



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA
PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**DINÁMICA DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA CON ACTIVIDAD SULFATO
REDUCTORA DURANTE LA BIOESTABILIZACIÓN DE As EN SISTEMAS BATCH**

PRESENTA:

VICTOR MANUEL ESCOT ESPINOZA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ELSA CERVANTES GONZÁLEZ

CO. DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROBERTO BRIONES GALLARDO

ASESORES:

DR. JAIME GARCIA MENA

DRA. CLAUDIA ESCUDERO LOURDES

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

PROYECTO REALIZADO EN:

EL INSTITUTO DE MELATULRGIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ Y
EN LA COORDINACION ACADEMICA REGION ALTIPLANO (COARA) DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

CON FINANCIAMIENTO DE:

PROYECTO FORDECYT No. 190966

ANÁLISIS, DIAGNÓSTICO Y DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE ARPOVECHAMIENTO
SOSTENIBLE DE AGUA Y ENERGÍA EN LA INDUSTRIA MÍNERA, CON UN ENFOQUE
MULTIDISCIPLINARIO Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS EN CIENCIAS DE LA TIERRA

AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS

BECARIO No. 416160

**LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO ATRAVÉS
DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC)**

AGRADECIMIENTOS

A los Programas Multidisciplinarios de Posgrados en Ciencias Ambientales (PMPCA) por brindarme la oportunidad de seguir formándome como persona, estudiante y profesionista.

A la Doctora Elsa Cervantes González por sus aportaciones, su gran paciencia y apoyo durante el trascurso de la presente investigación.

Al Doctor Roberto Briones Gallardo por darme la oportunidad de realizar la presente investigación, por su comprensión, paciencia y apoyo durante el tiempo en que se desarrolló el presente trabajo.

Al Doctor Jaime García Mena y la Doctora Claudia Escudero Lourdes por sus observaciones y aportaciones durante las actividades desarrolladas a partir de la presente investigación.

A la L. Q. Izanami López Acosta, encargada del Laboratorio de Análisis Químico del Instituto de Metalurgia de la UASLP, por su apoyo en la determinación de concentraciones de As mediante EAA y EAA-HG.

A la M.M.I.M. Rosa Lina Tovar Tovar encargada del Laboratorio de Difracción de Rayos X del Instituto de Metalurgia de la UASLP por su apoyo en la identificación de fases mineralógicas mediante EDS-MEB.

Al personal de la Coordinación Académica Región Altiplano (COARA) por las facilidades brindadas para la realización de la etapa de evaluación de la diversidad microbiana del presente trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Remediación Ambiental del Instituto de Metalurgia de la UASLP por las aportaciones académicas durante el trabajo experimental.

DEDICATORIAS

A Dios

A mis padres Irma Espinoza Esnauriza y Rubén Escot Cabral, por sus consejos, confianza, cariño y amor que me ayudaron a cumplir mis objetivos, por inculcar en mí la responsabilidad, el respeto y la tolerancia.

A mis hermanos Irma Escot Espinoza y Adrián Escot Espinoza, por su cariño, compañía y muestras de apoyo.

A Danairi, por brindarme su apoyo, motivación y comprensión durante esta etapa de mi formación.

A mis compañeros y amigos del PMPCA, Adriana, Ángel, Eduardo, Gloria, Karina, Gregorio, Gabriel, Néstor, Diana, Dulce, Ulises, Sarah, Sandra y Susanne. Del Laboratorio de Remediación Ambiental, Alejandro, Liliana, Itzi, Reyna y Andrea. Del COARA, Mariela, Claudia, Austria y José Luis. A todos gracias por su amistad sincera y alegrías brindadas.

A todos ustedes, gracias por acompañarme en este camino.

RESUMEN

En los últimos años se ha incrementado el uso de tecnologías que utilizan microorganismos para la estabilización y remoción de iones metálicos y metaloides como el arsénico (As) presente tanto en efluentes como en residuos generados por actividades minero-metalúrgicas, entre estas tecnologías están los procesos que incluyen bacterias sulfato reductoras (BSR), donde el sulfuro de hidrogeno (H_2S_{biog}) es usado para remover, mediante precipitación, iones metálicos en forma de sulfuros metálicos, dicho tratamiento es considerado una de las alternativas de biorremediación más prometedoras, por lo que la búsqueda de BSR resistentes a metales pesados y As es importante para el desarrollo de tecnologías de biorremediación. En la presente investigación, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de As (V) y As (III) sobre las cinéticas de producción de H_2S_{biog} en solución de dos consorcios microbianos previamente caracterizados con actividad sulfato-reductora (JH y M2), asimismo, se determinaron las concentraciones solubles de As a las que estos consorcios pueden estar expuestas antes de limitar completamente su crecimiento (IC_{50}), también se llevó a cabo la determinación de las concentraciones de especies de As (V) y As (III) durante el proceso de bioestabilización de As (V) que llevan a cabo estos consorcios y se planteó evaluar la dinámica en la diversidad microbiana presente en los consorcios durante la cinética de bioestabilización de As (V) a distintas concentraciones iniciales, permitiendo correlacionar la diversidad microbiana con los procesos que se presentan durante el proceso de bioestabilización.

Los resultados obtenidos en la presente investigación mostraron que el proceso de bioestabilización de As (V) generado por consorcios microbianos JH y M2 presenta una serie continua de etapas, las cuales incluyen un proceso de producción y acumulación de H_2S_{biog} , una reducción de As (V) a As (III) asociada con la oxidación incompleta del H_2S_{biog} a S elemental, y; una etapa en la que co-existen H_2S_{biog} y As (III), lo que genera la remoción del As en forma de polisulfuros, logrando porcentajes de precipitación dependientes de la concentración inicial de As (V) que van de 12 a 93 % para el consorcio JH y de 12 a 94 % para el consorcio M2. Mientras que en la cinética de producción de H_2S_{biog} en presencia de As (III) se observó que existe una producción constante de H_2S_{biog} a concentraciones ≤ 250 μ M de As (III), observándose un proceso inhibitorio en la producción de H_2S_{biog} a concentraciones $\geq 1\ 000$ μ M.

Los valores de IC_{50} para As (V) y As (III) en este estudio indican que los consorcios microbianos JH y M2 pueden ser expuestos a concentraciones ca. 232 y 200 μM de As (V) y As (III) respectivamente antes de limitar su desarrollo. Asimismo, microfotografías EDS-MEB muestran la bioprecipitación extracelular de nanocluster de sulfuros de As (tipo oropimente y rejalgar) y partículas de S elemental. La presencia de S elemental solo se determinó cuando los sistemas fueron inoculados con As (V), por lo que el mecanismo de tolerancia sugerido en este estudio incluye la bioprecipitación extracelular de sulfuros metálicos dada, principalmente, por la reducción de As (V) generada por factores fisicoquímicos y/o la oxidación incompleta de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$. Este mecanismo se asocia también con un incremento en la r_{max} para una concentración de 250 μM de As (V) (cercana al IC_{50}) y se confirmó con los resultados obtenidos en la especiación de As, en los que la presencia de As (III) en los sistemas disminuyó cuando se presentan las disminuciones en la producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ durante la cinética de bioprecipitación de As (V).

La presencia de 5 filotipos diferentes en el consorcio JH, así como mayores tasas de r_{max} en comparación con el consorcio M2, indican que es un consorcio microbiano que lleva a cabo diversos procesos metabólicos en conjunto entre los que se incluye la sulfato reducción, el cual presenta tolerancia a las condiciones fisicoquímicas que se presentan en los sistemas, dicha tolerancia genera que la diversidad microbiana se mantenga durante el proceso de bioestabilización de As (V), esto a diferencia del consorcio M2, en el cual se identificaron 9 filotipos diferentes y presentó variaciones en la diversidad microbiana durante la cinética de bioestabilización de As (V), los cuales están asociados a la concentración de As (V), As (III) y la producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ en cada etapa de las cinéticas, asimismo, se sugiere la presencia de microorganismos asociados a diversos procesos catabólicos de sustratos orgánicos en determinadas etapas de la cinética, las cuales actúan en conjunto con las BSR, pudiendo generar un retardo y menores concentraciones en la PHS que provocan mayores tiempos para que se evidencien los procesos de bioestabilización de As en los sistemas inoculados con este consorcio.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCION	1
1.1 Contaminación por As como problemática ambiental a nivel mundial	3
1.2 Especies de As en el ambiente y su toxicidad.....	4
1.3 El As en zonas mineras y su movilidad	5
1.3.1 Formación de drenaje ácido de mina (DAM)	7
1.4 Técnicas de biorremediación de As en sitios mineros y uso de BSR en el tratamiento de DAM.....	7
1.4.1 Producción biogénica de sulfuro de hidrógeno y bioprecipitación de metales pesados	9
1.5 Bacterias sulfato reductoras	11
1.6 Estudio de la dinámica de las BSR en sistemas naturales y procesos de biorremediación	13
1.7 Antecedentes del proyecto	19
2. JUSTIFICACIÓN.....	21
3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos específicos	23
5. MATERIALES Y METODOS	24
5.1 Consorcios microbianos a evaluar	24
5.2 Cinéticas de producción de sulfuro de hidrógeno biogénico	24
5.3 Determinación de la concentración de especies de As (V) y As (III).....	27
5.4 Análisis estadístico.....	29
5.5 Dinámica de la diversidad microbiana de los consorcios JH y M2 durante la bioestabilización de As (V)	29

5.5.1 Extracción de ANT de la biomasa presente en los sistemas batch	29
5.5.2 Caracterización de los ANT.....	30
5.5.3 Cuantificación de ANT.....	30
5.5.4 Amplificación de la región 16S rRNA por PCR.....	31
5.5.5 Técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)	32
5.5.6 Análisis bioinformático de los perfiles de DGGE	32
6. RESULTADOS Y DISCUSION	34
6.1 Cinéticas de producción de H ₂ S _{biog} en presencia de As (V) y (III).....	34
6.1.1 Estimación de las velocidades de producción específica de sulfuro (PHS) ...	49
6.1.2 Concentraciones de As soluble y porcentajes de bioprecipitación de As.....	52
6.1.3 Microanálisis, identificación y observación de fases mineralógicas de As....	57
6.2 Cinética de especiación de As y evaluación de la diversidad microbiana durante el proceso de bioestabilización de As (V)	60
6.2.1 Cinéticas de especiación de As para el consorcio microbiano JH.....	60
6.2.2 Cinéticas de especiación de As para el consorcio microbiano M2.....	66
6.2.3 Dinámica de la diversidad microbiana del consorcio microbiano JH durante la bioestabilización de As (V).....	76
6.2.4 Dinámica de la diversidad microbiana para el consorcio M2 durante la bioestabilización de As (V).....	81
6.2.5 Análisis multidimensional no métrico (NMDS).....	90
7. CONCLUSIONES	97
8. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO.....	100
9. BIBLIOGRAFIA	101
ANEXOS.....	110

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- A) Diagrama Eh- pH para As a 25 °C. Concentración de As [10^{-5} mol/L] y azufre [10^{-3} mol/L], fases solidas de As entre paréntesis. B) Distribución de especies de As (V) y As (III) en función del pH.....	5
Figura 2.- Reducción desasimilativa y asimilativa de sulfato.	10
Figura 3.- Cinética de producción especifica de H_2S_{biog} del consorcio microbiano JH en presencia de As (V). Dónde: ■ 0 μ M, ○ 1 μ M, ▲ 10 μ M, ◇ 100 μ M, □ 250 μ M, ● 1 000 μ M, △ 10 000 μ M, ◆ 100 000 μ M.....	35
Figura 4.- Cinética de producción especifica de H_2S_{biog} del consorcio microbiano M2 en presencia de As (V). Dónde: ■ 0 μ M, ○ 1 μ M, ▲ 10 μ M, ◇ 100 μ M, □ 250 μ M, ● 1 000 μ M, △ 10 000 μ M, ◆ 100 000 μ M.....	35
Figura 5.- Evidencia de formación de precipitados a las 140 h de iniciada la cinética [1 000 μ M de As (V)].	36
Figura 6.- Ajuste con el modelo de decaimiento logístico para los consorcios JH y M2 en presencia de As (V). Dónde: ● Consorcio JH y ○ Consorcio M2.....	43
Figura 7.- Cinética de producción especifica de H_2S_{biog} del consorcio microbiano JH en presencia de As (III). Dónde: ■ 0 μ M, ○ 1 μ M, ▲ 10 μ M, ◇ 100 μ M, □ 250 μ M, ● 1 000 μ M, △ 10 000 μ M, ◆ 100 000 μ M.....	44
Figura 8.- Cinética de producción especifica de H_2S_{biog} del consorcio microbiano M2 en presencia de As (III). Dónde: ■ 0 μ M, ○ 1 μ M, ▲ 10 μ M, ◇ 100 μ M, □ 250 μ M, ● 1 000 μ M, △ 10 000 μ M, ◆ 100 000 μ M.....	44
Figura 9.- Evidencia de formación de precipitados a las 50 h de iniciada la cinética [1 000 μ M de As (III)].	45
Figura 10.- Ajuste con el modelo de decaimiento logístico para los consorcios JH y M2 en presencia de As (III). Dónde: ▲ Consorcio JH y △ Consorcio M2.....	47
Figura 11.- Ajustes con el modelo de crecimiento sigmoidal de Gompertz en presencia de As (V). Dónde: ● consorcio JH y ○ consorcio M2.....	49
Figura 12.- Ajustes con el modelo de crecimiento sigmoidal de Gompertz en presencia de As (III). Dónde: ▲ consorcio JH y △ consorcio M2.	50

Figura 13.- Porcentajes de precipitación de As (V) de los consorcios microbianos.	54
Figura 14.- Porcentajes de precipitación de As (III) de los consorcios microbianos.	54
Figura 15.- Micrografía electrónica de barrido de las partículas sólidas recuperadas de los sistemas inoculados con 250 μ M de As (V) y análisis EDS (derecha) que sugiere la presencia de sulfuros de As del tipo oropimente (P1) y rejalgar (P2 y P3).....	58
Figura 16.- Micrografía electrónica de barrido de las partículas sólidas recuperadas de los sistemas inoculados con 250 μ M de As (III) y análisis EDS (derecha) que sugiere la presencia de sulfuros de As del tipo oropimente.	58
Figura 17.- Micrografía electrónica de barrido de las partículas sólidas recuperadas de los sistemas inoculados con 250 μ M de As (V) y análisis EDS (derecha) que documenta la presencia de S elemental.	59
Figura 18.- Cinética de producción específica de H_2S_{biog} (A), determinación de pH (B) y Producción de biomasa medida en forma de SSV(C) en presencia de As (V) obtenida con el consorcio JH. Dónde: ■ 0 μ M, ○ 10 μ M, ▲ 250 μ M y ▽ 10 000 μ M....	61
Figura 19.- Cinética de especiación de As obtenida con el consorcio JH a una concentración inicial de 10 μ M (A), 250 μ M (B) y 10 000 μ M (C) de As (V). Dónde: ■ [As total], ○ [As (V)], △ [As (III)] y ▼[As removido].....	64
Figura 20.- Cinética de producción específica de H_2S_{biog} (A), determinación de pH (B) y Producción de biomasa medida en forma de SSV(C) en presencia de As (V) obtenida con el consorcio M2. Dónde: ■ 0 μ M, ○ 10 μ M, ▲ 250 μ M y ▽ 10 000 μ M...68	68
Figura 21.- Cinética de especiación de As obtenida con el consorcio M2 a una concentración inicial de 10 μ M (A), 250 μ M (B) y 10 000 μ M (C) de As (V). Dónde: ■ [As total], ○ [As (V)], △ [As (III)] y ▼[As removido].....	70
Figura 22.- Gel de agarosa al 8% de las muestras de ANT extraídos de los consorcios microbianos JH (A) y M2 (B).....	77
Figura 23.- Gel de agarosa al 8% de los de los productos de PCR obtenidos con los primers 357F-GC y 907 R (586 pb). El 1er. carril corresponde al marcador de peso molecular. Corrimiento de electroforesis a 120 V durante 90 min.	77
Figura 24.- Perfiles de DGGE obtenidos para el consorcio JH en un gradiente de desnaturalización de 60-70%, con un corrimiento a 65°C durante 6 h 35 min. (A) y análisis clúster utilizando el índice de similitud de Jaccard (B).....	79

Figura 25.- Análisis clúster realizado mediante el índice de similitud de Jaccard para una concentración inicial de 10 000 μM	80
Figura 26.- Perfiles de DGGE obtenidos para el consorcio M2 en gradientes de desnaturalización de 32-42% y 60-70%, con un corrimiento a 65°C durante 6 h 35 min (A) y análisis clúster utilizando el índice de similitud de Jaccard (B)	83
Figura 27.- Análisis clúster mediante el índice de similitud de Jaccard a concentración inicial de As de 0 mM (A), 0.01 mM (B), 0.25 mM (C) y 10 mM (D).....	85
Figura 28.- Relación de variables con los perfiles de DGGE para el consorcio JH mediante un análisis de escalonamiento multidimensional no paramétrico a concentraciones iniciales de As de 0 μM (A), 10 μM (B), 250 μM (C) y 10 000 μM (D).....	91
Figura 29.- Relación de variables con los perfiles de DGGE para el consorcio M2 mediante un analisis de escalonamiento multidimensional no paramétrico a concentraciones iniciales de As de 0 μM (A), 10 μM (B), 250 μM (C) y 10 000 μM (D).....	93

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Principales características de crecimiento de las BSR.	12
Tabla 2.- Series experimentales y tiempos de análisis para determinar la concentración de especies de As y realizar la identificación de la diversidad microbiana.....	27
Tabla 3.- Concentraciones de biomasa en forma de SSV al final de la cinética (430 h) en presencia de As (V).	41
Tabla 4.- Estimación de la concentración máxima inhibitoria de As (V) en el desarrollo microbiano (IC ₅₀ para los consorcios JH y M2).	43
Tabla 5.- Concentraciones de biomasa en forma de SSV al final de la cinética (430 h) en presencia de As (III).	46
Tabla 6.- Estimación de la concentración máxima inhibitoria de As (III) en el desarrollo microbiano (IC ₅₀ para los consorcios JH y M2).	48
Tabla 7.- Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste con el modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz en presencia de As (V) para los consorcios JH y M2.	50
Tabla 8.- Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste con el modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz en presencia de As (III) para los consorcios JH y M2.	51
Tabla 9.- [As] inicial, [As] final y porcentaje de As precipitado para el consorcio JH.....	52
Tabla 10.- [As] inicial, [As] final y porcentaje de As precipitado para el consorcio M2....	52
Tabla 11.- Velocidades de reducción de As (V) y presencia de As (III) en sistemas concentración inicial de As de 250 µM para el consorcio JH.	65
Tabla 12.- Velocidades de reducción de As (V) y presencia de As (III) en sistemas concentración inicial de As de 250 µM para el consorcio M2.	72

1. INTRODUCCION

El desarrollo de actividades económicas de manera no sustentable ha contribuido a la emisión de elementos potencialmente tóxicos (EPT), que bajo ciertas condiciones y concentraciones pueden tener efectos nocivos en la salud de la población, así como afectaciones en el equilibrio ecológico y el ambiente. Una de estas actividades es la industria minero-metalúrgica, la cual ha tenido grandes impactos en el aspecto ambiental a lo largo de su historia, esto debido a que en la mayoría de las actividades minero-metalúrgicas desarrolladas en siglos anteriores no se tenía un control de los desechos que se generaban durante los procesos de extracción, lo que genero pasivos mineros, presas de jales y depósitos de escorias en sitios mineros históricos, los cuales generalmente contienen altas concentraciones de metales y metaloides como arsénico (As), mercurio (Hg), cadmio (Cd), cobre (Cu), níquel (Ni), selenio (Se), telurio (Te), plomo (Pb) y zinc (Zn) (Bundschuh *et al.*, 2012). Actualmente, las compañías minero-metalúrgicas en países desarrollados trabajan bajo rigurosos estándares de protección ambiental, sin embargo, en países en desarrollo, este tipo de regulaciones no existen o han sido establecidas recientemente con un carácter no retroactivo, por tal motivo se complica la reparación de los daños causados en el ambiente por el inadecuado manejo de residuos en los sitios mineros históricos previos a la normativa vigente (Razo *et al.*, 2004).

El As es uno de los EPT generados durante los procesos minero-metalúrgicos, es un elemento muy común en la corteza terrestre y la hidrosfera que se moviliza a través de una combinación de procesos naturales y antropogénicos, es un elemento extremadamente tóxico por bioacumulación y puede provocar efectos crónicos en la salud, los cuales se han asociado a diversos tipos de cáncer, patologías cardiovasculares, alteraciones en las funciones reproductoras, inmunológicas, neurológicas y del desarrollo, y su toxicidad lo ha convertido en una preocupación mundial, debido a que cada vez se acumulan mayores concentraciones de este contaminante en el agua y suelo de muchos países del mundo, entre ellos México (Nordstrom, 2002; Bundschuh *et al.*, 2012).

En la naturaleza el As se puede encontrar en distintos estados de oxidación como arseniato As (V), arsenito As (III), As elemental e inclusive como gas arsina As (-III). El estado de oxidación del As y su movilidad están controlados fundamentalmente por las

condiciones redox y el pH. El tratamiento de aguas y suelos en sitios contaminados con metales y metaloides como el As puede realizarse a través de métodos fisicoquímicos, mecánicos y/o biológicos, se debe de tomar en cuenta que los metales pesados en el ambiente no son eliminados, sino que son sometidos a procesos de transformación o inmovilización para disminuir su biodisponibilidad y toxicidad (Leung, 2004). Dentro de este tipo de tratamientos, destaca el uso de bacterias sulfato reductoras (BSR), que ofrecen los beneficios de obtener productos con menor solubilidad en condiciones reductoras al ser comparados con otros tipos de tratamientos, esta tecnología de biorremediación también tienen la ventaja de generar pocas cantidades de lodos y utilizar substratos de bajo costo, factores que son importantes para la factibilidad económica y técnica de un proceso de remediación (Muyzer y Stams, 2008). Asimismo, la evaluación microbiana mediante técnicas moleculares de los microorganismos presente en consorcios con actividad sulfato reductora, y que han sido utilizados en procesos de biorremediación de suelos o agua contaminados con metales pesados, ha ayudado a establecer la dinámica y evolución microbiana presenta durante los procesos de biorremediación, ayudando a entender las actividades metabólicas involucradas y generar estrategias para mejorar los procesos (Lara *et al.*, 2012).

1.1 Contaminación por As como problemática ambiental a nivel mundial y nacional

La presencia de altas concentraciones de As en suelos y aguas subterráneas es un grave problema ambiental, ya que millones de personas en varios países del mundo están expuestos a altas concentraciones de As. Se han reportado concentraciones elevadas de As en suelo y agua subterránea en países como India, Nepal, Mongolia, Rusia, Australia, Bangladesh, Taiwán, China, Camboya, Arabia Saudita, Vietnam, España, Italia, Francia, Sudáfrica, Argentina, Bolivia, Brasil, Perú, Chile, Nicaragua, El Salvador, Dominica, México, EUA, Canadá y Alaska (Bundschuh *et al.*, 2012; Mondal *et al.*, 2013). Debido a los diferentes contextos socio político económicos, así como la falta de disponibilidad de las diferentes tecnologías de tratamiento, el nivel máximo de contaminante en agua potable (MCL) para As es diferente entre los países. En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y las diversas Agencias Nacionales de distintos países redujeron el MCL en el agua potable de 50 a 10 $\mu\text{g/L}$, entre los países en los que se redujo esta México, sin embargo, en algunos países como India, Bangladesh, Taiwán, China y Vietnam, el MCL aún es de 50 $\mu\text{g/L}$ (Nriagu *et al.*, 2007). En América Latina países como Uruguay, Perú y Venezuela aún mantienen el límite de 50 $\mu\text{g/L}$ por la cantidad de sitios contaminados que presentan. México tiene un límite reglamentario de 25 $\mu\text{g/L}$ desde 2005 (Bundschuh *et al.*, 2012). Castro de Esparza (2006) estimó que en América Latina al menos 4.5 millones de personas están expuestas a consumir agua con concentraciones superiores a 50 $\mu\text{g/L}$ de As, esta cifra aumentaría a 14 millones de personas si tenemos en cuenta el límite de 10 $\mu\text{g/L}$ adoptado por la mayoría de los países de América Latina.

