

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

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Precipitación de sulfuros de arsénico en un sistema biológico-fisicoquímico

Tesis que presenta

Consuelo Brito García

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Ambientales

Directora de la Tesis: Dra. María de Lourdes Berenice Celis García

San Luis Potosí, S.L.P., febrero de 2025



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis **"Precipitación de sulfuros de arsénico en un sistema biológico-fisicoquímico**" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Consuelo Brito García** y aprobada el **24 de enero de 2025** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García

Directora de la tesis

Dr. Elías Razo Flores

Miembro del Comité Tutoral

Dr. Roberto Briones Gallardo

Miembro del Comité Tutoral



Créditos Institucionales

Esta tesis de maestría titulada "Precipitación de sulfuros de arsénico en un sistema biológico-fisicoquímico" fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García.

Durante la realización de los estudios de posgrado y del trabajo experimental la autora, Consuelo Brito García, recibió una beca académica del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT-827512).

Este trabajo de investigación fue financiado mediante el proyecto CF-2023-I-2616 "Remoción de arsénico del agua mediante procesos biológicos del ciclo del azufre en un sistema integral biotecnológico-fisicoquímico", del programa presupuestario F003 del CONAHCYT, y como responsable técnico la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García. Acta de examen

Dedicatorias

Al padre celestial, a mi familia y amigos, que, sin duda alguna, fueron parte fundamental para poder llegar hasta aquí. Son mi fuerza y motivación para lograr todo lo que me propongo.

Agradecimientos

Agradezco inmensamente a la Dra. Berenice Celis por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto bajo su dirección, por la confianza que me tuvo desde un inicio y el apoyo en todo el proceso de la maestría. No cabe duda de que me llevo mucho conocimiento de su parte. A mi comité tutoral el Dr. Elías Razo y Dr. Roberto Briones Gallardo por su tiempo, dedicación y aportaciones que sin duda alguna enriquecieron el trabajo.

También agradezco a los técnicos académicos M. en C. María de Carmen Rocha Medina y M. en C. Guillermo Vidriales Escobar por su apoyo técnico y administrativo en la realización de este proyecto.

De igual manera, extiendo los agradecimientos al personal técnico del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) M. en C. Ana Iris Peña Maldonado y M. en C. Beatriz Adriana Rivera Escoto por su apoyo con los análisis de caracterización de materiales mediante las técnicas analíticas de su especialidad.

Una mención especial a la Dra. Erika Elizabeth Ríos Valenciana, por su invaluable ayuda en las técnicas de laboratorio y apoyo técnico. Le agradezco su tiempo, paciencia y enseñanzas.

Agradezco al IPICYT por la infraestructura y las facilidades que me otorgaron para realizar la maestría, asimismo a CONAHCYT por la beca otorgada.

Finalmente, y con mucho amor, quiero agradecer a mi familia, amigos y compañeras de generación por su apoyo incondicional, que me acompañaron en momentos difíciles y llenos de incertidumbre, por creer en mí y motivarme hasta el final.

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionalesi	ii
Acta de exameni	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	xi
Anexosx	v
Resumen	vi
Abstractxv	′ii
1.INTRODUCCIÓN	8
2. MARCO TEÓRICO	0
2.1. Origen y química del arsénico (As) en los sistemas acuáticos	0
2.2. Toxicidad e impacto a la salud humana y el medio ambiente	2
2.3. Ciclo biogeoquímico del azufre2	4
2.4. Reducción biológica de As⁵⁺ y sulfato (SO₄²-)2	6
2.5. Biomineralización del arsénico (Sulfuros de arsénico)2	8
2.6. Tecnologías para la remoción de arsénico de la fase acuosa	0
3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	2
3.1. Justificación	2
3.2. Hipótesis	3
3.3. Objetivo general	3
3.4. Objetivos específicos	3
4. MATERIALES Y MÉTODOS	4
4.1 Fuente de inóculo	4
4.2. Reactivos	4
4.3. Medios de cultivo	4
4.4. Diseño experimental	5
4.5. Evaluación de la actividad microbiana arseniato- y sulfato-reductora	5
4.6. Puesta en marcha y operación del reactor lote alimentado	6
4.7. Puesta en marcha y operación de dos reactores biológicos en continuo con	
actividades separadas	7

4 p	.8. Determinación de las proporciones de arsenito y sulfuro biogénico para la recipitación de sulfuros de arsénico a diferentes pH (ensayos en lote)	39
4 d	.9. Puesta en marcha y operación del reactor semicontinuo para la precipitació e sulfuros de arsénico	n 40
4	.10. Métodos analíticos	41
	4.10.1. Cuantificación de sulfuro (Método Cord-Ruwisch)	41
	4.10.2 Cuantificación de arsénico	42
	4.10.3. Cuantificación de sulfato, lactato, acetato, propionato y butirato	42
	4.10.4. Recuperación de precipitados minerales	43
	4.10.5. Preparación de la muestra para el análisis de rayos X	43
	4.10.6. Caracterización morfológica, elemental y mineralógica	43
	4.10.7. Modelo en PHREEQC y Geochemist´s Workbench	44
5. R	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5	.1. Caracterización de la actividad arseniato- y sulfato-reductora	45
5 a	.2. Biorreactor en lote alimentado (actividades arseniato- y sulfato- reductora copladas)	47
	5.2.1. Caracterización morfológica y elemental del precipitado	50
5 S	.3. Biorreactores en continuo (actividades arseniato- y sulfato-reductora eparadas)	52
	5.3.1. Biorreactor arseniato-reductor	52
	5.3.2. Biorreactor sulfato-reductor	55
5	.4. Ensayos en lote a diferentes relaciones molares S/As	58
5	.5 .Operación del reactor de precipitación en semicontinuo	64
	5.5.1 Efecto del pH en la disolución del oropimente y As ₂ S ₃ amorfo	68
	5.5.2. Caracterización morfológica y elemental de los precipitados	72
6.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	77
7.	REFERENCIAS	79
Ane	exos	86

Lista de tablas

Tabla 2.1. Lineamientos de cumplimiento gradual para arsénico (NOM-127-SSA1-2121, vigente desde 2023)	24
Tabla 2.2. Tratamiento para remoción de arsénico empleando BSR	31
Tabla 4.1.Condiciones experimentales de los reactores en continuo conactividad arseniato- y sulfato-reductora por separado	38
Tabla 5.1. Velocidades de arseniato- y sulfato-reducción en cada ciclo delreactor en lote alimentado. Cada ciclo corresponde una alimentación	47
Tabla 5.2. Carga de As ⁵⁺ , velocidades de arseniato-reducción y eficiencia de reducción en cada etapa de operación del biorreactor arseniato reductor en continuo	53
Tabla 5.3. Carga de sulfato, velocidades de sulfato-reducción y eficiencia dereducción de sulfato en cada etapa de operación del biorreactor sulfato reductoren continuo	57
Tabla 5.4. Cantidad de arsenito y sulfuro biogénico, agua reducida y HCI 1Madicionados en botellas serológicas para determinar las proporcionesadecuadas de efluentes con sulfuro y arsenito necesarios para la formación deprecipitados. El volumen de trabajo fue de 80 mL	58
Tabla 5.5. Estimación de velocidades de precipitación de As ³⁺ biogénico con sulfuro biogénico. Los índices de saturación (SI) se calcularon a partir de las concentraciones experimentales utilizando el software PHREEQC. T=30°C	62
Tabla 5.6. Cantidad de arsenito y sulfuro biogénico, agua reducida y HCI 1Madicionados en el reactor de precipitación. El volumen de trabajo fue de 1600mL	65
Tabla 5.7. Porcentajes de precipitación y constantes de velocidad (estimadas)en el reactor de precipitación de sulfuros de arsénico. Los ensayos se hicieronpor duplicado	67

Tabla 5.8. Índices de saturación del As_2S_3 amorfo, oropimente y rejalgar en elreactor semicontinuo para la precipitación de sulfuros de arsénico. Los índicesde saturación (SI) se calcularon a partir de las concentraciones experimentalesutilizando el software PHREEQC. T=30°C

Lista de figuras

Figura 2.1. Diagrama de Pourbaix del arsénico que representa las especies o	20
fases más estables del arsénico en solución acuosa en función del pH y	
potencial oxido-reducción (Eh). El diagrama se construyó mediante el software	
The Geochemist's Workbench®. $[H_3AsO_3]=0.3125 \text{ mM}$, T=25°C y P=1.013 bars.	
Figura 2.2. Diagrama de Pourbaix del azufre que muestra las especies o fases	25
más estables del azufre en función del pH y del potencial oxido reducción (Eh).	
El diagrama se construyó mediante el software The Geochemist's Workbench®.	
[SO ₄ ²⁻]= 0.4688 mM, T=25°C, P=1.013 bars.	
Figura 2.3. Figura 2.3. Esquema que representa el acoplamiento de las actividades arseniato- y sulfato-reductora y la biomineralización de arsénico.	27
Figura 4.1. Representación esquemática del biorreactor de lecho empacado en lote alimentado.	37
Figura 4.2. Representación esquemática de dos biorreactores en continuo	39
(arseniato- y sulfato-reductor) de lecho empacado.	
Figura 4.3. Representación esquemática general del reactor de precipitación.	41
Figura 5.1. Perfiles de A) Consumo de sulfato, B) Producción de sulfuro, C)	45
Consumo de lactato y D) Producción de ácidos grasos volátiles (AGV): acetato	
y propionato, obtenidos en los ensayos en lote para evaluar la actividad sulfato-	
reductora del consorcio CT. En el día 7 se realizó una segunda adición de ácido	
láctico.	

- Figura 5.2. Perfiles de A) Concentración de As5+, B) Concentración de As3+, C)46Consumo de lactato y D) Producción de ácidos grasos volátiles (AGV): acetato46y propionato, obtenidos en los ensayos en lote para evaluar la actividad46arseniato-reductora del consorcio CT. En el día 7 se realizó una segunda adición46de ácido láctico.46
- Figura 5.3. Perfiles de A) Consumo de sulfato, B) Producción de sulfuro, C)48Concentración de As^{5+} en la fase acuosa y D) Concentración de As^{3+} en la fase48acuosa. Operación del reactor en lote alimentado: 2.5 mM As^{5+} + 2.5 mM sulfato.

Figura 5.4. A) Perfil de concentración de arsénico total en la fase acuosa y B)49Evidencia del precipitado biogénico. La fotografía corresponde a los 60 días de
operación del reactor. Se puede observar el precipitado de color amarillo entre
el material de soporte y dentro de la imagen un acercamiento del reactor en la
esquina inferior derecha.49

Figura 5.5. Perfiles de A) Consumo de lactato y B) producción de acetato. Las 50 flechas rojas indican adición de lactato (~5mM).

Figura 5.6. Análisis del precipitado biogénico formado en el reactor en lote51alimentado y recuperado después de 88 días de operación. A) Micrografía deMEB adquirida con el detector LFD, el recuadro verde señala el área analizaday B) Análisis químico elemental correspondiente.

Figura 5.7. Perfiles de concentración de arseniato y arsenito en la fase acuosa 52 durante la operación del biorreactor arseniato-reductor en continuo. A) Concentración de arseniato (As^{5+}) y B) Concentración de arsenito (As^{3+}) en el efluente.

Figura 5.8. Perfiles de concentración de lactato, acetato, butirato y propionato54durante la operación del biorreactor arseniato-reductor en continuo. A)54Consumo de lactato y B) Producción de ácidos grasos volátiles (AGV): acetatoy propionato.

Figura 5.9. Balance de miliequivalentes electrones (meq), durante las tres54etapas de operación del biorreactor arseniato-reductor en continuo.54

Figura 5.10. Perfiles de sulfato y sulfuro durante la operación del biorreactor55sulfato-reductor en continuo. A) Reducción de sulfato y B) Producción desulfuro.

Figura 5.11. Perfiles de concentración de lactato, acetato y propionato durante56la operación del biorreactor sulfato-reductor en continuo. A) Consumo de lactato59y B) Producción de ácidos grasos volátiles (AGV): acetato y propionato.56

Figura 5.12. Balance de miliequivalentes de electrones (meq) durante la Etapa571 y 2 de la operación del biorreactor sulfato-reductor en continuo.57

Figura 5.13. Fotografías tomadas de los experimentos de relaciones molares59S:As a diferentes pH 5. A) 5 min, pH 2. B) Día 6 del experimento, pH 2. C) 1010min, pH 5. D) Día 6 del experimento, pH 5. E) 10 min, pH 6. F) Día 6 del10experimento, pH 6.10

Figura 5.14. Perfil de concentración de As total disuelto con respecto al tiempo60para los experimentos de relaciones molares S/As: 1.4, 2.7 y 5.4. A) pH 2. B)pH 5 y C) pH 6.

Figura 5.15. Solubilidad del oropimente en función del pH. La gráfica se 61 construyó mediante el software PHREEQC (Versión 3) asumiendo 0.01 moles de oropimente en agua. T= 30° C y P= 1 atm.

Figura 5.16. Porcentajes de remoción de arsénico total en la fase acuosa de los63experimentos en lote con distintas relaciones molares S:As (1.4, 2.7 y 5.4). Losporcentajes se calcularon a partir de las concentraciones al final del experimento(día 6).

Figura 5.17. Fotografías del reactor de precipitación operado en semicontinuo,66A-C corresponde al reactor operado en pH 2: A) Ajustando pH (15 min). B) 1 hdespués del ajuste de pH. C) 4 h y D-G en pH 5: D) Antes de ajustar pH (15 mindespués del mezclado), E) 30 min después del ajuste de pH. F) 1 h. G) 72 h.

Figura 5.18. Perfil de concentración de arsénico total disuelto con respecto al66tiempo para los experimentos a la relación molar S/As de 1.5 y dos valores depH, A) pH 2 y B) pH 5

Figura 5.19. Concentraciones de especies de As³⁺en equilibrio con Oropimente 68 en presencia de concentraciones de sulfuro disuelto A) 10 μ M y B) 10 mM en función del pH. Fuente: D. Vlassopoulos et al. (2010)

Figura 5.20. Diagrama de Pourbaix para As y S en el reactor de precipitación70(relación S/As=1.5). El diagrama se construyó mediante el software TheGeochemist's Workbench® a partir de las concentraciones promedio conocidasde [As]=1.17mM y [S]= 1.755 mM. T=25°C y P=1.013 bars. Los puntos rojo ymorado señalan los valores de E(V) después de la formación del precipitado, a

condiciones de pH 2 y 5 respectivamente. El área amarilla denota las fases sólidas.

Figura 5.21. Diagrama de dominancia para la precipitación de $As_2S_3(am)$ en 71 equilibrio con especies de As^{3+} , incluyendo especies de tioarsenito con diferentes relaciones S/As (entre 1 y 4). El símbolo cuadrado muestra el pH y la fugacidad de H₂S(g) en los resultados reportados por Battaglia-Brunet et al (2012).

Figura 5.22. Análisis del precipitado formado en el reactor de precipitación a pH722 y recuperado después de 48 h de operación. A y B) Micrografía de MEB (elrecuadro verde señala el área de interés analizada con el detector EDS). C y D)Espectro EDS correspondiente.

Figura 5.23. Patrón de XRD del precipitado obtenido al final del experimento a73pH 2.

Figura 5.24. Análisis del precipitado formado en el reactor de precipitación a pH745 y recuperado después de 120 h de operación. A y B) Micrografía de MEB (elrecuadro verde señala el área de interés analizada con el detector EDS). C y D)Espectro EDS correspondiente.

Figura 5.25. Patrón de XRD del precipitado obtenido al final del experimento a75pH 5.

Anexos

Anexo 1. Determinación de los índices de saturación (SI) y gráfica de86solubilidad del oropimente en función del pH mediante el softwarePHREEQC Version 3.

Anexo 2. Elaboración de diagrama de Pourbaix mediante el software90Geochemist´s Workbench 2023 Versión 17.

Resumen

Consuelo Brito García (2025). Precipitación de sulfuros de arsénico en un sistema biológico-fisicoquímico. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.

La contaminación por arsénico en el agua representa un alto riesgo para la salud humana y el medio ambiente. La OMS establece un límite máximo permisible de 10 µg/L en agua para consumo humano. En México, altas concentraciones de arsénico son comunes en acuíferos y zonas mineras como por ejemplo Matehuala, S.L.P., con niveles de hasta 158 mg/L en agua. Los métodos de tratamiento existentes como la filtración y la precipitación química son costosos y generan subproductos tóxicos. La remediación biológica, la cual aprovecha la capacidad metabólica de las bacterias arseniato- y sulfato-reductoras, ofrece una alternativa prometedora para la remoción del arsénico mediante su biomineralización o formación de fases minerales de sulfuros de arsénico. El objetivo del presente estudio fue evaluar la precipitación de sulfuros de arsénico en un sistema biológico-fisicoquímico para la remoción de arsénico del agua. Se caracterizaron las actividades biológicas (arseniatoy sulfato-reductora) de un consorcio recuperado de sitios contaminados. Posteriormente se operó un reactor de lecho fijo en lote (volumen de trabajo 250 mL) con las dos actividades acopladas y se eliminó con éxito hasta 99% del arseniato (2.5 mM) y 100% del sulfato (hasta 5 mM) utilizando lactato como donador de electrones. Los precipitados biogénicos contenían principalmente sulfuros de arsénico (AsS) en estructuras similares a fibras. A partir del soporte del primer reactor, se pusieron en marcha dos reactores en continuo (500 mL c/u) con actividades por separado. En el reactor arseniato-reductor se logró una eficiencia de reducción superior a 85%, mientras que en el reactor sulfato-reductor se logró remover hasta 80% del sulfato alimentado. A partir de los efluentes de ambos reactores se evaluó el efecto de las relaciones molares y el pH en la precipitación de sulfuros de arsénico, mediante experimentos en lote con diferentes relaciones molares de S:As (1.4, 2.7, 5.4) y pH (2, 5 y 6). Los resultados mostraron un mayor porcentaje de remoción del arsénico (93%) a pH 2 en el plazo de una hora y menor eficiencia de eliminación (19-64%) a pH 6. Finalmente se operó un reactor de precipitación a relación molar S:As 1.5 a pH 2 y 5. Se encontró que a pH 2, los precipitados de arsénico se solubilizan después de 48 horas, mientras que a pH 5. los precipitados fueron más estables, logrando una remoción de hasta 92% en cinco días. Finalmente, los análisis de MEB-EDS indicaron que el precipitado obtenido a pH 2 estaba compuesto por S y As, en una relación molar 1.6 (S:As). El precipitado presentó morfología esférica con partículas entre 118 a 280 nm. El patrón de difracción de rayos X (XRD) confirmó la presencia de fases cristalinas de oropimente (As₂S₃) y rejalgar (As₄S₄). Con respecto al precipitado que se obtuvo con pH 5, la micrografía de MEB mostró una morfología de partículas prismáticas con tamaño entre 1.7 a 3 µm. Los resultados de EDS indicaron que el precipitado estaba conformado por As y S, en una relación entre 0.55 y 0.90 (S:As). El análisis XRD confirmó la presencia de oropimente y rejalgar. Se demostró que, al separar el proceso biológico del proceso de precipitación, afecta la morfología, tamaño de partícula y cristalinidad de los sulfuros de arsénico formados, por lo tanto, se espera que este estudio sea el punto de partida para indagar sobre las condiciones en la precipitación de sulfuros de arsénico, y cómo esto afecta sus propiedades físicas y químicas.

