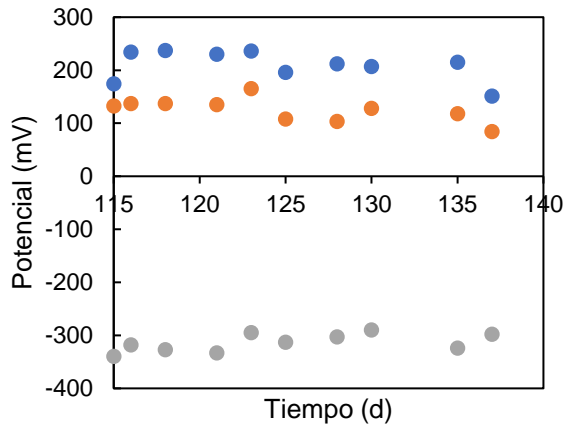


Figura A8-1. A: Comportamiento del ORP en el afluente del medio de cultivo (●), de la solución de Pb (●) y el efluente (●) en el R2.

Tabla A8-1. Valores de OD promedio y su equivalente en mg/L de O₂ en el afluente del R1 durante las Subetapas 2B y 2C.

Subetapa	Día de operación	OD (%) ¹	mg O ₂ /L
2B	157	70	5.6
2B	163	70.1	5.6
2B	168	71.3	5.7
2B	173	73.8	5.9
2B	178	70.7	5.6
2C	184	73.9	5.9
2C	189	74.1	5.9
2C	194	75.8	6.1
2C	200	75.2	6

¹Valor promedio de OD del medio de cultivo y la solución de Pb.