En México, la exposición crónica al As de las aguas subterráneas procedentes de acuíferos sedimentarios fue identificado por primera vez en 1958 en los estados de Durango y Coahuila, en esta zona se identificó que los altos niveles de As en el agua potable eran causa de efectos adversos en la salud de la población como enfermedad vascular periférica, queratosis, cáncer de piel, cambios de pigmentación de la piel y trastornos gastrointestinales. Desde entonces, un número creciente de estudios relacionados con el As en las ciencias del medio ambiente, la salud y geoquímica se han llevado a cabo. Hoy en día, el As en suelo y agua se ha encontrado en 13 de los 31 estados del país, incluyendo Durango, Coahuila,

Zacatecas, Morelos, Aguascalientes, Chihuahua, Sonora, Puebla, Nuevo León, Jalisco, Oaxaca, Guanajuato y San Luis Potosí, y se estima que 450 000 personas se encuentran expuestas a una concentración superior a 50 µg/L de As (Armienta y Segovia, 2008; Castro de Esparza, 2006), siendo las actividades minero-metalúrgicas, la quema de combustibles fósiles, el uso de fungicidas arsenicales, herbicidas e insecticidas en la agricultura y el uso de conservadores para madera las principales fuentes antropogénicas de contaminación con As de suelos y aguas subterráneas (Nriagu *et al.*, 2007).

1.2 Especies de As en el ambiente y su toxicidad

En los suelos, aguas subterráneas y aguas naturales el As está presente generalmente en forma inorgánica como oxianiones de arseniato [As (V)] y arsenito [As (III)], como arsina [As (-III)] de los gases que se emanan de ambientes anóxicos y como especie neutra [As (0)] que es muy poco frecuente (Oremland *et al.*, 2000). El As (V) es predominante en aguas subterráneas con condiciones oxidantes y procesos aeróbicos en un intervalo de pH de 4 a 8, a un pH menor a 2.1 el As (V) se encuentra como H_3AsO_4 , a un pH menor a 6.7 la especie $H_2AsO_4^-$, cuya constante de disociación (pKa) es de 2.1, es la especie predominante; a un pH mayor a 6.7 la especie de As (V) que predomina es $HAsO_4^{2-}$ con un pKa= 6.7, y en un medio extremadamente básico predomina el ion AsO_4^{3-} con un pKa = 11.2; mientras que el As (III) es más dominante en agua con condiciones reductoras y ambientes anóxicos, a un pH de entre 3 y 9.2 el As (III) no se disocia y existe predominantemente como especie neutra (H_3AsO_3). Los productos de hidrólisis del As (III) son el $H_2AsO_3^-$ con un pKa de 9.1, $HAsO_3^{2-}$ con un pKa de 12.1 y en medios extremadamente básicos con pH superior a 13.4 predomina la especie AsO_3^{3-} con un pKa de 13.4 (Figura 1) (Smedley y Kinniburgh, 2002; Mohan y Pittman, 2007; Wang y Zhao, 2009). Debido a una cinética lenta de transformación redox de los iones de As, las diversas especies conviven en aguas naturales y el predominio de las especies depende principalmente del pH y el potencial oxido-reducción (Mohan y Pittman, 2007).

El As (V) es menos móvil que el As (III) debido a que el As (V) por lo general se adsorbe más fuertemente a los sólidos. Se ha reportado que la proporción de As (III) a As (V) aumenta cuando el Eh disminuye debido a la saturación de agua o condiciones de anoxia,

así mismo, la formación de oxianiones protonados de As (III) y As (V) en soluciones acuosas aumenta con la disminución del pH (Figura 1) (Wang y Zhao, 2009).

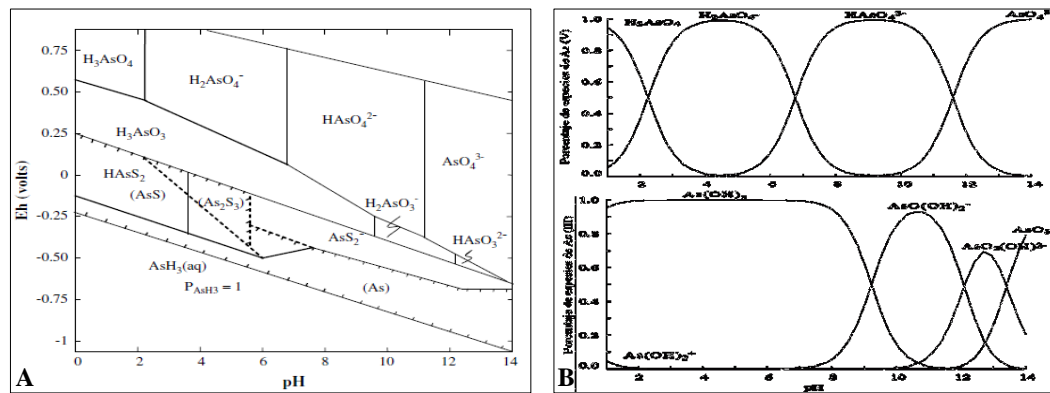


Figura 1.- A) Diagrama Eh- pH para As a 25 °C. Concentración de As [10^{-5} mol/L] y azufre [10^{-3} mol/L], fases solidas de As entre paréntesis. B) Distribución de especies de As (V) y As (III) en función del pH. Diagrama realizado en el software MEDUSA^(R).

En cuanto a la toxicidad del As, se sabe que la mayor parte del metaloide ingerido se excreta rápidamente por vía renal dentro de unos pocos días, sin embargo, altos niveles de As se conservan durante períodos más largos de tiempo en hueso, piel, cabello y uñas. Se han reportado una serie de efectos adversos en la salud por la exposición aguda y crónica a As, entre los que se encuentran edemas, problemas reproductivos, gastroenteritis intestinal, problemas de hígado, enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares, deterioro cognitivo en los niños expuestos a medias y altas concentraciones de As, riesgo elevado de mortalidad por cáncer de vejiga, riñón, hígado, piel y pulmón, asimismo, se ha demostrado que la exposición a As en el embarazo genera problemas en la placenta, bajo peso al nacer y mortalidad en neonatos (Concha *et al.*, 1998; Rocha-Amador *et al.*, 2007).

1.3 El As en zonas mineras y su movilidad

El As presente en sitios con actividad minero-metalúrgica se produce en asociación con distintos minerales como la arsenopirita (FeAsS), escorodita ($\text{Fe}^{2+}\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), mimetita ($\text{Pb}_5(\text{AsO}_4)_3\text{Cl}$), adamita $\text{Zn}_2(\text{AsO}_4)(\text{OH})$, tennantita ($(\text{Cu}, \text{Ag}, \text{Fe}, \text{Zn})_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$) y niquelina (NiAs), y se libera durante los procesos de fundición de minerales que generan polvos y gases con concentraciones altas de As en forma de trióxido de As (As_2O_3) principalmente, lo cuales se dispersan a los alrededores de la fuente de emisión (Armieta y Segovia, 2008). El impacto

ambiental de los pasivos mineros, presas de jales, depósitos de escorias, polvos de fundición y humos, incluida la dispersión de As en los acuíferos, cuerpos de agua superficiales y suelos, se ha estudiado en varias zonas mineras de México, principalmente en los estados de San Luis Potosí, Hidalgo, Chihuahua, Guerrero, Sonora, Guanajuato y Baja California. Estos estudios incluyen la determinación de metales pesados y As en los procesos de movilización de relaves; basada principalmente en las características químicas y mineralógicas del sitio (Razo *et. al.*, 2004; Armienta y Segovia, 2008).

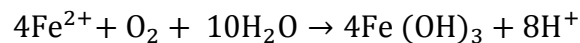
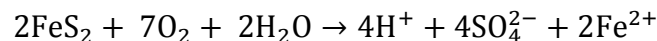
Un sitio de gran interés debido a las intensas actividades minero-metalúrgicas desarrolladas por más de 200 años, en los cuales se generaron grandes volúmenes de residuos mineros y de fundición (pasivos mineros, presas de jales y depósitos de escorias), es el Distrito Minero de Villa de la Paz en la ciudad de Matehuala, San Luis Potosí, México, este sitio presenta altas concentraciones de EPT que han propiciado la contaminación de suelos, flora y mantos acuíferos dentro y en las cercanías de las ciudades de Villa de la Paz y Matehuala sin un debido control de su dispersión hacia el ambiente, esto ha provocado también que extensas áreas de suelos urbanos y rurales se encuentren contaminados (Razo *et al.*, 2004). En este sitio, muestras de agua de riego presentan concentraciones de hasta más de 5 900 mg/L de As, mientras que muestras de agua de los canales y estanques de almacenamiento de las minas oscilan entre 0.059 a más de 0.400 mg/L de As, asimismo, las concentraciones totales de As en suelo del Distrito minero van de 5 138 mg/Kg hasta 13 443 mg/Kg, con porcentajes de bioaccesibilidad de 62% hasta 87% y As total en agua superficial es hasta de 60.6 mg/L (Labastida *et al.*, 2007; Márquez, 2008).

En cuanto a su movilidad, en fase sólida, el As puede encontrarse como oropimente (As_2S_3) y rejalgar (AsS) que son las dos formas reducidas más comunes de As. Sin embargo, como fase mineralógica primaria en México, el As se encuentra preferentemente como arsenopirita (FeAsS), que es el mineral más abundante que contiene As (Smedley y Kinniburgh, 2002; Nriagu *et al.*, 2007). La oxidación de minerales que contienen As y sulfuro son el punto de partida de la presencia de As en los sistemas naturales, asimismo, la concentración de As disuelto en cuerpos de aguas superficiales y subterráneas está en función del espacio y tiempo, y depende de las fuentes disponibles de As primarias y secundarias, las propiedades de los fluidos (pH, potencial redox, iones presentes, fuerza iónica, contenido de

materia orgánica) y de los procesos entre el sólido y el líquido como pueden ser la disolución/precipitación, transformaciones microbiológicas, adsorción/desorción, intercambio iónico y la disolución de oxihidróxidos metálicos en condiciones ácidas (Smedley y Kinniburgh, 2002; Wang y Zhao, 2009; Bundschuh *et al.*, 2012).

1.3.1 Formación de drenaje ácido de mina (DAM)

Uno de los principales impactos ambientales de las actividades minero-metalúrgicas es la generación de drenaje ácido de mina (DAM) o drenaje ácido de roca (DAR), el cual se produce cuando la actividad minera aporta roca sulfurosa (FeS_2 , ZnS , FeAsS , etc.) en contacto con el aire, lluvia, aguas superficiales o subterráneas, lo que genera una serie de reacciones de oxidación que producen sulfatos y acidez al medio circundante. En condiciones oxidantes, la roca que contiene pirita (FeS_2) produce ácido sulfúrico, acidez, hierro disuelto e inclusive hierro coloidal asociado a precipitados de oxihidroxidos de hierro. Estas aguas ácidas pueden disolver otros metales contenidos en la roca tales como As, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn, lo que resulta en un agua de bajo pH y alta concentración de metales que se conoce como DAM o DAR (Doshi, 2006; Miao *et al.*, 2012). Las formas generales de la generación de ácido y sulfato del DAM se presentan en la siguiente reacción:



La infiltración del DAM puede causar una contaminación significativa y persistente del agua subterránea. En ese sentido, los sistemas de tratamiento pasivos para DAM implican la neutralización química o biológica del ácido y la remoción de metales (Doshi, 2006). Sin embargo, el As puede ser atenuado naturalmente por la presencia de hierro y limitar su movilidad o disminuir su velocidad de dispersión a otros cuerpos receptores.

1.4 Técnicas de biorremediación de As en sitios mineros y uso de BSR en el tratamiento de DAM

Los procesos de biorremediación en aguas subterráneas y suelos contaminados con As muestran un gran potencial debido a su compatibilidad con el medio ambiente y la posible rentabilidad de los procesos, la biorremediación se basa en la actividad microbiana para

reducir, movilizar o inmovilizar el As a través de absorción a la biomasa, biometilación, formación de complejos y/o co-precipitación biogénica con hidróxidos o sulfuros, fitorremediación y procesos de oxidación-reducción (Wang y Zhao, 2009; Mondal *et al.*, 2013). La remoción de As usando procesos de biorremediación se puede mejorar por la adición de los sólidos portadores de Fe (o soluciones), un donante de electrones de carbono (por ejemplo, sacarosa, melazas, metanol, acetato, metanol, etc.), y/o la introducción de especies de bacterias apropiadas en caso de ausencia, asimismo, productos biodegradables ambientalmente benignos tales como biosurfactantes y/o materia orgánica natural pueden ser utilizados para aumentar la disponibilidad de As a los microorganismos (Wang y Zhao, 2009). El entendimiento de estos procesos de remediación se puede mejorar si se conocen los procesos metabólicos llevados a cabo por los microorganismos presentes mediante la caracterización de los mismos (Abulencia *et al.*, 2006).

Los principales métodos de tratamiento pasivo para el DAM que presenta altas concentraciones de As y que implican el uso de BSR son las barreras reactivas permeables (BRP), la bioprecipitación *in situ* (ISBP), la construcción de humedales anaerobios y los biorreactores con BSR (Johnson y Hallberg, 2005).

En los biorreactores reductores de sulfato se aprovechan los procesos biológicos para el tratamiento de DAM, ya que la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S_{biog}) a partir de la reducción del sulfato puede reducir sustancialmente las concentraciones de metales pesados en solución, debido a la formación de precipitados de polisulfuros de baja solubilidad, asimismo, la oxidación conjunta de la materia orgánica en la reducción de sulfato produce bicarbonato, que sirve como un tampón para el pH bajo que presente el DAM (Miao *et al.*, 2012). En la mina Lilly/Orphan se trabajó con un biorreactor *in situ* para remediación de DAM que presenta concentraciones altas de As ($14.55 \mu\text{M}$), y otros elementos como Al, Cd, Cu, Mg, Fe, Zn y sulfato, con un pH de 3, el biorreactor fue construido en el pozo de la mina, que proporcionaba un substrato orgánico permeable para la reducción de sulfato logrando la reducción de las concentraciones de As hasta $0.534 \mu\text{M}$ (Canty *et al.*, 2001). Costa y Duarte (2005) reportaron el uso de BSR en la biorremediación de DAM con pH 2.3 neutralizado por la producción de iones bicarbonato durante la reducción de sulfato, los autores utilizaron un biorreactor de columna empacada adicionado con lodos residuales y lactosa como substrato

orgánico, obteniendo porcentajes de precipitación del 75 % de Fe, 99 % de Cu, 99 % de Zn, 65 % de As, 80 % Cd y 73 % de Pb de concentraciones iniciales de 123, 0.03, 0.14, 0.14, 0.1 y 0.8 mg/L respectivamente.

El tratamiento pasivo de DAM utilizando BSR depende en gran medida de la composición química del flujo, ya que, hasta cierto punto, las concentraciones altas de metales conducen a tasas de precipitación más altas, sin embargo, estudios en sistemas batch mostraron que las concentraciones altas de metal podrían limitar el crecimiento de la población bacteriana, disminuir la capacidad sulfato reductora y en última instancia provocar la muerte, entre estos estudios se encuentra el realizado por Cabrera *et al.* (2006), quienes reportaron que el IC_{100} o la más baja concentración de metal disuelto a la que se inhibe la reducción del sulfato en cultivos de *Desulfovibrio vulgaris* y *Desulfovibrio sp.* fue de 12 mg/L para Cu y 20 mg/L para Zn.

1.4.1 Producción biogénica de sulfuro de hidrogeno y bioprecipitación de metales pesados

La acción de las BSR en el tratamiento *in situ* y *ex situ* de suelos o aguas contaminadas se basa en la producción sulfuro de hidrogeno biogénico (H_2S_{biog}) y la precipitación de metales por la presencia del H_2S_{biog} producido, siendo esto, una valiosa herramienta biotecnológica para la remoción de contaminantes en efluentes mineros e industriales (Muyzer y Stams, 2008).

La reducción biológica de sulfato es el proceso por el cual el sulfato se reduce a sulfuro de hidrogeno mediante la disminución de estado de oxidación del azufre (S) desde +6 hasta -2. En la Figura 2 se presentan las dos formas de reducción biológica de sulfato: la reducción asimilatoria que es un proceso que requiere energía y la reducción desasimilatoria, que genera energía para el crecimiento y mantenimiento de las funciones de las BSR (Postgate J., 1984; Madigan *et al.*, 2000).

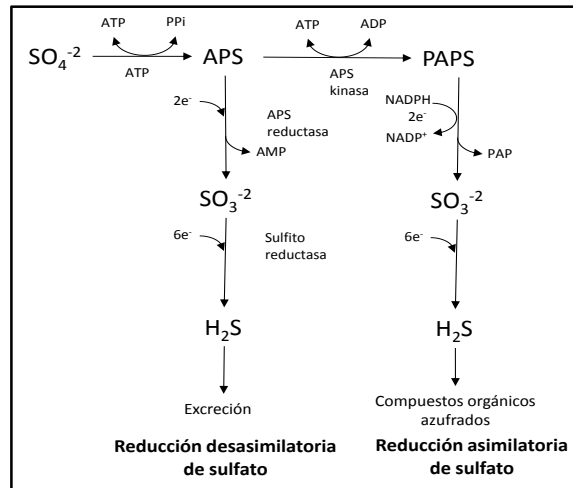
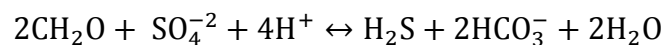
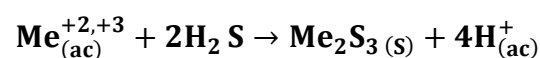


Figura 2.- Reducción desasimilativa y asimilativa de sulfato (Madigan *et al.*, 2000).

La interacción que desarrollan las BSR entre donadores (fuentes de carbono) y aceptores de electrones en el medio, durante el metabolismo de sustratos orgánicos, es aprovechada para llevar a cabo distintos procesos de biorremediación (Muyzer y Stams, 2008). La siguiente ecuación representa de manera general la reducción de sulfato (SO_4^{-2}) a H_2S_{biog} empleando sulfato como aceptor de electrones:



Donde CH_2O es una forma genérica para representar el sustrato orgánico, el cual puede ser oxidado de manera completa e incompleta formando productos secundarios (por ejemplo la oxidación de lactato que genera acetato). Los iones de hidrógeno se consumen, lo que lleva a un aumento del pH en solución. Estas formas acuosas junto con los cambios en las condiciones redox y especies sensibles redox se pueden utilizar como evidencia de la presencia y caracterización de la reducción del sulfato (Miao *et al.*, 2012). El H_2S_{biog} queda disponible para reaccionar con metales disueltos en el agua o disponibles en las fases mineralógicas del suelo, formando polisulfuros metálicos que precipitan como lo muestra la siguiente ecuación:



Donde $Me_{(ac)}^{+2,+3}$ pueden ser iones metálicos tales como Cd, Cu, Zn, Pb, Ni, Fe y Hg, que precipitan como sulfuros metálicos de baja solubilidad; o As, Sb y Mo que forman

minerales de sulfuro más complejos. Es posible formar precipitados de polisulfuros de As siempre y cuando este elemento se encuentre en su estado de oxidación (III) (Battaglia-Brunet *et al.*, 2012). Los metales tales como Mg, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg y Pb también pueden ser retirados en cierta medida por la co-precipitación con otros sulfuros metálicos (Figueroa, 2005). La reducción del sulfato también consume acidez, elevando el pH, lo que facilita las reacciones de precipitación. Asimismo, se ha reportado el efecto tóxico por parte del H_2S_{biog} en el desarrollo de las BSR y en relación con la distribución de especies de sulfuro en función del pH, se establece que el intervalo de pH óptimo para la sulfato reducción es de alrededor de 7.0, debido a que existe un equilibrio entre la forma disociada y no disociada del sulfuro (especie tóxica) que permite la presencia y actividad de BSR (Visser, 1995). También se ha reconocido la existencia de permeabilidad de membrana solo a H_2S , por lo que el mecanismo de toxicidad más aceptado es que el H_2S no disociado es el agente que genera toxicidad celular, debido a que dentro de las células este compuesto reacciona con los componentes celulares formando puentes sulfuro o bisulfuro de las cadenas polipeptídicas, lo que inhibe la actividad bacteriana (Oude-Elferink *et al.*, 1994). Por tanto, la inhibición del crecimiento de las BSR puede producirse por altas concentraciones de sulfuro, pH y metales, sin embargo, tanto el sulfuro como los metales pueden ser removidos al formar un precipitado insoluble, disminuyendo la toxicidad de estos.

1.5 Bacterias sulfato reductoras

Las BSR son ubicuas en el subsuelo y están presentes en condiciones aerobias (metabólicamente inactivas) así como en condiciones anaeróbicas, algunas BSR anaerobias presentan resistencia al O_2 por sistemas enzimáticos dedicados a la reducción y la eliminación de oxígeno y sus especies reactivas (Dolla *et al.*, 2006). Se ha identificado una amplia biodiversidad microbiana de BSR en sedimentos marinos y ecosistemas acuáticos, en plantas de tratamiento de agua residual, DAM, lagunas carbonatadas, sedimentos de humedales, rumen de ganado y respiraderos geotermales, también pueden prosperar en ambientes afectados antropogenicamente como arrozales, fábricas de papel y arroyos afectados por aguas residuales o DAM (Postgate Jr., 1984; Church *et al.*, 2007, Muyzer y Stams, 2008). Si bien, la obtención de BSR no es difícil, los sistemas de tratamiento pasivo deben crear un

entorno adecuado para que pueda garantizar el éxito del tratamiento. Algunos de los requisitos para el desarrollo de las BSR se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1.- Principales características de crecimiento de las BSR.

Condición de desarrollo	Estrictamente anaerobias
Potencial oxido reducción óptimo	-100 a -300 mV
pH óptimo de crecimiento	6.5 - 7.8
Temperatura óptima de crecimiento	25-40 °C
Fuentes de carbono más empleadas	Lactato, acetato, piruvato, etanol, propanol y glucosa
Morfologías	Bacilos, vibrios, cocos o espirilos

En general, los donadores de electrones para las BSR son los productos finales de la fermentación, tales como compuestos de bajo peso molecular o ácidos alifáticos dicarboxílicos, así como los alcoholes y compuestos aromáticos polares e hidrocarburos. Las fuentes de carbono preferidas por las BSR son los compuestos de bajo peso molecular derivados de la degradación anaerobia de carbohidratos, proteínas y lípidos entre las que se incluyen ácidos orgánicos (lactato, piruvato, formiato y malato), ácidos volátiles (acetato) y alcoholes (etanol, propanol, metanol y butanol), también pueden crecer en presencia de glucosa, fructosa, etanol e hidrogeno como sustrato (Liamleam y Annachhatre, 2007).

Cuando la materia orgánica se utiliza como una fuente de carbono para BSR, otras bacterias heterótrofas deben descomponerla en compuestos simples de carbono. En el caso de fuentes de carbono líquidas, se pueden usar sustratos completamente inorgánicos. (Tsukamoto *et al.*, 2004). La mayoría de las BSR prefieren un ambiente de pH entre 6.5 y 8.0, su crecimiento y las velocidades de reducción de sulfato se reducen a valores de pH menores a 5.5 o mayores a 9.0 (Widdel y Hansen, 1992). Sin embargo, se han reportado procesos de sulfato reducción en sedimentos y en operaciones de reactores sulfato-reductores a pH ácido (<4) (Jong y Parry, 2003; Kaksonen *et al.*, 2004; Tsukamoto *et al.*, 2004), la cuales pueden mejorar el rendimiento en el tratamiento de DAM, sin embargo, es necesario un pH más alto para tener mejores rendimientos en la precipitación de metales y en la degradación de sustratos orgánicos (Johnson y Hallberg, 2005). La temperatura óptima para la mayoría de los cultivos puros de BSR es de entre 28 y 40 °C y una temperatura límite de 45°C (Widdel y Hansen, 1992). La mayoría de las BSR termófilas presentan crecimiento

óptimo entre 54 y 70 °C, su temperatura máxima de crecimiento es de 56 a 85 °C en los géneros *Desulfotomaculum* y *Thermodesulfobacterium* (Rabus *et al.*, 2006).

1.6 Estudio de la dinámica de las BSR en sistemas naturales y procesos de biorremediación

El metabolismo de las BSR ha sido muy estudiado y se utiliza indirectamente para precipitar metales pesados, sin embargo, existe falta de información acerca de los microorganismos involucrados y de los factores que controlan su crecimiento y metabolismo en ambientes contaminados, lo que a menudo limita su aplicación en procesos de biorremediación y/o estrategias de rehabilitación a largo plazo. Idealmente, los sistemas de biorremediación pasivos deben ser diseñados con base en el conocimiento de los microorganismos que están presentes en el área contaminada, sus capacidades metabólicas, cómo responden a los cambios en las condiciones ambientales y si pueden ser utilizados en los procesos de remediación (Dann *et al.*, 2009). Estudios recientes relacionados con el potencial biorremediador de microorganismos en procesos de recuperación ambiental como la atenuación natural de metales pesados, radiactivos y de compuestos orgánicos, sugieren de antemano tener un conocimiento completo de la diversidad, ecología, fisiología y filogenia de las comunidades microbiana (Abulencia *et al.*, 2006). La dinámica microbiana en muestras ambientales que presentan contaminación por metales pesados está íntimamente relacionada a procesos de adaptación por parte de los microorganismos, los cuales pueden ser usados en procesos de biorremediación de sitios con características similares, tratando de entender los procesos metabólicos involucrados en dicha adaptación. Tradicionalmente, la caracterización de la composición de las comunidades microbianas en suelo y agua contaminados se ha limitado a la capacidad de cultivar los microorganismos a partir de muestras ambientales, sin embargo los desarrollos tecnológicos y el estudio de la biodiversidad basado en la extracción y análisis del ADN total de una muestra ambiental han permitido determinar la estructura y función de los microorganismos sin necesidad de aislar y cultivar especies individuales (Malik *et al.*, 2008). Por otro lado, caracterizar la diversidad de una comunidad así como evaluar su dinámica durante los procesos de biorremediación ayuda a inferir mecanismos bioquímicos que pueden contribuir a la remoción y/o estabilización de contaminantes y a su vez permite diseñar estrategias de biorremediación más eficientes.