Palabras clave: arsénico, bacterias arseniato-reductoras, bacterias sulfato-reductoras biomineralización, oropimente, rejalgar

Abstract

Consuelo Brito García (2025). Precipitation of arsenic sulfides in a biologicalphysicochemical system. M.Sc. Thesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.

Arsenic contamination in water represents a high risk to human health and the environment. The WHO establishes 10 µg/L of arsenic as the maximum permissible limit in water for human use. In Mexico, high concentrations of arsenic are common in aquifers and mining areas such as Matehuala, S.L.P., with levels up to 158 mg/L in water. Existing treatment methods such as filtration and chemical precipitation are expensive and generate toxic byproducts. Biological remediation, which takes advantage of the metabolic features of arsenic- and sulfate-reducing bacteria, offers a promising alternative for arsenic removal through its biomineralization or formation of arsenic sulfides mineral phases. The objective of the present study was to evaluate the precipitation of arsenic sulfides in a biologicalphysicochemical system for arsenic removal from water. The biological activities (arsenateand sulfate-reducing) of a consortium recovered from contaminated sites were characterized. Afterwards, a fixed bed batch reactor (250 mL working volume) with the two coupled activities was operated at laboratory scale and successfully removed up to 99% of arsenate (2.5 mM) and 100% of sulfate (up to 5 mM) using lactate as electron donor. The biogenic precipitates contained mainly arsenic sulfides (AsS) in fiber-like structures. From the support of the first reactor, two continuous reactors (500 mL each) with separate activities were set up and operated. The arsenate-reducing reactor reached more than 80% of arsenic reduction efficiency, while the sulfate-reducing reactor showed up to 80% sulfate removal efficiency. From the effluents of both reactors, the effect of molar ratios and pH was evaluated in batch experiments at different S:As molar ratios (1.4, 2.7, 5.4) and pH (2, 5 and 6). The results showed a higher arsenic removal efficiency (93%) at pH 2 within one hour and lower removal efficiency (19-64%) at pH 6. Finally, a precipitation reactor was operated at molar ratio S:As 1.5 at pH 2 or 5. At pH 2, arsenic precipitates solubilized after 48 hours, while at pH 5, the precipitates were more stable, achieving up to 92% removal in five days. Finally, SEM-EDS analyses indicated that the precipitate at pH 2 was composed of S and As, in a 1.6 molar ratio (S:As). The precipitate showed spherical morphology with particles between 118 to 280 nm. The X-ray diffraction pattern (XRD) confirmed the presence of crystalline phases of orpiment (As_2S_3) and realgar (As_4S_4) . Regarding the precipitate at pH 5, SEM micrographs of the precipitate showed a prismatic particle morphology with particle sizes between 1.7 to 3 µm. The EDS results indicated that the precipitate was composed of As and S, in a ratio between 0.55 and 0.90 (S:As). The X-ray diffraction pattern (XRD) confirmed the presence of orpiment and realgar. It was shown that the separation of the biological process from the precipitation process affects the morphology, particle size, and crystallinity of the formed arsenic sulfides. It is therefore expected that this study will be the starting point for investigating the conditions governing the precipitation of arsenic sulfides, which affect their physical and chemical properties.

Keywords: arsenic, arsenate-reducing bacteria, biomineralization, sulfate-reduction, oropiment, realgar

1.INTRODUCCIÓN

Actualmente la contaminación por arsénico (As) de cuerpos de agua es una problemática que va en aumento a nivel mundial y que afecta a muchas ciudades en el mundo. Se estima que aproximadamente 140 millones de personas en alrededor de 70 países han estado bebiendo agua con niveles de arsénico superiores a 10 µg/L (UNICEF & WHO, 2018).

El arsénico puede estar presente de forma natural en concentraciones superiores a 50 μ g/L en el agua subterránea de muchos países, tales como Argentina, Chile, México, China, Hungría, India, Bangladesh y Vietnam. Dichas concentraciones exceden el límite máximo permisible establecido por organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud y la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU que establecen un límite máximo permisible de arsénico en agua para consumo humano de 10 μ g/L (Smedley & Kinniburgh, 2002). El arsénico se considera un contaminante inorgánico prioritario y es altamente tóxico, su presencia en concentraciones mayores que la normativa representa una amenaza para la salud humana y el medio ambiente.

En México, se han detectado concentraciones de arsénico mayores a 50 µg/L en acuíferos aluviales (centro y norte del país), áreas con actividad minera (reciente o antigua) y aguas geotermales. Particularmente en el estado de San Luis Potosí, hay reportes de casos representativos con una elevada concentración de arsénico en cuerpos de agua localizados en el distrito minero Santa María de la Paz y la ciudad de Matehuala, en donde se han detectado hasta 158 mg/L de arsénico disuelto (Martínez-Villegas et al., 2013). De acuerdo con un estudio hidrogeoquímico realizado en esta zona, los principales procesos que controlan la concentración del metaloide en dicho sitio están relacionados con la precipitación y disolución de minerales que contiene arsénico, como los arseniatos de calcio (Martínez-Villegas et al., 2013; Rios-Valenciana et al., 2017). El agua subterránea se usa para riego, ganadería y actividades recreacionales; sin embargo, no cumple con la normatividad mexicana vigente para agua de riego, que establece concentraciones máximo-permisibles entre 0.2 y 0.4 mg/L (DOF, NOM-001-SEMARNAT-2021; Ruíz-Huerta et al., 2017).

La preocupación por el potencial riesgo del arsénico sobre la salud humana y el medio ambiente ha dado lugar a extensos estudios sobre tecnologías de tratamiento para remover arsénico en aguas subterráneas, los cuales incluyen filtración por membrana, coagulación y floculación, y adsorción/filtración por medios porosos (Duong et al., 2021). Sin embargo, los métodos físicos y químicos no son rentables, debido al uso continuo de sustancias químicas, que conlleva a un aumento de costos y formación de residuos con sustancias no deseadas o subproductos tóxicos (Daraz et al., 2023). Por ende, se ha apostado por la tecnología de remediación microbiana, que implica el uso de consorcios microbianos para la biotransformación de metales pesados en sus formas no tóxicas o la modificación de su movilidad, formando compuestos insolubles (biominerales), los cuales poseen una mayor estabilidad y facilitan su recuperación de la fase acuosa (Estay et al., 2021).

En el presente trabajo se llevó a cabo un proceso biológico-fisicoquímico de remoción de arsénico en fase acuosa mediante un sistema integral usando un consorcio microbiano recuperado de sitios contaminados con arsénico. Se operaron en continuo dos reactores biológicos (arseniato-reducción y sulfato-reducción) acoplados a un reactor de tanque agitado para lograr la precipitación de sulfuros de arsénico.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Origen y química del arsénico (As) en los sistemas acuáticos

El arsénico es un metaloide que se encuentra de manera natural en la atmósfera, suelos y rocas, cuerpos de agua y organismos. Ocupa el vigésimo lugar de los elementos más abundantes en la corteza terrestre y se estima que su concentración es entre 1 y 2 mg/kg (Kabata-Pendias, 2010). En la naturaleza, el arsénico se asocia con minerales sulfurosos, hierro y otros metales (Ag, Au, Zn, Cu, Sb, Ni y Co) y se ha detectado en más de 200 minerales diferentes, donde los sulfuros minerales más comunes que contienen arsénico son la arsenopirita (FeAsS), oropimente (As₂S₃) y rejalgar (AsS o As₄S₄) (Onishi, 1969).

El arsénico se libera y se mueve en el medio ambiente por fenómenos naturales como la actividad volcánica (Wakao et al., 1988), procesos geológicos naturales (p.ej., erosión eólica de los depósitos minerales que contienen arsénico), espuma marina, incendios forestales, actividad biológica y actividades antropogénicas. Dentro de las actividades antropogénicas que emiten arsénico al ambiente se encuentra la industria metalúrgica y minera, procesamiento de madera, manufactura del vidrio, industria electrónica (componentes de los semiconductores), industria farmacéutica y agroquímicos (Jong & Parry, 2005).

La química del arsénico en los sistemas acuáticos es bastante compleja y existen diferencias importantes en comparación con los metales traza (p.ej., cadmio, cromo y níquel). El arsénico puede existir en cualquiera de los cuatro estados de oxidación estables (+5, +3, 0, -3), forma oxianiones a valores de pH típicamente encontrados en aguas subterráneas (6.5-8.5), tanto en condiciones oxidantes como reductoras. Dependiendo de las condiciones ambientales, las especies de arseniato (H₂AsO₄⁻ y HAsO₄²⁻) y arsenito (H₃AsO₃) suelen ser las más predominantes (Fig.2.1) (Chakravarty et al., 2002).

El arsénico también puede encontrarse en compuestos orgánicos los cuales pueden ser producidos por la actividad biológica, sobre todo en aguas superficiales. Cabe destacar que las formas orgánicas pueden ocurrir cuando los cuerpos de agua son afectados por la descarga de efluentes industriales (Smedley & Kinniburgh, 2002).



Figura 2.1. Diagrama de Pourbaix del arsénico que representa las especies o fases más estables del arsénico en solución acuosa en función del pH y potencial oxido-reducción (Eh). El diagrama se construyó mediante el software The Geochemist's Workbench®. [H₃AsO₃]=0.3125 mM, T=25°C y P=1.013 bars.

En valores de pH casi neutros (6.5 - 7.5) y típicos de la mayoría de las aguas subterráneas, la solubilidad de la mayoría de los cationes metálicos está severamente limitada por procesos de precipitación o coprecipitación con: óxidos, hidróxidos, carbonatos o fosfatos minerales, o probablemente por su fuerte adsorción a óxidos de metales hidratados, arcillas o, incluso, materia orgánica. Por el contrario, la mayoría de los oxianiones, incluido el arseniato (abreviado en lo sucesivo como As⁵⁺), tienden a absorberse con menos fuerza a medida que aumenta el pH; por esta razón estos aniones pueden persistir en concentraciones mayores a 3000 µg/ L en el agua, incluso a valores de pH casi neutros (Morin et al., 2003). En cambio, el arsenito (abreviado en lo sucesivo como As³⁺), en su forma no iónica (H₃AsO₃), tiene una mayor movilidad, característica que lo hace más tóxico que el arseniato (Glodowska et al., 2020).

Diferentes factores fisicoquímicos y climáticos afectan la dinámica general y el ciclo biogeoquímico de los metales pesados en el medio ambiente, la presencia del arsénico en los cuerpos de agua naturales está regida principalmente por la geoquímica del ecosistema, hidrología, química del agua, procesos biológicos, pH, potencial redox (Eh) del ecosistema (Lièvremont et al., 2009).

2.2. Toxicidad e impacto a la salud humana y el medio ambiente

La contaminación del suelo por metales pesados provoca alteración y perturbación en su microbiota, debido a que éstos pueden intervenir en el metabolismo microbiano y modificar las actividades enzimáticas del suelo (Huang et al., 2009). Asimismo, la presencia de metales pesados en el suelo induce cambios en las propiedades físicas y químicas, tales como pH, densidad, porosidad, superficie relativa, contenido de arcilla, concentración de iones y cantidad de materia orgánica presente (Briffa et al., 2020).También pueden tener un efecto indirecto perjudicial en el crecimiento de las plantas, esto se debe a que los nutrientes esenciales requeridos pueden ser reemplazados en los sitios de intercambio catiónico por metales pesados o metaloides como el arsénico (Chibuike & Obiora, 2014).

En los sistemas acuáticos, los sedimentos actúan como el principal almacén de metales, y sirven como sumidero y fuente de metales pesados. Sin embargo, debido a procesos fisicoquímicos y/o biológicos son liberados en la columna del agua, provocando la contaminación del acuífero (Ali et al., 2019). Los metales pesados constituyen un grupo de elementos químicos que se caracterizan por un alto peso atómico y una alta densidad. Dentro de ese grupo, por su toxicidad, también se incluyen algunos metaloides y metales ligeros como el arsénico, el selenio y el aluminio (Briffa et al., 2020; Tchounwou et al., 2012). Son considerados sustancias químicas peligrosas debido a su persistencia ambiental, bioacumulación y biomagnificación (Ali et al., 2019), ya que poseen la tendencia a formar enlaces covalentes con otros compuestos, lo que resulta en la formación de compuestos lipofílicos que pueden unirse a las macromoléculas de la célula e imponer efectos tóxicos. Por ejemplo, el arsénico y cadmio pueden unirse a las

proteínas celulares y provocar algunos cambios en su estructura, o provocar su desnaturalización (Kishore et al., 2023).

Los efectos adversos y la toxicidad del arsénico se atribuyen a su capacidad de sustituir a un grupo fosfato y formar metabolitos, interrumpiendo procesos bioquímicos, ocasionando muerte celular. Lo anterior se debe a la similitud que tiene la estructura química del arseniato con el fosfato (Firrincieli et al., 2019). La Agencia Internacional para la investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasifica al arsénico dentro del Grupo I (metales pesados carcinogénicos), la toxicidad del arsénico inorgánico tiene efectos en la salud humana y causa irritación del sistema gastrointestinal, irritación pulmonar, cambios en la piel, disminución de la producción de glóbulos rojos y glóbulos blancos, infertilidad y abortos espontáneos, problemas cardiovasculares, daño cerebral, alteraciones epigenéticas y daño al ADN (Briffa et al., 2020; Tchounwou et al., 2012).

Los límites máximos permisibles de arsénico en agua difieren para cada país, sin embargo, se toman como referencia los límites establecidos por organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud y la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU., ambas establecen un límite permisible de 10 µg/L. De acuerdo con la normatividad mexicana vigente, el límite máximo permisible de arsénico en agua para uso y consumo humano es de 0.025 mg/L (DOF, NOM-127-SSA1-2021) para todas las localidades y se ajusta conforme a la tabla de cumplimiento gradual (Tabla 2.1). Para descargas de aguas residuales, el límite máximo permisible es de 0.4 mg/L (para ríos, arroyos, canales, drenes, zonas marinas y riego de áreas verdes) y de 0.2 mg/L (para embalses, lagos, lagunas, infiltración y otros riegos, suelos cársticos) (DOF, NOM-001-SEMARNAT-2021). El intervalo de concentraciones de arsénico reportadas en agua a nivel mundial comprende desde 0.5 µg/L hasta más de 5000 µg/L (Smedley P.L. & Kinniburgh, 2002).

Localidad	Localidad Año	
		arsénico (mg/L)
Mayor de 500,000	Un año posterior a la entrada en	0.01
habitantes	vigor de la presente Norma	
Entre 50,000 y	Tres años posterior a la entrada en	0.01
499,999 habitantes	vigor de la presente Norma	
Menor de 50,000	Seis años posterior a la entrada en	0.01
habitantes	vigor de la presente Norma	

Tabla 2.1. Lineamientos de cumplimiento gradual para arsénico (NOM-127-SSA1-2121, vigente desde 2023)

2.3. Ciclo biogeoquímico del azufre

El azufre forma parte de los elementos químicos más abundantes en la Tierra. Los grandes depósitos de azufre se encuentran en sedimentos y rocas (7800 x 10^{18} g) en forma de sulfuros de hierro, principalmente pirita (FeS₂) y yeso (CaSO₄) o como sulfato (SO₄²⁻) en agua de mar (1280 x 10^{18} g). En el medio ambiente, el azufre se presenta en diferentes estados de oxidación (de -2 a +6) y formas químicas (cisteína, sulfuro, sulfato, etc.) (Fig. 2.2). Estos compuestos pueden sufrir transformaciones mediante procesos químicos y biológicos. El ciclo del azufre comprende procesos redox y es liberado al ambiente por procesos de meteorización de las rocas. El sulfato (SO₄²⁻) suele ser el producto de oxidación final, que se acumula en los minerales y en el océano. También hay diversas fuentes que liberan azufre a la atmósfera. Estas fuentes pueden ser naturales (erupciones volcánicas) o antropogénicas (quema de combustibles) (Sánchez-Andrea et al., 2014).



Figura 2.2. Diagrama de Pourbaix del azufre que muestra las especies o fases más estables de azufre en función del pH y del potencial oxido-reducción (Eh). El diagrama se construyó mediante el software The Geochemist's Workbench®. $[SO_4^2] = 0.4688 \text{ mM}, T = 25^{\circ}C, P = 1.013 \text{ bars}.$

Los microorganismos desempeñan un papel crucial en el ciclo del azufre, catalizando las reacciones redox de los compuestos azufrados. Estas reacciones incluyen: (1) reducción no asimilativa de sulfato a sulfuro, la cual está acoplada a la conservación de energía y al crecimiento; (2) reducción no asimilativa de azufre , el aceptor de electrones es azufre elemental y se obtiene energía al acoplar la reducción con la oxidación de un donador de electrones; (3) reducción de sulfato asimilativa, el sulfuro reducido es asimilado en biomasa, proteínas, aminoácidos y cofactores por plantas, hongos y microorganismos; (4) mineralización de compuestos orgánicos con liberación de sulfuro de hidrógeno; (5) oxidación de sulfuro por O₂ , NO₃⁻ , Fe³⁺ o Mn⁴⁺ como aceptores de electrones por bacterias litotróficas y fototróficas, produciendo azufre y posteriormente sulfato; y (6) dismutación, la oxidación y reducción combinadas de compuestos de azufre (tiosulfato, sulfito y azufre) a sulfato y sulfuro (Mao et al., 2024; Sánchez-Andrea et al., 2014).

2.4. Reducción biológica de As⁵⁺ y sulfato (SO₄²⁻)

La movilidad del arsénico en el medio ambiente depende principalmente de las interacciones biogeoquímicas mediadas por microorganismos. La reducción microbiana de As⁵⁺ a especies móviles de arsénico en forma de As³⁺ tiene lugar por desintoxicación (Cervantes et al., 1994) o por procesos de respiración (Ahmann et al., 1994).

La desintoxicación se logra mediante una enzima arseniato reductasa (regulada por el gen *ars*C) citoplasmática que reduce el As⁵⁺ hasta As³⁺ sin la producción de energía para la célula. Posteriormente, el arsenito se expulsa fuera de la célula mediante un sistema de bombas de expulsión (regulado por el gen *ars*B). Se ha observado una gran abundancia de microorganismos que son capaces de reducir arseniato hasta arsenito mediante sistemas de desintoxicación del arsénico, incluso células eucariotas son capaces de realizarlo (Andres & Bertin, 2016).

La respiración de As⁵⁺ es regulada por el gen *arr*A, que se ha identificado en diferentes géneros bacterianos (Santini et al., 2002). En condiciones reductoras, la especie predominante de arsénico es el arseniato, algunos procariotes anaerobios pueden usar As⁵⁺ como aceptor final de electrones (Ahmann et al., 1994; Newman et al., 1998). Estos microorganismos obtienen energía (ATP) al acoplar la reducción de As⁵⁺ con la oxidación de materia orgánica, por lo tanto, se trata de un proceso de respiración. Los microorganismos que respiran As⁵⁺ pueden utilizar diferentes donadores de electrones (por ejemplo, acetato, lactato, glicerol) y varían desde mesófilos hasta extremófilos (Oremland & Stolz, 2003). Entre los géneros con capacidad de reducir arseniato se encuentran: *Desulfuromonas, Desulfitobacterium, Desulfotomaculum, Desulfotomaculum, Coreniana, 2003*; Routh et al., 2007).

Por otra parte, las bacterias sulfato-reductoras (BSR), utilizan el sulfato como aceptor final de electrones, produciendo sulfuro. De igual manera que la reducción del As⁵⁺, estos microorganismos obtienen energía acoplando la reducción del sulfato con la oxidación de materia orgánica o de H₂ y CO₂. Los donadores de electrones más utilizados para la sulfato-reducción son: acetato, etanol, glicerol, hidrógeno y lactato. Cuando se emplea

lactato, este puede ser oxidado de manera completa hasta CO₂ o incompleta hasta acetato, debido a que algunas bacterias sulfato-reductoras no pueden oxidar el acetato (Alam & McPhedran, 2019). Entre los géneros de bacterias sulfato-reductoras se encuentran *Desulfovibrio, Desulfomicrobium* y *Desulfosporosinus*.

La interacción entre las bacterias arseniato-reductoras y sulfato-reductoras permite la biomineralización de sulfuros de arsénico (Fig.2.3). Esto ha llevado a los investigadores a concluir que estos microorganismos desempeñan un papel crucial en el ciclo del arsénico.



Figura 2.3. Esquema que representa el acoplamiento de las actividades arseniato- y sulfatoreductora y la biomineralización de arsénico.

Para la biomineralización se requiere la presencia de sulfuro y arsenito, las reacciones 1 y 2 presentan las reacciones estequiométricas para la oxidación incompleta de lactato con arseniato y con sulfato, respectivamente (Newman et al., 1997; Sánchez-Andrea et al., 2014):

C₃H₅O_{3⁻} + 2H⁺ + HAsO_{4²⁻} + H₂AsO_{4⁻} → 2H₃AsO₃ + HCO_{3⁻} + C₂H₃O_{2⁻} (Δ G^o' = -172 kJ/mol) (Reacción 1)

 $2C_{3}H_{5}O_{3}^{-} + SO_{4}^{2-} \rightarrow 2C_{2}H_{3}O_{2}^{-} + 2HCO_{3}^{-} + 0.5HS^{-} + 0.5 H_{2}S + 0.5H^{+} (\Delta G^{\circ} = -89 \text{ kJ/mol})$ (Reacción 2)

Una vez producidos, el arsenito reacciona con el sulfuro para dar lugar a la formación de sulfuros de arsénico. Idealmente se podría obtener oropimente y rejalgar (reacciones 3 y 4, respectivamente)(Lu & Zhu, 2011) :

 $2H_{3}AsO_{3} + 3H_{2}S \rightarrow As_{2}S_{3 (s)} + 6H_{2}O$ (Reacción 3) $4H_{3}AsO_{3} + 4H_{2}S + 4H^{+} + 4e^{-} \rightarrow As_{4}S_{4(s)} + 12H_{2}O$ (Reacción 4)

2.5. Biomineralización del arsénico (Sulfuros de arsénico)

La biomineralización es un proceso utilizado por diversos sistemas biológicos para producir una amplia variedad de estructuras mineralizadas que se encuentran en la naturaleza y dentro de ciertos organismos unicelulares que incluyen bacterias, hongos y algas. En la naturaleza se producen diferentes tipos de mineralización, incluida la calcificación, la silicificación y la mineralización de hierro (Ehrlich et al., 2010; Qin et al., 2020).

Se ha prestado mucha atención al estudio de la mineralización mediada por microbios y sus posibles aplicaciones en medicina y eliminación de contaminantes. La mineralización bacteriana también es importante en los procesos geológicos y biotecnológicos. El proceso de precipitación de biominerales en diferentes situaciones puede imitarse y usarse en el desarrollo de biotecnologías, como, por ejemplo, la remediación de metales (Qin et al., 2020).

La síntesis de cristales mediante biomineralización es un proceso que los microorganismos usan para protegerse del efecto adverso de su entorno (Cuéllar-Cruz, 2017). Los microorganismos pueden proporcionar plantillas o andamios para la nucleación y el crecimiento de cristales de minerales, incluyendo los sulfuros metálicos. La nucleación está definida como la formación de partículas sólidas en el seno de un fluido sobresaturado. La nucleación de cristales se puede dividir en nucleación primaria y nucleación secundaria. La nucleación primaria ocurre en el seno del fluido y puede ser

homogénea. La nucleación homogénea se caracteriza por ser espontánea y requiere alcanzar la mayor sobresaturación o bien puede ser heterogénea (favorecida por la presencia de superficies sólidas). Por su parte la nucleación secundaria, es inducida por la presencia de cristales macroscópicos en el fluido. La matriz orgánica microbiana (como polisacáridos, proteínas, péptidos, aminoácidos, ADN, etc.) con grupos cargados negativamente induce la nucleación heterogénea e inhibe la nucleación homogénea, lo que favorece la nucleación y el crecimiento de cristales (Taylor et al., 2020).

La sobresaturación es la fuerza termodinámica impulsora detrás de cada proceso de precipitación y el nivel de sobresaturación gobierna los procesos de velocidad de formación de partículas, como la nucleación, el crecimiento y la agregación. El nivel de sobresaturación en el sistema de precipitación está determinado por la actividad de las especies reaccionantes y el producto de solubilidad del precipitado (K_{ps}). Debido a la naturaleza de la mayoría de los sulfuros metálicos (K_{ps} < 10⁻¹⁵), los procesos de precipitación de solubilidad sobresaturación, incluso a bajas concentraciones de los analitos. Como resultado, la nucleación primaria es el mecanismo dominante responsable de la formación de partículas y, por lo general, se forman partículas muy pequeñas (orden nanométrico) (Mokone et al., 2010).

En sistemas de mineralización biológica, el control de la interacción entre las dos especies que constituirán el mineral se afecta por la materia orgánica microbiana y es el resultado de varias interacciones sinérgicas. La interacción electrostática contribuye a una mayor concentración (sobresaturación) de sustancias nucleantes (como aniones inorgánicos y cationes metálicos) alrededor de la materia orgánica (Luo et al., 2019; Su et al., 2022). Además, los microorganismos desempeñan un papel clave en la regulación de la nucleación y el crecimiento de los cristales, controlando así el tamaño, la morfología y la estructura de los cristales (Zeng et al., 2021).

En condiciones reductivas, las BSR destacan por su capacidad de promover la formación de minerales de sulfuros en presencia de metales en solución. En el caso de los sulfuros de arsénico, un incremento de pH y oxígeno disuelto, así como una alta concentración de sulfuro disuelto puede provocar la solubilización de éstos (Floroiu et al., 2004) y promover la formación de especies poco estables como los tioarsenitos (Wilkin et al.,

2019). Por lo tanto, las reacciones de precipitación dependen de las condiciones ambientales siendo las más relevantes el pH y el oxígeno disuelto (Hoffmann et al., 2021).

En la biomineralización del arsénico se pueden obtener fases amorfas y fases cristalinas; las fases amorfas, se caracterizan por tener átomos, iones o moléculas distribuidas de manera aleatoria, sin seguir una estructura definida (red cristalina) y las fases cristalinas tienen acomodos geométricos y simétricos. Los sulfuros de arsénico más relevantes son el rejalgar (As₄S₄) y el oropimente (As₂S₃), debido al interés en sus propiedades ópticas y electrónicas. Adicionalmente, tienen una mayor estabilidad termodinámica y por lo tanto, tasas lentas de liberación de arsénico y azufre en comparación con fases amorfas de sulfuros de arsénico (Mirazimi et al., 2021).

2.6. Tecnologías para la remoción de arsénico de la fase acuosa

Existen diversas tecnologías de tratamiento para la remoción de metales pesados en matrices acuosas, estas tecnologías se pueden clasificar en tres categorías: físicas, químicas y biológicas. Entre éstas, el método más común es emplear absorbentes que incluyen alúmina, resinas de intercambio iónico, sílice, arcillas, hierro, compuestos de hierro y polímeros orgánicos. Sin embargo, estos métodos no son tan efectivos cuando la concentración del metal es baja o si hay presencia de arsenito, ya que dichos tratamientos son más efectivos para la especie arseniato (Bertin et al., 2022). En la remediación microbiológica, varios microorganismos como bacterias, levaduras, hongos y algas se utilizan para la biotransformación de metales pesados en sus formas no tóxicas o para modificar su movilización.

Actualmente ha crecido el interés por la aplicación de tecnologías biológicas para la eliminación de arsénico del agua, debido a sus numerosas ventajas sobre otras tecnologías; por ejemplo, el nulo uso de sustancias químicas (coagulantes) y la menor cantidad de lodos generados durante el tratamiento. La reducción de sulfato mediante la actividad de las BSR tiene un excelente potencial para eliminar arsénico de aguas subterráneas, drenaje ácido de minas y sedimentos, entre otras matrices. En condiciones anóxicas o anaerobias, la reducción del sulfato en presencia de arsenito favorece la formación de diferentes fases minerales (sulfuros de arsénico), los más comunes son el oropimente y rejalgar (Alam & McPhedran, 2019). Las BSR son microorganismos

anaerobios que se encuentran naturalmente en ambientes acuáticos y terrestres. Se ha demostrado que muchas BSR son capaces de reducir el arseniato a arsenito. Por ejemplo, Rios-Valenciana et al. (2017) observaron una remoción de As³⁺ de la fase acuosa, en forma de sulfuros de arsénico, mediante experimentos en lote, usando sedimentos de sitios contaminados con arsénico, los cuales tenían comunidades microbianas capaces de reducir el arseniato y el sulfato.

Diversos estudios combinan ambas actividades biológicas de comunidades microbianas para la remoción de arsénico del agua, mediante la operación de reactores semicontinuos o continuos. En la siguiente tabla se resume tres tratamientos biológicos para la remoción de arsénico de la fase acuosa empleando BSR.

Como podemos observar, en los estudios revisados, se emplearon tratamientos para drenaje ácido de mina, usando consorcios acidófilos. En nuestro país existen pocos estudios para el tratamiento de aguas subterráneas (pH 5~9) utilizando consorcios arseniato y sulfato-reductores.

Matriz	Tipo de reactor	Fuente de carbono	рН	т (ºС)	Fuente de inóculo	As (mg/L)	Duración (días)	Velocidad /porcentaje de Remoción
Drenaje ácido de mina ¹	Biopelícula fija	Glicerol y/o Hidrógeno	2.7 a 5	30	Sedimentos de un sitio minero	100	7	2.5 mg/L∙h
Drenaje ácido de mina²	Lote	Glicerol	4.5	25	Sedimentos superficiales	10	94	80%
Agua sintética ³	Lote	Lactato Etanol	7	30	Lodo de un relave minero	5	2 a 14	98%
¹(Batta	glia-Brunet et a	al., 2012)						
$\frac{2}{1}$ e Pape et al. 2017)								

Tabla 2.2. Tratamiento para remoción de arsénico empleando BS	ŝR
---	----

(Le Pape et al., 2017)

³(Liu et al., 2018)

3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Justificación

Los problemas de salud asociados con la contaminación de arsénico en aguas subterráneas se descubrieron por primera vez en Bengala Occidental y Bangladesh a principios de los 90's. A partir de ese suceso, se han realizado diversos estudios e identificado aguas subterráneas contaminadas con arsénico en muchas partes del mundo. Debido a la problemática, hay un alto interés por el desarrollo de tecnologías de tratamiento para remover arsénico en aguas subterráneas (Duong et al., 2021). La remediación microbiana es una tecnología emergente, en la cual se aprovechan las capacidades metabólicas de consorcios microbianos para la biotransformación de metales pesados tóxicos.

Se ha observado que en biorreactores semicontinuos o continuos (con acoplamiento de las actividades arseniato-reductora y sulfato-reductora) dan lugar a la formación de fases minerales de sulfuro y una vez que se alcancen los niveles de sobresaturación de estos minerales (As₂S₃, pKs= -64.70) ocurre la biomineralización de arsénico. Sin embargo, los biominerales generalmente presentan fases amorfas. Como se mencionó las fases amorfas, se caracterizan por tener átomos, iones o moléculas distribuidas de manera aleatoria, mientras que las fases cristalinas tienen acomodos geométricos y simétricos. Por ende, se prefiere la formación de fases cristalinas como el oropimente o rejalgar debido a que las fases amorfas suelen ser termodinámicamente inestables, siendo susceptibles a la luz, el pH, la temperatura y otras sustancias coexistentes (Sun et al., 2024). El proceso de biomineralización contribuye a la remoción del arsénico de la fase acuosa y el secuestro del metaloide en fase sólida (biomineral). Considerando que los sulfuros de arsénico en condiciones reducidas son muy estables, la formación de estos precipitados puede fungir como un mecanismo de inmovilización del arsénico en sistemas hidráulicos.

En este estudio, se busca obtener precipitados de sulfuro de arsénico en fases cristalinas con una mayor velocidad de precipitación. Para ello se debería trabajar en condiciones de pH ácido (2-5) y potenciales redox negativos (cercanos a -200 mV). Sin embargo, la principal limitante es que dichas condiciones no son favorables para los procesos

biológicos que deben ocurrir a valores de pH cercanos a la neutralidad (pH~ 6.5). Por lo tanto, se optó por separar el sistema biológico del fisicoquímico, permitiendo controlar parámetros como el pH y las relaciones molares de S/As en el reactor y asimismo conocer el efecto en la formación de sulfuros de arsénico. En el presente trabajo se desarrolló un proceso biotecnológico de remoción de arsénico en fase acuosa utilizando consorcios microbianos recuperados de sitios contaminados de arsénico, mediante un sistema integral biológico-fisicoquímico que consiste en dos etapas. La primera etapa consistió en la operación de dos reactores continuos biológicos uno en condiciones de sulfato reducción y el otro en condiciones de arsénico en un reactor de precipitación.

3.2. Hipótesis

Dado que para lograr la mineralización de sulfuros de arsénico se requieren condiciones ácidas (pH 2-5), la separación de los procesos biológicos del proceso fisicoquímico de mineralización promoverá la formación de fases cristalinas de minerales de sulfuros de arsénico.

3.3. Objetivo general

Evaluar la precipitación de sulfuros de arsénico preferentemente en fases cristalinas para la remoción de arsénico de agua mediante un sistema biológico-fisicoquímico.

3.4. Objetivos específicos

- Caracterizar consorcios microbianos recuperados de sitios contaminados con arsénico para evaluar su actividad arseniato- y sulfato-reductora.
- Poner en marcha un reactor biológico arseniato-reductor y otro sulfato-reductor en continuo para establecer las condiciones que favorecen la producción de arsenito y sulfuro.
- Determinar las proporciones de arsenito y sulfuro biogénico necesarias para la producción de sulfuros de arsénico, mediante ensayos en lote.
- Evaluar la formación y precipitación de sulfuros de arsénico en un reactor de precipitación usando efluentes de los reactores biológicos en las proporciones que favorezcan la formación de sulfuros de arsénico para su caracterización.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Fuente de inóculo

Se utilizó un consorcio recuperado de sitios contaminados con arsénico (club de tiro privado "Los halcones", CT), localizado en el municipio de Matehuala, San Luis Potosí, México, dicho sitio se encuentra cerca al distrito minero de Santa María de la Paz, en Matehuala. Este consorcio se ha cultivado y mantenido en condiciones de arseniato- y sulfato-reducción combinadas por al menos 7 años consecutivos. (Ríos-Valenciana, 2015).

4.2. Reactivos

Para llevar a cabo los experimentos se emplearon como aceptores de electrones arseniato de sodio heptahidratado (Na₂HAsO4·7H₂O, CAS: 10048-95-0, Sigma-Aldrich) y sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄, CAS: 7757-82-6, Fermont). Como donador de electrones y fuente de carbono se utilizó ácido láctico (C₃H₆O₃, CAS: 50-21-5, Baker Analyzed).

Para los análisis de las muestras de los reactores se utilizaron los siguientes reactivos: Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄·5H₂O), ácido clorhídrico (HCI), sulfuro de sodio nonahidratado (NaS•9H₂O), tartrato de potasio y antimonio trihidratado (C₈H₄K₂O₁₂Sb₂•3H₂O), heptamolibdato de amonio tetrahidratado ((NH₄)₆Mo₇O₂₄•4H₂O), ácido ascórbico (C₆H₈O₆) y ácido sulfúrico (H₂SO₄).

4.3. Medios de cultivo

Se empleó un medio basal representativo de agua subterránea de ambientes sulfatoreductores (modificado de Burton *et al.*, 2013) el cual contiene los siguientes componentes (mM): KCl (1); MgCl₂ (1); CaCl₂ (1); NH₄Cl (1); KH₂PO₄ (0.08 mM) y 0.1 mL/L de solución mineral de Wolfe (micronutrientes). La composición de la solución Wolfe es la siguiente (g/L): MgSO₄·7H₂O (3); ácido nitriloacético (1.5 g/L); NaCl (0.1); MnSO₄·H₂O (0.5); FeSO₄·7H₂O (0.1); CoCl·6H₂O (0.1); CaCl₂ (0.1); ZnSO₄·7H₂O (0.1); CuSO₄·5H₂O (0.1); AlK (SO₄)₂·12H₂O (0.01); H₃BO₃ (0.01) y Na₂MoO₄·2H₂O (0.01). Dependiendo del experimento, el medio basal se suplementó con las concentraciones deseadas del donador de electrones y fuente de carbono, y de los aceptores de electrones (sulfato y arseniato), ya sea juntos o por separado. Posteriormente se ajustó el pH a 6.5 utilizando bicarbonato de sodio (NaHCO₃).

4.4. Diseño experimental

El proyecto consistió en dos etapas. La primera etapa fue la caracterización funcional del consorcio microbiano recuperado de un sitio contaminado con arsénico donde se evaluó su actividad arseniato-reductora y sulfato-reductora. Los ensayos en lote se realizaron por triplicado en medio de cultivo basal añadiendo la fuente de carbono y sus respectivos aceptores de electrones, dependiendo del experimento (Secc. 4.5). Posteriormente, se puso en marcha un reactor en lote alimentado que se operó por 88 días con el objetivo de producir biomasa para los experimentos subsecuentes de la segunda etapa del proyecto de investigación.

La segunda etapa consistió en operar dos biorreactores continuos, uno en condiciones de arseniato reducción y otro en condiciones de sulfato reducción para la producción de sulfuro y arsenito biogénico. Los efluentes de estos reactores se usaron en experimentos en lote para determinar la relación molar (S:As) y el pH más apropiado para promover la precipitación de sulfuros de arsénico. Finalmente, las relaciones molares y valores de pH más exitosas para precipitar los sulfuros de arsénico se replicaron a mayor escala en un tanque.