Condiciones como temperatura, pH, nutrientes, condiciones anaerobias y presencia o ausencia de contaminantes pueden generar variaciones en las poblaciones microbianas de BSR antes o durante los procesos de biorremediación en los que se utilizan este tipo de microorganismos, por tanto, es importante evaluar la dinámica de las comunidades microbianas de BSR presentes en los sistemas durante las distintas etapas de un proceso de biorremediación, esto debido a que las condiciones en los sistemas pueden variar conforme se desarrolla el proceso, en especial cuando se realizan pruebas *in vitro*, generando una respuesta por parte de los microorganismos basada en cambios en la actividad metabólica por la presencia de genes específicos, lo que a su vez genera cambios en la composición por inhibición o aumento en la población. Es importante mencionar que el rendimiento y la estabilidad de los procesos biológicos durante los procesos de biorremediación también están condicionados a la adaptación y evolución de las comunidades microbianas presentes (Kikot *et al.*, 2010; Lara *et al.*, 2012).

El uso de técnicas moleculares ha permitido detectar poblaciones microbianas concretas y evaluar sus actividades metabólicas sin necesidad de cultivarlas, además de ofrecer nuevas oportunidades para el análisis de la estructura y composición de especies específicas en comunidades microbianas (Muyzer *et al.*, 1993). Los estudios moleculares de diversidad microbiana a partir de métodos independientes de cultivo comenzaron a mediados de los 90's con experimentos de reasociación de moléculas de ADN y la directa amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA a partir muestras ambientales. Este gen es considerado un excelente marcador molecular debido a la cantidad de regiones conservadas a lo largo del gen, que sirven de blanco para una gran variedad de iniciadores, cebadores o primers, ya que las secuencias del gen se conservan lo suficiente para permitir el diseño de iniciadores para la reacción en cadena de polimerasa (PCR) que se dirigen a diferentes grupos taxonómicos (de reino a género), pero tienen suficiente variabilidad para proporcionar comparaciones filogenéticas de las comunidades microbianas, entre estas regiones altamente conservadas, se encuentran regiones variables que permiten detectar un amplio número de individuos filogenéticamente diversos como criterio de *screening* o búsqueda (Muyzer *et al.*, 1993), brindando la posibilidad de estudiar los ecosistemas microbianos e identificar y evaluar poblaciones microbianas específicas en su hábitat.

La composición y dinámica de comunidades microbianas en ambientes contaminados puede ser analizada por técnicas como la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE), esta técnica separa fragmentos obtenidos de la amplificación del gen 16s rDNA y de otros genes de acuerdo a su secuencia y movilidad diferencial en geles con un gradiente lineal de concentración de un compuesto desnaturalizante, con este principio, las moléculas de ADN con la misma longitud, pero con diferente secuencia de pares de bases son parcialmente desnaturalizados, obteniendo un patrón particular de bandas en un gel de poliacrilamida (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer y Smalla, 1998), esta técnica puede ser utilizada para determinar los miembros dominantes de las comunidades microbianas, permitiendo el seguimiento de los cambios espaciales/temporales en la estructura de las comunidades (Sanz y Kochling, 2007). Al respecto, Chong *et al.* (2009) estudiaron la estructura de la comunidad microbiana en suelos de los alrededores de la estación Casey, en la Antártida, contaminados con hidrocarburos, Zn y Pb principalmente, en su estudio encontraron una diversidad microbiana superior en suelos de zonas protegidas o sitios con impactos antropogénicos relativamente bajos en comparación con los sitios altamente impactados. La comparación de la estructura de la comunidad basada en análisis de escalonamiento multidimensional no métrico (NMDS) reveló que todos los sitios, a excepción de un lugar contaminado con hidrocarburos, se agruparon con una similitud del 45%, asimismo, informaron que no existe una correlación significativa entre las variables ambientales y la diversidad microbiana, dichas variables incluyen el pH del suelo, conductividad eléctrica, carbono, nitrógeno, contenido de agua y metales pesados. En su estudio determinaron 23 secuencias parciales del gen 16S rRNA obtenidas de las bandas de DGGE, dichas secuencias están estrechamente relacionadas con microorganismos de los grupos *Cytophaga*, *Flexibacter* y *Bacteroides*.

Bouskill *et al.* (2010) mencionan que el objetivo primordial dentro de la ecología microbiana es la determinación de los factores abióticos responsables de la estructura de comunidades a escalas locales y globales. Asimismo, mencionan que la influencia de los metales en la diversidad es aparentemente desconocida, con sitios contaminados por una única especie de metales que muestran una baja diversidad microbiana causada por la presión selectiva del metal, fomentando el crecimiento de organismos resistentes especializados. Anderson *et al.* (2009) estudiaron la dinámica microbiana de tres suelos de las inmediaciones de una planta de fundición de cobre contaminados por vía aérea depositaria, en su estudio

determinaron que las comunidades microbianas nativas de los tres suelos convergen en una comunidad microbiana con estructura y función similar, como resultado de la tensión que genera la presencia del metal, esto en comparación con la comunidad microbiana presente en un suelo que no fue impactado por el metal, asimismo, la modificación de estos suelos con sales de metales de Zn, Pb, As, Cd y Cu, dio lugar a una disminución de la actividad microbiana, así como cambios en la estructura de la comunidad microbiana y la función en cada sitio, mostrando ser sensibles a la presencia de dichas sales, demostrando que otros factores fisicoquímicos como el contenido de materia orgánica y pH pueden generar variaciones en la estructura microbiana de suelos, ya que influyen la biodisponibilidad y toxicidad de los metales. Sin embargo, Gillan *et al.* (2005) demostraron, en sedimentos contaminados crónicamente con concentraciones elevadas de Cd, Cu, Pb y Zn, que la presencia de estos metales no afecta significativamente la diversidad de la comunidad microbiana a lo largo de un gradiente de concentración.

Quillet *et al.* (2011), mencionan que los patrones de bandas de DGGE combinado con una estudio de las actividades enzimáticas y metabólicas de los microorganismos pueden ser índices para evaluar la calidad de suelos contaminados procedentes de sitios mineros, de igual manera, Geets *et al.* (2005) mencionan que la evaluación y la optimización de los procesos in-situ para precipitación de metales se facilita cuando las técnicas de análisis físico/químicos se combinan con herramientas moleculares que controlan específicamente la abundancia, diversidad y dinámica de las comunidades de BSR, es su estudio, realizó experimentos en sistemas batch con el fin de investigar la viabilidad de un proceso in-situ de precipitación de metales como una estrategia de recuperación en aguas subterráneas de una zona industrial contaminada con Zn, Cd, Co y Ni, observando cambios considerables en las comunidades microbianas cuando se adicionaron diferentes sustratos (lactato, acetato, melaza, etanol y metanos). Aunque el número de bandas en los perfiles de DGGE fue muy variado, determino un predominio de BSR pertenecientes al género *Desulfosporosinus* con la aparición ocasional de un miembro del género *Desulfotomaculum*.

Otro estudio en el que se evaluó la diversidad microbiana en sistemas con acción sulfato reductora mediante la técnica de DGGE es el realizado por Dar *et al.* (2009), quienes estudiaron la diversidad y los cambios en la población microbiana en un biorreactor

sulfidogénico para el tratamiento de agua residual sintética rica en Zn, sus resultados indicaron la presencia de poblaciones de *Desulfovibrio desulfuricans* como especies más abundantes entre las BSR durante tres fases de diferentes concentraciones de sulfuro y Zn, con un aumento gradual entre cada fase que concuerda con una disminución en la producción de sulfuro, asimismo, reportó poblaciones de *Desulfovibrio marrakechensis* y *Desulfovibrio aminophilus* como especies menos dominantes, las cuales disminuyen cuando decaen las concentraciones de sulfuro en el biorreactor. Asimismo, Lu *et al.* (2011), mediante amplificación de las mismas técnicas moleculares, evaluaron la comunidad microbiana en un biorreactor usado para la remediación de DAM que contenía altas concentraciones de Zn y Cu, logrando identificar microorganismos de los géneros *Clostridiaceae*, *Eubacterium*, *Pseudobutyrvibrio* y *Clostridium*, las cuales se han asociado a la degradación compuestos orgánicos, así mismo detectaron una BSR del genero *Desulfotomaculum sp.* CYP9, demostrando un papel simbiótico en el proceso de biorremediación, ya que los microorganismos anaeróbicos celulíticos rompieron los materiales orgánicos complejos en carbono fácilmente disponible para las BSR. En 2010, Piña-Salazar realizó la evaluación de una población microbiana por la técnica DGGE presente en inóculos de reactores de lecho fluidizado con flujo ascendente y en la biopelícula sulfato reductora que se forma en ellos, esta evaluación microbiana la realizo a distintos tiempos basados en la operación de los reactores con la finalidad de comprender la influencia de los factores operacionales del reactor en la capacidad metabólica de la biopelícula, esto le permitió identificar los microorganismos presentes en los reactores, y que pertenecían a géneros de BSR como *Desulfovibrio* y varios microorganismos sulfidogénicos no cultivables, así como otros microorganismos no sulfato reductores como *Acinetobacter*, *Clostridium* y *Lactococcus*.

En diferentes estudios, también se ha investigado el efecto que tiene el pH sobre el desarrollo de las BSR, al respecto, Jian Lu *et al.* en 2012, investigaron la respuesta de tolerancia al ácido de un sistema de biorremediación de DAM basado en la reducción de sulfato, en su experimento en columna a pH de 2 se mantuvo una reducción eficiente de sulfato mientras que la precipitación de Cu o Zn fue del 98% y 85% respectivamente, determinaron a la vez, que la mayoría de las bacterias presentes en el sistema de remediación pertenecían a géneros *Clostridiaceae*, *Eubacterium*, *Pseudobutyrvibrio*, y *Clostridium*, lo

que indica la presencia de bacterias hidrolíticas en sistemas en los cuales predomina la sulfato reducción.

Estudios de diversidad han revelado la presencia de grupos bacterianos con potencial biorremediador y por lo tanto de genes de interés en procesos catabólicos importantes (Abulencia *et al.*, 2006). La identificación de genes funcionales que codifican enzimas que juegan un papel importante en la vía de la sulfato reducción y en la resistencia a ambientes contaminados se ha desarrollado desde hace varios años. Uno de los genes que se ha utilizado para evaluar la presencia de BSR en sitios contaminados es el *dsrAB*, el cual, codifica para una sulfato reductasa desasimilatoria y ha servido de marcador para evaluar la diversidad y abundancia de comunidades de BSR en diferentes ambientes naturales y procesos de biorremediación de metales pesados. Kieu *et al.* (2013), evaluaron el efecto de metales pesados en la estructura de comunidad de un consorcio sulfidogénico tolerante a metales pesados, esto lo evaluaron mediante el uso combinado de la DGGE y el gen *dsrB* en cuatro reactores anaerobios semi-continuos de tanque agitado con tasas de carga de metales pesados de 1.5, 3, 4.5 y 7.5 mg l⁻¹ d¹ de Cu, Ni, Zn y Cr respectivamente, determinando un predominio de *Desulfovibrio vulgaris*, lo que indicó que *D. vulgaris* fue dominante en todas las muestras analizadas y desempeñó un papel clave en los procesos de sulfato reducción y eliminación de metales pesados. Asimismo, lograron la identificación de bacterias anaerobias, tales como *Peritrimonas sulfuriphila*, *Clostridium sp.*, *Citrobacter amalonaticus*, y *Klebsiella sp* e informaron de una relación entre la cantidad de géneros encontrados conforme se presentan las distintas etapas en la eliminación de metales.

Es importante evaluar los microorganismos presentes en muestras ambientales contaminadas con As, ya que en años recientes se han identificado genes relacionados con la resistencia a este metaloide por parte de algunos géneros de BSR, que además de reducir sulfato también pueden llevar a cabo la reducción de As (V) a As (III), esta reducción se produce a través de procesos de desintoxicación o de respiración aerobia y anaerobia. Un mecanismo de reducción microbiana de As (V) que ha sido estudiado en años recientes es la reducción desasimilatoria por bacterias reductoras desasimilatorias de As (DAsRB), donde los microorganismos utilizan el As (V) como un aceptor terminal de electrones y lo reducen a As (III) por medio de una reductasa presente en la envoltura celular de ciertos

microorganismo anaerobios, la cual, les permite conservar la energía derivada de la oxidación de sustratos orgánicos o H_2 , este proceso está bien caracterizado en microorganismo presentes en sedimentos anòxicos que provienen de sitios contaminados con As (Dowdle *et al.*, 1996; Ahmann *et al.*, 1997; Newman *et al.*, 1997a; Stolz y Oremland, 1999). Algunas BSR que presentan actividad reductora de As pertenecen a las especies *Desulfotomaculum auripigmentum* (Newman *et al.*, 1997a), *Sulfurospirillum barnesii*, *Sulfurospirillum arsenophilum* (Stolz y Oremland, 1999), *Desulfomicrobium strain Ben-RB*, *Desulfovibrio strain Ben-RA* (Macy *et al.*, 2000) y *Desulfitobacterium* (Niggemyer *et al.*, 2001).

1.7 Antecedentes del proyecto

Se han realizado varios trabajos para generar información y establecer un sistema de remediación en el Distrito Minero de Santa María de la Paz, Matehuala San Luis Potosí, entre los cuales se encuentra el de Labastida *et al.* (2007), quienes lograron el aislamiento de dos consorcios microbianos con acción sulfato reductora (JH y M2) de dos puntos de muestreo del Distrito Minero, el primer sitio de muestreo correspondía a un terreno que es usado actualmente como una cancha de futbol y que constituye la parte superior de un cerro de residuos del procesamiento de mina (presa de jales históricos) y el segundo sitio son los patios de una antigua planta de fundición en el centro del Distrito (M2). En ambos sitios las concentraciones de As en suelo eran de 4 500 y 4 719 $mg\ kg^{-1}$ respectivamente y presentan baja solubilidad en condiciones de lixiviación con agua meteórica (0.7 y 0.4%) (Labastida *et al.*, 2007). Estos consorcios fueron investigados por Márquez en ese mismo año (Marquez, 2008), quien demostró que la mayor actividad sulfato reductora en presencia de un sustrato orgánico sólido (BIOSL) se determinó con el consorcio microbiano M2 ($110\ mmol\ H_2S\ g^{-1}\ SSV\ h^{-1}$), y ésta probablemente se pueda atribuir a una mayor diversidad microbiana en este consorcio, también encontró que este consorcio tenía una actividad hidrolítica mayor que el consorcio JH, que por sus características fisiológicas y metabólicas podría degradar sustratos complejos y favorecer una mayor actividad sulfato reductora. Por otra parte, Azpeitia-Ramos (2011) también comprobó que en ambos consorcios existen BSR que degradan el sustrato de forma incompleta, asimismo, demostró que ambos consorcios presentan diferencias significativas con respecto a las velocidades iniciales máximas de producción específica de H_2S_{biog} ; siendo de $0.0902\ mmol\ H_2S\ g^{-1}\ SSV\ g^{-1}\ lodo\ g^{-1}\ suelo\ h^{-1}$

para JH, equivalente a 2.6 veces mayor que la obtenida con el consorcio microbiano M2, la cual fue de $0.0345 \text{ mmol H}_2\text{S g}^{-1} \text{ SSV g}^{-1} \text{ lodo g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$ cuando se utilizaron para estabilizar la contaminación en un suelo que presentaba concentraciones para As de $7\ 066 \text{ mg kg}^{-1}$ y Pb de $5\ 533.3 \text{ mg kg}^{-1}$. El suelo problema con el que Azpeitia-Ramos trabajó contenía una fracción bioaccesible de As y Pb de $2\ 443.3 \text{ mg kg}^{-1}$ y $3\ 133.3 \text{ mg kg}^{-1}$ respectivamente. Azpeitia-Ramos propuso un sistema de remediación basado en la acción sulfato reductora promovida por los consorcios JH y M2 en sistemas batch, el cual permitió disminuir la fracción bioaccesible del 49 % para As y el 27 % para Pb en el suelo de estudio. En su trabajo concluyó que debido al predominio de BSR dentro del consorcio JH se generó una mayor velocidad de producción específica de H_2S (PHS), lo que deriva en una transición de fases sólidas más rápida mediada por la precipitación de polisulfuros metálicos, a diferencia del consorcio M2, donde podrían predominar bacterias hidrolíticas además de BSR, las cuales facilitan el desdoblamiento de moléculas orgánicas para ser consumidas por las BSR.

En la presente investigación, se pretende evaluar el efecto de diferentes concentraciones de As (V) y As (III) sobre las cinéticas de producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ en solución de los consorcios microbianos JH y M2, asimismo, determinar las concentraciones solubles de As a las que estos consorcios pueden estar expuestas antes de limitar completamente su crecimiento. También se pretende llevar a cabo a cabo la determinación de las concentraciones de especies de As (V) y As (III) y evaluar la dinámica en la diversidad microbiana presente en los consorcios durante el proceso de bioestabilización de As (V). Estos resultados ayudaran a discernir las interrogantes planteadas por los investigadores que han trabajado con estos consorcios microbianos, en las que mencionan que una mayor diversidad microbiana está asociada a una menor actividad sulfato reductora, así mismo permitirá conocer la dinámica microbiana presente en dichos consorcios para establecer los posibles mecanismos implicados en las bioestabilización de As que estos llevan a cabo, diferenciando entre las contribuciones de modificaciones fisicoquímicas del medio y las biológicas asociadas a la heterogeneidad funcional de los consorcios microbianos.

2. JUSTIFICACIÓN

El tratamiento biológico con BSR es considerado una de las alternativas más prometedoras para la remediación de suelo y agua contaminados con As, por lo que la búsqueda de BSR resistentes a metales pesados y metaloides como el As es importante para el desarrollo de tecnologías de biorremediación en sitios específicos con la finalidad de disminuir su biodisponibilidad. Por tanto, es importante conocer las concentraciones solubles de As en diferentes estados de oxidación a las que dos consorcios microbianos (JH y M2) pueden estar expuestos antes de limitar completamente su desarrollo. Adicionalmente es de interés el conocimiento de la diversidad microbiana presente en estos consorcios. Esta información permitirá determinar los cambios posibles en la organización microbiana durante los procesos de bioestabilización de As.

3. HIPÓTESIS

Los consorcios microbianos procedentes de suelos impactados por actividades minero-metalúrgicas llevan a cabo un proceso de bioestabilización de As (V) mediado por la concentración de H_2S_{biog} generado de la reducción de sulfato, la concentración de As (V) presente en los sistemas y su reducción fisicoquímica y/o biológica a As (III) para formar polisulfuros de As.

La dinámica poblacional de cada consorcio microbiano está determinada por las variaciones en la concentración de As, su especiación y la producción de H_2S_{biog} ocurridas durante el proceso de bioestabilización de As.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar la dinámica de la diversidad microbiana de consorcios con actividad sulfato reductora, provenientes de suelos impactados por actividades minero-metalúrgicas, durante la bioestabilización de As en sistemas batch.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar las cinéticas de producción de H_2S_{biog} de los consorcios microbianos JH y M2 con actividad sulfato reductora en presencia y ausencia de As (V) y As (III) en sistemas batch.
- Determinar la concentración de especies de As (V) y As (III) presentes durante la cinética de bioestabilización de As (V).
- Evaluar los cambios en la estructura microbiana presente en los consorcios JH y M2 durante las distintas etapas del proceso de bioestabilización de As (V) a través de la amplificación parcial del gen 16S rRNA y de su análisis por la técnica de electroforesis con gradiente desnaturalizante (DGGE).

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Consorcios microbianos a evaluar

En la presente investigación se utilizaron dos consorcios microbianos previamente caracterizados con actividad sulfato reductora, denominados JH y M2, estos consorcios, fueron aislados de sitios que presentan concentraciones totales de As de 4 500 y 4 719 mg de As/kg de suelo respectivamente (Labastida *et al.*, 2007). Los consorcios microbianos JH y M2 están en resguardo en el Laboratorio de Remediación Ambiental del Instituto de Metalurgia de la UASLP y se enriquecen cada 21 días utilizando medio Postgate, el cual utiliza lactato de sodio como substrato orgánico, adicionando los siguientes compuestos en mg/L: NH_4Cl (1000), KH_2PO_4 (500), NaSO_4 (4 500), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (40), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (60), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4), tioglicolato de sodio (100), ácido ascórbico (100), piruvato de sodio (1100) y lactato de sodio (2.3 mL).

Para generar los inóculos de biomasa que se utilizaron en las pruebas realizadas en la presente investigación se prepararon sistemas batch en botellas serológicas de 125 mL que fueron selladas con tapones de neopreno y sellos de aluminio. El medio de cultivo Postgate adicionado a estos sistemas se ajustó a un pH de 7 usando HCl o NaOH 0.1 M con un potenciómetro Thermo Orion 420A+. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120° C y 15 psig, y los sistemas preparados se incubaron a 30° C dentro de una cámara ambiental. Después de 60 días de incubación, la biomasa de los consorcios JH y M2 en estos sistemas se utilizó para realizar las pruebas experimentales.

5.2 Cinéticas de producción de sulfuro de hidrogeno biogénico

Para evaluar el efecto que tiene el As (V) y el As (III) en la producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ de los consorcios microbianos JH y M2, se prepararon series de sistemas batch (sistemas) en presencia de medio Postgate, inoculados con 90 mg/L de biomasa de cada consorcio, el contenido de biomasa fue determinado con la técnica de sólidos suspendidos volátiles (SSV) de acuerdo al método estándar 2540-E. (Eaton *et al.*, 2005), en el sistema se adicionaron concentraciones conocidas de una sal de arseniato de sodio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) o una sal de arsenito de sodio (NaAsO_2). Se prepararon dos series de 7 sistemas para cada consorcio con concentraciones de arseniato de sodio de 1, 10, 100, 250, 1 000, 10 000 y 100 000 μM y un

sistema control sin la presencia de esta sal, de igual manera se prepararon los mismos sistemas en presencia de la sal de arsenito de sodio, estas series experimentales se prepararon para estudiar cada uno de los consorcios de forma independiente. En una de las series de sistemas, se monitoreó la producción de H_2S_{biog} cada 24 horas (h) durante 430 h utilizando el método turbidimétrico de Cord-Ruwish (1985) con un espectrofotómetro UV-Vis (Beckman, DU 650), para lo cual se emplean alícuotas de 0.1 mL de cada uno de los sistemas. El volumen utilizado en la alícuota fue remplazado por medio Postgate para evitar la entrada de oxígeno al sistema. Se realizó una curva de calibración en base al método turbidimétrico antes mencionado, esta curva de calibración se preparó con una solución patrón de $Na_2S \cdot 9H_2O$ equivalente a 100 mM de H_2S_{biog} .

La biomasa en los sistemas al final del estudio cinético se cuantificó de manera indirecta como SSV de acuerdo con el método 2540 E (Eaton *et al.*, 2005), esto se realizó con crisoles de porcelana porosos, que fueron introducidos en una mufla VulcanTM 3-550PD programada con 2 rampas de temperaturas y dos tiempos de mantenimiento. En la primera etapa se llevó la mufla a 105 °C a 5 °C min^{-1} y se sostuvo esta temperatura por 1 hora, en la segunda etapa se llevó a la mufla a 550 °C con una velocidad de 5°C min^{-1} y se sostuvo esta temperatura por 15 min. Este procedimiento se realizó hasta obtener el peso constante del crisol, el cual se consideró cuando no existía una variación de peso superior a 0.5 mg. Posteriormente se obtuvo el peso del crisol con el filtro de fibra de vidrio Whatman No. 934-AH (diámetro de poro de 1.5 μm), este peso se registró y se consideró dentro de los cálculos finales. Una vez realizado lo anterior se procedió a tomar una alícuota de 2 a 3 mL de muestra y posteriormente se filtró al vacío. Al término del filtrado, el crisol se colocó nuevamente en la mufla en rampas de 1h a 105 °C para cuantificar los SST y posteriormente a 550 °C por 20 minutos para determinar los SSV, estos referidos al volumen de muestra analizada.

La concentración media máxima inhibitoria (IC_{50}) de As (V) y (III) en el desarrollo microbiano se determinó usando un modelo logístico de dosis-respuesta, esto se realizó normalizando la concentración de SSV obtenida para cada concentración de As (V) y As (III) en base a la mayor concentración de SSV determinada.