4.5. Evaluación de la actividad microbiana arseniato- y sulfato-reductora

La actividad arseniato-reductora y sulfato-reductora del consorcio se determinó en ensayos de microcosmos en lote. Se usaron botellas serológicas (120 mL) con 90 mL de medio basal suplementado con 10 mM de ácido láctico (donador de electrones y fuente de carbono) y con 10 mM de arseniato o sulfato como aceptor de electrones, dependiendo si el ensayo era para cuantificar la actividad arseniato-reductora o sulfato-reductora. Las botellas se sellaron con tapones de goma y anillos de aluminio. Una vez preparadas las botellas, se intercambió la atmósfera de cada una con N₂/CO₂ (80/20, v/v) durante 3 minutos para garantizar las condiciones anóxicas, y se esterilizaron en autoclave (121 °C, 20 minutos).

Posteriormente, cada botella se inoculó con 10 mL del consorcio (Secc. 4.1). La inoculación se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar para garantizar las condiciones estériles. Finalmente, las botellas inoculadas se incubaron a 30 ± 2 °C sin agitación en la oscuridad. Se cuantificó el As⁵⁺, arsénico total, lactato, acetato, propionato, butirato, sulfato y sulfuro (ver sección 4.5.1, 4.5.2 y 4.5.3).

Adicionalmente, se determinaron las velocidades de reducción de arsénico y sulfato, mediante la obtención de las pendientes máximas a partir de los perfiles de concentración contra el tiempo de As⁵⁺ y SO₄²⁻ usando Excel (Microsoft, Versión 2021).

4.6. Puesta en marcha y operación del reactor lote alimentado

Con el objetivo de contar con inóculo suficiente para los experimentos subsecuentes, primero se operó un reactor en lote alimentado. El reactor consistió en una columna de vidrio con fondo cónico (volumen total=500 mL y volumen de trabajo = 250mL, diámetro interno=5.4 cm, h=27 cm) con puertos de entrada (inferior) y salida (superior), así como tres puertos de muestreo laterales, dos bombas peristálticas para controlar el flujo de alimentación y de salida, un contenedor (1 L) para suplementar el medio de cultivo, un contenedor para recolectar el efluente y mangueras de conexión (Fig. 4.1). La inmovilización del consorcio se realizó en un material de soporte, compuesto por una mezcla (50/50% en peso) de arena (~2 mm) y perlas de vidrio de ebullición (~4 mm). Antes de su uso, el soporte se lavó con una solución de HNO3 al 10%, secado (60 °C, 24 h) y esterilizado en autoclave (120 °C, 20 minutos). Dentro de la columna se colocaron ~500 g en peso húmedo del soporte, que ocupó 300 mL del volumen total de la columna (h=13.2 cm). Encima del lecho, se colocó una pieza circular de goma con orificios (~1 mm de diámetro) a manera de filtro. Posteriormente, el reactor se inoculó con 50 mL del consorcio microbiano arseniato-sulfato-reductor. El biorreactor se alimentó con medio basal que contenía macro y micronutrientes suplementado con lactato (5 mM) como donador de electrones y sulfato (2.5 mM) y arseniato (As⁵⁺, 2.5 mM) como aceptores de electrones. Previamente, el pH del medio se ajustó a 6 y se burbujeó con N₂/CO₂ (80/20, v/v) durante 8 minutos para remover el oxígeno. El modo de operación del reactor fue en lote alimentado, por lo que cada 15 días se retiraban 200 mL del líquido del reactor y el mismo volumen se reponía con medio fresco conteniendo las concentraciones antes
señaladas de donador y aceptores de electrones. De esta forma se completaba un ciclo. Para dar seguimiento al desempeño del reactor, se tomaron muestras periódicamente (cada 3 días) para cuantificar el consumo de lactato, sulfato, y arseniato, así como las concentraciones de acetato, sulfuro, arsenito, y arsénico total. El reactor se operó por 88 días (6 ciclos). Al finalizar la operación, el reactor se desmontó para usar la biomasa como inóculo en los siguientes experimentos.



Figura 4.1. Representación esquemática del biorreactor de lecho empacado en lote alimentado.

4.7. Puesta en marcha y operación de dos reactores biológicos en continuo con actividades separadas

Se operaron dos reactores biológicos en continuo, uno en condiciones de sulfato reducción y otro en condiciones de arseniato reducción. Cada uno de los reactores consistió en una columna de vidrio con fondo cónico (Volumen total=500 mL y volumen de trabajo= 375 mL) con puertos de entrada (inferior) y salida (superior), así como tres puertos de muestreo laterales. Cada reactor contenía material de soporte (350 g en peso húmedo, que ocupaba 252 mL), compuesto por una mezcla estéril de arena (~2 mm,

37.5% en peso), perlas de vidrio (~4 mm, 37.5% en peso), esferas de vidrio Poraver® (~1 mm, 25% en peso) y 90 g de soporte previamente colonizado (recuperado del biorreactor descrito en la Sección 4.6). Los biorreactores se alimentaron con medio basal que contenía macro y micronutrientes (Rios-Valenciana et al., 2017) suplementado con ácido láctico como donador de electrones y sus respectivos aceptores de electrones (As⁵⁺ o SO4²⁻), de acuerdo con las concentraciones que se muestran en la Tabla 4.1. El pH del medio se ajustó a 6 y se burbujeó con N₂ durante 8 minutos para remover el oxígeno. Cada reactor se operó en diferentes etapas definidas por las condiciones experimentales (Tabla 4.1). Después de inocular, los reactores se operaron durante 14 días en lote, para promover la colonización del soporte y posteriormente en continuo durante 199 días (Figura 4.2). Para evaluar el desempeño de ambos reactores, se tomaron muestras cada 3 días para cuantificar el consumo de lactato, sulfato, y arseniato, así como las concentraciones con atmósfera de N₂/CO₂ (80/20, v/v) hasta su uso en los experimentos subsecuentes.

Reactor	Etapa	Tiempo (d)	TRH ^a (h)	Q (mL/h)	Donador ^b de e- (mM)	Aceptor ^c de e- (mM)
Arseniato-	1	0-40			2.8	2.8
reductor	2	41-156	48	7.71	1.1	1.1
	3	157-199			2.7	2.7
Sulfato-	1	0-40	48	7.71	10	5-8
reductor	2	41-199	24	15.42	15	10

Tabla 4.1. Condiciones experimentales de los reactores en continuo con actividad arseniato- y sulfato-reductora por separado.

^aTiempo de residencia hidráulica; ^bel donador de electrones fue lactato para ambos reactores; ^carseniato o sulfato



Figura 4.2. Representación esquemática de los biorreactores en continuo (arseniato- y sulfatoreductor) de lecho empacado.

4.8. Determinación de las proporciones de arsenito y sulfuro biogénico para la precipitación de sulfuros de arsénico a diferentes pH (ensayos en lote)

Con el objetivo de determinar la proporción de arsénico y sulfuro para formar precipitados, se realizaron experimentos en lote con los efluentes de los reactores que contenían arsenito y sulfuro. Se usaron botellas serológicas (120 mL) cuya atmósfera se intercambió con una mezcla de N₂/CO₂ (80/20, v/v) durante 3 minutos, para garantizar las condiciones anóxicas. A continuación, se añadió el volumen necesario de efluente del biorreactor arseniato-reductor en un volumen final de trabajo de 80 mL. Posteriormente se añadió agua reducida y seguidamente el volumen necesario de efluente del biorreactor sulfato-reductor para obtener relaciones molares de 1.4, 2.7 y 5.4. Estas relaciones se eligieron con respecto a la formación de oropimente (S:As 1.5). Asimismo, se estudiaron relaciones molares mayores para evaluar el efecto de la concentración del sulfuro. Los ensayos se realizaron a tres valores de pH 2, 5 ó 6, para ajustar el pH se usó HCl 1M. Las botellas se taparon con tapones de caucho y el contenido se mezcló manualmente por 10

segundos y se dejó reposar. Los experimentos se realizaron por duplicado a temperatura ambiente y se dejaron reaccionar sin agitación. Para determinar la cinética, se tomaron muestras a diferentes tiempos durante 6 días. El arsénico total se cuantificó por absorción atómica (ver sección 4.10.2) y se determinó el porcentaje de remoción de arsénico total.

4.9. Puesta en marcha y operación del reactor semicontinuo para la precipitación de sulfuros de arsénico

Una vez que se determinaron las proporciones adecuadas para la precipitación de sulfuros de arsénico, se seleccionaron dos condiciones y se replicaron a mayor escala. Para esto se usó un reactor con agitación mecánica (SEV-PRENDO Mod. FAM-2000/U1, México) con capacidad de 2 L, que operó en semicontinuo. El reactor automatizado estaba equipado con una tapa en la parte superior con puertos para los electrodos de pH y ORP (Redox/ORP Thermo Scientific), sensor de temperatura, entrada de los efluentes, entrada de la solución de HCI 1 M, eje del impulsor y entrada de la mezcla de gas N₂/CO₂ (80/20 v/v). En la parte inferior contaba con una llave de salida para recuperar el producto de reacción o desagüe. Se logró el mezclado utilizando un agitador de cabeza equipado con dos turbinas Rushton de disco (6 palas planas, diámetro= 5.3 cm, distancia entre turbinas= 6 cm, distancia con respecto a la pared del tanque= 5 cm, relación del diámetro de la turbina con respecto al diámetro del tanque= 1/3), a una velocidad de 150 rpm durante 25 min, de acuerdo con lo propuesto por otros autores (Xia et al., 2021) (Figura 4.3). Para realizar los experimentos, primero se intercambió la atmósfera del reactor (sin líquido) con una mezcla de N₂/CO₂ (80/20 v/v) y se colocaron bolsas Tedlar llenas de N₂/CO₂ en la manguera de entrada previamente cerrada con pinzas Hoffman. Después, en un frasco de vidrio (2 L) con atmósfera de N₂/CO₂ (80/20, v/v), se añadió el volumen del efluente que contenía el arsenito biogénico (del reactor arseniato reductor) y posteriormente se agregó el agua reducida y el volumen requerido del efluente con sulfuro biogénico y enseguida se transfirió al reactor. Al término del llenado, se inició el ajuste del pH con la solución de HCl 1M con ayuda del controlador de pH del reactor. Los experimentos se realizaron a una relación de S:As 1.5 a dos valores de pH 2 y 5 (para cada condición se realizaron dos lotes). La duración de los experimentos fue de dos días para pH 2, mientras para el pH 5 fue de 5 días. Para determinar el desempeño del reactor, se tomaron muestras y se cuantificó el As total (descrito en la Sección 4.10.2), pH y potencial redox.



Figura 4.3. Representación esquemática general del reactor de precipitación.

4.10. Métodos analíticos

4.10.1. Cuantificación de sulfuro (Método Cord-Ruwisch)

El sulfuro se cuantificó por espectrofotometría por el método de Cord-Ruwisch que se basa en la precipitación de sulfuro de cobre (Cord-Ruwisch, 1985). Se preparó una solución stock de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄·5H₂O) 0.5 M y una solución stock de ácido clorhídrico 5 M. La curva de calibración se preparó con sulfuro de sodio en un intervalo de 2 a 20 mM, a partir de una solución stock de sulfuro de sodio 100 mM (la solución estándar y las soluciones de la curva se prepararon con agua desionizada reducida el mismo día del análisis).

La solución de trabajo se preparó el mismo día del análisis, diluyendo 1:100 con agua desionizada las soluciones de sulfato de cobre y HCl en un matraz aforado. Las concentraciones finales de la solución de trabajo fueron de 5 mM de CuSO₄·5H₂O y 50 mM de HCl.

En tubos Hach para espectrofotómetro se adicionaron 4 mL de la solución de trabajo, consecutivamente con ayuda de una jeringa de 1 mL se agregó 0.1 mL de la muestra (o

de la solución estándar de sulfuro de sodio) y se agitó el tubo vigorosamente en el vortex, enseguida se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV/VIS (Thermo Spectronic, Mod. Aquamate, USA) a una longitud de onda de 480 nm. Este procedimiento se realizó de igual manera por triplicado para la curva de calibración. El blanco consistió en agua desionizada en lugar de solución de sulfuro de sodio.

4.10.2 Cuantificación de arsénico

El arsénico total se determinó mediante la técnica de espectrometría de absorción atómica de flama (Varian Spectra Mod. AA 240FS, USA). Se utilizó una longitud de onda de 193.7 nm, anchura de rendija 0.5 nm, corriente de lámpara 10 mA, corrección de fondo C y llama Aire/Acetileno (flujo de aire: 13.50 L/min, flujo de acetileno: 2.45 L/min). El análisis se realizó a partir de muestras filtradas (0.22 µm) con las diluciones correspondientes en medio ácido (HNO₃ al 2%), la concentración se determinó a partir de la curva de calibración correspondiente.

El arseniato se determinó mediante la técnica espectrofotométrica UV-Vis (método del azul de molibdeno; Johnson & Pilson, 1972) a partir de muestras filtradas (0.22 µm). Este método permite cuantificar As⁵⁺, el cual forma un complejo con el molibdato en medio ácido y produce un heteropoliácido de molibdeno (H₇[As(Mo₂O₇)₆]•10H₂O) de coloración amarilla (con estructura tipo jaula), el cual es posteriormente reducido (el Mo⁶⁺ se reduce a Mo⁵⁺) por el ácido ascórbico y tartrato de antimonio y potasio a un compuesto de coloración azul (complejo arsenomolibdato, H₁₃[AsMo₁₂O₄₀]) el cual absorbe a una longitud de onda de 880 nm. Esta reacción solo ocurre con el arseniato y es nula con el arsenito. La cuantificación de As³⁺ se determinó mediante la diferencia entre el arsénico total y el As⁵⁺.

4.10.3. Cuantificación de sulfato, lactato, acetato, propionato y butirato

Las concentraciones de sulfato, lactato, acetato, propionato y butirato se cuantificaron mediante un equipo de electroforesis capilar Agilent 7100. El equipo cuenta con una columna capilar de sílica fundida (Agilent, id= 50 μ m, L= 80.5 cm, longitud efectiva= 72 cm). La determinación de los analitos se realizó mediante detección indirecta UV, usando un detector de arreglo de diodos, con un buffer básico de aniones (Agilent, pH= 12.1) a

una señal de longitud de onda de 350 nm y otra de referencia a 230 nm. El voltaje aplicado fue de -25 kV y la temperatura en el capilar 20 °C. El análisis se realizó a partir de muestras filtradas (0.22 µm) empleando una curva de calibración como sistema de referencia.

4.10.4. Recuperación de precipitados minerales

Los minerales obtenidos en el tanque de precipitación se recuperaron por la parte inferior del reactor en un frasco de 1 L y se dejó sedimentar durante 5 h. Posteriormente por decantación se desechó la mayor parte del agua y el precipitado se colocó en un frasco serológico de 120 mL, finalmente se selló con tapones de goma y anillos de aluminio y se intercambió la atmósfera mediante burbujeo de N₂/CO₂ (80/20, v/v) durante 3 minutos y se refrigeró hasta los análisis de caracterización morfológica y elemental.

4.10.5. Preparación de la muestra para el análisis de rayos X

Con ayuda de una jeringa se colocó el precipitado en tubos eppendorf de 2 mL, los cuales se centrifugaron (8,000 rpm, 5 minutos), posteriormente se retiró la fase acuosa y se añadió agua desionizada reducida (1800µL), se repitió el proceso de centrifugación y se retiró del sobrenadante. Finalmente, el pellet se secó (40°C durante 48 h), se pulverizó en un mortero de ágata y se almacenó en tubos eppendorf en un desecador hasta su análisis por difracción de rayos X.

4.10.6. Caracterización morfológica, elemental y mineralógica

Para conocer la morfología superficial y composición elemental de los precipitados de sulfuro de arsénico, se efectuó un análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB, FEI-QUANTA 2000) acoplada a un sistema de espectroscopia de energía dispersiva (EDS, EDAX Mod. DX4). Para el análisis EDS-MEB se utilizaron pines de aluminio, sobre los cuales se colocó cinta adhesiva de carbono (~0.5 x 0.5 cm) y se cubrió con muestra (recuperada del reactor descrito en la sección 4.10.4) mediante goteo. Posteriormente, la muestra montada se almacenó en un desecador durante 24 h y finalmente se recubrió con polvo de oro para aumentar la conductividad (Recubridora-Au/Pt, Cressington Sputter Coater 108 auto).

Las fases minerales presentes en el precipitado se determinaron mediante un difractómetro de rayos X (Bruker, Mod. D8 Advance) con una fuente de radiación Kα de Cu, un barrido en el ángulo 2 theta de 10 a 80, aplicando un tamaño de paso de 0.02° y un tiempo en cada paso de 10 segundos. El análisis se efectuó a partir de 0.2 g de muestra previamente seca y pulverizada. La identificación de las fases minerales se realizó mediante el software MATCH versión 2 (Putz, 2013). Se compararon los difractogramas de los precipitados (muestra) con los patrones estándar de fases minerales establecidos en la base de datos de Crystallography Open Database (COD, por sus siglas en inglés).

4.10.7. Modelo en PHREEQC y Geochemist's Workbench

El modelo considera las principales reacciones que ocurren en el sistema (sulfuro disuelto y arsenito), para la simulación se seleccionó la base de datos WATEQ4F, ya que esta cuenta con las reacciones y constantes de equilibrio de metales pesados.

En PHREEQC Version 3 (Parkhurst & Appelo, 2013), como entrada (input) del programa con la función SOLUTION 1 se ingresaron los parámetros de pH, concentraciones de sulfuro disuelto y arsenito, temperatura. Luego con la función SAVE se guardó la solución 1 y con END se procede a utilizar la solución para determinar la especiación, incluyendo las fases minerales. Finalmente, se procede a la ejecución del archivo de entrada mediante la selección de la pestaña RUN que se encuentra en la barra de herramientas (ver Anexo 1). Los resultados del modelado se generaron en un archivo de salida (extensión *.phr.out*) y son presentados en cuatro secciones: composición de la solución (moles/ kg de agua), descripción de la solución (pH, temperatura, conductividad eléctrica, etc.), distribución de especies e índice de saturación. Para construir el diagrama de Pourbaix para el sistema As-S en el reactor de precipitación, se utilizó el software Geochemist's Workbench 2023 Versión 17 (Bethke & Farrell, 2023) empleando la herramienta de Act2 e ingresando las concentraciones de sulfuro disuelto, As³⁺ y temperatura (ver Anexo 2). Los resultados se grafican seleccionando la pestaña PLOT, y finalmente se puede guardar el diagrama en diferentes formatos (PNG, JPEG, PDF).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de la actividad arseniato- y sulfato-reductora

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de los ensayos de la actividad sulfato-reductora. Como se puede observar en la Figura 5.1A existe una remoción de sulfato en el experimento (~60%), mientras que hubo un incremento en la formación del H₂S, logrando alcanzar concentraciones de sulfuro disuelto de hasta 3.54 mM a partir del día 20 (Fig. 5B). La velocidad de reducción de sulfato fue de 0.2 mmol/L·d calculada a partir de la producción de sulfuro. Además, se observa que el consumo de donador de electrones, ácido láctico, se llevó a cabo de manera incompleta ya que se formó acetato y también propionato (Figs. 5C y D). Debido a que en el día 7 aún se tenían concentraciones menores de sulfuro (~1 mM) y la concentración del donador de electrones era de ~5 mM, se decidió añadir más ácido láctico, por lo tanto, dicha adición se observa en el perfil de concentración de lactato.