Las concentraciones de H_2S_{biog} obtenidas en las cinéticas de producción para cada concentración inicial de As (V) y As (III), así como de los sistemas sin As, se dividió entre

la cantidad de biomasa inoculada al inicio de la cinética (90 mg/L), con esto se estimó la producción específica de sulfuro (PHS) en $\text{mmol H}_2\text{S} \cdot \text{mg}^{-1} \text{SSV}$ para cada concentración de As y los resultados se utilizaron para realizar un ajuste utilizando el modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz (Ortiz *et al.*, 2003) y obtener parámetros cinéticos que incluyen: la constante cinética de primer orden, la concentración máxima de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ y la tasa de velocidad máxima de producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ de los consorcios microbianos a las distintas concentraciones iniciales de As (V) y As (III).

Asimismo, se llevó a cabo la determinación de la concentración de As total disuelto presente en el sistema al final de la cinética de producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$, esta determinación se realizó mediante espectrometría de absorción atómica (EAA) utilizando un equipo Marca Varian Spectra Mo. AA 220 mediante el filtrado de 10 mL de solución de cada sistema utilizando filtros para jeringa de 0.45 μm y adicionando ácido nítrico al 1% antes de llevar a cabo la cuantificación de As, concentraciones menores a 3 mg/L de As se midieron utilizando espectrometría de absorción atómica acoplado a horno de grafito (EAA-HG) utilizando un espectrómetro marca Perkin Elmer, Mod Analyst 200.

Las fases asociadas al As formadas en los estudios de cinética, fueron microanalizadas cuantitativamente al final de la cinética utilizando espectroscopia de energía dispersa Si (Li) de 30- mm^2 (EDS; EDAX, Mod. DX4) asociado a un microscopio electrónico de barrido (MEB; Philips, modelo XL30). Con el objetivo de identificar las diferentes fases presentes, en los microanálisis realizados, se utilizó el detector de electrones electrodispersados (BSE). La identificación de fases se realizó liofilizando los precipitados inorgánicos a $-40\text{ }^\circ\text{C}$ en un equipo LABCONCO Floor-model Freeze Dryer, y posteriormente, los liofilizados se montaron en soportes de aluminio con cinta de adhesiva de carbono de doble cara y se recubrieron con polvo de oro para minimizar la alteración de minerales y para crear conductividad en la superficie para ser analizados mediante MEB.

En base a los resultados de la cinética de producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ se determinaron los tiempos y las concentraciones de As (V) a las cuales se desarrollarían las pruebas de cuantificación de especies de As (V) y As (III) así como los tiempos a los cuales se evaluaría la diversidad microbiana presente en los consorcios JH y M2, esto con la finalidad de cumplir con los dos últimos objetivos específicos planteados durante esta investigación, para esto se

prepararon series experimentales en sistemas batch, las cuales contenían medio Postgate en presencia de las concentraciones de la sal de As (V) establecidas en base a los resultados de la cinética de producción de H_2S_{biog} y fueron inoculados con 90 mg/L de biomasa en forma de SSV. Cada una de estas series experimentales se preparó para realizar un análisis específico, los cuales se describen en la Tabla 2.

Tabla 2.- Series experimentales y tiempos de análisis para determinar la concentración de especies de As y realizar la identificación de la diversidad microbiana.

No. de serie experimental	Análisis	Tiempos de análisis (h)
1	Determinación de la concentración de especies de As (V) y As (III)	0, 24, 48, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 350 y 408
2	Evaluación de la diversidad microbiana	0, 48, 144, 210, 240, 350 y 408

5.3 Determinación de la concentración de especies de As (V) y As (III)

El proceso de especiación de As en el cual se determinaron las concentraciones de As (V) y As (III) presentes en los sistemas batch durante la cinética de bioestabilización se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando una resina marca Dowex 1x8 forma Cl^- con tamaño de malla 100 - 200 en los tiempos establecidos en la Tabla 2. Esta técnica se basa en el intercambio iónico de los grupos acetato, que están presentes en la resina, por los grupos arseniato (AsO_4^{-3}), intercambio que es efectivo a un intervalo aproximado de pH de 4 a 8, donde solamente la especie As (V) se encuentra en forma iónica, mientras que el arsénico (III) se mantiene neutro como ácido arsenioso (H_3AsO_3) y pasa a través de la resina sin sufrir retención alguna.

La resina comercial Dowex 1x8 en forma Cl^- fue empacada, de forma vertical y en exceso de agua desionizada, en una columna cromatográfica de vidrio marca PIREX de 30 cm de altura por 1.4 cm de diámetro interno, la resina empacada tenía una altura de 10 cm, posteriormente, la resina fue intercambiada a forma acetatos utilizando el método reportado por Ficklin en 1983, para lo cual se adicionaron a la columna cromatográfica 12 mL de una solución de NaOH 1M, posteriormente, la columna fue lavada con 60 mL de agua

desionizada, se agregaron 20.5 mL de una solución de CH_3COOH 1 M y la columna fue lavada nuevamente con 60 mL de agua desionizada con un flujo de salida de 0.7 ml/min aproximadamente y velocidades de migración para el NaOH y CH_3COOH de 0.568 y 0.745 cm/min respectivamente y tiempos de retención de 17.6 y 13.0 min respectivamente.

Después de que la resina fue intercambiada a grupos acetato, un volumen de 20.5 mL de muestra del sistema batch, previamente filtrado a un tamaño de poro de 0.45 μm y ajustado a un pH de 5, se adicionó a la columna cromatográfica seguido de 62 mL de una solución eluyente de HCl 0.13 M el cual presentó una velocidad de migración de 0.398 cm/min, se recuperaron 4 fracciones de 20.5 mL en frascos de polipropileno, el As recolectado en las dos primeras fracciones correspondía al As (III) presente en la muestra, mientras que el As recolectado en las dos últimas fracciones correspondía a As (V), el cual, fue eluido de la resina por la solución de HCl (Ficklin, 1983). Las fracciones recolectadas fueron acidificadas al 1% con HCl y aforadas a 25 mL para su medición por espectrometría de absorción atómica (EAA) utilizando un espectrómetro Mca. Varian Spectra Mod. AA 220 con límite de detección >3 mg/L de As, del mismo modo, concentraciones menores a 3 mg/L de As se midieron por EAA-HG. En cada prueba se recolectó el volumen intersticial o volumen cero (3 mL aproximadamente), en el cual también se determinó la concentración de As. Asimismo, un volumen de 5 mL de los sistemas batch analizados, el cual fue previamente filtrado, se analizó por EAA para determinar la concentración de As total presente en la muestra. Las pruebas de especiación de As para cada una de las muestras se realizó por triplicado y al final de cada prueba la columna era guardada en exceso de agua a 4° C en bolsa de plástico hasta su reutilización.

Para evaluar la eficiencia de la resina Dowex 1x8 en la separación de las especies As (III) y As (V), antes de realizar las pruebas con sistemas batch, se llevaron a cabo pruebas de especiación con soluciones de concentración conocida de 10, 250 y 10 000 μM de As (V) adicionado en forma de sal como arseniato de sodio ($\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), una solución 250 μM de As (III) adicionado en forma de sal como arsenito de sodio (NaAsO_2) y una solución mezcla de As (V) y As (III) con una concentración final 250 μM de As.

Durante la cinética para determinar las concentraciones de As (V) y As (III) presente en los sistemas batch, también se evaluó la producción de sulfuro mediante el método antes

mencionado y se midió el pH cada 24 h. Asimismo, se determinó la concentración de biomasa en forma de SSV en los tiempos en que se realizó la evaluación de la dinámica microbiana (Tabla 2).

5.4 Análisis estadístico

Para determinar la dependencia entre la concentración de As total, As (V), As (III), PHS, pH y SSV para cada concentración inicial de As (V), se realizó un análisis estadístico de correlación de Spearman, dicho análisis se realizó en el software STATISTICA v10 utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Se realizaron análisis de rachas Wald-Wolfowitz con la finalidad de determinar diferencias significativas en la PHS, pH y SSV con respecto a la concentración inicial de As (V) adicionada en los sistemas batch con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Dicho análisis también se realizó en el software STATISTICA v10 (Perzyk *et al.*, 2009).

5.5 Dinámica de la diversidad microbiana de los consorcios JH y M2 durante la bioestabilización de As (V)

La evaluación de la diversidad microbiana presente en los consorcios JH y M2 durante el proceso de bioestabilización de As se llevó a cabo mediante la amplificación parcial de gen 16S rRNA y la técnica DGGE, para realizar estas pruebas se llevó a cabo la extracción de los ácidos nucleicos totales (ANT) presentes en los sistemas batch en los tiempos establecidos en la Tabla 2. Las distintas pruebas para llevar a cabo la evaluación de la diversidad microbiana se realizaron mediante la siguiente metodología.

5.5.1 Extracción de ANT de la biomasa presente en los sistemas batch

El contenido de cada uno de los sistemas batch se centrifugó a 5500 rpm durante 6 min en tubos Eppendorff de 50 mL. La biomasa de cada tubo se lavó con agua desionizada y se colocó en tubos Eppendorff de 1.5 mL para ser centrifugados a 12 000 rpm por 3 min a 5 °C. Se retiró el sobrenadante y al sedimento se le adicionaron 500 µL de agua desionizada y 500 µl de fenol (fenol equilibrado con Tris-HCl, pH 8.0), el contenido presente en el tubo se mezcló en vortex durante 6 min, posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm por 5 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorff, al cual se le adicionó un volumen

de cloroformo y se mezcló en vortex durante 30 s con el objetivo de extraer el fenol, inmediatamente se centrifugó a 12 000 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó en un nuevo tubo Eppendorff en el cual se precipitaron los ANT adicionando 1/10 de volumen de acetato de sodio (CH₃COONa) pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, el tubo se dejó durante toda la noche en refrigeración a 4 °C. Posteriormente, los ANT presentes en el sedimento se recuperaron centrifugando los tubos a 12 000 rpm durante 30 min a 4 °C, el sobrenadante fue retirado y los tubos se dejaron secar al ambiente de 10 a 20 min. Por último, la pastilla de ANT se resuspendió en 50 µL de buffer TE 1X (Tris-HCl, 0.5 M pH 8 y EDTA 1 mM) y se guardaron en refrigeración a -20°C hasta su procesamiento y análisis.

5.5.2 Caracterización de los ANT

Para corroborar la correcta extracción de los ANT de los sistemas se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 0.5X (5.4 g de Tris base, 2.75 g de ácido bórico y 0.37 g de EDTA por litro), el gel se tiñó con 1 µL de bromuro de etidio (1 mg/mL), posteriormente se vertió en una cámara de electroforesis, se colocó un peine de 8 pozos y se dejó gelificando durante 20 min.

En cada uno de los pozos del gel se adicionó un volumen de 10 µl (6 µl de agua + 2 µl de buffer de carga (azul de bromofenol al 0.25% y glicerol al 30%) + 2 µL de ANT). La electroforesis se llevó a cabo utilizando solución TBE 0.5X a 120 volts durante 60 min aproximadamente. El gel fue retirado de la cámara de electroforesis y fue colocado en un transluminador UV marca UVP para su análisis cualitativo.

5.5.3 Cuantificación de ANT

Los ANT extraídos de los sistemas batch fueron cuantificados haciendo una dilución en agua inyectable 1:200, la absorbancia de la dilución fue medida a 260 y 280 nm con un espectrofotómetro UV-VIS marca Thermo SCIENTIFIC modelo GENESYS 10S. Para determinar la concentración de ANT se consideró que 1 U A₂₆₀ = 50 µg/mL. Asimismo, se determinó el grado de pureza de los ANT extraídos utilizando los valores de absorbancia determinados a los 260 y 280 nm mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Grado de pureza} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Un cociente entre 1.8 y 2 indica un alto grado de pureza de los ANT, mientras que cocientes inferiores a este rango indican contaminación con proteínas.

5.5.4 Amplificación de la región 16S rRNA por PCR

La amplificación parcial del gen 16S rRNA para llevar a cabo la evaluación de la diversidad microbiana se realizó mediante la técnica de PCR utilizando los primers o iniciadores 357F-GC (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 907R (5'-CCGTCAATTCMTTGGAGTTT-3'), estos iniciadores generan un producto de PCR de 586 pb aproximadamente y amplifican la región V3-V5 del gen 16S rRNA, entre las 341 y 357 pb para el iniciador 357F-GC y entre las 907 y 926 pb para el iniciador 907R. El iniciador 357F-GC presenta un fragmento de 40 pares de bases rico en GC en el extremo 5' (5'-CCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3'), el cual estabiliza el comportamiento desnaturizante del fragmento de interés durante la prueba de DGGE (Muyzer y Smalla, 1998).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L, adicionando buffer de PCR 1X, 10 μ L de ANT, 0.2 μ M de cada primer universal (357F-GC y 907R), 0.2 μ M de un mix de desoxinucleotidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2.0 mM de $MgCl_2$ y 2 U/ μ L de *Taq* polimerasa. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 bajo las siguientes condiciones: precalentamiento a 94 °C durante 5 min, desnaturización a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 52 °C durante 30 s, alargamiento a 72 °C durante 30 s, 35 ciclos y un tiempo de permanencia final de 7 min a 72 °C.

Una vez finalizada la reacción de PCR, los productos fueron analizados cualitativamente mediante una electroforesis en gel de agarosa. El gel se preparó al 0.8 % de agarosa en TBE 0.5X y fue teñido adicionando 1 μ L de bromuro de etidio antes de la gelificación del mismo. La electroforesis en el gel de agarosa se realizó utilizando solución TBE 0.5X. En el primer pozo del gel se adicionó marcador molecular con un volumen total de muestra de 10 μ L (6 μ L de agua + 2 μ L de buffer de carga + 2 μ L de marcador de peso molecular). En cada uno de los pozos sobrantes del gel se adicionarán los productos de PCR con un volumen total de 10 μ L (6 μ L de agua + 2 μ L de buffer de carga + 2 μ L de cada producto de PCR). La electroforesis se llevó a cabo a 120 volts durante 60 min

aproximadamente. El gel fue retirado y colocado en un transluminador UV para ser analizado cualitativamente en base al marcador molecular utilizado, determinando si los productos de PCR presentaron el tamaño de pares de bases esperado (586 pb).

Los productos de PCR para cada concentración inicial de As y tiempo de extracción de ANT fueron cuantificados haciendo una dilución en agua inyectable 1:500, la absorbancia de la dilución se midió a 260 nm con un espectrofotómetro UV-VIS y se determinó la concentración de ANT considerando que $1 \text{ U } A_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

5.5.5 Técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

Los productos de PCR obtenidos fueron separados mediante una electroforesis empleando la técnica DGGE en un equipo Mini-PROTEAN® de la marca Bio-Rad. En esta técnica se utilizaron geles de poliacrilamida de 1 mm de espesor (37.5:1 acrilamida-para-N, N'-metil-bis-acrilamida 7.5% [wt/ vol]). Los geles fueron preparados para generar un gradiente desnaturizante lineal de urea-formamida, se utilizó una solución TAE 5 X y se adicionó 0.1% de N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 0.1% de persulfato amónico (PSA) a los geles. Para el caso del consorcio JH se prepararon geles que presentaban un gradiente desnaturizante de urea-formamida de 60-70%, mientras que para el consorcio M2 se utilizaron gradientes desnaturizantes de urea-formamida de 32-42% y 60-70%, esto para buscar una mejor resolución en las bandas encontradas en pruebas realizadas anteriormente. En cada pozo del gel se adicionaron 6 μL de buffer de carga + 0.6 μL de DNA de los productos de PCR del consorcio JH y 1 μL de DNA para el caso de los productos de PCR del consorcio M2. Se utilizó un sistema sumergido en baño de agua a una temperatura de 65° C, el gel fue sumergido en buffer TAE 0.5 X y la electroforesis se realizó con un voltaje de 90 V durante 6 h 35 min. Posteriormente, los geles fueron teñidos durante 10 min con 1 μL de bromuro de etidio (1 mg/mL) y buffer TAE 0.5 X para visualizar los patrones o perfiles de bandas en un transluminador UV marca UVP.

5.5.6 Análisis bioinformático de los perfiles de DGGE

En base a los patrones de bandas obtenidos mediante la técnica DGGE, para cada tiempo en el que se extrajeron los ANT en las distintas concentraciones iniciales de As (V), se realizó un análisis clúster para generar dendogramas utilizando el software estadístico

PAST v5. Los dendogramas fueron generados en base a una matriz de presencia-ausencia de bandas en los perfiles de DGGE usando el método de las medias aritméticas no ponderadas (UPGMA del inglés Unweighted Pair-Group Method arithmetic Averages) y se utilizó el índice de similitud de Jaccard para lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos. La validación de los dendogramas generados y el nivel de confianza de los nodos se determinó mediante el test Bootstrap realizando 500 réplicas.

La riqueza de microorganismos entre tratamientos se estimó usando el índice de Chao 2, el cual se basa en el número de especies de un muestreo considerando la relación entre el número de especies únicas y el número de especies repetidas, asimismo este índice estima la abundancia en los tratamientos con base en el mismo criterio (Magurran, 2004).

Para correlacionar los perfiles de DGGE obtenidos con las distintas variables fisicoquímicas medidas durante la cinética de bioestabilización de As (PHS, pH, SSV y concentraciones de As total) se realizó un análisis de escalonamiento multidimensional no métrico (NMDS), este análisis se realizó en el software estadístico PAST utilizando el método de distancia euclidiana para establecer las proximidades entre los perfiles de diversidad microbiana. Con dicho análisis, se presenta en un espacio geométrico de pocas dimensiones la distancia entre los distintos perfiles de diversidad microbiana basada en el efecto que las variables fisicoquímicas medidas presentan sobre los mismos (Bouskill *et al.*, 2010).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Cinéticas de producción de H_2S_{biog} en presencia de As (V) y (III)

Las concentraciones de H_2S_{biog} en mmol obtenidas en las cinéticas de producción para cada concentración inicial de As fueron divididas entre la cantidad de biomasa inoculada al inicio de la cinética, con esto se estimó la producción específica de sulfuro (PHS) en $mmol H_2S \cdot mg^{-1} SSV$. Las gráficas obtenidas utilizando el valor de PHS se observan en la Figura 3 para el consorcio JH y en la Figura 4 para el consorcio M2 en presencia de As (V) y se pueden distinguir una serie de procesos que se relacionan con la producción de H_2S_{biog} , los cuales se describen a continuación:

Al inicio de la cinética de producción de H_2S_{biog} se observó un proceso de acondicionamiento por parte de los microorganismos, el cual está asociado a una acumulación en la producción de H_2S_{biog} , este aumento en la producción se manifestó de las 0 a las 168 h de iniciada la cinética para ambos consorcios. Posterior a este proceso, se observó un decaimiento en la concentración de H_2S_{biog} , el cual se presentó entre las 168 y 216 h para ambos consorcios. Este decaimiento podría asociarse a un proceso de reducción de As (V) a As (III) por las condiciones reductoras generadas por la oxidación de los donadores de electrones adicionados y altas concentraciones de H_2S_{biog} , el cual también se podría oxidar parcialmente generando la presencia de azufre elemental (S) en el medio (Church *et al.*, 2007). Por consiguiente, la presencia de As (III) y la presencia de una concentración remanente de H_2S_{biog} puede llevar a la precipitación de As en forma de polisulfuros de As, este proceso de precipitación se puso en evidencia por la formación de precipitados de color verde-amarrillo a partir de las 140 h de iniciada la cinética en los sistemas inoculados con concentraciones iniciales de 250 y 1 000 μM de As (V) (Figura 5), tiempo en el cual se presenta el primer decaimiento en la concentración de H_2S_{biog} . Esta relación entre la caída en la producción de sulfuro disuelto y la presencia de As (III) relacionada con la precipitación de As fue reportada por Jong y Parry (2003) en biorreactores usados para la remoción de metales pesados en DAM.

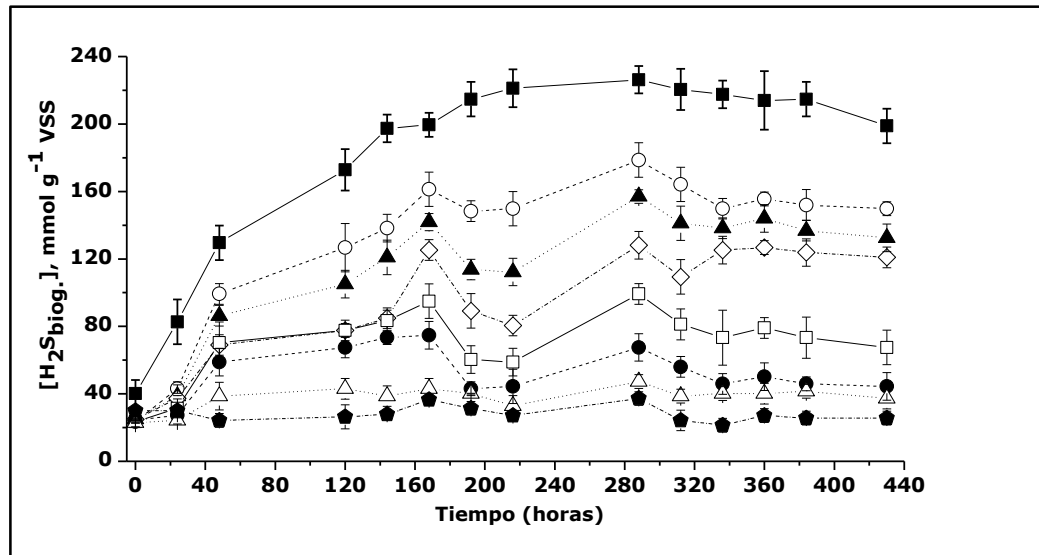


Figura 3.- Cinética de producción específica de H_2S_{biog} del consorcio microbiano JH en presencia de As (V). Dónde: ■ 0 μM , ○ 1 μM , ▲ 10 μM , ◇ 100 μM , □ 250 μM , ● 1 000 μM , △ 10 000 μM , ◆ 100 000 μM .

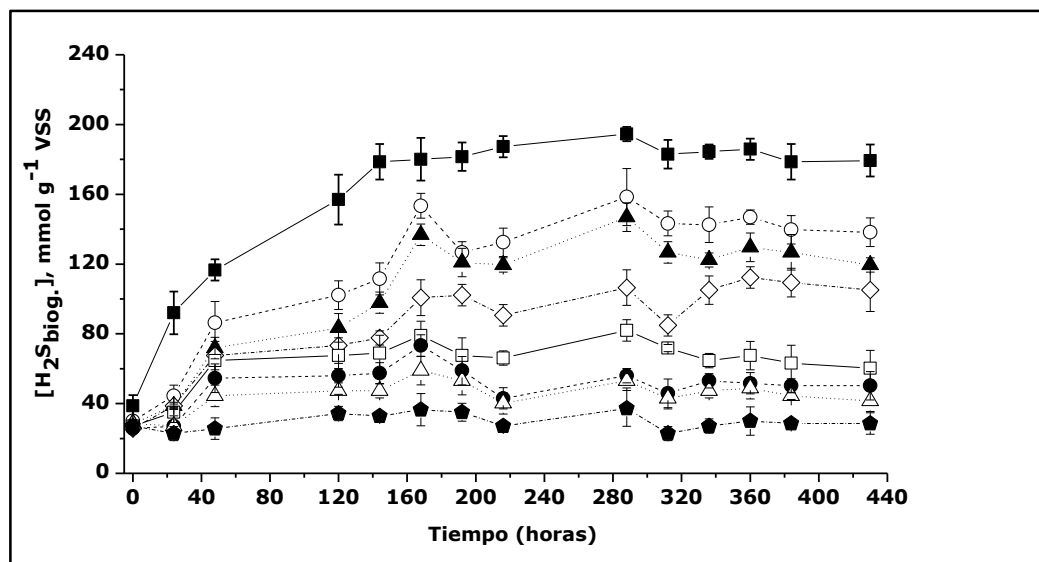


Figura 4.- Cinética de producción específica de H_2S_{biog} del consorcio microbiano M2 en presencia de As (V). Dónde: ■ 0 μM , ○ 1 μM , ▲ 10 μM , ◇ 100 μM , □ 250 μM , ● 1 000 μM , △ 10 000 μM , ◆ 100 000 μM .