Figura 5.1. Perfiles de A) Consumo de sulfato, B) Producción de sulfuro, C) Consumo de lactato y D) Producción de ácidos grasos volátiles (AGV): acetato y propionato, obtenidos en los ensayos en lote para evaluar la actividad sulfato-reductora del consorcio CT. En el día 7 se realizó una segunda adición de ácido láctico.

Por lo que respecta a los ensayos de actividad arseniato-reductora, en la Figura 5.2 se presentan los resultados obtenidos. Se puede observar que a partir del día 9 el As⁵⁺ ya se había reducido casi en su totalidad (97%) a As³⁺. La velocidad de reducción de arseniato fue de 2.5 mmol/L·d y se registró un consumo de 71.46% del lactato al día 24 (Fig. 5.2C), asimismo la producción de acetato y propionato (Fig. 5.2D). Se observó que el acetato no se consumió, lo cual indica que la comunidad arseniato-reductora efectúa la oxidación incompleta del donador de electrones, tal como se observó en los ensayos de la actividad sulfato-reductora. La presencia de propionato en ambos ensayos, indican que hay presencia de microorganismos fermentativos en el consorcio.



Figura 5.2. Perfiles de A) Concentración de As⁵⁺, B) Concentración de As³⁺, C) Consumo de lactato y D) Producción de ácidos grasos volátiles (AGV): acetato y propionato, obtenidos en los ensayos en lote para evaluar la actividad arseniato-reductora del consorcio CT. En el día 7 se realizó una segunda adición de ácido láctico.

Tomando en cuenta las velocidades de reducción de arseniato y de sulfato, se observa que la arseniato-reducción resultó 12.5 veces mayor que la sulfato reducción, lo cual podría ayudar a promover la bioprecipitación. De acuerdo con estudios en *Shewanella*

sp. cepa ANA-3 una alta tasa de reducción de arseniato en presencia de sulfuro promueve la bioprecipitación de sulfuros de arsénico con alto rendimiento (McFarlane et al., 2015).

5.2. Biorreactor en lote alimentado (actividades arseniato- y sulfato- reductora acopladas)

El reactor se operó en lote alimentado por un total de 88 días equivalente a seis ciclos, con lactato (5 mM), arseniato (2.5 mM) y sulfato (2.5 mM). El desempeño del biorreactor confirmó que el consorcio fue capaz de reducir sulfato y arseniato (Tabla 5.1) simultáneamente. La Figura 5.3 muestra el perfil de consumo de sulfato y producción de sulfuro. A partir del ciclo 4 se removió 100% del sulfato alimentado y consistentemente la tasa de sulfato-reducción incrementó desde 0.079 mmol/L-d (Ciclo 1) hasta 0.540 mmol/L-d (Ciclo 6) (Fig. 5.3A) lo que representa un incremento de 6.8 veces en la velocidad de sulfato reducción. Cabe destacar que en el ciclo 6 la concentración de sulfato se aumentó con el fin de estimular la sulfato reducción, dicho incremento se reflejó en una mayor producción de sulfuro (Fig. 5.3B).

Ciclo	Velocidad de reducción de As⁵+ (mmol/L⋅d)	Velocidad de reducción de sulfato (mmol/L⋅d)
1	0.291	0.079
2	0.597	0.36
3	0.629	0.154
4	0.614	0.271
5	0.670	0.363
6	0.665	0.540

 Tabla 5.1.
 Velocidades de arseniato- y sulfato-reducción en cada ciclo del reactor en lote

 alimentado.
 Cada ciclo corresponde una alimentación

Por otra parte, la concentración inicial de As⁵⁺ disminuyó, dando como producto As³⁺ (Fig. 5.3C). La tasa de reducción de arseniato incrementó de 0.291 mmol/L·d (Ciclo 1) hasta 0.665 mmol/L·d (Ciclo 6). Además, la concentración de arsenito disuelto disminuyó a través de los ciclos, indicando su precipitación con el sulfuro biogénico (Fig. 5.3D). En consecuencia, se alcanzó una eficiencia de remoción de arsénico disuelto de 99% (Ciclos 4-6) (Fig. 5.4). Se observó la formación abundante de precipitado color amarillo dentro del reactor, sugiriendo que se trataba de sulfuros de arsénico. Dichos precipitados también se encontraban entre el material de soporte, lo que apunta a que la biomasa se retuvo satisfactoriamente en el lecho empacado (Fig. 5.4B). Cabe destacar que, con la operación de este reactor, además de conocer su desempeño para remover arsénico y sulfato de manera simultánea, también se perseguía la colonización del soporte mediante el desarrollo de biomasa, con el fin de utilizarlo en los reactores subsecuentes (reactores en continuo).



Figura 5.3. Perfiles de A) Consumo de sulfato, B) Producción de sulfuro, C) Concentración de As⁵⁺ en la fase acuosa y D) Concentración de As³⁺ en la fase acuosa. Operación del reactor en lote alimentado: 2.5 mM As⁵⁺ + 2.5 mM sulfato.

En la parte superior del lecho empacado se observó que el precipitado se comportaba como una suspensión coloidal, esto se atribuye a que la composición de la matriz orgánica microbiana, que constituye los microorganismos y las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (como polisacáridos, proteínas, péptidos, aminoácidos etc.) que contienen grupos con carga negativa pueden interactuar con las partículas de sulfuro de arsénico y actuar como una barrera que evita la aglomeración de partículas y, por consiguiente, la mezcla resulta una suspensión coloidal estable (Su et al., 2022).



Figura 5.4. A) Perfil de concentración de arsénico total en la fase acuosa y B) Evidencia del precipitado biogénico. La fotografía corresponde a los 60 días de operación del reactor. Se puede observar el precipitado de color amarillo entre el material de soporte y dentro de la imagen un acercamiento del reactor en la esquina inferior derecha.

Con respecto a la fuente de carbono y donador de electrones (ácido láctico) para los microorganismos, se observó el consumo de lactato y producción de acetato (Fig. 5.5A y 5.5B). Esto confirma que los microorganismos oxidaron incompletamente el lactato hasta acetato, y no hasta CO₂, lo cual es característico de ciertos géneros de bacterias arseniato- y sulfato-reductoras, como por ejemplo *Desulfosporosinus*. La presencia de microorganismos asociados con este género se evidenció en trabajos previos realizados con este mismo consorcio (Rios-Valenciana et al., 2023).



Figura 5.5. Perfiles de A) Consumo de lactato y B) producción de acetato. Las flechas rojas indican adición de lactato (~5mM).

De acuerdo con la literatura, existen bacterias que poseen un metabolismo versátil capaz de utilizar diferentes aceptores de electrones (SO₄²⁻, NO₃⁻, As³⁺, Fe³⁺). En el caso del consorcio microbiano usado en este estudio, se demostró que los microrganismos que lo conforman pueden emplear As⁵⁺ y sulfato como aceptores finales de electrones. Durante la oxidación de lactato, termodinámicamente, la arseniato-reducción proporciona mayor energía ($\Delta G^{o'}$ = -172 kJ/mol) que la sulfato-reducción ($\Delta G^{o'}$ = -89 kJ/mol) (Huang, 2014; Rios-Valenciana et al., 2017), en concordancia observamos mayores tasas de arseniato-reducción que de sulfato-reducción (Tabla 5.1). Aparentemente, el consorcio tiene preferencia por el As⁵⁺ y una vez que éste se agota usa el sulfato.

5.2.1. Caracterización morfológica y elemental del precipitado

Al final de la operación del biorreactor, los precipitados se recuperaron y analizaron por MEB-EDS para determinar la morfología y composición elemental del biomineral. Este análisis mostró que el biomineral consiste principalmente de fibras de hasta 60 µm de largo y diámetro aproximado de 350 nm, que están formadas por azufre y arsénico. La relación atómica porcentual entre S: As fue de 1.76 (Fig. 5.6). La precipitación de sulfuros de arsénico (As₂S₃ y As₄S₄) se ha observado en experimentos en lote inoculados con biopelículas anaerobias de un cultivo mixto (Rodriguez-Freire et al., 2014).



Figura 5.6. Análisis del precipitado biogénico formado en el reactor en lote alimentado y recuperado después de 88 días de operación. A) Micrografía de MEB adquirida con el detector LFD, el recuadro verde señala el área analizada y B) Análisis químico elemental correspondiente.

Por su parte Le Pape et al. (2017) observaron la remoción total de arsénico en drenajes ácidos de minas mediante un consorcio sulfato-reductor en experimentos en lote. Luego de incubar los experimentos por 94 días, la remoción del metaloide se debió a que precipitó como As₂S₃ amorfo (33-73%) y rejalgar (As₄S₄) (0-34%). Al igual que en la presente tesis, la morfología de los minerales fue de filamentos (fibras) con diámetros en escala nanométrica. Hasta ahora, el consenso científico indica que la precipitación de los sulfuros de arsénico está fuertemente influenciada por diversos factores como pH, relaciones molares de arsenito y sulfuro y las condiciones redox. En este contexto, valores de pH bajos (2-5), una dosificación lenta de sulfuro y potenciales redox negativos (cercanos a -200 mV) son los factores que promueven la formación de sulfuros de arsénico (Gorny et al., 2015; Le Pape et al., 2017; Rodriguez-Freire et al., 2014).

Adicionalmente, Lee et al. (2007) compararon la capacidad de 10 cepas diferentes de especies de *Shewanella*, incluidas HN-41 para generar nanotubos de As₂S₃. Los resultados de los experimentos en lote mostraron que, entre ellas, la cepa HN-41 y *S. putrefaciens* CN-32 formaron rápidamente (después de 7 días) precipitados de sulfuro de arsénico, mientras que las cepas *S. alga* BrY y *S. oneidensis* MR-1 tuvieron una tasa de producción mucho menor (después de 30 días). Con lo anterior se destaca que la biomineralización del arsénico puede ocurrir y ser mediada por microorganismos. Sin

51

embargo, hasta ahora no existe información sobre cómo controlar la morfología y las fases minerales que se forma. La formación de fibras se ha reportado en experimentos en lote, en donde existe un gradiente de concentración y el sistema no está perturbado por agitación, por lo tanto, no hay dispersión coloidal y se favorece este tipo de morfología. Tomando en cuenta lo anterior, se puede decir que la hidrodinámica del sistema influye en el tipo de morfología de los precipitados.

5.3. Biorreactores en continuo (actividades arseniato- y sulfato-reductora separadas)

Los reactores se operaron primero en lote alimentado durante 14 días y posteriormente se operaron en continuo durante 199 días. A continuación, se presentan los resultados de la operación en continuo de ambos reactores biológicos. El desempeño de los biorreactores confirmó que el consorcio fue capaz de reducir arseniato y sulfato de la alimentación.

5.3.1. Biorreactor arseniato-reductor

En el panel A de la Figura 5.7 se presentan los perfiles de concentración de As⁵⁺ en el influente y efluente en la operación en continuo, donde se observa la disminución de la concentración de As⁵⁺ en el efluente, mientras que hay un incremento en la concentración de arsenito (Fig. 5.7B), indicando que el As⁵⁺ se está reduciendo a As³⁺.



Figura 5.7. Perfiles de concentración de arseniato y arsenito en la fase acuosa durante la operación del biorreactor arseniato-reductor en continuo. A) Concentración de arseniato (As⁵⁺) y B) Concentración de arsenito (As³⁺) en el efluente.

Etapa	Periodo	Carga	Velocidad	Eficiencia de
	(días)	(mmol/L·d)	(mmol/L·d)	reducción
				(%)
1	0-40*	1.4 ± 0.31	1.28 ± 0.06	94.56 ± 3.47
2	41-156	0.585 ± 0.09	0.49 ± 0.06	88.52 ± 11.75
3	157-199	1.35 ± 0.17	1.30 ± 0.11	97.03 ± 3.78

Tabla 5.2. Carga de As⁵⁺, velocidades de arseniato-reducción y eficiencia de reducción en cada etapa de operación del biorreactor arseniato reductor en continuo

*Se consideraron datos entre los días 13-40, debido a que los primeros 12 días hubo una falla operacional

En la Tabla 5.2 se presentan las tasas de arseniato-reducción y las eficiencias de reducción para cada etapa de operación. Se obtuvieron eficiencias de reducción de arseniato superiores a 85%, demostrando que las condiciones operacionales fueron adecuadas para la producción de arsenito biogénico. Cabe destacar que en el reactor continuo se alcanzaron velocidades de reducción mayores en la etapa 1 y 3 en comparación con las velocidades que se obtuvieron en el reactor de lote alimentado (actividad arseniato- y sulfato-reductora acopladas). Sin embargo, en la Etapa 2 se obtuvo una tasa menor de reducción de arseniato, ese comportamiento se atribuye a la disminución del arsénico en la alimentación. En dicha etapa se decidió disminuir la concentración de As⁵⁺ debido a que no se requería una alta concentración de arsenito para realizar los experimentos de relaciones molares en lote.

En la Figura 5.8 se presenta el perfil de consumo de lactato y la producción de acetato, el cual confirma que los microorganismos oxidaron incompletamente el lactato hasta acetato y no hasta CO₂. De igual forma la producción de propionato (Fig. 5.8B), indica que ocurrió actividad fermentativa con lactato. De acuerdo con la caracterización previa del consorcio, se ha observado la presencia del género *Clostridium* (Rios-Valenciana et al., 2017). Dicho género se conoce por su capacidad fermentativa y para respirar respirar arsénico, lo cual podría explicar la presencia de propiónico (Wang et al., 2021). Cabe mencionar que, en el presente estudio, existió un exceso de ácido láctico con respecto al aceptor de electrones (arseniato), lo cual estimuló la fermentación.



Figura 5.8. Perfiles de concentración de lactato, acetato, butirato y propionato durante la operación del biorreactor arseniato-reductor en continuo. A) Consumo de lactato. B) Producción de ácidos grasos volátiles (AGV): acetato y propionato.

En la Figura 5.9 se presentan los balances de cada etapa del reactor arseniato-reductor, donde se observan porcentajes mayores a 75 % de electrones recuperados, esto indica que el proceso es eficiente. Sin embargo, en todas las etapas se observaron porcentajes entre 41 y 53 % en recuperación como propionato, producto de la fermentación.



Figura 5.9. Balance de miliequivalentes electrones (meq), durante las tres etapas de operación del biorreactor arseniato-reductor en continuo.

5.3.2. Biorreactor sulfato-reductor

En la Figura 5.10 podemos observar los perfiles de consumo de sulfato y producción de sulfuro respectivamente. Hasta el día 36 solo se reducía 44% del sulfato que se adicionaba (~10 mM), lo cual no corresponde a la concentración de sulfuro, ya que se reportaron concentraciones menores a 2.5 mM, asimismo, se reportó 100% de consumo de lactato. Por lo tanto, se aumentó la concentración de ácido láctico en la alimentación (15 mM) y se disminuyó el TRH a 24 h (antes 48 h), con el fin de estimular la sulfato-reducción y lograr producir una mayor concentración de sulfuro biogénico (\geq 6 mM). Se quería alcanzar dicha concentración de sulfuro para poder utilizar el efluente en los experimentos subsecuentes. A partir del día 69 se logró incrementar la concentración de sulfuro disuelto (\geq 6 mM) alcanzando concentraciones de hasta 10 mM (al día 178).



Figura 5.10. Perfiles de sulfato y sulfuro durante la operación del biorreactor sulfato-reductor en continuo. A) Reducción de sulfato y B) Producción de sulfuro.

En la Figura 5.10B también podemos observar que en el día 71 hay una caída en la concentración de sulfuro, esto se debió a un problema operacional, sin embargo, la actividad sulfato-reductora se pudo reestablecer después de 17 días.

Para determinar el desempeño del reactor se cuantificó la concentración de lactato y AGV. A continuación, se detallan los perfiles de consumo de lactato y producción de acetato y propionato (Fig. 5.11), que indican oxidación incompleta y fermentación de lactato respectivamente (Fig. 5.11B). A partir del día 148, solo hubo presencia de acetato, lo cual es indicativo de que el lactato se oxidó incompletamente.



Figura 5.11. Perfiles de concentración de lactato, acetato y propionato durante la operación del biorreactor sulfato-reductor en continuo. A) Consumo de lactato y B) Producción de ácidos grasos volátiles (AGV): acetato y propionato.

La baja eficiencia de reducción de sulfato en el periodo de 0-40 días se puede asociar a la competencia de la actividad sulfato-reductora con la fermentación por el donador de electrones. En la Tabla 5.3 se presentan las velocidades de reducción de sulfato, donde efectivamente podemos constatar que en la Etapa 1 (0-40 días) se tiene la menor velocidad de reducción y por lo tanto una eficiencia de reducción de sulfato menor a 50%. En el balance de electrones, en la Etapa 1, se puede corroborar que 45% de los electrones recuperados fueron a partir de la producción de propionato (Fig. 5.12), por lo tanto, la fermentación fue la actividad que más prevaleció en la primera etapa de operación, eso se puede constatar con la baja concentración de sulfuro en el reactor (Fig. 5.10B). Por otro lado, en la Etapa 2 se tuvo una eficiencia promedio de reducción de sulfato de 80%, a partir de esa etapa se establecieron las condiciones aptas para la producción de sulfuro biogénico. El balance de electrones indica que el proceso es eficiente (Fig. 5.12).

Etapa	Periodo (días)	Carga (mmol/L⋅d)	Velocidad de sulfato reducción (mmol/L⋅d)	Eficiencia de reducción (%)
1	0-40	3.25 ± 0.31	1.77 ± 0.68	43.03 ± 13.03
2	41-199	10.57 ± 0.83	8.33 ± 2.39	80.63 ± 19.38

Tabla 5.3. Carga de sulfato, velocidades de sulfato-reducción y eficiencia de reducción de sulfato en cada etapa de operación del biorreactor sulfato reductor en continuo



Figura 5.12. Balance de miliequivalentes de electrones (meq) durante la Etapa 1 y 2 de la operación del biorreactor sulfato-reductor en continuo.

La versatilidad que poseen estos microorganismos de utilizar diferentes aceptores de electrones permitió que ambas actividades se mantuviesen en cada reactor, logrando obtener altas eficiencias de reducción de arseniato y sulfato, ya que el objetivo de la operación de los reactores fue evaluar su desempeño con actividades separadas y generar efluente para los experimentos de relaciones molares a diferentes pH.

5.4. Ensayos en lote a diferentes relaciones molares S/As

La finalidad de los experimentos de relaciones molares fue corroborar que mezclar, en ciertas proporciones, arsenito y sulfuro biogénico, propiciaría la formación de sulfuros de arsénico. Por otro lado, se buscó obtener precipitados cuyas fases fueran cristalinas, con menor porcentaje de redisolución en fase acuosa, asimismo porcentajes de remoción de arsénico mayores a 95%. A continuación, se presentan los resultados de los experimentos de relaciones molares de S:As (1.4,2.7 y 5.4) a diferentes pH (2,5 y 6). Con base en la concentración de arsenito y sulfuro en los efluentes se realizaron los cálculos necesarios para determinar los volúmenes y construir la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Cantidad de arsenito y sulfuro biogénico, agua reducida y HCl 1M adicionados en botellas serológicas para determinar las proporciones adecuadas de efluentes con sulfuro y arsenito necesarios para la formación de precipitados. El volumen de trabajo fue de 80 mL.

рН	S:As	H₂O reducida (mL)	HCI 1M (mL)	[As ³⁺] Efluente (mM)	Volumen de efluente As ³⁺ (mL)	[H₂S] Efluente (mM)	Volumen de efluente H ₂ S (mL)
	1.4	45.2	0.8		25		9
2	2.7	35.8	1.2	1	25	7	18
	5.4	17.2	1.8		25		36
	1.4	42.4	0.6		25		12
5	2.7	31.1	0.9	1	25	5.5	23
	5.4	7.6	1.4		25		46
	1.4	47.5	0.04		20		12.5
6	2.7	34.7	0.3	0.98	20	4	25
	5.4	9.4	0.66		20		50

En la Figura 5.13 se aprecia que efectivamente ocurrió la formación de precipitados de color amarillo, excepto en la relación S:As 5.4 en pH 6 (Figs. 5.13 E y F). De acuerdo con los resultados, valores de pH entre 2 y 5, son óptimos para la precipitación de sulfuros de arsénico. Sin embargo, una acumulación de sulfuro puede promover la redisolución de los minerales, tal como se obtuvo en la relación 5.4, donde podemos observar que la solución presenta turbidez (Figs. 5.13E y F). Por lo tanto, no es conveniente trabajar con relaciones molares mayores a 2.7. Asimismo, la ausencia de precipitado en el experimento S:As 5.4 en pH 6, se puede deber a una acumulación de sulfuro en el sistema, y favorecer la formación de especies inestables como los tioarsenitos.



Figura 5.13. Fotografías tomadas de los experimentos de relaciones molares S:As a diferentes pH. A) 5 min, pH 2. B) Día 6 del experimento, pH 2. C) 10 min, pH 5. D) Día 6 del experimento, pH 5. E) 10 min, pH 6. F) Día 6 del experimento, pH 6.

En la Figura 5.14 se presenta el perfil de concentración de arsénico total con respecto al tiempo. En los experimentos en pH 2 (Fig. 5.14A) podemos observar que en menos de una hora se logró remover 95% del arsénico en las tres relaciones molares evaluadas (S:As 1.4, 2.7 y 5.4). Sin embargo, después de ese tiempo, se observó redisolución, esto se reflejó en el aumento de la concentración de arsénico total a partir de las 4 horas y hasta el final del experimento. La redisolución del precipitado se atribuye al ligero decremento del pH en la solución (Tabla 5.5).



Figura 5.14. Perfil de concentración de As total disuelto con respecto al tiempo para los experimentos de relaciones molares S/As. A) pH 2. B) pH 5 y C) pH 6.

Con base en la literatura, la disolución de oropimente y rejalgar se inicia por ataque de protones, que da lugar a la ruptura de los enlaces As-S y libera As³⁺ y sulfuro. Por lo tanto, trabajar en pH 2 no es conveniente, debido a que se favorece la redisolución de las fases

minerales en medio acuoso (Sun et al., 2024). La simulación de la solubilidad del oropimente mediante el software PHREEQC (Fig. 5.15) permitió constatar que la solubilidad del oropimente es mayor (0.06 mol/kg) a pH menores a 2, lo cual coincide con los resultados observados en los experimentos.



Figura 5.15. Solubilidad del oropimente en función del pH. La gráfica se construyó mediante el software PHREEQC (Versión 3) asumiendo 0.01 moles de oropimente en agua. T= 30° C y P= 1 atm.

En los experimentos realizados a pH 5, la remoción total de arsénico se logró a las 48 h para las relaciones molares de 1.4 y 2.7. En cambio, para la relación 5.4 solo se alcanzó a remover el 93% del arsénico a las 48 horas y no se logró remover la totalidad del arsénico aún después de 125 horas (Fig. 5.14B). En cuanto a los experimentos a pH 6, aquí se obtuvieron los más bajos porcentajes de remoción de arsénico de la fase acuosa para las tres relaciones molares estudiadas, entre 19 y 64%. Cabe mencionar que para los experimentos de las tres relaciones molares evaluadas a diferentes pH (2, 5 y 6) se observó la redisolución del precipitado a los 6 días del experimento. Para cada experimento se estimaron las velocidades de precipitación de sulfuro de arsénico (Tabla 5.5) utilizando Excel. Se obtuvieron velocidades entre 0.0003 y 0.2305 h⁻¹. Las velocidades (K_{exp}) en los experimentos a pH 2 fueron 67 veces más rápidas en comparación a las alcanzadas a pH 5 ó 6, lo cual concuerda con los resultados

observados. Ostermeyer et al. (2021) reportaron una completa remoción de arsénico total (1000 mg/L) de una solución sintética de As^{3+} después de agregar sulfuro grado reactivo, a pH 2.1 ± 0. 4, después de 1 minuto. En el presente trabajo, la remoción completa del arsénico disuelto en los ensayos a pH 2, sucedió a los 30 minutos de la reacción, sin embargo, el precipitado empezó a solubilizarse conforme transcurrían los días.

Adicionalmente, la modelación geoquímica de los experimentos mediante el software PHREEQC permitió evaluar si las especies presentes en el sistema tienden a estar disueltas o a precipitar, a partir del análisis de los de índices de saturación (SI, Tabla 5.5). Asimismo, el software permite predecir la formación de fases cristalinas y/o amorfas de sólidos de sulfuros de arsénico (por ejemplo, As₂S₃ amorfo, oropimente, rejalgar). De acuerdo con los índices de saturación, los sulfuros de arsénico que predominaron en las condiciones experimentales son el As₂S₃ amorfo y oropimente. Los experimentos a pH 6 obtuvieron SI<0 y cercanos a cero (Tabla 5.5). Por lo tanto, se puede explicar la baja eficiencia de remoción de arsénico disuelto en la fase acuosa.

рН	S:As	рН	рН	K _{exp}	SI	SI	SI
		inical	final	(h⁻¹)	As ₂ S ₃	Oropimente	Rejalgar
					amorfo		
2	1.4	2.120	1.909	0.2305	2.95	4.30	-1.48
	2.7	2.073	1.817	0.2086	2.48	3.83	-2.03
	5.4	1.974	1.749	0.1921	1.83	3.18	-2.68
5	1.4	5.125	5.069	0.0031	1.37	2.71	-5.04
	2.7	5.033	5.081	0.0031	0.46	1.80	-6.02
	5.4	5.094	5.096	0.0019	-0.23	1.12	-6.70
6	1.4	6.074	5.890	0.0017	0.33	1.68	-6.42
	2.7	6.028	5.917	0.0023	-0.57	0.77	-7.46
	5.4	6.074	5.934	0.0003	-1.26	0.09	-8.14

Tabla 5.5. Estimación de velocidades de precipitación de As³⁺ biogénico con sulfuro biogénico. Los índices de saturación (SI) se calcularon a partir de las concentraciones experimentales utilizando el software PHREEQC. T=30°C

SI=0 (equilibrio), SI>0 Sobresaturado (Precipitación),SI<0 Subsaturado (Disolución)

Estudios previos han demostrado que la precipitación de As³⁺ con sulfuro está dominada por la formación de oropimente (As₂S₃), de acuerdo con la reacción (3) (Altun et al., 2014; Le Pape et al., 2017). El análisis realizado mediante el software PHREEQC coincide con los reportes anteriores ya que el modelo predijo que la fase mineral más favorable fue oropimente y As₂S₃ amorfo (Tabla 5.5). Los porcentajes de remoción de arsénico total de los ensayos se presentan en la Figura 5.16. Por un lado, se observa la influencia de la relación molar, donde la remoción va disminuyendo conforme incrementa la relación molar. Por otro lado, se observa el efecto del pH, entre más ácido mayor remoción. Las máximas remociones se alcanzaron con la relación S:As de 1.4 a pH 2 y 5 (93 y 87.5%, respectivamente). En relaciones molares S:As de 5.4 (pH 6) podemos observar que el porcentaje de remoción fue el menor de todos los experimentos, sólo 19%. Estos resultados concuerdan con reportes previos. Por ejemplo, Wilkin et al. (2003) simuló aguas sulfúricas mediante experimentos abióticos, donde reportaron que en relaciones molares S:As > 4 (pH 5 – 10) se incrementó la solubilidad del As₂S₃ (oropimente), debido a la acumulación de sulfuro (Reacción 5).



Figura 5.16. Porcentajes de remoción de arsénico total en la fase acuosa de los experimentos en lote con distintas relaciones molares S:As (1.4, 2.7 y 5.4). Los porcentajes se calcularon a partir de las concentraciones al final del experimento (día 6).

También se ha reportado la formación de especies no estables, tales como los tioarsenitos (Reacción 6). Se ha confirmado que el sulfuro, se puede adsorber en la superficie de las partículas primarias, por lo tanto, se adopta una carga negativa superficial, dando lugar a una mayor repulsión entre partículas y una posible inhibición de agregación de partículas primarias, favoreciendo tamaños de partículas más pequeños, tasa de crecimiento de la partícula más lenta y mayor tiempo de sedimentación (Mokone et al., 2012).

$$\frac{3}{2} \operatorname{As}_2 \operatorname{S}_3(\operatorname{am}) + \frac{3}{2} \operatorname{H}_2 \operatorname{S} \xrightarrow{} \operatorname{H}_2 \operatorname{As}_3 \operatorname{S}^- + \operatorname{H}^+ \qquad (\text{Reacción 5})$$
$$\operatorname{H}_3 \operatorname{AsO}_3 + 3\operatorname{HS}^- + 2\operatorname{H}^+ \xrightarrow{} \operatorname{H}_2 \operatorname{AsS}^- + 3 \operatorname{H}_2 \operatorname{O} (\operatorname{pH} \ge 7) \qquad (\text{Reacción 6})$$

Aunque se obtuvo un alto porcentaje de remoción de arsénico a pH 2, esta condición tiene una desventaja con respecto a la redisolución del mineral, además se obtendría un efluente muy ácido. Por lo tanto, se tendría que adicionar un postratamiento a dicho efluente.

5.5. Operación del reactor de precipitación en semicontinuo

Considerando los porcentajes de remoción de arsénico disuelto en los ensayos en lote, se decidió trabajar con la relacion molar S:As 1.5 (relación molar del oropimente) a pH 2 y 5 en un reactor tanque agitado (150 rpm durante 25 minutos). La agitación sólo fue para mezclar la solución mientras se realizaba el ajuste de pH y se estableció de acuerdo a un estudio previo (Xia et al., 2021). Cabe mencionar que no se encontró información relacionada con el número de Reynolds y la formación de precipitados de sulfuros de arsénico, para evitar generar turbulencia y perturbar el sistema (destruir los aglomerados). Para determinar los volúmenes de cada componente y construir la Tabla 5.6 se realizaron los cálculos pertinentes con base a la concentración de arsenito y sulfuro en los efluentes.

рН	S:As	Ciclo	[As ³⁺] Efluente (mM)	Volumen de efluente As (III) (mL)	H₂O reducida (mL)	[H₂S] Efluente (mM)	Volumen de efluente H ₂ S ^a (mL)	HCI 1M (mL)
2	1.5	1	2.2	800	300	10	500	30
		2	2.5	800	131	9	629	35
5	1.5	1	2.4	800	58	7.4	742	60
		2	2.5	750	-	6	890	70

Tabla 5.6. Cantidad de arsenito y sulfuro biogénico, agua reducida y HCl 1M adicionados en el reactor de precipitación. El volumen de trabajo fue de 1600 mL

Los resultados obtenidos de los experimentos muestran el efecto del pH en la velocidad de precipitacion, la morfologia y composicion elemental de los precipitados obtenidos en el reactor. En la Figura 5.17 (panel B, E y F) se observa la formación de precipitados de color amarillo para ambas condiciones experimentales. En el panel C y G se observa la redisolución del precipitado, dando como resultado una solución turbia. En la Figura 5.18 se visualiza que la precipitación a pH 5 ocurrió en horas (15-24 horas), mientras que a pH 2 fue mucho mas rápida, en minutos (15-30min). La redisolución se confirmó con los perfiles de concentración (Fig. 5.18) a partir de las muestras para dar seguimiento al experimento. Podemos visualizar en la gráfica, que en el ensayo a pH 2 hubo un incremento importante en la concentración de arsénico en el medio acuoso a las 4 h (0.09 mM) y en pH 5 ese mismo comportamiento fue evidente a las 72 h.



Figura 5.17. Fotografías del reactor de precipitación operado en semicontinuo, A-C corresponde al reactor operado en pH 2: A) Ajustando pH (15 min). B) 1 h después del ajuste de pH. C) 4 h y D-G en pH 5: D) Antes de ajustar pH (15 min después del mezclado), E) 30 min después del ajuste de pH. F) 1 h. G) 72 h.



Figura 5.18. Perfil de concentración de arsénico total disuelto con respecto al tiempo para los experimentos a la relación molar S/As de 1.5 y dos valores de pH, A) pH 2 y B) pH 5.

En la Tabla 5.7 se ilustra los porcentajes de precipitación, donde a pH 2, se obtuvo el mayor porcentaje de precipitación (30 min) siendo de 99 ± 0.93%, mientras que a pH 5 el porcentaje de precipitación fue de 95 ± 6.24% a las 24 h. Después de la redisolucion del precipitado al final del experimento, se calcularon los porcentajes de precipitacion el cual corresponde a la remoción del arsénico en la fase acuosa. En el experimento a pH 2 se obtuvo el menor porcentaje de remoción de arsénico en la fase sólida, 88 ± 2.14 %, evidenciando que el precipitado se solubiliza a pH \leq 2 después de 48 h. En cambio, el precipitado a pH 5 se mantuvo estable, obteniendo una remoción de 92.14 ± 5.04 % al final del experimento (5 días).

Tabla 5.7. Porcentajes de precipitación y constantes de velocidad (estimadas) en el reactor de precipitación de sulfuros de arsénico. Los ensayos se hicieron por duplicado

Lote	pH inicial	pH final	As³⁺ (mM)	As ³⁺ precipitado (%)*	As ³⁺ precipitado final (%)**	ORP Inicial (mV)	ORP Final (mV)	K _{exp} (min⁻¹)
1	2.110	1.717	1.205	99.341ª	88°	-317.8	89.3	ND
2	2.176	1.644	1.154	±0.93	±2.140	-347.2	73.3	5x10 ⁻⁴
1	5.015	5.188	1.031	94.960 ^b	92.142 ^d	-249.4	-129.6	4x10 ⁻⁵
2	5.120	5.096	1.011	±6.24	±5.040	-234.6	166	ND

*Promedio al cabo de ^a30 min y ^b24 h; **Promedio al cabo de ^c48 h y ^d120 h (5 días).

5.5.1 Efecto del pH en la disolución del oropimente y As₂S₃ amorfo

En los experimentos de precipitación con sulfuro y arsenito biogénicos a pH 2, se observó una disminución en el pH, al final del experimento se obtuvieron valores de 1.717 y 1.644 en los ensayos (Tabla 5.7). La estabilidad del oropimente depende de la concentración de sulfuro disuelto, pH y potencial redox. Para entender mejor la importancia de las especies de arsénico presentes en solución, la Figura 5.19 muestra las concentraciones de las especies acuosas de As³⁺ en equilibrio con el oropimente para concentraciones bajas (μ M) y altas de sulfuro disuelto (mM). Se puede observar que a una concentración de 10 μ M de sulfuro (concentración baja), los monotiarsenitos (H₃AsSO₂) son importantes en todo el intervalo de pH (1 a 10). Por otra parte, a una concentración alta de sulfuro disuelto (10 mM), las especies H₂AsS₃⁻ y HAsS₃²⁻ son predominantes a pH entre 3 y 8. De acuerdo con el diagrama, se predice que el H₃AsSO₂ será la especie dominante a un pH ≤ 3, lo cual explica la posible disolución del precipitado y la formación de especies poco estables. Alternativamente, la solubilidad del oropimente puede estar controlada por As₂S₃ amorfo (Vlassopoulos et al., 2010).



Figura 5.19. Concentraciones de especies de As³⁺en equilibrio con Oropimente en presencia de concentraciones de sulfuro disuelto A) 10 μ M y B) 10 mM en función del pH. Fuente: D. Vlassopoulos et al. (2010)

Los índices de saturación (SI≥0), del modelado teórico (Tabla 5.8), indican que se favorece la formación de As₂S₃ amorfo y oropimente para las dos condiciones operacionales. En su estudio, Kirk et al. (2010) no reportaron formación de minerales de sulfuro de arsénico en un reactor semicontinuo que operaron a pH ligeramente básico (7.3), el As₂S₃ amorfo y rejalgar estuvieron subsaturados (SI≤0), mientras que el oropimente estuvo saturado en concentraciones bajas de sulfuro (303.2- 320.4 μ M). Sin embargo, al aumentar la concentración de sulfuro, el oropimente se solubilizó. La precipitación del arsénico se hubiera logrado probablemente si el pH fuera menor. Por su parte, Newman et al. (1998) observaron que la precipitación de oropimente se produjo mucho más rápido a un pH ácido que a pH de 7, tal como se observó en el presente estudio.

Tabla 5.8. Índices de saturación del As₂S₃ amorfo, oropimente y rejalgar en el reactor semicontinuo para la precipitación de sulfuros de arsénico. Los índices de saturación (SI) se calcularon a partir de las concentraciones experimentales utilizando el software PHREEQC. T=30°C

Lote	рН	SI As ₂ S ₃ amorfo	SI Oropimente	SI Rejalgar
1	2	3.5	4.84	0.84
2		3.48	4.82	-1.17
1	5	1.90	3.25	-4.72
2		1.89	3.24	-4.73

Los cálculos de especiación, construidos a partir de las condiciones experimentales de este estudio, predicen la precipitación de As₂S₃ amorfo y oropimente. El diagrama de Pourbaix muestra que el pH y la concentración de sulfuro y arsénico en el reactor contribuyeron a la sobresaturación de estos sólidos (Fig. 5.20).