Debido a la formación de estos polisulfuros de As, la concentración de As y H_2S_{biog} en solución disminuyó y por ende, la toxicidad de estos iones podría inducir en el metabolismo microbiano se ve disminuida. Lo anterior, genera un nuevo aumento en la concentración de H_2S_{biog} por acción microbiana, el cual se presenta a partir de las 230 h. A las 288 h de iniciada

la cinética se determinaron las concentraciones más altas en la producción de H_2S_{biog} . a concentraciones iniciales $\leq 250 \mu M$ de As, en dicho tiempo la reducción de As (V) a As (III) podría ser considerable y la bioprecipitación del mismo genera un ambiente libre de toxicidad que provoca que la producción de H_2S_{biog} sea considerable. Se ha reportado que cuando se suministran dos receptores de electrones, una BSR del genero *D. auripigmentum* reduce el As (V) y sulfato de forma simultánea, pero muestra una preferencia por el As (V) (Newman *et al.*, 1997a) contrario a lo mencionado por Oremland *et al.*(2000) en un sistema que contenía un consorcio microbiano de BSR y que podría indicar que este segundo aumento en la concentración de H_2S_{biog} es debido a que se eliminan los dos agentes tóxicos del sistema y por tanto el proceso de sulfato reducción por parte del consorcio es inhibido en menor medida.



Figura 5.- Evidencia de formación de precipitados a las 140 h de iniciada la cinética [1 000 μM de As (V)].

Posterior a las 288 h de iniciada la cinética se observó un nuevo decaimiento en la concentración de H_2S_{biog} , el cual se manifestó hasta las 312 h (2do. decaimiento en la concentración de H_2S_{biog}), este decaimiento se genera de manera similar para los dos consorcios y se podría asociar a un nuevo proceso de bioprecipitación de polisulfuros de As. A partir de las 312 h se presentó un nuevo aumento en la concentración de H_2S_{biog} en el cual, las concentraciones máximas de H_2S_{biog} son menores a las reportadas en la segunda etapa de acumulación de H_2S_{biog} .

Las distintas variaciones en la concentración de H_2S_{biog} que se presentaron durante la cinética podrían asociarse a un posible sistema mixto de bioprecipitación de As, el cual consiste en varias etapas o procesos. Una primer etapa de acondicionamiento microbiano y

acumulación de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ en solución como el proceso reportado por Jong y Parry (2003) en un reactor para el tratamiento de DAM usando BSR y lactato como fuente de carbono y donador de electrones la cual duro aproximadamente 48 h. Al respecto, Oremland *et al.* (2000) mencionó que el As (V) puede actuar como aceptor terminal de electrones después del sulfato y en consecuencia, el As (V) no puede ser reducido de manera inmediata ya que las BSR tiene mayor afinidad por el sulfato. Lo anterior, podría explicar la etapa de acumulación de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ durante las primeras horas de la cinética en sistemas de este estudio para concentraciones de As $\leq 1000 \mu\text{M}$. Posterior a la etapa de acumulación de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ se presenta un proceso de reducción de As (V) a As (III), la cual no necesariamente estaría relacionada a la actividad microbiana, sino a su reducción química por disminución del potencial redox del sistema dado por la misma acumulación de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ en solución, lo anterior justificaría la presencia de S elemental al final de la cinética (Sección 6.1.3) como consecuencia de la oxidación parcial de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ a S. El $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ presente en los sistemas actuaría como donador de electrones durante la reducción de As (V) a As (III). Al respecto, Kirk *et al.* (2010) reportó que en un reactor en el cual se adicionaron $7.5 \mu\text{M}$ de As (V), 1.1 mM de sulfato y acetato de sodio como donador de electrones, la reducción de As se dio antes de empezar una etapa de acumulación de sulfuro, esto debido a la poca concentración de As adicionada. Lo que indica que si se agregan concentraciones bajas de As y sulfato la reducción de ambos se llevaría de forma paralela, sin embargo a concentraciones altas de As no se sabe cuál sería el receptor de electrones dominante durante el proceso. Asimismo, Hoefft *et al.* (2004) reportaron una bacteria quimio autótrofa DAsRB con similitud a *Desulfobulbus sp.* capaz de reducir el As (V) a As (III) utilizando el sulfuro como único donador de electrones durante la oxidación de este a sulfato en aguas subterráneas que contenían alrededor de 6 mM de sulfuro y 130 mM de sulfato, adicionadas con concentraciones de hasta $18\,000 \mu\text{M}$ de As (V), logrando la reducción y/o remoción del 100% del As en forma de AsS en aproximadamente 600 h siendo el sulfuro el donante de electrones en la primer etapa del proceso se bioestabilización de As.

Una posible reducción desasimilatoria de As (V) genera una segunda etapa en la que coexisten en solución de iones de As (III) y $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ excedente en el sistema, lo cual conllevaría a la precipitación de As en forma de polisulfuros metálicos cuando se alcancen los valores relativos de la constante de producto de solubilidad (Kps) de estas nuevas fases

mineralógicas que son ca. $\log K = -21.67$ a 25 °C (Cheng *et al.*, 2009). Newman *et al.* (1997b) reportaron que la presencia de precipitados de As en forma de As_2S_3 en sistemas batch se empezó a observar después de 96 h de iniciado un estudio en sistemas que contenían 1 000 μM de As (V) y lactato como donador de electrones usando un inoculo de *Desulfotomaculum auripigmentum*, a los 12 días ya había eliminado del 40 al 50% del As en forma de As_2S_3 . El tiempo en que se empezó a registrar la presencia de precipitados en el presente estudio fue de 140 h aproximadamente, esto podría deberse a que en el presente estudio se utilizó un consorcio microbiano en el cual pueden llevarse a cabo la reducción de As (V) a As (III) simultáneamente con la sulfato reducción durante la oxidación del sustrato orgánico, lo cual genera un retardo para alcanzar las condiciones fisicoquímicas necesarias para que ocurra la bioprecipitación. Vaxevanidou *et al.* (2012) observaron una etapa de acondicionamiento similar que se presentó entre las 168 y 240 h en condiciones similares a las reportadas por Newman *et al.* (1997b) en sistemas batch que contenían suelos contaminados con As, esta etapa de acondicionamiento la relaciono con el inicio de un proceso de reducción desasimilatoria de As (V) a As (III), demostrando también que los microorganismos no requieren una aclimatación a largo plazo en presencia de arsénico para que se desarrollen las reacciones de reducción del mismo. La precipitación de polisulfuros de As en los sistemas batch genera una disminución en la concentración de ambos agentes tóxicos (H_2S_{biog} y As) en solución lo cual podría llevar a un nuevo aumento en la concentración de H_2S_{biog} . Esta serie de etapas podría considerarse cíclicas y podrían repetirse hasta alcanzar porcentajes altos de bioprecipitación de As en solución o hasta que se presente un agotamiento de los nutrientes presente en el medio de cultivo.

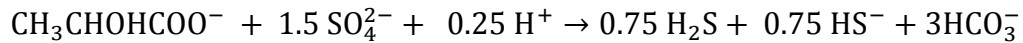
En relación a la producción de H_2S_{biog} en los sistemas, Kolmert *et al.* (1997) reportaron una tasa de producción de H_2S_{biog} que se mantuvo constante en concentraciones ca. 10 mM durante aproximadamente 300 días en un biorreactor de lecho empacado, el cual fue inoculado con *Desulfovibrio sp.*, adicionando una concentración constante de 10 mM de sulfato y lactato como donador de electrones, presentando una inhibición en la sulfato reducción cuando se alcanzaron los 14 mM de sulfuro en el medio. Asimismo, Church *et al.* (2007) reportaron concentraciones tóxicas ca. 15 mM de H_2S , las cuales fueron generadas por sulfato reducción en biorreactores de sedimentos con alta concentración de sulfato y presencia de metales pesados como Zn , Cd y Cu a pH 4, dichas concentraciones de H_2S se

generaron agregando sulfato de sodio y sulfato de amonio en concentraciones de 1.8 y 2.5 g/L respectivamente como aceptores de electrones, generando una inhibición por toxicidad del sulfuro, que a este pH se encuentra totalmente protonado, lograron precipitar los metales presente en forma de sulfuros metálicos, el autor menciona que la solubilidad de los sulfuros metálicos aumenta conforme disminuye el pH a excepción de los sulfuros de As que son más estables a pH ligeramente ácidos, en el estudio también se determinó la presencia de S como resultado de una reducción de sulfato. Asimismo, en un biorreactor diseñado para recuperar el sulfuro generado por la reducción de sulfato usando BSR y *Desulfovibrio desulfuricans*, adicionando 32 mM de sulfato y 54 mM de lactato, se logró mantener una concentración de sulfuro disuelto constante de 14 mM, que corresponde a la concentración inhibitoria reportada para *Desulfovibrio desulfurocans* (McMahon *et al.*, 2008).

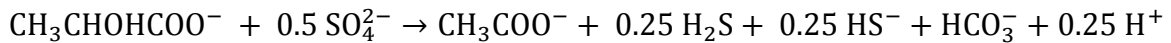
Los efectos inhibidores del H_2S_{biog} son reversibles, y las BSR pueden recuperarse de concentraciones inhibitorias mencionadas por Kaksonen *et al.* (2004) quienes determinaron concentraciones inhibitorias de 16.1 mM de H_2S (IC_{50}) en sedimentos anaerobios adicionados con lactato como donador de electrones, una inhibición completa con 20.9 mM de H_2S disuelto cuando se adiciona acetato en un biorreactor anaerobio y una inhibición del 50% en las tasas de oxidación de sustratos a concentraciones de 11.1 mM de H_2S cuando se adiciona acetato como donador de electrones en el tratamiento de DAM, estas concentraciones de H_2S_{biog} son cercanas a las máximas alcanzadas en este estudio para los consorcios JH y M2 en los sistemas sin As o cuando se adicionan concentraciones $\leq 100 \mu M$ de As, sin embargo, es importante mencionar que las tasas de producción máxima de H_2S en estos sistemas estarían en función de la cantidad de As que está siendo removido y la cantidad de lactato y sulfato añadidas al medio.

Las etapas anteriormente mencionadas sugieren que durante la cinética de bioprecipitación de As (V) se llevan a cabo diversas reacciones entre los aceptores y donadores de electrones durante el metabolismo de sustratos orgánicos, las cuales son conocidas por ser comunes entre los microorganismos anaerobios, incluyendo las BSR (Madigan *et al.*, 2000). Algunas de las reacciones involucradas en estos sistemas complejos de consorcios microbianos que podrían generar la precipitación de As en el medio son: (Kirk *et al.*, 2010; Nevatalo *et al.*, 2010).

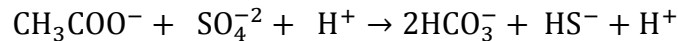
- Oxidación completa de lactato: (Labastida, 2007)



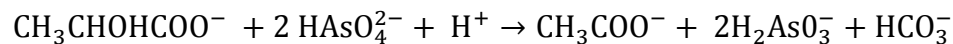
- Oxidación incompleta de lactato (Reacción de media celda): (Labastida, 2007)



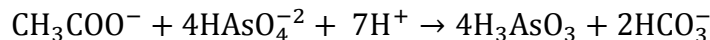
- Reducción de sulfato usando acetato como donador de electrones:



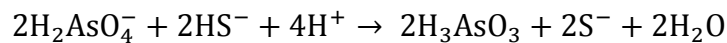
- Reducción de As (V) usando lactato como donador de electrones: (Routh *et al.*, 2007)



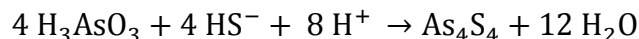
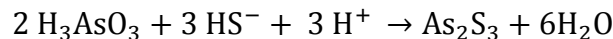
- Reducción de As (V) usando acetato como donador de electrones: (Kirk *et al.*, 2010)



- Reducción de As (V) usando HS⁻ acetato como donador de electrones:



- Formación de precipitados en forma de sulfuros de As: (Kocar *et al.*, 2010).



El sistema control preparado sin As (V) presentó una producción constante de H₂S_{biog} hasta las 230 h para ambos consorcios, alcanzando un estado estacionario a las 280 h, después de esta etapa se observa un decaimiento paulatino en la producción de H₂S_{biog} el cual se puede asociar a un agotamiento de las fuentes de sulfato en el medio. Típicamente se ha reportado que el IC₅₀ de H₂S para la inhibición de la sulfato reducción es hasta máximo 15 mM de H₂S (Koschorreck, 2008), lo cual se correlaciona con las concentraciones máximas obtenidas en este estudio que fueron de 19.9 mM para JH y de 17.5 mM para M2 aun cuando la relación estequiometría menciona que la producción debería de alcanzar los 26 mM de H₂S si se llevara a cabo la de oxidación completa del lactato, lo cual no es el caso y que fue demostrado por Labastida (2007).

La presencia de acetato sin embargo, podría mejorar el desarrollo microbiano en los consorcios JH y M2 en caso de que en este hubiera bacterias metanogénicas que podrían

utilizar este sustrato (Azpetia-Ramos, 2011). Se ha reportado que la presencia de bacterias metanogénicas en un consorcio estimula la reducción de As generando mejores tasa de reducción de As (V) a As (III) ya que compiten con las BSR por el donador de electrones (H₂ y lactato) generando mayores condiciones reductoras (Field *et al.*, 2004).

Al final de la cinética en presencia de As se determinó la concentración de biomasa de cada sistema en forma de SSV, estas concentraciones se presentan en la Tabla 3. En base a estos resultados se observó que existe una disminución de la producción de biomasa cuando los consorcios microbianos JH y M2 son expuestos a concentraciones iniciales de As (V) \geq 1 000 μ M, dichas concentraciones de biomasa en forma de SSV son de entre 100 y 167 mg/L, esto en comparación con la biomasa producida a concentraciones de 1, 10, 100 y 250 μ M de As, que son de entre 233 y 433 mg/L, lo que indica que el grado de inhibición en la producción de biomasa aumenta conforme aumenta la concentración inicial de As adicionado, llegando a limitar en gran medida el desarrollo a una concentración de 100 000 μ M de As en donde la concentración aumento solamente 10 mg/L, esto en comparación con la producción de biomasa presentada en el sistema con la menor concentración de As utilizada en este estudio que fue de 1 μ M y que presentó un aumento de aproximadamente 5 veces la concentración inicial de biomasa.

Tabla 3.- Concentraciones de biomasa en forma de SSV al final de la cinética (430 h) en presencia de As (V).

Concentración μM de As (V)	Consorcio JH SSV (mg/L)	Consorcio M2 SSV (mg/L)
0	433	433
1	433	400
10	400	400
100	400	367
250	233	233
1 000	167	133
10 000	133	100
100 000	100	100

Con respecto al tiempo de aclimatación de los consorcios microbianos JH y M2 sin presencia de As, Cao *et al.* (2012) reportaron la presencia de 650 mg/L de solidos totales en un sistema usando lactato como donador de electrones después 150 h de experimentación, esto a comparación de 200 mg/L de solidos totales alcanzados con acetato como donador de

electrones, estos resultados en la concentración de biomasa se correlacionan con los obtenidos para los consorcios JH y M2 sin la presencia de As (ca. 433mg/L de SSV) cuando se utilizan lactato y acetato como donadores de electrones (Tabla 3).

Asimismo, Gallegos-García *et al.* (2009) reportaron concentraciones de biomasa inmovilizada como solidos volátiles inmovilizados IVS de 1400 mgVIS/L en un biorreactor usado para la remediación de DAM, el cual contenía altas concentraciones de Fe, Zn y Cd, después de la adición de estos metales las concentraciones de IVS aumentaron hasta 2200 mgVIS/L debido a la presencia de sustancias exopolimericas (EPS) en la biopelícula formada dentro del reactor, ya que los sulfuros formados eran recolectados en otra zona del biorreactor. Asimismo, Nevatalo *et al.* (2010) utilizando un biorreactor de lecho fluidizado, determinaron concentraciones de biomasa suspendida en el biorreactor de 50 a 380 mg/L en los primeros días de estudio (1-331 días) aumentando hasta 690 mg/L en la etapa final (332-539 días), el biorreactor fue usado para el tratamiento de aguas residuales de mina y la remoción de Fe y Zn con etanol y lactato como donadores de electrones. Chou *et al.* (2008) estimaron las concentraciones de SSV de BSR mediante modelos matemáticos obtenidas en presencia de acetato como donador de electrones y adicionando sulfato como único aceptor, obteniendo concentraciones ca. 427 mg SSV/L en filtros anaerobios cuando se alcanzaron las mayores tasas de sulfato reducción. Las concentraciones reportadas por este autor se correlacionan con las reportadas en el presente estudio cuando los sistemas no son expuestos a As.

Los resultados de producción de biomasa en forma de SSV permitieron normalizar el comportamiento en la producción tomando en cuenta la mayor concentración de SSV obtenida en presencia de As (V). Los resultados de esta normalización fueron ajustados utilizando un modelo logístico dosis-respuesta. El modelo logístico dosis-respuesta está representado por:

$$\theta = \theta_{max} + \frac{\theta_{min} - \theta_{max}}{1 + ([As]/[As]_{\theta=0.5})^p}$$

Donde θ representa la biomasa normalizada, los parámetros θ_{min} y θ_{max} se definen por los sistemas que presentan la concentración más alta y más baja de biomasa, p indica el

valor de la pendiente en el punto de inflexión de la curva, y $[As]_{\theta=0.5}$ representa la IC_{50} , que se refiere a la concentración de As a la cual se presenta una disminución del 50% en el desarrollo microbiano (Angelidaki *et al.*, 2007).

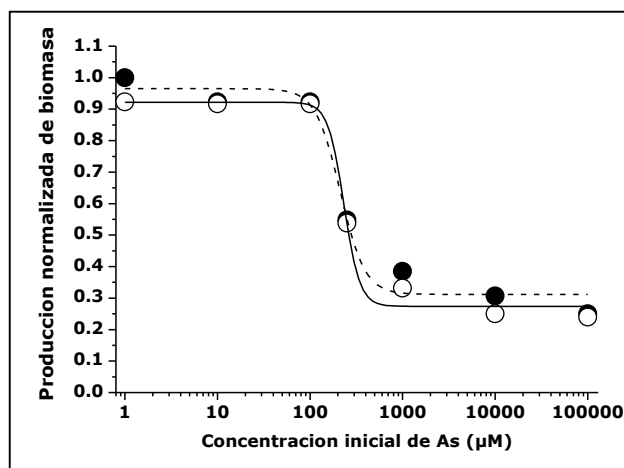


Figura 6.- Ajuste con el modelo de decaimiento logístico para los consorcios JH y M2 en presencia de As (V). Dónde: ● Consortio JH y ○ Consortio M2.

Tabla 4.- Estimación de la concentración máxima inhibitoria de As (V) en el desarrollo microbiano (IC_{50} para los consorcios JH y M2).

Consortio	IC_{50} [As(V)] µM	R^2
JH	232	0.983
M2	212	0.964

En base a los resultados del ajuste realizado con el modelo dosis-respuesta presentados en la Tabla 4 se estableció que para el consorcio JH el valor de IC_{50} es de 232 µM de As (V) y para el caso del consorcio microbiano M2 es de 212 µM de As (V). Por tanto, se establece que el consorcio JH presenta menor inhibición cuando se expone a As (V), lo cual se correlaciona con una mayor producción de H_2S_{biog} por parte de este consorcio en comparación con el consorcio M2.

En conjunto con la cinética de producción de H_2S_{biog} en presencia de As (V) también se preparó una cinética de producción en presencia de As (III) para determinar la dependencia del estado de oxidación en la producción de H_2S_{biog} , en la formación de polisulfuros de As y en el efecto tóxico que tiene sobre el desarrollo microbiano en comparación con el As (V).

Los resultados de la cinética de producción de H_2S_{biog} en presencia de As (III) se presentan en la Figura 7 para el consorcio microbiano JH y en la Figura 8 para el consorcio microbiano M2.

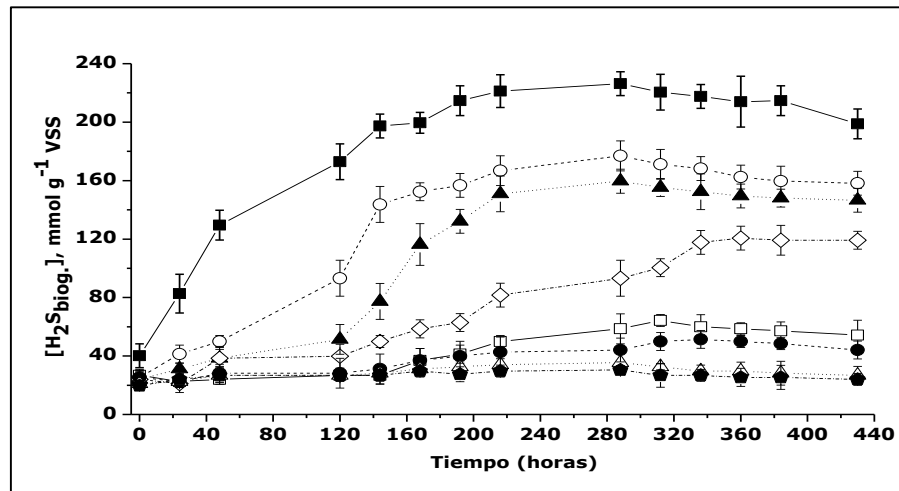


Figura 7.- Cinética de producción específica de H_2S_{biog} del consorcio microbiano JH en presencia de As (III). Dónde: ■ 0 μM , ○ 1 μM , ▲ 10 μM , ◇ 100 μM , □ 250 μM , ● 1 000 μM , △ 10 000 μM , ◆ 100 000 μM .

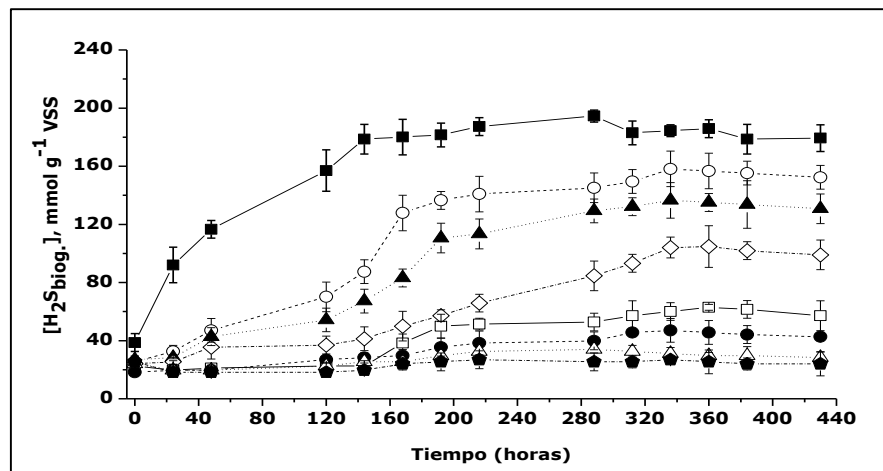


Figura 8.- Cinética de producción específica de H_2S_{biog} del consorcio microbiano M2 en presencia de As (III). Dónde: ■ 0 μM , ○ 1 μM , ▲ 10 μM , ◇ 100 μM , □ 250 μM , ● 1 000 μM , △ 10 000 μM , ◆ 100 000 μM .

En las cinéticas de producción de H_2S_{biog} presentadas en la Figuras 7 y 8 se observó una producción constante de H_2S_{biog} a partir de las primeras 24 h para los sistemas que fueron inoculados con concentraciones iniciales $\leq 250 \mu M$ de As (III), sin embargo, es notorio que

conforme la concentración de As (III) adicionada al sistema aumenta, la concentración de H_2S_{biog} disminuye. Para dichas concentraciones se podría indicar que el As (III) no presenta una inhibición significativa en la producción de H_2S_{biog} con respecto a las concentraciones más altas de As (III) adicionadas inicialmente, que para este estudio fueron de 1 000, 10 000 y 100 000 μM , y por tanto, se genera la coexistencia de As (III) y H_2S_{biog} en solución lo que permite alcanzar las concentraciones en solución suficientes para lograr la precipitación de polisulfuros a partir de las primeras horas de iniciada la cinética. Este proceso de precipitación se presentó a partir de las 50 h para concentraciones de As (III) de 250 μM (Figura 9). En el caso de las concentraciones iniciales de 1 000, 10 000 y 100 000 μM As (III), se observó una inhibición considerable en la producción de H_2S_{biog} , esto debido al efecto tóxico que estas concentraciones presentan en el desarrollo microbiano de los consorcios, sin embargo, se observó la presencia de formación de precipitados en el sistema que contenía una concentración de 1 000 μM de As, lo que podría indicar que el H_2S_{biog} generado precipita de manera inmediata y por tanto, no era cuantificado en solución, asimismo, se observa un efecto tóxico en la producción de biomasa en estas concentraciones que corresponde a 100, 100 y 133 mg/L de SSV respectivamente (Tabla 5).



Figura 9.- Evidencia de formación de precipitados a las 50 h de iniciada la cinética [1 000 μM de As (III)].

El comportamiento en la producción de biomasa en forma de SSV asociado a la concentración inicial de As (III) se presenta en la Tabla 5 para ambos consorcios microbianos.

El comportamiento en las concentraciones de SSV indica que conforme disminuye la concentración inicial de As (III) aumenta la concentración de SSV, esto se debe a que

concentraciones bajas de As generan un ambiente libre de la toxicidad de H_2S_{biog} y As debido a la precipitación, lo cual favorece el desarrollo microbiano.