El nivel de sobresaturación se puede determinar utilizando la Ecuación 5.1, donde [M⁺] y [H₂S] son las concentraciones de los iones en solución, K_{sp} es el producto de solubilidad del sulfuro metálico, y *v* es el número de iones presentes en la fórmula unitaria de la sal (Zhang et al., 2023).

$$S = \left(\frac{[M+][H2S]}{Ksp}\right)^{1/\nu}$$
 (Ecuación 5.1)

Cuando la concentración de iones de azufre es insuficiente, el sulfuro metálico no se precipita completamente. Sin embargo, una excesiva concentración de sulfuro en solución favorece la formación de sulfuros metálicos coloidales, que son difíciles de sedimentar, asimismo la redisolución de sulfuros metálicos (Reacción 5).



Figura 5.20. Diagrama de Pourbaix para As y S en el reactor de precipitación (relación S/As=1.5). El diagrama se construyó mediante el software The Geochemist's Workbench® a partir de las concentraciones promedio conocidas de [As]=1.17mM y [S]= 1.755 mM. T=25°C y P=1.013 bars. Los puntos rojo y morado señalan los valores de E(V) después de la formación del precipitado, a condiciones de pH 2 y 5 respectivamente. El área amarilla denota las fases sólidas.

El diagrama de dominancia para la precipitación de As₂S₃(am) en equilibrio con las especies de tioarsenito con diferentes razones molares S:As (entre 1 y 4) caracterizado por Wilkin et al. (2003) demuestra que la formación del As₂S₃(am) se afecta por el incremento del pH y la concentración de sulfuro. En la Figura 5.21 podemos observar el empleo de este diagrama en los resultados reportados por Battaglia-Brunet et al. (2012), en dicho estudio se obtuvo la bioprecipitación de As₂S₃(am) a partir de una solución ácida que contenía hasta 100 mg/L de As⁵⁺ en un biorreactor. La caracterización de la fase solida se confirmó mediante la estructura fina de absorción de rayos X extendida (EXAFS).



Figura 5.21. Diagrama de dominancia para la precipitación de $As_2S_3(am)$ en equilibrio con especies de As^{3+} , incluyendo especies de tioarsenito con diferentes relaciones S/As (entre 1 y 4). El símbolo cuadrado muestra el pH y la fugacidad de H₂S(g) en los resultados reportados por Battaglia-Brunet et al (2012).

5.5.2. Caracterización morfológica y elemental de los precipitados

Los resultados del análisis morfológico y elemental de los precipitados obtenidos de las reacciones de precipitación a pH 2 se presentan en la Figuras 5.22 y 5.23. La micrografía de SEM del precipitado mostró una morfología esférica con partículas entre 118 a 280 nm (Fig 5.22A). Los resultados de EDS indicaron que el precipitado estaba compuesto de As y S, en una relación 1.6 (S:As). Este valor es cercano a 1.5, relación atómica del oropimente.





Figura 5.22. Análisis del precipitado formado en el reactor de precipitación a pH 2 y recuperado después de 48 h de operación. A y B) Micrografía de MEB adquirida con el detector CBS, el recuadro verde señala el área analizada. C y D) Análisis químico elemental correspondiente
Mediante el patrón de difracción de rayos X (XRD) en la Figura 5.23 se confirmó la presencia de fases cristalinas de oropimente y rejalgar. Por otra parte, en las Figuras 5.24 y 5.25, se presentan los resultados del análisis morfológico y elemental de los precipitados obtenidos en el reactor de precipitación a pH 5.



Figura 5.23. Patrón de XRD del precipitado obtenido al final del experimento a pH 2.





1200

39.44

As L

11.19

9.76

35.17

As L

1200

Figura 5.24. Análisis del precipitado formado en el reactor de precipitación a pH 5 y recuperado después de 120 h de operación. A y B) Micrografía de MEB adquirida con el detector CBS, el recuadro verde señala el área analizada. C y D) Análisis químico elemental correspondiente.

La micrografía de SEM del precipitado mostró una morfología de prismas con tamaños de partícula entre 1.7 a 3 μ m (Fig 5.24B). Los resultados de EDS indicaron que el precipitado estaba conformado por As y S, en una relación 0.90 y 0.55 (S:As) para la zona A y B respectivamente. Posiblemente se trata de una mezcla de sulfuros de arsénico, tales como el oropimente y rejalgar.



Figura 5.25. Patrón de XRD del precipitado obtenido al final del experimento a pH 5.

El patrón de difracción de rayos X (XRD) en la Figura 5.25 confirmó la presencia de oropimente y rejalgar. Hernández et al. (2023) confirmaron la presencia de sulfuros de arsénico en biorreactores en continuo operados a pH ácido (~2), mediante el uso de BSR acidófilas para la remoción de As⁵⁺ y As³⁺ por separado. El análisis del patrón de difracción de rayos X de los precipitados confirmó que la fase sólida coincidía con los sulfuros de arsénico de α -dimorfita (As₄S₃), rejalgar (As₄S₄) y bonazziita (β -As₄S₄ ó As₈S₈), un polimorfo del rejalgar. Estos resultados solo coinciden con la presencia de rejalgar, cabe destacar que ambos patrones de XRD, la línea base tiene una intensidad de fondo de ~1300, lo cual representa un porcentaje elevado de amorfos y que fue cercano a 77%. Adicionalmente, Le Pape et al. (2016) describieron que el oropimente se puede reducir a rejalgar, mediante la maduración. Posiblemente, primero se forma el As₂S₃ amorfo y se

transforma gradualmente a fases metaestables (p.ej., bonazzita) hasta la formación de rejalgar.

En el presente estudio se encontró que la morfología y tamaño de partícula varia con el pH, dando como resultado partículas de menor tamaño en condiciones ácidas y más esféricas. Adicionalmente, se demostró que, al separar el proceso biológico del proceso de precipitación, se obtuvieron diferencias en la morfología y tamaño de partícula. Como se observó en el reactor en lote, en donde las dos actividades estaban acopladas, la morfología de los sulfuros de arsénico eran fibras. En cambio, en el reactor de precipitación, se obtuvieron morfologías esféricas de menor tamaño (nanométricas) en condiciones fuertemente ácidas (~2) y partículas prismáticas de tamaño micrométrico en pH 5.

Este estudio revela que las partículas de sulfuros de arsénico producidas por precipitación tienen diferentes rendimientos de agregación, que puede deberse a su diferente hidrofilicidad/hidrofobicidad. La hidrofilicidad/hidrofobicidad son características importantes de las partículas de sulfuros metálicos debido a que determinan las interacciones entre las partículas de sulfuro metálico y el solvente (agua). Esta característica se puede determinar mediante la medición del ángulo de contacto. Xia et al. (2021) reportaron ángulos de contacto de partículas de As₂S₃ generadas en aguas residuales fuertemente ácidas, de entre 62.25 a 77.5°. En el presente trabajo no se determinó el ángulo de contacto de las partículas sintetizadas, sin embargo, con los valores reportados en la literatura se puede inferir que las partículas son hidrofóbicas. Por lo tanto, las partículas de As₂S₃ prefieren agregarse entre ellas y permitir la formación de partículas secundarias y favorecer tiempos menores de sedimentación, permitiendo la separación de la fase sólida de la acuosa.

76

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se corroboró que el consorcio microbiano utilizado posee la capacidad de reducir arseniato y sulfato. En los experimentos de evaluación de actividad microbiana, la actividad arseniato-reductora resultó 12.5 veces mayor que la sulfato reducción. Lo cual es una ventaja, debido a que nos permite dosificar el sulfuro y favorecer la formación de sulfuros de arsénico.

Por otra parte, en el biorreactor de lote alimentado se logró la reducción completa del arseniato y sulfato simultáneamente, lo cual permitió alcanzar una eficiencia de remoción de arsénico disuelto de 99% debido a su precipitación como sulfuros de arsénico. Los resultados respaldan que el acoplamiento de la reducción de arseniato y sulfato en biorreactores en flujo semicontinuo es factible para llevar a cabo la biomineralización y remoción de arsénico de corrientes acuosas con altas concentraciones de arseniato (2.5 mM ó 187.5 mg/L). El microanálisis por MEB-EDS confirmó la presencia de arsénico y azufre (relación de S:As= 1.76) en el precipitado biogénico, asimismo, su morfología consiste principalmente de fibras, de hasta 60 µm de largo y diámetro aproximado de 350 nm.

El desempeño de los reactores en continuo con las actividades arseniato- y sulfatoreducción confirmó que el consorcio fue capaz de reducir arseniato y sulfato de la alimentación, con eficiencias de reducción de 97 y 80% respectivamente, permitiendo establecer los parámetros operacionales para la producción de arsenito y sulfuro biogénico.

Los experimentos de relaciones molares permitieron establecer que la mejor relación molar de S:As es 1.4, donde se obtuvieron mayores tasas de remoción de As³⁺ en la fase acuosa, de 93% (pH 2) y 87.5% (pH 5), por lo tanto se estableció como parámetros operacionales para el reactor de precipitación. En el reactor de precipitación se logró porcentajes de hasta 92% a pH 5. En el experimento a pH 2 se obtuvo el menor porcentaje de remoción de arsénico en la fase sólida, 88%, debido a la redisolucion del precipitado a pH \leq 2 después de 48 h. Los cálculos de especiación y la construcción del diagrama de Pourbaix a partir de las condiciones experimentales de este estudio, predicen la precipitación de As₂S₃ amorfo y oropimente. El diagrama de Pourbaix muestra que el pH

y la concentración de sulfuro y arsénico en el reactor contribuyeron a la sobresaturación de estos sólidos (SI>0), que coinciden con los resultados obtenidos y reportados en la literatura.

El microanálisis por MEB-EDS confirmó que el precipitado obtenido del reactor a pH 2 estaba compuesto de arsénico y azufre, en una relación 1.6 (S:As), asimismo su morfología esférica de partículas entre 118 a 280 nm. Adicionalmente, mediante el patrón de difracción de rayos X (XRD) se confirmó la presencia de fases cristalinas de oropimente y rejalgar. Con respecto al precipitado obtenido del reactor a pH 5, el microanálisis por MEB-EDS confirmó que el mineral estaba conformado por arsénico y azufre, en una relación 0.90 y 0.55 (S:As) y presentaba morfología de prismas con tamaños de partícula entre 1.7 a 3 µm. Asimismo, el patrón de difracción de rayos X (XRD) confirmó la presencia de oropimente y rejalgar. Sin embargo, podemos observar en ambos patrones de XRD, líneas base con intensidad de ~1300, lo cual indica un elevado porcentaje de amorfos en las muestras, que posiblemente logren cristalizar después de una fase de maduración del precipitado. Para corroborar la maduración del mineral se sugiere realizar la caracterización morfológica y elemental de los precipitados por MEB-EDS y la identificación de las fases cristalinas por XRD.

Adicionalmente, se demostró que, al separar el proceso biológico del proceso de precipitación, se obtuvieron diferencias en la morfología y tamaño de partícula. Tal y como se observó en el reactor en lote (actividades acopladas y presencia de microorganismos) la morfología de los sulfuros de arsénico eran fibras. En cambio, en el reactor de precipitación, se obtuvieron morfologías esféricas de menor tamaño (nanométricas) en condiciones fuertemente ácidas (~2) y partículas prismáticas de tamaño micrométrico en pH 5.

Esta investigación es el punto de partida para indagar sobre las condiciones en la precipitación de sulfuros de arsénico, y cómo afectan la morfología y cristalinidad. Por lo tanto, se propone operar un reactor de tanque agitado, dosificando el sulfuro biogénico a pH 5 para controlar la formación de precipitados. Adicionalmente, se sugiere analizar las muestras por Dispersión de Luz Dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) y ángulo de

78

contacto con el objetivo de evaluar su comportamiento en el agua y sus rendimientos de agregación.

7. REFERENCIAS

- Ahmann, D., Roberts, A. L., Krumholz, L. R., & Morel, F. M. M. (1994). Microbe grows by reducing arsenic. *Nature*, *371*(6500), 750–750. https://doi.org/10.1038/371750a0
- Alam, R., & McPhedran, K. (2019). Applications of biological sulfate reduction for remediation of arsenic – A review. *Chemosphere*, 222(1), 932–944. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.194
- Ali, H., Khan, E., & Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. In *Journal of Chemistry* (Vol. 2019). Hindawi Limited. https://doi.org/10.1155/2019/6730305
- Andres, J., & Bertin, P. N. (2016). The microbial genomics of arsenic. *FEMS Microbiology Reviews*, *40*(2), 299–322. https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUV050
- Battaglia-Brunet, F., Crouzet, C., Burnol, A., Coulon, S., Morin, D., & Joulian, C. (2012). Precipitation of arsenic sulphide from acidic water in a fixed-film bioreactor. *Water Research*, 46(12), 3923–3933. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.035
- Bertin, P. N., Crognale, S., Plewniak, F., Battaglia-Brunet, F., Rossetti, S., & Mench, M. (2022). Water and soil contaminated by arsenic: the use of microorganisms and plants in bioremediation. In *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 29, Issue 7, pp. 9462–9489). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/s11356-021-17817-4
- Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. In *Heliyon* (Vol. 6, Issue 9). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691
- Cervantes, C., Ji, G., Luis Ram~rez, J., & Silver, S. (1994). Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, *15*(4), 355–367. https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.1994.TB00145.X
- Chakravarty, S., Dureja, V., Bhattacharyya, G., Maity, S., & Bhattacharjee, S. (2002). Removal of arsenic from groundwater using low cost ferruginous manganese ore. *Water Research*, *36*(3), 625–632. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00234-2
- Chibuike, G. U., & Obiora, S. C. (2014). Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremediation Methods. *Applied and Environmental Soil Science*, 2014, 1–12. https://doi.org/10.1155/2014/752708

- Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, *4*(1), 33–36. https://doi.org/10.1016/0167-7012(85)90005-3
- Cuéllar-Cruz, M. (2017). Synthesis of inorganic and organic crystals mediated by proteins in different biological organisms. A mechanism of biomineralization conserved throughout evolution in all living species. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, *63*(3), 94–103. https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2017.07.001
- D. Vlassopoulos B. Bessinger P.A. O'Day. (2010). Aqueous solubility of As2S3 and thermodynamic stability of thioarsenites.
- Daraz, U., Li, Y., Ahmad, I., Iqbal, R., & Ditta, A. (2023). Remediation technologies for acid mine drainage: Recent trends and future perspectives. *Chemosphere*, *311*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137089
- DOF. (2021). NOM-001-SEMARNAT-2021, Que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación.
- DOF. (2021). NOM-127-SSA1-2021, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua.
- Duong, H. C., Tran, L. T. T., Vu, M. T., Nguyen, D., Tran, N. T. V., & Nghiem, L. D. (2021). A new perspective on small-scale treatment systems for arsenic affected groundwater. In *Environmental Technology and Innovation* (Vol. 23). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101780
- Ehrlich, H., Demadis, K. D., Pokrovsky, O. S., & Koutsoukos, P. G. (2010). Modern Views on Desilicification: Biosilica and Abiotic Silica Dissolution in Natural and Artificial Environments. *Chemical Reviews*, *110*(8), 4656–4689. https://doi.org/10.1021/cr900334y
- Estay, H., Barros, L., & Troncoso, E. (2021). Metal sulfide precipitation: Recent breakthroughs and future outlooks. In *Minerals* (Vol. 11, Issue 12). MDPI. https://doi.org/10.3390/min11121385
- Firrincieli, A., Presentato, A., Favoino, G., Marabottini, R., Allevato, E., Stazi, S. R., Mugnozza, G. S., Harfouche, A., Petruccioli, M., Turner, R. J., Zannoni, D., & Cappelletti, M. (2019). Identification of resistance genes and response to arsenic in rhodococcus aetherivorans BCP1. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAY), 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00888
- Floroiu, R. M., Davis, A. P., & Torrents, A. (2004). Kinetics and Mechanism of As2S3(am) Dissolution under N2. *Environmental Science and Technology*, 38(4), 1031–1037. https://doi.org/10.1021/es034292q

- Glodowska, M., Stopelli, E., Schneider, M., Lightfoot, A., Rathi, B., Straub, D., Patzner, M., Duyen, V. T., Berg, M., Kleindienst, S., & Kappler, A. (2020). Role of in Situ Natural Organic Matter in Mobilizing As during Microbial Reduction of FeIII-Mineral-Bearing Aquifer Sediments from Hanoi (Vietnam). *Environmental Science and Technology*, *54*(7), 4149–4159. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.9B07183
- Gorny, J., Billon, G., Lesven, L., Dumoulin, D., Madé, B., & Noiriel, C. (2015). Arsenic behavior in river sediments under redox gradient: A review. *Science of the Total Environment*, *505*, 423–434. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.011
- Hernández, P., Recio, G., Schwarz, A., Villa-Gomez, D., Southam, G., Saavedra-Mella, F., Canales, C., & Nancucheo, I. (2023). Arsenic (III) and arsenic (V) removal from acidic mine waters using an acidophilic sulfate-reducing bioreactor. *Hydrometallurgy*, *221*. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2023.106137
- Hoffmann, T. D., Reeksting, B. J., & Gebhard, S. (2021). Bacteria-induced mineral precipitation: A mechanistic review. *Microbiology (United Kingdom)*, 167(4). https://doi.org/10.1099/mic.0.001049
- Huang, J. H. (2014). Impact of microorganisms on arsenic biogeochemistry: A review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 225(2). https://doi.org/10.1007/s11270-013-1848-y
- HUANG, S., PENG, B., YANG, Z., CHAI, L., & ZHOU, L. (2009). Chromium accumulation, microorganism population and enzyme activities in soils around chromium-containing slag heap of steel alloy factory. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, *19*(1), 241–248. https://doi.org/10.1016/S1003-6326(08)60259-9
- Johnson, D. L., & Pilson, M. E. Q. (1972). Spectrophotometric determination of arsenite, arsenate, and phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, *58*(2), 289–299. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(72)80005-9
- Jong, T., & Parry, D. L. (2005). Evaluation of the stability of arsenic immobilized by microbial sulfate reduction using TCLP extractions and long-term leaching techniques. *Chemosphere*, *60*(2), 254–265. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.12.046
- Kabata-Pendias, A. (2010). *Trace Elements in Soils and Plants*. CRC Press. https://doi.org/10.1201/b10158
- Kirk, M. F., Roden, E. E., Crossey, L. J., Brealey, A. J., & Spilde, M. N. (2010). Experimental analysis of arsenic precipitation during microbial sulfate and iron reduction in model aquifer sediment reactors. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(9), 2538–2555. https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.02.002
- Kishore, S., Malik, S., & Kumari, M. (2023). Heavy metals in the environment: toxicity to microbial remediation. In *Emerging Technologies in Applied and Environmental*

Microbiology (pp. 181–203). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99895-6.00006-X

- Le Pape, P., Battaglia-Brunet, F., Parmentier, M., Joulian, C., Gassaud, C., Fernandez-Rojo, L., Guigner, J. M., Ikogou, M., Stetten, L., Olivi, L., Casiot, C., & Morin, G. (2017). Complete removal of arsenic and zinc from a heavily contaminated acid mine drainage via an indigenous SRB consortium. *Journal of Hazardous Materials*, *321*, 764–772. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.09.060
- Lee, J.-H., Kim, M.-G., Yoo, B., Myung, N. V, Maeng, J., Lee, T., Dohnalkova, A. C., Fredrickson, J. K., Sadowsky, M. J., Hur, H.-G., Performed, H.-G. H., & Contributed, J. K. F. (2007). *Biogenic formation of photoactive arsenic-sulfide nanotubes by Shewanella sp. strain HN-41* (Vol. 104).
- Lièvremont, D., Bertin, P. N., & Lett, M.-C. (2009). Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie*, *91*(10), 1229–1237. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.06.016
- Liu, F., Zhang, G., Liu, S., Fu, Z., Chen, J., & Ma, C. (2018). Bioremoval of arsenic and antimony from wastewater by a mixed culture of sulfate-reducing bacteria using lactate and ethanol as carbon sources. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *126*, 152–159. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.011
- Lu, P., & Zhu, C. (2011). Arsenic Eh-pH diagrams at 25°C and 1 bar. *Environmental Earth Sciences*, *62*(8), 1673–1683. https://doi.org/10.1007/s12665-010-0652-x
- Luo, M., Gao, Y., Yang, S., Quan, X., Sun, D., Liang, K., Li, J., & Zhou, J. (2019). Computer simulations of the adsorption of an N-terminal peptide of statherin, SN15, and its mutants on hydroxyapatite surfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(18), 9342–9351. https://doi.org/10.1039/C9CP01638D
- Mao, S., Zhao, Q., Ma, S., Du, Y., Shi, J., Zou, J., Qiu, Z., & Yu, C. (2024). Heavy metal pollution pressure in gold mines shows overall suppressed biochemical sulfur cycle. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 191. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2024.105807
- Martínez-Villegas, N., Briones-Gallardo, R., Ramos-Leal, J. A., Avalos-Borja, M., Castañón-Sandoval, A. D., Razo-Flores, E., & Villalobos, M. (2013). Arsenic mobility controlled by solid calcium arsenates: A case study in Mexico showcasing a potentially widespread environmental problem. *Environmental Pollution*, 176, 114– 122. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.12.025
- McFarlane, I. R., Lazzari-Dean, J. R., & El-Naggar, M. Y. (2015). Field effect transistors based on semiconductive microbially synthesized chalcogenide nanofibers. *Acta Biomaterialia*, *13*, 364–373. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.11.005

- Mirazimi, M., Mohammadi, M., & Liu, W. (2021). Kinetics and mechanisms of arsenic and sulfur release from crystalline orpiment. *Minerals Engineering*, *170*, 107032. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2021.107032
- Mokone, T. P., Lewis, A. E., & Van Hille, R. P. (2012). Effect of post-precipitation conditions on surface properties of colloidal metal sulphide precipitates. *Hydrometallurgy*, *119*, 55–66. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2012.02.015
- Mokone, T. P., van Hille, R. P., & Lewis, A. E. (2010). Effect of solution chemistry on particle characteristics during metal sulfide precipitation. *Journal of Colloid and Interface Science*, *351*(1), 10–18. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.06.027
- Morin, G., Juillot, F., Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.-C., Elbaz-Poulichet, F., Leblanc, M., Ildefonse, P., & Calas, G. (2003). Bacterial Formation of Tooeleite and Mixed Arsenic(III) or Arsenic(V)–Iron(III) Gels in the Carnoulès Acid Mine Drainage, France. A XANES, XRD, and SEM Study. *Environmental Science & Technology*, 37(9), 1705–1712. https://doi.org/10.1021/es025688p
- Newman, D. K., Ahmann, D., & Morel, F. M. M. (1998). A brief review of microbial arsenate respiration. *Geomicrobiology Journal*, *15*(4), 255–268. https://doi.org/10.1080/01490459809378082
- Newman, D. K., Kennedy, E. K., Coates, J. D., Ahmann, D., Ellis, D. J., Lovley, D. R., & Morel, F. M. M. (1997). Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in Desulfotomaculum auripigmentum sp. nov. *Archives of Microbiology*, *168*(5), 380– 388. https://doi.org/10.1007/S002030050512/METRICS
- Onishi, H. (1969). Chapter 33: Arsenic (K. Wedepohl, Ed.). Handbook of Geochemistry.
- Oremland, R. S., & Stolz, J. F. (2003). The Ecology of Arsenic. *Science*, *300*(5621), 939–944. https://doi.org/10.1126/science.1081903
- Ostermeyer, P., Bonin, L., Folens, K., Verbruggen, F., García-Timermans, C., Verbeken, K., Rabaey, K., & Hennebel, T. (2021). Effect of speciation and composition on the kinetics and precipitation of arsenic sulfide from industrial metallurgical wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 409, 124418. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124418
- Qin, W., Wang, C., Ma, Y., Shen, M., Li, J., Jiao, K., Tay, F. R., & Niu, L. (2020). Microbe-Mediated Extracellular and Intracellular Mineralization: Environmental, Industrial, and Biotechnological Applications. *Advanced Materials*, *32*(22), 1907833. https://doi.org/10.1002/adma.201907833
- Rios-Valenciana, E. E., Briones-Gallardo, R., Cházaro-Ruiz, L. F., Martínez-Villegas, N., & Celis, L. B. (2017). Role of indigenous microbiota from heavily contaminated sediments in the bioprecipitation of arsenic. *Journal of Hazardous Materials*, 339, 114–121. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.019

- Rios-Valenciana, E. E., Moreno-Perlin, T., Briones-Gallardo, R., Sierra-Alvarez, R., & Celis, L. B. (2023). The key role of biogenic arsenic sulfides in the removal of soluble arsenic and propagation of arsenic mineralizing communities. *Environmental Research*, 220. https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.115124
- Rodriguez-Freire, L., Sierra-Alvarez, R., Root, R., Chorover, J., & Field, J. A. (2014). Biomineralization of arsenate to arsenic sulfides is greatly enhanced at mildly acidic conditions. *Water Research*, 66, 242–253. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.016
- Routh, J., Saraswathy, A., & Collins, M. D. (2007). Arsenicicoccus bolidensis a novel arsenic reducing actinomycete in contaminated sediments near the Adak mine (northern Sweden): Impact on water chemistry. *Science of the Total Environment*, 379(2–3), 216–225. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.06.027
- Ruíz-Huerta, E. A., de la Garza Varela, A., Gómez-Bernal, J. M., Castillo, F., Avalos-Borja, M., SenGupta, B., & Martínez-Villegas, N. (2017). Arsenic contamination in irrigation water, agricultural soil and maize crop from an abandoned smelter site in Matehuala, Mexico. *Journal of Hazardous Materials*, 339, 330–339. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.041
- Sánchez-Andrea, I., Sanz, J. L., Bijmans, M. F. M., & Stams, A. J. M. (2014). Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. *Journal of Hazardous Materials*, *269*, 98–109. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.032
- Santini, J. M., Stolz, J. F., & Macy, J. M. (2002). Isolation of a New Arsenate-Respiring Bacterium--Physiological and Phylogenetic Studies. *Geomicrobiology Journal*, *19*(1), 41–52. https://doi.org/10.1080/014904502317246156
- Smedley P.L., & D.G. Kinniburgh. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, *17*, 517–568.
- Su, Z., Li, X., Xi, Y., Xie, T., Liu, Y., Liu, B., Liu, H., Xu, W., & Zhang, C. (2022). Microbemediated transformation of metal sulfides: Mechanisms and environmental significance. In *Science of the Total Environment* (Vol. 825). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153767
- Sun, X., Huang, D., Huang, Y., Häggblom, M., Soleimani, M., Li, J., Chen, Z., Chen, Z., Gao, P., Li, B., & Sun, W. (2024). Microbial-mediated oxidative dissolution of orpiment and realgar in circumneutral aquatic environments. *Water Research*, 251. https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121163
- Taylor, J. M., Konda, A., & Morin, S. A. (2020). Spatiotemporal control of calcium carbonate nucleation using mechanical deformations of elastic surfaces. Soft *Matter*, 16(26), 6038–6043. https://doi.org/10.1039/D0SM00734J

- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). *Heavy Metal Toxicity and the Environment* (pp. 133–164). https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- UNICEF, & WHO. (2018). Guidance on the investigation and mitigation of arsenic contamination.
- Wakao, N., Koyatsu, H., Komai, Y., Shimokawara, H., Sakurai, Y., & Shiota, H. (1988).
 Microbial oxidation of arsenite and occurrence of arsenite-oxidizing bacteria in acid mine water from a sulfur-pyrite mine. *Geomicrobiology Journal*, 6(1), 11–24.
 https://doi.org/10.1080/01490458809377818
- Wang, Y., Wei, D., Li, P., Jiang, Z., Liu, H., Qing, C., & Wang, H. (2021). Diversity and arsenic-metabolizing gene clusters of indigenous arsenate-reducing bacteria in high arsenic groundwater of the Hetao Plain, Inner Mongolia. *Ecotoxicology*, *30*(8), 1680–1688. https://doi.org/10.1007/S10646-020-02305-1/FIGURES/4
- Wilkin, R. T., Ford, R. G., Costantino, L. M., Ross, R. R., Beak, D. G., & Scheckel, K. G. (2019). Thioarsenite Detection and Implications for Arsenic Transport in Groundwater. *Environmental Science and Technology*, *53*(20), 11684–11693. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b04478
- Wilkin, R. T., Wallschläger, D., & Ford, R. G. (2003). Speciation of arsenic in sulfidic waters. *Geochemical Transactions*, *4*, 1–7. https://doi.org/10.1039/b211188h
- Xia, Z., Peng, X., Kong, L., & Hu, X. (2021). Hydrophilicity/hydrophobicity of metal sulfide particles as a determinator of aggregation performance in wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, 40. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101900
- Zeng, Y., Chen, Z., Du, Y., Lyu, Q., Yang, Z., Liu, Y., & Yan, Z. (2021). Microbiologically induced calcite precipitation technology for mineralizing lead and cadmium in landfill leachate. *Journal of Environmental Management*, 296. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113199
- Zhang, X., Zeng, L., Wang, Y., Tian, J., Wang, J., Sun, W., Han, H., & Yang, Y. (2023). Selective separation of metals from wastewater using sulfide precipitation: A critical review in agents, operational factors and particle aggregation. In *Journal of Environmental Management* (Vol. 344). Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118462

Anexos

Anexo 1. Determinación de los índices de saturación (SI) y gráfica de solubilidad del oropimente en función del pH mediante el software PHREEQC Version 3.

Paso 1. En PHREEQC Version 3 (Parkhurst & Appelo, 2013), se ingresa los datos en la consola de entrada (input), con la función SOLUTION 1 se ingresaron los parámetros de pH, concentraciones (mg/L) de sulfuro disuelto y arsenito, temperatura y con END se procede a utilizar la solución para determinar la especiación, incluyendo las fases minerales.



👙 PHR	EEQC Interactive - [Phro	(c1)			- 🗆 ×	Paso 2
👙 File	Edit Insert View	Options Wi	ndow	Help	- 8 ×	
С	New	Ctrl+N	Bu	x. .		funciór
Init	Open	Ctrl+O	\sim	▶ X 號 ●		ianoloi
Fo	Close		5	£ № K I 🞬 🞬		auardá
-	Save	Ctrl+S	×	SOLUTION 1 RP		guaruc
8	Save As			temp 30		
	Save All			units mg/L		
	Print	Ctrl+P		density 1.03		
	Print Preview	\		As(3) 18.5625 S(-2) 42.768		
	Print Setup			end		
_		<u> </u>		END		
	Run	P.				
_	Properties					
	Recent Input Files	>				
	Recent Output Files	>				
	Exit					
-						
🌰 Inpi	t 😂 Database 🖑 E	Errors 💼 PfW	1			
Save the	active document		~	1		

Paso 2. Luego con la función SAVE As se guardó la solución 1

Paso 3. Posteriormente se procede a la ejecución del archivo de entrada mediante la selección de la pestaña Run, que se encuentra en la barra de herramientas. Se despliega una ventana y se elige el Database file Wateq4f.dat y selecciona el botón Abrir.



PHREEQC Interactive - [Reactor pH2]		- 0 X
Sile Edit Insert View Options Windo	w Help	- 8 ×
🗅 📽 🖬 🌒 🐰 🐂 🛍 🎒 🕰 🔟 📗	Run	
Initial conditions 🏭 🕼 🦉 🛪 🖽 🖨 🗍 🖉	>★×:X部 ●	
Forward and inverse modeling 🔐 🐵 🕴 🗷	○ 金 彦 K I 醤 醤	
	SOLUTION 1 RP	
E- S Input files	temp 30	
E Beactor pH2	Se Run X	
	here the	
	Collinguistics (Comparison Frankrick Pagetter pH 2 mail	
	Cancel	
	ENI Output file:	
	C:\Users\chel_\OneDrive\Escritorio\Reactor pH2.pqo	
	Uatabase file:	
	C:\Program Files (x86)\USGS\Phreeqc Interactive 3.7.3-15968\c 💌 🛄	
	☐ Set as default	
	Clean this datas has also faithed	
	1 Clube his daug box witerninshed	
😌 Input 🔮 Database 🕐 Errors 💼 PfW		
Ready		

Paso 4. Finalmente haga click en el botón Start y seguidamente en Dismiss Los resultados del modelado se generan en un archivo de salida (extensión .phr.out) y son presentados en 4 secciones: composición de la solución (moles/ kg de agua), descripción de la solución (pH, temperatura, conductividad eléctrica, etc.), distribución de especies e índice de saturación.

PHREFOC Interactive - IReactor pH21		- n v								
File Edit View Onlines Words 111		U ^								
File Edit View Options Window Help		- 6 X								
$ \begin{array}{c} \text{Ce} \\ \text{Initial conditions} & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & $	× 詩 •									
Forward and inverse modeling 🖉 🕲 🌡 ᆂ 🗠 🛔	: № K I 🛗 🛗									
×										
Output files Dutput files	Beginning of initial solution calculations.									
Co Reading data base.										
CE B B Reading input data for simulation 1.	Initial solution 1. RP									
Reading input data for simulation 2. Reading input data for simulation 3.	Solution composition									
24	Elements Molality Moles	T.								
of	As(3) 2.406e-04 2.406e-04									
	S(-2) 1.295e-03 1.295e-03									
	Description of solution									
	pH = 2.000 pe = 4.000 Activity of water = 1.000 Ionic strength (mol/kgw) = 5.411e-03 Mass of water (kg) = 1.000e+00 Total alkalinity (eg/kg) = -1.066e-02 Temperature (*C) = 30.000									
5	Electrical balance (eq) = 1.066e-02									
	<pre>recent error, 100^(Cat-[An])/(Cat+[An]) = 98.51 Iterations = 13</pre>									
	Total H = 1.110250e+02									
	Total 0 = 5.550622e+01									
	Distribution of species									
202										
	Log Log mole V Species Molality Activity Molality Activity Gamma cm ³ /mol									
HW Shout Soutput Statabase 🖑 Error ()	H+ 1.074e-02 1.000e-02 -1.969 -2.000 -0.031 0.00									
Pandy	OH- 1.5658-12 1.44/8-12 -11.805 -11.840 -0.035 (0)									
neady										

PHREEQC Interactive - [Reactor pH2]									- 0	×
Se File Edit View Options Window Help										e x
										-
	to a set t									-
Initial conditions 🍯 🕼 🕴 🗙 🖽 🚝 🛛 🖓	F X 訪 •									
Forward and inverse modeling 🔐 🚳 🌡 ᆂ 🗠 :	£ f≈ K I 🗎 🎬									
	S2-2	5.927e-	-21 4.38	6e-21	-20.227	-20.358	-0.131	(0)		
E Gutput files			Satur	ation in	dices					
C Reading data base.	Phase	STAR	log TAP	log K	303 K.	1 arm)				
Reading input data for simulation 1. Reading input data for simulation 2						1				
Beading input data for simulation 3	Arsenolite	-11.13	-12.43	-1.29	As203					
	As253 (am)	1.86	-42.33	-44.19	As2S3					
	As native	-12.01	-24.21	-12.20	As					
o l	Claudetite	-11.17	-12.43	-1.26	As203					
f	H2 (g)	-12.00	-15.17	-3.17	H2					
	H2O(g)	-1.38	-0.00	1.38	H2O					
	H2S(g)	-2.04	-3.09	-1.05	H2S					
	02 (g)	-57.52	-60.45	-2.93	02					
	Orpiment	3.21	-42.33	-45.54	As253					
	Realgar	-2.61	-22.18	-19.57	Ass					
6	Sulfur	4.19	-10.74	-14.93	S					
	**For a gas, SI For ideal gas	= log10(ft es, phi = 1	igacity). L.	Fugacity	= pres	sure * phi	/ 1 atm.			
	End of simulati	on.								
5										
	Reading input d	ata for sim	ulation 2							
				-						
	END									
	End of simulati	on.								1
Sinput Soutput Statabase 🖑 Error 4)										
Reach/]			-						- ,

Paso 5. Para construir el gráfico de solubilidad del oropimente en función del pH, se añade las funciones: SOLUTION 1, GAS_PHASE (si requiere especificar un sistema en presencia de O₂, N₂ o CO₂), REACTION 1 (especificando los moles de mineral que se va a disolver en un numero de etapas o puntos de la curva), USER_GRAPH 1 (nos permite construir el plot de los datos obtenidos de la simulación) y finalmente END. Posteriormente realizar el paso 2 al 4. El grafico se puede guardar en formato JPG o PDF.



Anexo 2. Elaboración de diagrama de Pourbaix mediante el software Geochemist's Workbench 2023 Versión 17.

Paso 1. Para construir el diagrama de Pourbaix se emplea la herramienta de Act2, que también nos permite realizar diagramas de actividad, estabilidad y solubilidad. A continuación, se despliega una ventana (consola), en dónde se ingresa las especies químicas, concentraciones en términos de actividad, intervalos de pH y Eh(V). Asimismo, la temperatura y la presión.



Paso 2. Posteriormente se procede a la ejecución del archivo de entrada mediante la selección de la pestaña Run, que se encuentra en la barra de herramientas. Automaticamente se contruye el Plot.

				in theip									
	Basis	mmand R	esults	Plot									_
r'	diagram species -	\mathbf{N}											
		As(OH)3	#	As(OH)4-		0.0003125	▼ a	tivity 🔻					
~	on axes												
		H	#			on x axis							
				рн 🔻	from	0.0	▼ to	14.0	 increment 	2.0	•		
		e	#	O2(aq)		on y axis							
				Eh 👻	from	-0.75	▼ to	1.25	 increment 	0.5	-		
-1	n the presence of												
		H2C				1.0	▼ a	tivity 🔻	solvent				
		temperature				25.0	▼ c	•					
		pressure				1.0	▼ bi	ars 🔻					
	add dalata												

Paso 3. Finalmente el diagrama se puede guardar como archivo PDF, JPEG, PNG en la pestaña File \rightarrow Save Image \rightarrow elegir el tipo de archivo