Tabla 5.-Concentraciones de biomasa en forma de SSV al final de la cinética (430 h) en presencia de As (III).

Concentración μM de As (III)	Consortio JH SSV (mg/L)	Consortio M2 SSV (mg/L)
0	433	433
1	367	333
10	367	300
100	300	267
250	200	167
1 000	167	133
10 000	100	100
100 000	100	100

Las concentraciones de SSV obtenidas en los sistemas inoculados con concentraciones iniciales $\geq 1\ 000\ \mu M$ de As (III) son similares a las concentraciones obtenidas en los sistemas inoculados con As (V), estas concentraciones de SSV van de 100 a 167 mg/L. En los sistemas inoculados con concentraciones $\leq 250\ \mu M$ de As, las concentraciones de SSV en presencia de As (V) son relativamente mayores (233 a 433 mg/L) en comparación con los sistemas inoculados con dichas concentraciones de As (III) (200 a 367 mg/L), lo cual indica una mayor inhibición en el desarrollo microbiano por la presencia de As (III). También se observó que la presencia de As tiene un mayor efecto inhibitorio en el desarrollo microbiano del consorcio M2 en comparación con el consorcio JH. Al respecto, Kieu *et al.* (2013) mencionan que el impacto de los metales pesados en los microorganismos está clasificado como tóxico (cuando se causa la muerte) y/o inhibidor (cuando causa una reducción en la actividad metabólica) y reportaron, en un biorreactor anaerobio de tanque agitado con actividad sulfato reductora operado durante 12 semanas, que concentraciones de 6 mg/L/d de Cu^2 , Zn^2 , Ni^2 y Cr^6 presentan un efecto inhibitorio en la reducción de sulfato, la eliminación de metales y en el desarrollo microbiano; mientras que a una concentración de 7.5 mg/L/d se presentó un efecto tóxico sobre los microorganismos presentes en el biorreactor, con concentraciones de metales adicionados de 3 mg/L/d, 6 mg/L/d y 7.5 mg/L/d se determinaron concentraciones de H_2S en solución durante el tratamiento de entre 250-300 mg/L, <250 mg/L y de entre 280 a 0 mg/L respectivamente. Esto concuerda con la relación establecida en los sistemas a los cuales se

les adicionaron concentraciones de 10 000 y 100 000 μM de As (V) y As (III) en las cuales la producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog.}}$ fue relativamente baja en comparación con sistemas con concentraciones menores de As, indicando un efecto inhibitorio por parte del As que se ve reflejado en el desarrollo microbiano. Se ha reportado que no sólo los iones metálicos solubles pueden ser tóxicos o generar inhibición, los compuestos metálicos insolubles, especialmente sulfuros metálicos, podrían afectar a la actividad de BSR por su deposición en la superficie de las células, ya que bloquean el acceso al sustrato y otros nutrientes (Kieu *et al.*, 2013). Este podría ser otro agente limitante en la producción de biomasa cuando se forman los precipitados de As en los sistemas batch a parte de la presencia de As en solución.

Los resultados de producción de biomasa del consorcio JH y M2 en presencia de As (III) fueron normalizados y ajustados utilizando un modelo logístico dosis-respuesta. En base a los resultados se generó la gráfica de decaimiento logístico de biomasa para los dos consorcios, la cual se presenta en la Figura 10. Este ajuste se realizó para establecer las concentraciones de As (III) a la cual se presenta una inhibición del 50% en la producción de biomasa (IC_{50}).

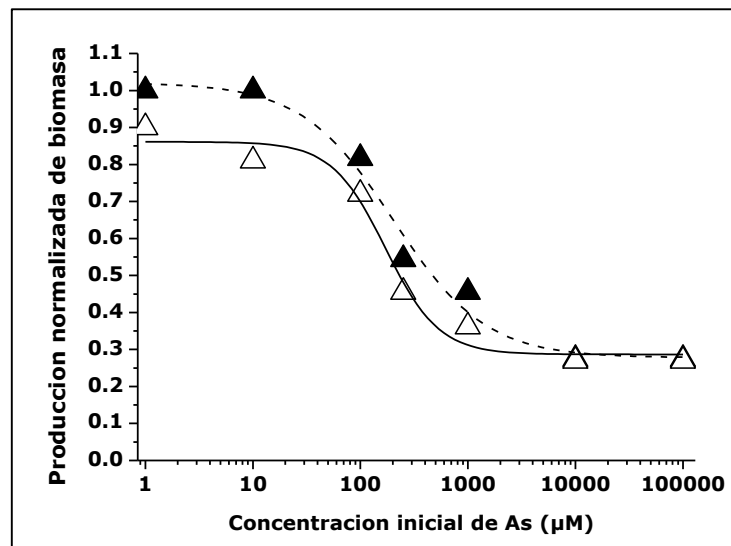


Figura 10.- Ajuste con el modelo de decaimiento logístico para los consorcios JH y M2 en presencia de As (III). Dónde: \blacktriangle Consorcio JH y \triangle Consorcio M2.

Tabla 6.- Estimación de la concentración máxima inhibitoria de As (III) en el desarrollo microbiano (IC_{50} para los consorcios JH y M2).

Consortorio	IC_{50} [As(III)] μ M	R^2
JH	202	0.967
M2	170	0.961

En base a los resultados del ajuste realizado con el modelo dosis-respuesta presentados en la Tabla 6, para el consorcio JH se determinó que el IC_{50} es de 202 μ M y para el consorcio microbiano M2 fue de 170 μ M de As (III). Estos valores de IC_{50} son menores a los determinados para As (V) (232 μ M para el consorcio JH y 212 μ M para el consorcio M2). Al respecto, Newman (1997a) reportó que la BSR *Desulfotomaculum Auripigmentum* presentó una concentración inhibitoria en la producción de sulfato cuando se exponía a concentraciones superiores a 5 000 μ M de As (V) usando lactato como donador de electrones, asimismo, Dowdle *et al.* (1996), reportaron que DASRBs presentes en sedimentos anòxicos de un lago salino adicionados con As presentaron una inhibición completa en sus reacciones de sulfato reducción cuando se expusieron a concentraciones de 8 000 y 10 000 μ M de As (III) y As (V) respectivamente, sulfato 16 mM y lactato 10 mM a comparación de un control en el cual se adicionaron solo el lactato y el sulfato, en el cual, a los 7 días, el sulfato había sido eliminado por completo de la solución, de igual manera, comprobaron que usando lactato como donador de electrones lograron una reducción completa del As (V) en los primeros 4 días de experimentación. Es importante mencionar que estas son concentraciones altas de As adicionadas a los sedimentos para promover la actividad microbiana, sin embargo, no se reportan las concentraciones móviles de los sitios de donde fueron aislados estos microorganismos. Los valores de IC_{50} determinados en el presente estudio sugieren una mayor tolerancia a la presencia de As (V) y As (III) por parte del consorcio JH comparándolo con el consorcio M2, y esto se relaciona con las fracciones bioaccesible de As reportadas en el suelo del que fue aislado JH (30.8 mg/Kg) en comparación con la fracción bioaccesible del suelo de donde fue aislado el consorcio M2 (20.6 mg/Kg), asimismo estos resultados se relacionan con las fracciones móviles de As de los suelos de donde fueron aislados estos consorcios que fueron de 0.41mmol/Kg de suelo para JH y de 0.27 mmol/kg de suelo para

M2, que son concentraciones de As cercanas a los valores de IC_{50} obtenidos (Labastida *et al.*, 2007). Por lo tanto, la exposición a estas concentraciones de As sugiere que la energía que se obtiene por los procesos metabólicos se distribuye principalmente para el mantenimiento celular (metabolismo catabólico) y no para la biosíntesis (metabolismo anabólico).

6.1.1 Estimación de las velocidades de producción específica de sulfuro (PHS)

Las concentraciones de PHS obtenidas para cada concentración de As (V) fueron ajustadas con el modelo sigmoide de Gompertz. El ajuste permitió estimar la velocidad máxima de producción de sulfuro (r_{max}) en cada condición de concentración de As (V). La r_{max} está expresada en $\text{mmol H}_2\text{S g}^{-1} \text{SSV h}^{-1}$ y puede ser calculada con los parámetros del modelo con la siguiente expresión:

$$r_{max} = 0.386 ak$$

En la cual se utilizan los valores de la constante cinética de primer orden (k) y la concentración máxima de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ (a) (Labastida *et. al.*, 2013).

En la Figura 11 se muestran los resultados del ajuste con el modelo de crecimiento de Gompertz para los consorcios JH y M2 en presencia de As (V) y en la Tabla 7 se presentan los parámetros cinéticos obtenidos de dicho ajuste.

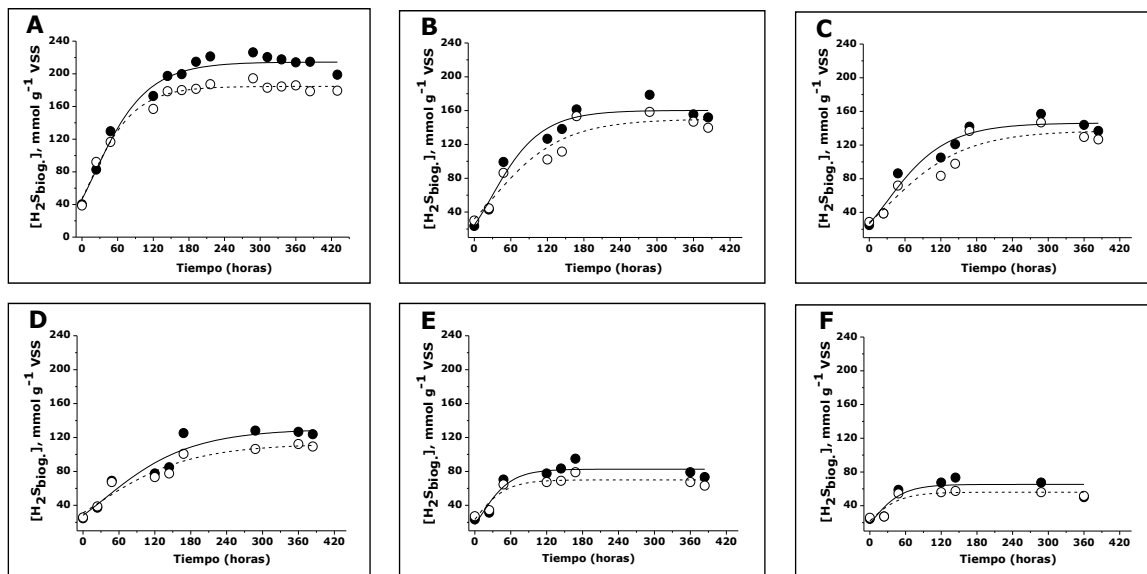


Figura 11.- Ajustes con el modelo de crecimiento sigmoide de Gompertz en presencia de As (V). Dónde: ● consorcio JH y ○ consorcio M2.

Tabla 7.-Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste con el modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz en presencia de As (V) para los consorcios JH y M2.

		[As] μM	a	k (h^{-1})	r_{max} ($\text{mmol H}_2\text{S}_{\text{biog.}}$ g^{-1} VSS)	t_c (h)	R
JH	A	0	214.4	0.019	1.64	21.7	0.974
	B	1	160.3	0.021	1.33	29.1	0.934
	C	10	146.2	0.018	0.99	30.6	0.930
	D	100	130.2	0.012	0.60	35.9	0.896
	E	250	82.7	0.035	1.12	12.5	0.846
	F	1 000	65.3	0.035	0.87	6.1	0.671
M2	A	0	184.6	0.023	1.62	21.7	0.976
	B	1	150.1	0.015	0.88	28.9	0.893
	C	10	137.3	0.014	0.72	33.8	0.867
	D	100	112.7	0.011	0.48	22.8	0.921
	E	250	70.0	0.035	0.94	2.7	0.820
	F	1 000	56.1	0.034	0.72	-1.9	0.753

Los valores de PHS obtenidos en los sistemas que fueron inoculados con As (III) se ajustaron con el modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz, las gráficas del ajuste se presentan en la Figura 12. Asimismo se presentan los parámetros cinéticos obtenidos de dicho ajuste en la Tabla 8.

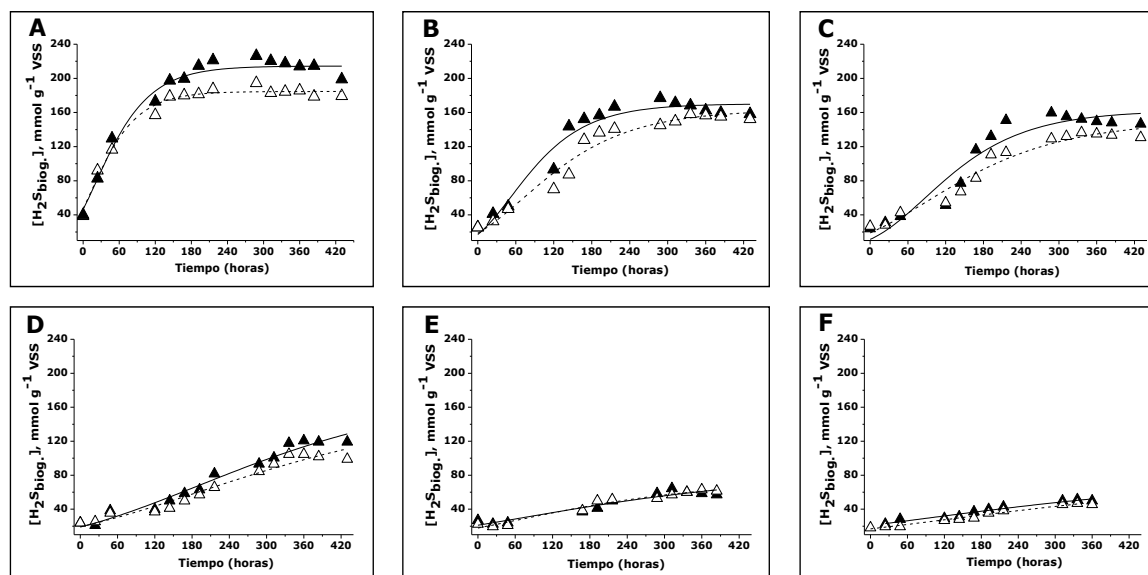
**Figura 12.-** Ajustes con el modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz en presencia de As (III). Dónde: \blacktriangle consorcio JH y \triangle consorcio M2.

Tabla 8.- Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste con el modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz en presencia de As (III) para los consorcios JH y M2.

		[As] μM	a	k (h^{-1})	r_{max} ($\text{mmol H}_2\text{S}_{\text{biog}} \text{g}^{-1} \text{VSS}$)	t_c (h)	R
JH	A	0	213.2	0.019	1.64	13.6	0.973
	B	1	170.2	0.015	1.02	53.9	0.951
	C	10	162.3	0.011	0.71	87.0	0.911
	D	100	182.9	0.004	0.30	188.7	0.966
	E	250	83.6	0.004	0.13	77.9	0.902
	F	1 000	78.6	0.003	0.10	86.6	0.946
M2	A	0	184.4	0.022	1.60	13.6	0.975
	B	1	163.3	0.011	0.68	72.6	0.956
	C	10	150.3	0.008	0.47	89.1	0.954
	D	100	162.4	0.004	0.25	188.6	0.946
	E	250	74.7	0.005	0.16	65.2	0.957
	F	1 000	76.1	0.003	0.10	125.5	0.973

En los sistemas sin As (sistemas control) se determinaron velocidades máximas de producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ (r_{max}) similares para ambos consorcios (1.64 y 1.62 $\text{mmol H}_2\text{S}_{\text{biog}} \text{g}^{-1} \text{VSS}$). Mientras tanto, en presencia de As (V) los valores de r_{max} disminuyen conforme la concentración de As aumenta hasta 100 μM de As para ambos consorcios. Por encima de esta concentración, y específicamente a 250 μM , la r_{max} aumento hasta valores de 1.1 y 0.94 $\text{mmol H}_2\text{S}_{\text{biog}} \text{g}^{-1} \text{VSS}$ para JH y M2 respectivamente, con una disminución repentina a concentraciones de 1 000 μM en ambos consorcios, esto podría sugerir la presencia de un mecanismo de tolerancia a As que se activa en un umbral de concentración aproximado a 250 μM de As (V), aumentando la producción $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ para contrarrestar el efecto tóxico del As, este mismo comportamiento en la r_{max} se reportó para el consorcio M2 en presencia de distintas concentraciones de Pb (Labastida *et al.*, 2013). Para el caso de los sistemas en presencia de As (III), los valores de r_{max} disminuyen conforme aumenta la concentración inicial de As, siendo las mayores r_{max} de 1.01 y 0.67 $\text{mmol H}_2\text{S}_{\text{biog}} \text{g}^{-1} \text{VSS}$ para JH y M2 respectivamente, y presentándose a una concentración inicial de 1 μM de As.

Como se presenta en la Tabla 7 y 8, los valores de r_{max} obtenidos con el consorcio M2 son menores a los valores de r_{max} obtenidos con el consorcio JH en concentraciones iniciales de 1, 10, 100, 250 y 1 000 μM de As (V) o As (III), estos resultados también indican que existe una mayor inhibición en la producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ por la presencia de As (III) en

comparación con los sistemas que contenían As (V). Los resultados de PHS a concentraciones de 10 000 y 100 000 μM de As (V) y As (III) no presentaron un ajusté adecuado con el modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz debido al efecto inhibitorio observado, por tanto, los resultados no fueron considerados en esta parte de la investigación.

6.1.2 Concentraciones de As soluble y porcentajes de bioprecipitación de As

Se determinaron las concentraciones de As total en las soluciones con las cuales se llevó a cabo la inoculación de As (V) y As (III) ([As] inicial) en los sistemas al inicio de la cinética producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$, así como las concentraciones de As determinadas al final de la cinética de producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ ([As] final) y se calcularon los porcentajes de precipitación de As. Estos resultados se presentan en la Tabla 9 para el consorcio JH y en la Tabla 10 para el consorcio M2.

Tabla 9.- [As] inicial, [As] final y porcentaje de As precipitado para el consorcio JH.

[As] μM	([As] inicial) mg/L	([As] final) mg/L	% de precipitación
Arsénico (V)			
1	0.304	0.02	93.4
10	0.93	0.127	87.2
100	8.77	1.32	84.9
250	19.47	2.74	85.9
1 000	83.6	50.5	39.6
10 000	750	634	15.5
100 000	7500	6590	12.1
Arsénico (III)			
1	0.179	0.013	92.7
10	0.825	0.1	87.9
100	6.92	1.26	81.8
250	18.41	5.1	71.7
1 000	77.8	46.2	40.6
10 00	692	498	28.0
100 000	6920	5730	17.2

En base a los resultados presentados de las Tablas 9 y 10 se graficaron los porcentajes de precipitación de As (V) para los dos consorcios microbianos, los cuales se presentan en la Figura 13 mientras que los porcentajes de precipitación de As (III) se presentan en la Figura 14, en base a dichos resultados se observó que los mayores porcentajes de precipitación se

presentaron cuando los sistemas se inocularon con As (V), obteniendo un porcentaje máximo de precipitación de 93.4 % para el consorcio JH y 94.1% para el consorcio M2 en presencia de una concentración inicial de 1 μM de As. En los sistemas inoculados con As (III) se obtuvieron porcentajes máximos de precipitación a una concentración de 1 μM del 92.7 y 91.6 % para el consorcio JH y M2 respectivamente.

Tabla 10.- [As] inicial, [As] final y porcentaje de As precipitado para el consorcio M2.

[As] μM	([As] inicial) mg/L	([As] final) mg/L	% de precipitación
Arsénico (V)			
1	0.304	0.018	94.1
10	0.993	0.14	85.9
100	8.77	1.02	88.4
250	19.47	2.3	88.2
1 000	83.6	57.9	30.7
10 000	750	645	14.0
100 000	7500	6560	12.5
Arsénico (III)			
1	0.179	0.015	91.6
10	0.825	0.09	89.1
100	6.92	1.03	85.1
250	18.42	6.35	64.7
1 000	77.8	46.3	40.5
10 000	692	578	16.5
100 000	6920	6200	10.4

En el caso de los sistemas inoculados con concentraciones de 1, 10, 100 y 250 μM de As (V) se observó que los porcentajes de precipitación oscilan entre los 71 y 94% para los dos consorcios, lo cual nos indica que a estas concentraciones no se tuvo un proceso inhibitorio en el desarrollo microbiano y en la producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$, ya que se produce la cantidad de sulfuro necesaria para obtener dichos porcentajes de precipitación, sin embargo, a concentraciones iniciales de 1 000, 10 000 y 100 000 μM de As (V) los porcentajes de precipitación oscilan entre 12 y 39% para los dos consorcios, lo cual nos indica que existe un proceso inhibitorio en el desarrollo microbiano así como en el proceso de producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ generando porcentajes bajos de precipitación de As.

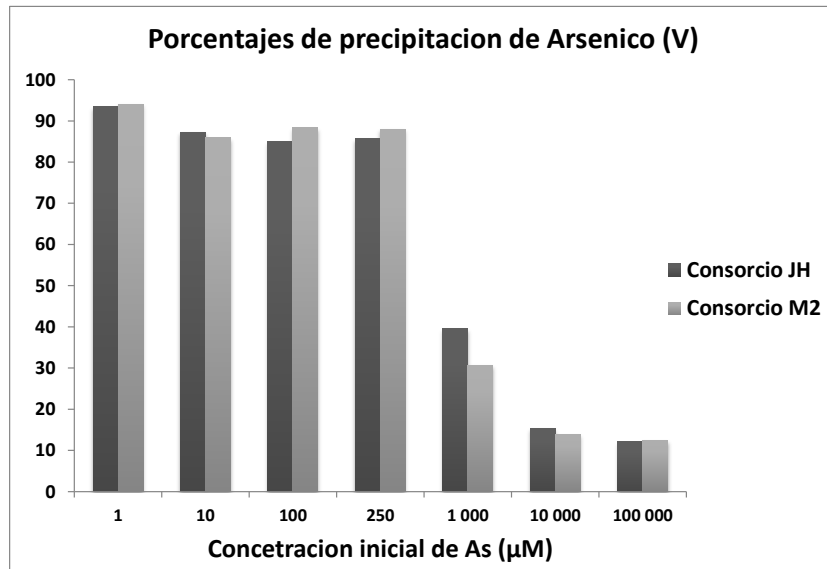


Figura 13.- Porcentajes de precipitación de As (V) de los consorcios microbianos JH y M2.

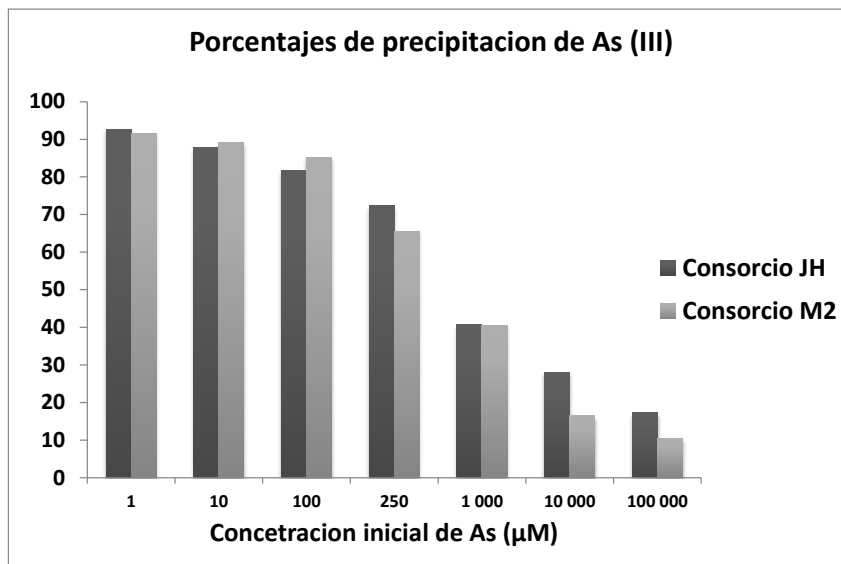


Figura 14.- Porcentajes de precipitación de As (III) de los consorcios microbianos JH y M2.

En el caso de los sistemas inoculados con concentraciones iniciales de 1, 10 y 100 μM de As (III) se determinó que los porcentajes de precipitación son de entre 82 y 91%. En el caso de la concentración de 250 μM de As (III), los porcentajes de precipitación para los dos consorcios (71 y 64 %) son menores a los obtenidos con la misma concentración de As (V) (85 y 88%) lo cual indica un mayor efecto tóxico inhibitorio por parte del As (III) a comparación del As (V). Para las concentraciones iniciales de 1 000, 10 000 y 100 000 μM de As (III) se obtuvieron porcentajes de precipitación bajos para los dos consorcios, los cuales

van del 10 al 40%, observando un efecto inhibitorio en el desarrollo microbiano y en la producción de H_2S_{biog} en comparación con concentraciones menores de As (III) utilizadas en este estudio. Se observa también que el consorcio JH presenta mejores porcentajes de precipitación de As (V) y As (III) cuando se expone a altas concentraciones de As, lo cual podría indicar de igual manera que en los resultados del IC_{50} que este consorcio presenta mayor diversidad microbiana tolerante a altas concentraciones de As.

Al respecto Uhrie *et al.* (1996) reportaron que después de 6 días de incubación, el 96% de As de una concentración inicial de 133 μM había sido precipitado en solución en botellas de suero que contienen biomasa de BSR sulfidogénicas activas, esto en presencia de lactato y sulfato a pE de -300 mV y pH ligeramente básico. Asimismo, Jong y Parry (2003) reportaron porcentajes de precipitación de As superiores a 77.5 % dados en 14 días y partiendo de una concentración inicial de 141 μM presentes en un efluente que también contenía Zn, Cu, Fe, Ni y Al, esto usando lactato como donador de electrones en un biorreactor, los resultados de estos autores se correlacionan con concentraciones cercanas utilizadas en esta investigación (100 μM de As) en las cuales se determinaron porcentajes de precipitación de As c. a. 86 % para As (V) y c. a. 84 % para As (III), y que en comparación con lo que reportaron Jong y Parry, se presentaron mejores porcentajes de bioestabilización para los consorcios JH y M2.

Asimismo, Belin *et al.* (1993) lograron una reducción en la concentración de As de 961 μM a 26.7 μM de agua industrial residual usando un reactor de dos etapas, esta eliminación se dio principalmente por la formación de sulfuro de As del tipo oropimente (As_2S_3), esto en comparación con la concentración más cercana de As utilizada en el presente estudio (1 000 μM) indica que a dicha concentración ya existe un efecto tóxico para los consorcios JH y M2, ya que a esta concentración se presentaron porcentajes de precipitación máximas c. a. 40% para As (V) y As (III). Asimismo, Teclu *et al.* (2008) utilizaron un consorcio sulfato reductor para lograr eliminar As en porcentajes de un 55% de As (III) y 77% de As (V) de una concentración inicial de 13 μM , esto lo realizó en reactores discontinuos mediante la formación de sulfuros de As y adsorción en biomasa, reportando que el 6.6 y 10.5 % de As (V) y As (III) respectivamente fue eliminado por adsorción en biomasa de BSR, por tanto,

para los sistemas preparados en este estudio se debe considerar que cierto porcentaje del As removido de los sistemas pudiera estar adsorbido en la biomasa de los consorcios JH y M2.

Se ha reportado de la remoción de concentraciones de hasta 1 335 μM de As (V) en reactores de película fija con BSR capaces de reducir de manera desasimilatoria el As (V) utilizando glicerol como donador de electrones y pH de 2.7 a 5, lo que indica que cierto tipo de BSR son capaces de tolerar concentraciones altas de As cuando se manejan de manera adecuada las condiciones de desarrollo (Battaglia-Brunet *et al.*, 2012), asimismo, Newman *et al.* (1997a), reportaron que *Desulfotomaculum auripigmentum* promueve la remoción de As (V) presente en una concentración de 1 000 - 5 000 μM , logrando porcentajes de precipitación de As ca. 100% en forma de As_2S_3 . Para el caso de este estudio, la concentración más cercana a la utilizada por Battaglia-Brunet *et al.* y Newman *et al.* fue la de 74.9 mg/l (1 000 μM) en la cual se obtuvieron porcentajes de precipitación de As (V) de 39% para JH y 30% para M2, este podría mejorar si se revisa la concentración de sulfato en el sistema necesario para la precipitación de esta concentración de As y si se monitorea el pH de las soluciones, ya que la estabilidad de este tipo de precipitados depende en gran medida de las condiciones redox y el pH generados en el sistema. Esto también lo mencionan Kirk *et al.* (2010) en un estudio con biorreactores, en los que demostraron que un menor contenido de sulfuro puede favorecer la formación de oropimente y rejalgar. Esta relación se debe a que la acumulación de sulfuro finalmente permite la formación de sulfuros de As, pero a su vez mejorara la solubilidad del As, asimismo, menciona que la precipitación de sulfuros de As es más probable a $\text{pH} < 7$ y genera mejor estabilidad de los mismos, en este mismo estudio, no se logró precipitar completamente una concentración de 7.5 μM de As (V) adicionada cada 7 días, aun cuando fue reducido a As (III) de manera desasimilatoria en un biorreactor generando concentraciones de As (III) libres mínimas de 3.4 μM , con presencia de 0.05 y 0.15 mM de sulfuro como concentraciones de saturación en la formación de sulfuros de As y la formación de solo 1.4 μM de oropimente, esto se presentó por la falta de estabilidad en los sulfuros de As producidos, esta falta de estabilidad debida en gran medida a la gran cantidad de sulfuro producido y acumulado dentro del reactor.

Se han reportado microorganismos que toleran altas concentraciones de As que no pertenecen a géneros de BSR, pero si a las DASRB, tal es el caso de *Bacillus sp. SF-1*, este

microorganismo fue reportado por Soda *et al.* (2005) como una cepa bacteriana que puede crecer utilizando lactato como donador de electrones y fuente de carbono durante el uso de arseniato como aceptor de electrones, incluso a concentraciones muy altas (20 a 260 μM de As (V)). Para este estudio, la concentración cercana a la usada por Soda *et al.* es de 10 000 μM (749 mg/L), concentración a la cual la PHS y el desarrollo microbiano se vieron inhibidos de manera considerable, generando porcentajes de remoción de As ca. 15%, mientras que *Bacillus sp. SF-1* logro reducir por completo las concentraciones de As adicionadas en su estudio. Sin embargo, Macy *et al.* (2000), utilizaron 2 microorganismos DAsRB para demostrar los mecanismos implicados en la reducción de As, observando que cuando se cultivan con lactato (21.2 mM), arseniato (9 200 μM), sulfuro (2 mM) y sulfato (16.9 mM), después de 60 h de incubación, estos 2 microorganismos lograron reducciones en la concentración de As del 66 % y 37 % en forma de As_2S_3 . Estos porcentajes de precipitación pudieron estar influenciados por la adición de sulfuro o por el uso de cultivos puros de BSR. Asimismo, Chang *et al.* (2012) lograron el aislamiento de una bacteria DAsRB perteneciente al género de anaerobios *Citrobacter* que puede reducir concentraciones de 20 000 μM de As en 24 h y presentó actividad reductora de As hasta concentraciones de 60 000 μM usando glucosa como donador de electrones, esto en comparación con lo obtenido usando los consorcios JH y M2 en los que la mayor concentración fue de 100 000 μM y presentaron una inhibición considerable en la actividad sulfato reductora y en la precipitación de As, lo que indica que sería necesario estandarizar las condiciones de crecimiento de estos consorcios para poder considerarse en proceso de remoción de As en el cual sean expuestos a concentraciones superiores a 1 000 μM de As en sistemas en los cuales estén en contacto con el metaloide o considerar un proceso en el cual estos consorcios no estén en contacto con el As.

6.1.3 Microanálisis, identificación y observación de fases mineralógicas de As

Los precipitados obtenidos al finalizar la cinética de producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ fueron analizados mediante EDS-MEB para determinar la conformación de los mismos y caracterizar el tipo de precipitado que se formó durante la cinética. Los resultados obtenidos a una concentración de 250 μM de As (V) y As (III) se muestran en las Figuras 15 y 16 respectivamente.

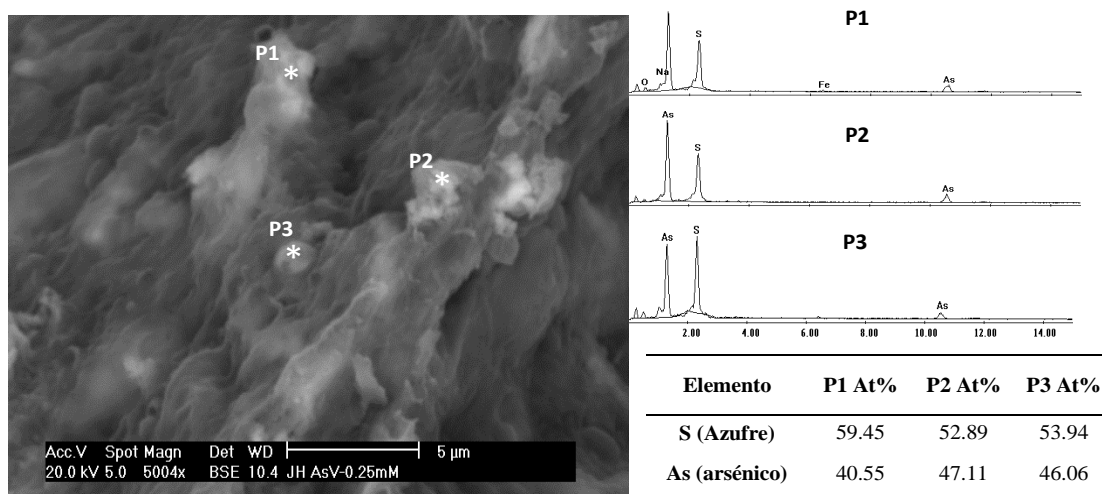


Figura 15.- Micrografía electrónica de barrido de las partículas sólidas recuperadas de los sistemas inoculados con 250 μ M de As (V) y análisis EDS (derecha) que sugiere la presencia de sulfuros de As del tipo oropimente (P1) y rejalgar (P2 y P3).

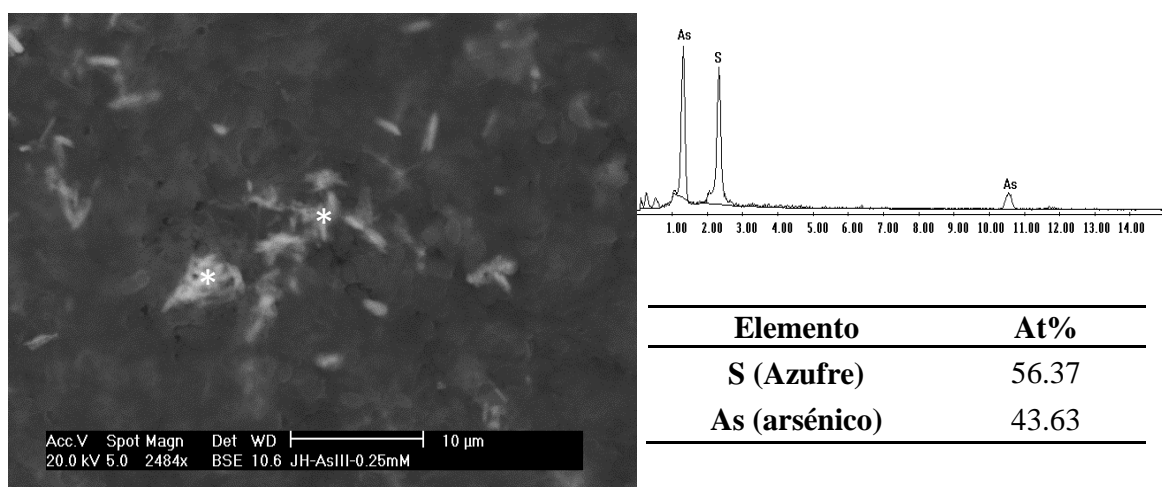


Figura 16.- Micrografía electrónica de barrido de las partículas sólidas recuperadas de los sistemas inoculados con 250 μ M de As (III) y análisis EDS (derecha) que sugiere la presencia de sulfuros de As del tipo oropimente.

El microanálisis químico utilizando EDS-MEB que se muestra en la Figura 15 muestra una asociación atómica porcentual entre el azufre (59.45 %) y el As (40.55 %) para el punto analizado (P1), lo que sugiere la formación de fases de sulfuro de As tipo oropimente (As_2S_3), mientras que en los otros dos puntos analizados se muestra una asociación porcentual de azufre 52.89 % (P2) y 53.94% (P3), y As de 47.11 % (P2) y 46.06% (P3), lo que sugiere la formación de fases de sulfuro de As tipo rejalgar (AsS). En microanálisis que se presenta en

la Figura 16 muestra una asociación atómica de azufre de 56.37% y As de 43.63%, lo que sugiere la presencia de sulfuros de As tipo oropimente (As_2S_3) cuando se adiciona As (III).

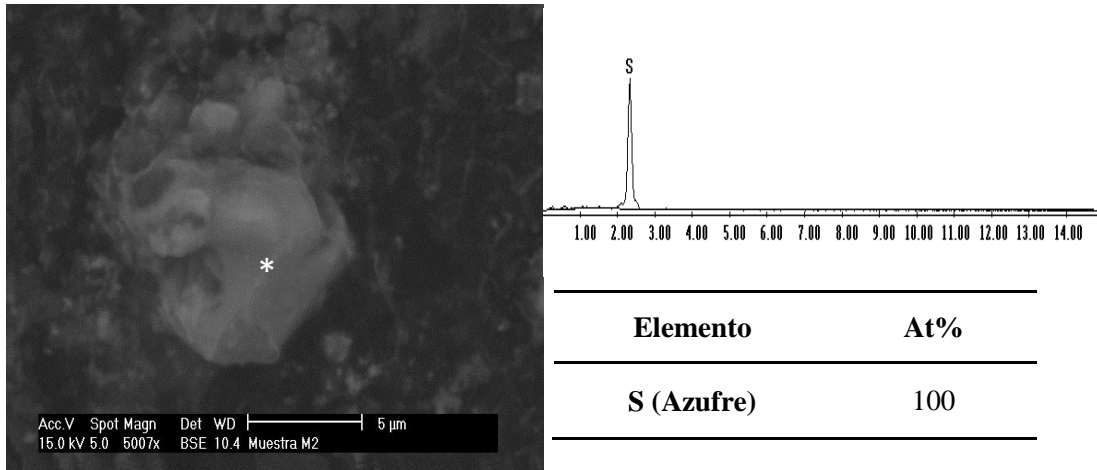


Figura 17.- Micrografía electrónica de barrido de las partículas sólidas recuperadas de los sistemas inoculados con 250 μ M de As (V) y análisis EDS (derecha) que documenta la presencia de S elemental.

Los resultados de EDS-MEB presentados en la Figura 15 sugieren un mecanismo extracelular de tolerancia a As, que genera la precipitación de As en forma de sulfuros tipo rejalgar (AsS) y oropimente (As_2S_3), presentando una etapa intermedia de formación de S elemental, en los casos donde el As se introduce como As (V), cuya evidencia se presenta en Figura 17, la presencia de S elemental no se determinó cuando los sistemas fueron inoculados con As (III).

Las observaciones anteriores, son muy similares a lo observado por otros autores, por ejemplo: Thomson *et al.* (2001) reportaron la formación de sulfuros de As tipo AsS y As_2S_3 con la presencia de S en un soporte de biomasa de BSR durante la remoción de As (V) en concentraciones de 5 mg/L usando lactato como donador de electrones. Onstott *et al.* (2011) reportaron la presencia de S en sedimentos adicionados con sulfato y lactato como donador de electrones con precipitación de As en forma de AsS y Newman (1997b) reportó la formación As_2S_3 y la presencia de S en sistemas con condiciones de donadores y receptores de electrones similares en presencia de un inóculo de *D. auripigmentum* con actividad DAsRB.

6.2 Cinética de especiación de As y evaluación de la diversidad microbiana durante el proceso de bioestabilización de As (V)

6.2.1 Cinéticas de especiación de As para el consorcio microbiano JH

En la cinética de producción de PHS presentada en la Figura 18 A para el consorcio JH, se determinó un comportamiento similar al presentado en la cinética realizada en la primer etapa experimental de este proyecto (Sección 6.1), en el cual se observó una etapa de acondicionamiento por parte de los microorganismos, posteriormente, se presentó una etapa de producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ en la cual se determinó un máximo de 214, 153, 118 y 43 mmol g^{-1} SSV para concentraciones iniciales de As (V) de 0, 1, 250 y 10 000 μM respectivamente, posteriormente, se presentó una etapa de reducción de As (V) a As (III), y un proceso de bioestabilización de As en forma de polisulfuros de As fue evidente a partir de las 140 h de iniciada la cinética en sistemas que presentaron una concentración de 250 μM de As (V). Dichas etapas no se presentaron en el sistema que no contenía As (V) y no se observaron de manera clara en los sistemas con concentraciones iniciales de As de 10 000 μM , en donde el efecto tóxico del metaloide fue considerable, este efecto tóxico se observó en las concentraciones de PHS obtenidas para estos sistemas, determinando un máximo de 43 mmol g^{-1} SSV así como en las concentraciones de SSV presentados en la Figura 18 C en la cual se determinaron 166 mg/L de SSV. Las distintas etapas presentadas durante la cinética de PHS fueron discutidas en la sección 6.1. En cuanto a los valores de pH determinados durante la cinética (Figura 18 B), no se observó una tendencia en los valores obtenidos, sin embargo, para el sistema sin As se determinó una caída en el pH, llegando a un pH de 6.53 hasta aproximadamente las 80 h, posterior a dicho tiempo, el pH aumentó constantemente hasta las 240 h alcanzo un pH de 7.15 y posteriormente empezó a decrecer al final de la cinética, determinando un pH final en el sistema de 6.91. Los pHs determinados para este sistema se correlacionan con el pH idóneo para el desarrollo de BSR que es de entre 6.5 y 7.8.

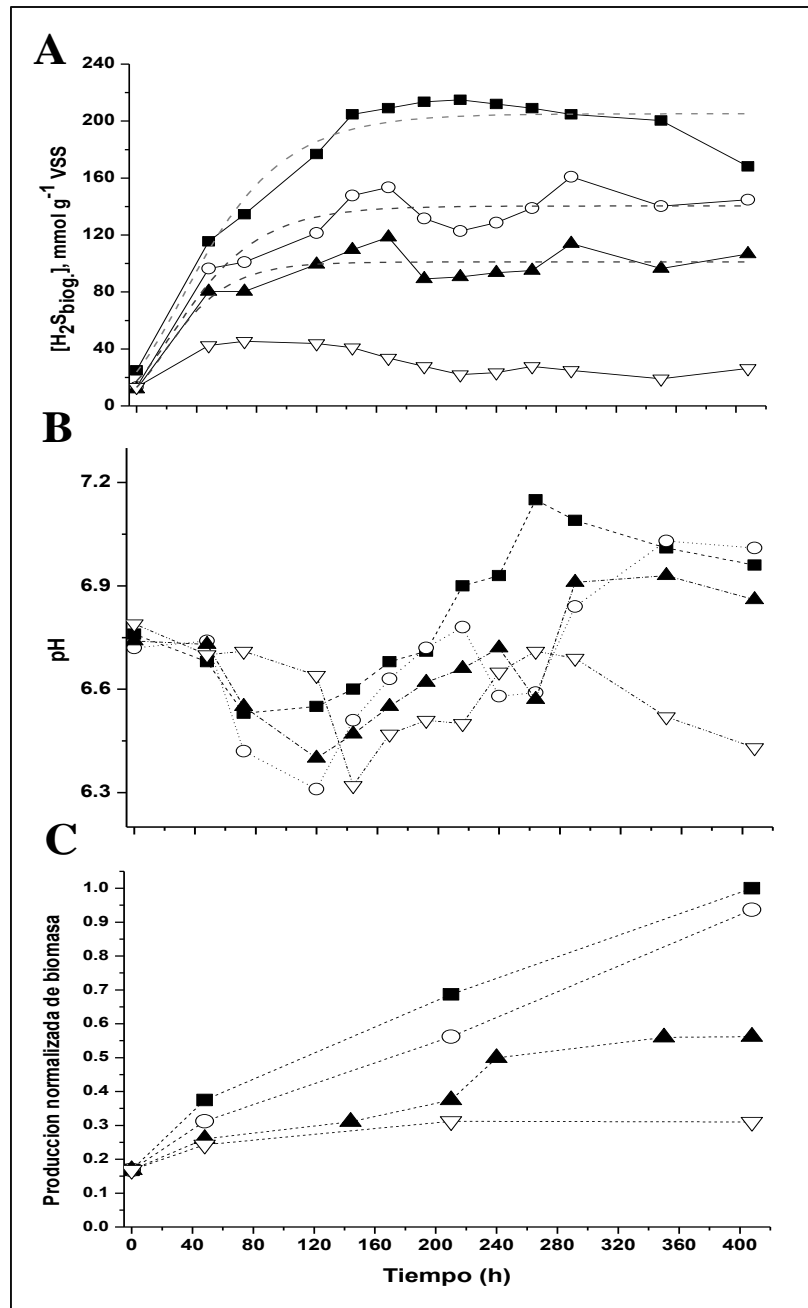


Figura 18.- Cinética de producción específica de H_2S_{biog} (A), determinación de pH (B) y Producción de biomasa medida en forma de SSV (C) en presencia de As (V) obtenida con el consorcio JH. Dónde: ■ 0 μM , ○ 10 μM , ▲ 250 μM y ▽ 10 000 μM .

Para los sistemas con concentraciones iniciales de As de 10 y 250 μM , se observó que posterior a la primer caída en la PHS (192 h), el pH comenzó a aumentar hasta 6.8 y 6.7 respectivamente, y disminuyó hasta 6.5 antes de que se presentara la segunda caída en la PHS (264 h), posterior a esta segunda caída, el pH aumentó nuevamente hasta 7.03 y 6.93

respectivamente, obteniendo un pH al final de la cinética de 7.01 y 6.83 respectivamente, este comportamiento no se presentó en el sistema con concentración inicial de 10 000 μM , ya que el pH decreció abruptamente antes de la primer caída en la PHS de 6.7 a 6.3 para posteriormente aumentar paulatinamente y decaer al final de la cinética. La prueba de correlación de Spearman para los sistemas que presentan una concentración inicial de As (V) de 250 μM determinó una correlación negativa entre la concentración de As (III) presente en el sistema y el pH lo que indicó que conforme aumenta o disminuye la concentración del As (III) en el sistema, el pH se comporta de manera opuesta ($p < 0.05$), lo que indicó que después de una pérdida de As (III) por bioestabilización el pH tiende a aumentar hacia el pH óptimo en el sistema, que en este caso es el pH de los sistemas que no presentan As.

En cuanto a la producción de SSV, se observó un comportamiento similar para los sistemas con concentraciones iniciales de 0 y 10 μM determinando concentraciones máximas al final de la cinética de 533 y 500 mg/L respectivamente, mientras que para el sistema con concentración inicial de As de 250 μM se observó un aumento en la producción de biomasa evidente a las 240 h, tiempo en el cual se reportó una concentración de 200 mg/l, este tiempo es posterior a la primer caída en la PHS (192 h), lo que generó que el efecto tóxico que el As y el $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ presentan en los microorganismos disminuyera y por tanto la producción de SSV aumentara hasta 300 mg/L al final de la cinética, este efecto no se observó en los sistemas con concentraciones iniciales de As de 0 y 10 μM , sin embargo, en el sistema con concentración inicial de As de 10 000 μM , la concentración de biomasa se mantuvo constante, lo que indicó que posiblemente, los procesos metabólicos presentes estaban enfocados a generar un ambiente libre de toxicidad por parte del As (V) y no para procesos metabólicos que generen un aumento en el desarrollo microbiano, obteniendo una concentración de 166 mg/L de SSV al final de la cinética, por tanto, es evidente el efecto tóxico del As (V) en el desarrollo de biomasa a una concentración inicial de 10 000 μM , esto se observó también en la PHS para estos sistemas, ya que las concentraciones obtenidas fueron menores a las obtenidas para los sistemas inoculados con menor concentración inicial de As (V), sin embargo, durante el proceso de especiación de As se determinó que las concentraciones de As (V) removido eran superiores a las alcanzadas en sistemas con menor concentración inicial de As (V) (Figura 19).

Durante la cinética de especiación de As para el consorcio JH se lograron porcentajes de remoción de As (V) del 85% para una concentración inicial de 10 μM , del 86% para 250 μM y del 18% para 10 000 μM de As (V). En base a la Figura 19 A, en donde se presenta la cinética de especiación de As para una concentración inicial de As (V) de 10 μM , se observó un aumento en la concentración de As removido entre las 144 y 240 h, tiempo en el cual también se presentó la primer caída en la PHS para estos sistemas, asimismo, a las 144 h se determinó la concentración máxima de As (III) (0.26 ppm), la cual, posterior a este tiempo comenzó a disminuir. En estos sistemas, la concentración de As (V) disminuye de manera constante durante toda la cinética, lo que indica una reducción constante de As (V) a As (III) a partir de las 48 h. El comportamiento en la concentración de As (III) determinada en los sistema, evidencio la etapa de bioestabilización de As en forma de polisulfuros de As planteada en la sección 6.1, este proceso de bioestabilización se mantuvo constante hasta el final de la cinética, ya que la concentración de As (III) después de las 144 h presento una tendencia a disminuir. La concentración de As (V) en el sistema presentó una disminución constante durante toda la cinética.

Para el caso de la cinética de especiación de As para sistemas con una concentración inicial de 250 μM (Figura 19 B), se observó que la concentración de As total en el sistema se mantiene constante hasta aproximadamente las 180 h, para posteriormente disminuir de manera considerable desde dicho tiempo hasta las 280 h, sin embargo, antes de las 180 h, se observó que cerca del 31% del As se encuentra en forma de As (III) y que el 6% del As adicionado en el sistema se encuentra removido. A partir de las 168 h la concentración en la PHS comenzó a disminuir al igual que la concentración de As (III) presente en el sistema, lo que demostró un proceso de bioestabilización de As (III) en forma de polisulfuros de As a partir de este tiempo. Asimismo, se observaron dos etapas en las que aumentó la concentración de As removido, las cuales se presentaron a las 168 h y 264 h aproximadamente, que son los tiempos en los cuales se presentan las caídas en la PHS. La concentración de As (V), de igual manera que para la cinética de los sistemas concentración inicial de 10 μM de As, presentó una disminución constante en el sistema durante toda la cinética, el cual comenzó a reducirse a partir de las 24 h.

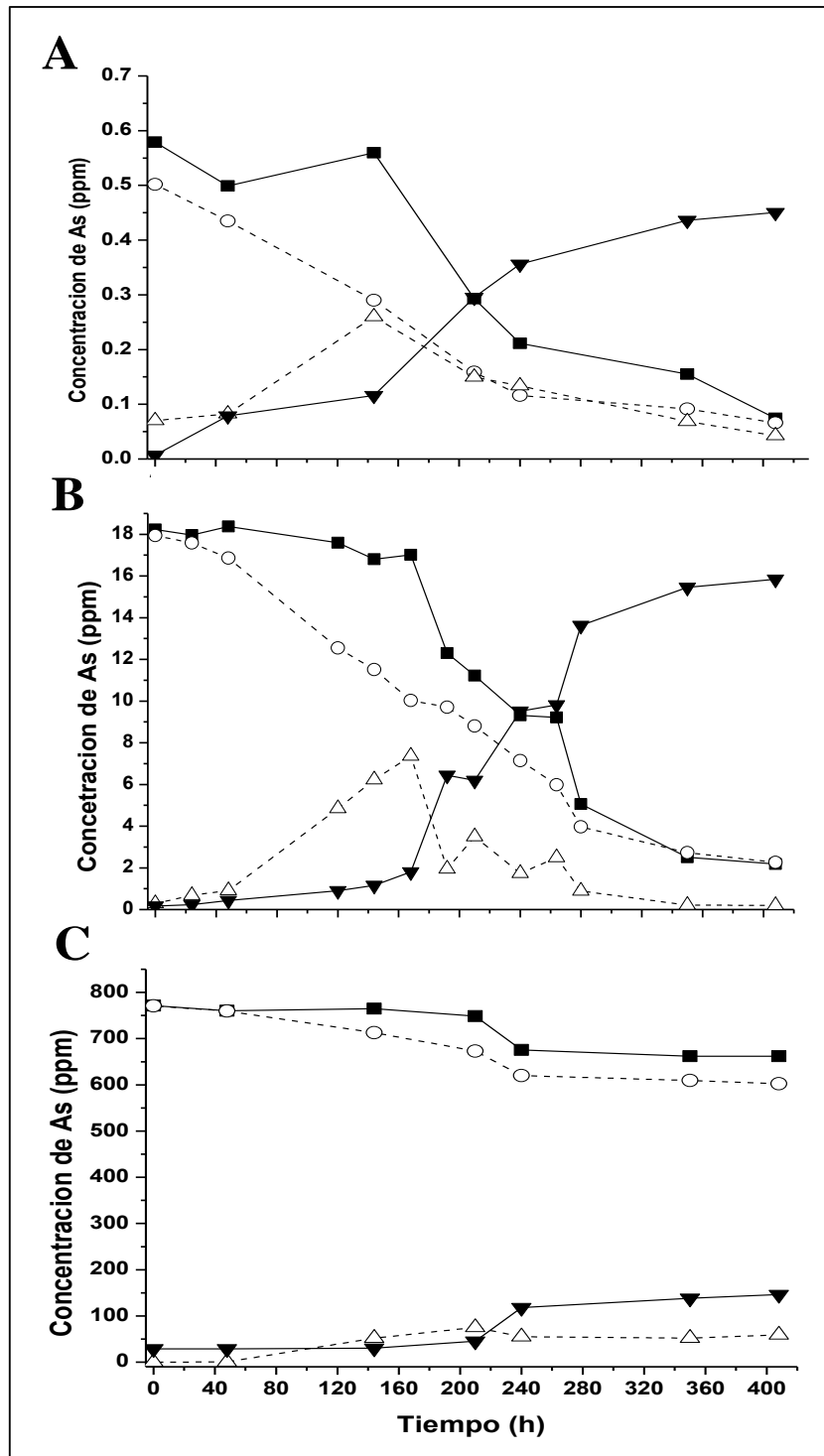


Figura 19.- Cinética de especiación de As obtenida con el consorcio JH a una concentración inicial de 10 μM (A), 250 μM (B) y 10 000 μM (C) de As (V). Dónde: ■ [As total], ○ [As (V)], △ [As (III)] y ▼ [As removido].

Tabla 11.- Velocidades de reducción de As (V) y presencia de As (III) en sistemas concentración inicial de As de 250 μM para el consorcio JH.

[As (V)]	Especie de As	Pendiente	Tiempos (h)	No de puntos tomados	R	Velocidad ($\mu\text{M/h}$)
250 μM	As (V)	1	0-168	6	0.984	-0.709
		2	168-280	6	0.947	-0.661
		3	280-408	3	0.960	-0.180
	As (III)	1	0-168	6	0.974	0.714
		2	168-280	6	0.869	0.657
		3	280-408	3	0.947	0.159

En la Tabla 11 se presentan las velocidades de reducción de As (V) y presencia de As (III) para los sistemas con concentración inicial de 250 μM , dicha concentración de As corresponde a la concentración IC_{50} determinada en la 6.1 para los consorcios JH y M2. Para el consorcio JH se estableció una velocidad promedio de reducción de As (V) de 0.516 $\mu\text{M/h}$ y una velocidad de presencia de As (III) de 0.510 $\mu\text{M/h}$, lo que indica una relación ca. 1 entre la reducción de As (V) y la presencia de As (III) en el sistema. Durante la determinación de las velocidades de formación de As (III) se tomó en cuenta el As que fue removido en forma de polisulfuros de As.

Para el caso de la cinética de especiación de As en los sistemas que contenían una concentración inicial de 10 000 μM (Figura 19 C), se observó una primer etapa a las 210 h, en la cual la concentración de As removido aumento hasta 117 ppm, esto coincidió con el comienzo de una etapa de disminución y estabilización de la concentración de As (III) presente en el sistema, en este mismo tiempo se observó una disminución en la concentración de As (V) y As total, lo que concuerda con un aumento progresivo en la concentración de As removido a partir de este tiempo. El efecto tóxico que presentó esta concentración de As en los sistemas batch se evidencio nuevamente, ya que solo se logró la remoción del 18% del As total adicionado al inicio de la cinética, sin embargo, este porcentaje de remoción corresponde a una remoción de 146 ppm, en comparación con los sistemas con una concentración inicial de 250 μM en los cuales se logró la remoción de 16 ppm, lo que indica que a concentraciones altas de elementos tóxicos para el consorcio, se podrían generar procesos metabólicos que favorecen la eliminación del mismo.

Mediante el análisis de correlación de Spearman se estableció que no existe una correlación estadísticamente significativa entre la PHS, el pH y la concentración de SSV determinados en los sistemas sin As ($p > 0.05$) (Anexo 2), lo que indica que en este tipo de sistemas cada una de las variables que se midieron son independientes entre ellas. Para los sistemas que presentaban As, se determinó una correlación positiva entre la concentración de As total y la concentración de As (V) en el sistema, lo que indica que conforme la concentración de As total disminuye, la concentración de As (V) en el sistema también disminuye ($p < 0.05$). Mediante la prueba de Wald-Wolfowitz se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa en la PHS con respecto a cada una de las concentraciones iniciales de As adicionadas a los sistemas ($p < 0.05$) (Anexo 2).

6.2.2 Cinéticas de especiación de As para el consorcio microbiano M2

En la cinética de PHS para el consorcio M2 presentada en la Figura 20 A, se observaron, al igual que para el consorcio JH, una serie de etapas relacionadas, en primer lugar, con una etapa de producción de H_2S_{biog} , una etapa de reducción de As (V) a As (III), y un proceso de bioestabilización de As en forma de polisulfuros de As, sin embargo, las concentraciones máximas de PHS alcanzados por este consorcio fueron de 200, 131 103 y 42 $mmol\ g^{-1}$ SSV para concentraciones iniciales de As de 0, 10, 250 y 10 000 μM , las cuales son inferiores a la alcanzadas por el consorcio JH (214, 153, 118 y 43 $mmol\ g^{-1}$ SSV respectivamente) y los tiempos en los que se presentaron las caídas en la PHS son diferentes. Asimismo, se observó que en los sistemas con una concentración inicial de As (V) de 10 000 μM , la concentración en la PHS se mantiene baja y constante después de las 210 h, lo que indicó un efecto tóxico dado por la concentración de As o que el sulfuro producido está siendo utilizado para reducir el As (V) y bioestabilizarlo, por tanto, no es detectado con el método utilizado.

En cuanto a las determinaciones de pH para el sistema sin As, al igual que para el consorcio JH, se determinó una caída en el pH hasta aproximadamente las 73 h (pH 6.53), posterior a dicho tiempo, el pH aumentó constantemente hasta las 360 h determinando un pH a dicho tiempo de 6.95 y un pH al final de la cinética de 6.85. Para los sistemas con concentraciones iniciales de As de 10 μM y 250 μM , se observó que el pH tiende a disminuir hasta las 100 h aproximadamente, determinado pHs de 6.45 y 6.40 respectivamente,

posteriormente, y a diferencia del comportamiento del consorcio JH, durante la caída en la PHS, se observó un aumento del pH hasta las 240 h, determinado pHs de 6.61 y 6.72 respectivamente, para posteriormente decaer a las 260 h y aumentar nuevamente durante la segunda caída en la producción de sulfuro (350h) hasta pH de 6.78, el análisis de correlación de Spearman no encontró una correlación estadísticamente significativa entre la PHS y el pH para los sistemas con esta concentración inicial de As (V). El pH en los sistemas con una concentración inicial de As (V) de 10 000 μM disminuyó de manera considerable antes de la primer caída en la PHS hasta un pH de 6.4, para posteriormente mantenerse constante durante 120 h aproximadamente y empezar a aumentar a las 240 h hasta alcanzar un pH de 6.58, después de las 240 h el pH en los sistemas comenzó a disminuir hasta el final de la cinética.

En cuanto a la producción de SSV (Figura 20 C), al igual que para el consorcio JH, se observó un comportamiento similar para los sistemas con concentraciones iniciales de 0 y 10 μM , determinando concentraciones de 500 y 433 mg/L de SSV respectivamente, mientras que para el sistema con concentración inicial de As (V) de 250 μM , se observó un aumento creciente en la producción de biomasa, que fue más evidente, al igual que para el consorcio JH, a las 240 h, este tiempo es posterior al primer proceso de acumulación $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ y corresponde al tiempo en el que se presentó la primer etapa de bioestabilización de As, lo que generó que el efecto tóxico que el As y el $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ presentan en los microorganismos se redujera, determinando una concentración de SSV a este tiempo de 200 mg/L y una concentración de 266 mg/L al final de la cinética. En los sistemas con concentración inicial 10 000 μM de As (V), la concentración de biomasa se mantuvo constante, a dicha concentración, el poco aumento en la concentración de SSV podría estar dado por la presencia de sulfuros de As y no precisamente por la producción de biomasa, determinando una concentración de SSV al final de la cinética de 166 mg/L. De igual manera que con el consorcio JH, durante el proceso de especiación de As se determinó que las concentraciones de As bioestabilizado en los sistemas con concentraciones iniciales de 10 000 μM eran superiores (ca. 150 ppm) a las alcanzadas en sistemas con menor concentración inicial de As 250 μM (ca. 18 ppm).

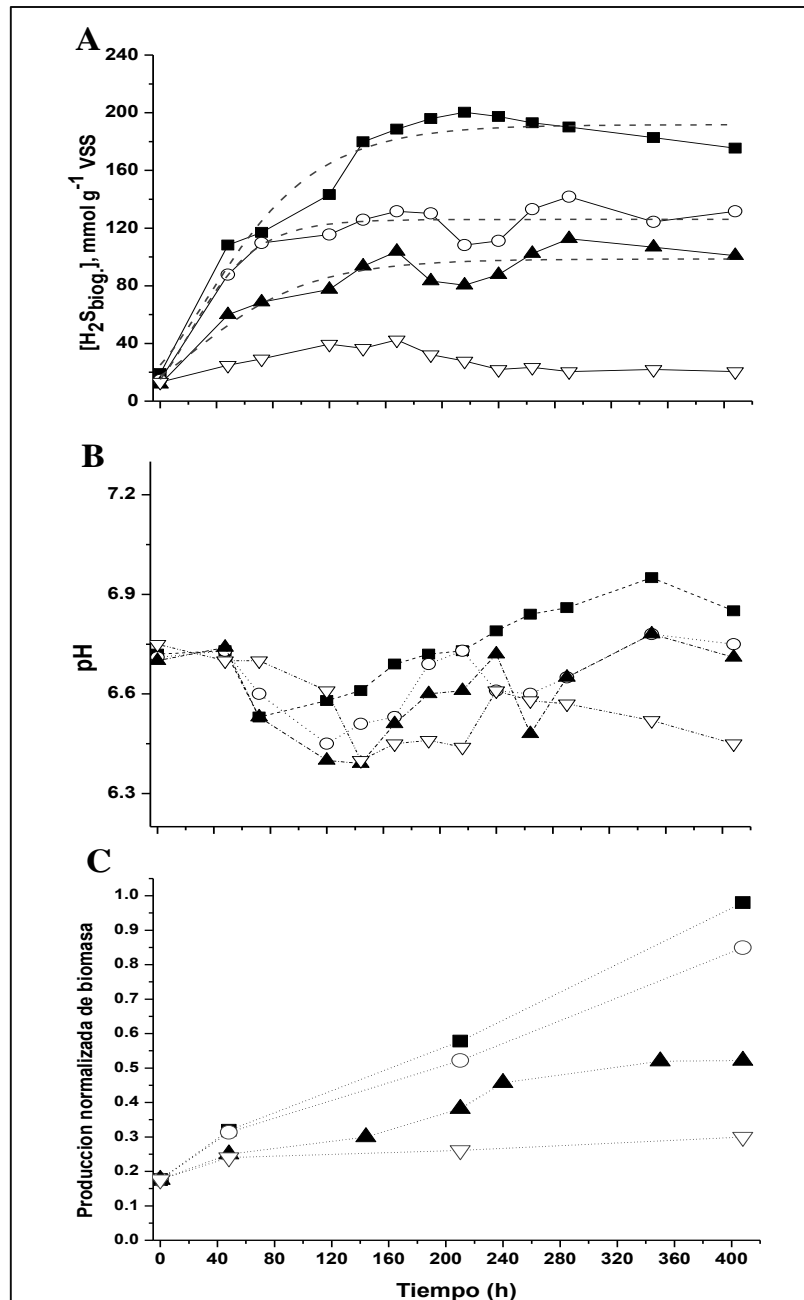


Figura 20.- Cinética de producción específica de H_2S_{biog} (A), determinación de pH (B) y Producción de biomasa medida en forma de SSV (C) en presencia de As (V) obtenida con el consorcio M2. Dónde: ■ 0 μM , ○ 10 μM , ▲ 250 μM y ▽ 10 000 μM .

Estudios mencionan que la estabilidad de los sulfuros de As es dependiente del pH, así como de las concentraciones de sulfuro soluble y As (III), siendo un pH de entre 6.6 y 6.9 los que generan estabilidad en los precipitados formados (Battaglia-Brunet *et al.*, 2012), la estabilidad del pH durante la cinéticas para los consorcio JH y M2 puede ser tomado como

un factor importante en los procesos de remoción de As ya que el pH determinado fue de entre 6.3 a 7.1 para los sistemas del consorcio JH y de entre 6.4 y 7.0 para los sistemas del consorcio M2, dichos intervalos de pH son idóneos para que se lleven a cabo los procesos de formación y estabilidad de sulfuros de As. Asimismo, se ha demostrado que aumentos graduales en el pH son indicativos de procesos de adaptación de las BSR cuando estos se utilizan en procesos de remediación de metales pesados y metaloides como el As, llevando el pH de 4 hasta 7 como un proceso de adaptación (Jong y Parry, 2004), para los consorcios microbianos JH y M2 no se presentaron aumentos en el pH tan drásticos, sin embargo, en los sistemas con concentraciones $\leq 250 \mu\text{M}$ de As (V) se presentaron etapas en las que el pH disminuye, esto debido a procesos como el aumento y la disminución en la concentración de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ relacionados con procesos de bioestabilización de As, pero que en ciertas etapas de la cinética tiendes a una estabilidad a pH cercanos a 7, estas variaciones no se observaron en los sistemas sin As, en los cuales se observa una sola etapa de adaptación. Asimismo, se ha reportado que un pH ca. 7.4 genera una saturación en la formación de polisulfuros de As (Kirk *et al.*, 2010), dicho valor de pH no se alcanzó en los sistemas inoculados con los consorcios JH y M2, por tanto, el pH no puede ser considerado como una limitante en el proceso de remoción de As.

Durante la cinética de especiación de As para el consorcio M2 se logró la remoción del 83%, 86% y 18% de As (V) para concentraciones iniciales de 10, 250 y 10 000 μM respectivamente (Figura 21). Dichos porcentajes de remoción son similares a las obtenidas por el consorcio JH. En base a la Figura 21 A se observó que para la concentración inicial de As (V) 10 μM , la concentración de As removido aumentó considerablemente a partir de las 210 h, tiempo en el cual también se presentó la primer caída en la PHS para el consorcio M2, esto indica que el proceso de biosteabilización de As (V) que se presentó en los sistemas inoculados con el consorcio M2 es más lento, ya que para el consorcio JH, dicha etapa se presentó a partir de las 194 h. Para M2, a las 210 h también se observó una caída en la concentración de As (III), lo que mostró que el As está siendo removido, posiblemente en forma de polisulfuros de As. Posterior a las 240 h, la concentración de As (III) se mantuvo constante, sin embargo, la concentración de As (V) continuó disminuyendo, lo que demostró que el As (III) estaba siendo removido de manera constante, esto se explica el aumento que presentó la concentración de As removido a partir de las 240 h.

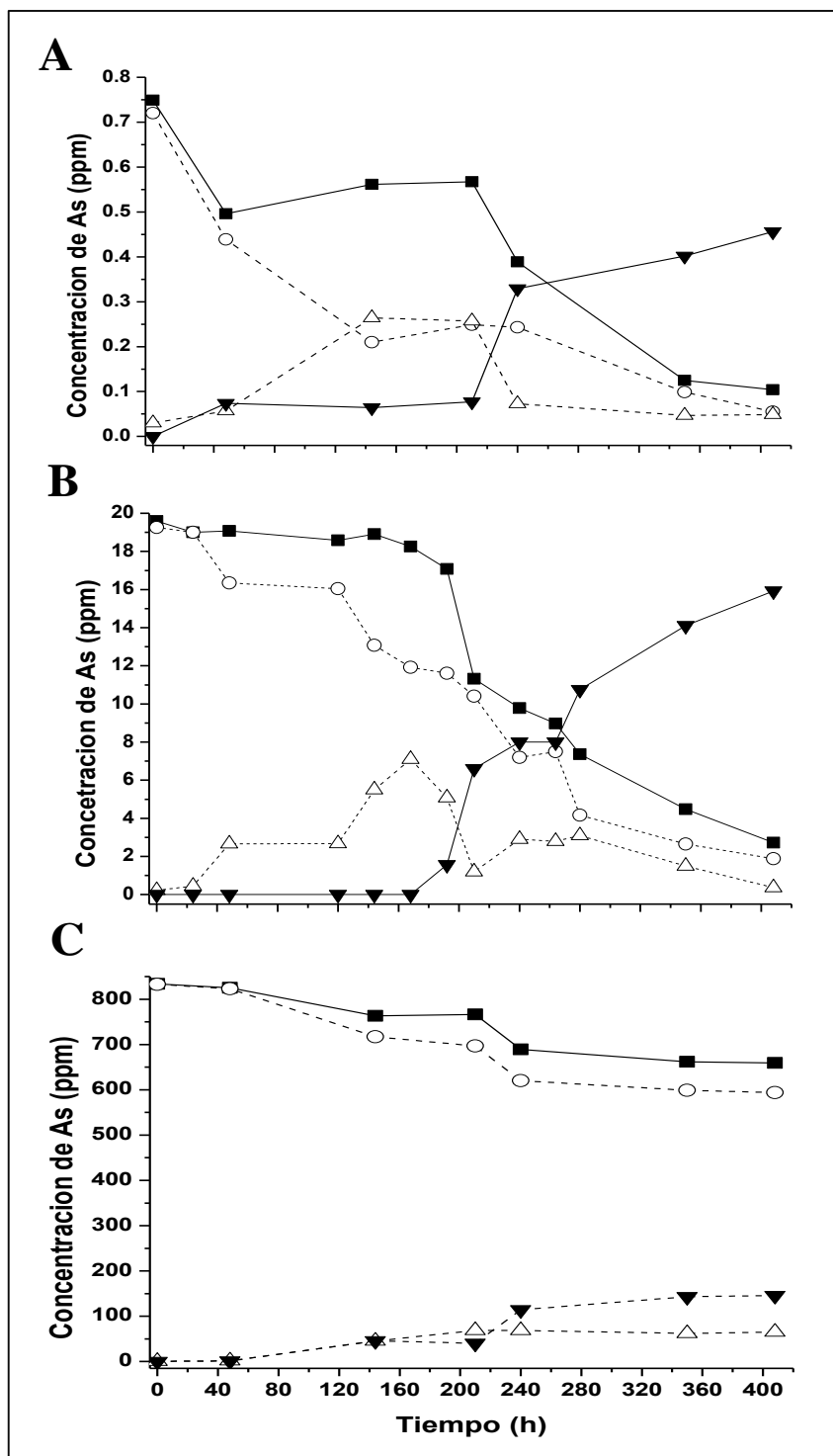


Figura 21.- Cinética de especiación de As obtenida con el consorcio M2 a una concentración inicial de 10 µM (A), 250 µM (B) y 10 000 µM (C) de As (V). Dónde: ■ [As total], ○ [As (V)], △ [As (III)] y ▼[As removido].

Una etapa en la que coexisten altas concentraciones de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ y As (III) dada entre las 144 y 210 h, demostró que en los sistemas del consorcio M2 las reacciones metabólicas para alcanzar las condiciones de bioestabilización de As son relativamente más lentas a comparación con el consorcio JH, para el cual, dicha etapa se presentó a partir de las 144 h. La acción sulfato reductora de los consorcios microbianos JH y M2 generaron una reducción $>80\%$ de una concentración de $10 \mu\text{M}$ de As (V) a las 408 horas, dichos procesos son relativamente rápidos en comparación con trabajos en los cuales los cuales la concentración de As (III) aumenta a las 168 h de inoculación hasta alcanzar $0.13 \mu\text{M}$ a los 14 días, considerando una concentración inicial de As (V) de hasta $0.15 \mu\text{M}$ (Routh *et al.*, 2007).

Para el caso de la cinética de especiación de As para una concentración inicial de $250 \mu\text{M}$ de As (V) (Figura 21 B), se observó un comportamiento similar al presentado para los sistemas con una concentración inicial de $10 \mu\text{M}$. La concentración de As total en el sistema se mantiene constante hasta aproximadamente las 168 h aun cuando el 38% del As se encuentra en forma de As (III), sin embargo, a dicho tiempo, la concentración de As removido es mínima, a comparación del consorcio JH, en el cual, a dicho tiempo, el 6 % del As total ya había sido removido. Posteriormente, a las 210 h, el As (III) tiende a disminuir de manera considerable, tiempo en el cual se observó la primera caída en la PHS para este consorcio, lo que indica su posible bioestabilización en el sistema. La concentración de As (V) presentó una disminución constante en el sistema durante toda la cinética. Asimismo, se observaron dos etapas en las que la concentración de As removido aumenta, estas se presentaron a las 192 y 294 h aproximadamente, que se correlacionan con los tiempos en los cuales se presentaron las caídas en la PHS y la concentración de As (III) en solución, en comparación con los tiempos en los que dichas etapas se presentaron para el consorcio JH que fue a las 168 h y 264 h, lo que indica un proceso de bioestabilización de As más lentos para el consorcio M2.

En la tabla 12 se presentan las velocidades de reducción de As (V) y presencia de As (III) para el consorcio M2 en sistemas con concentración inicial de $250 \mu\text{M}$ de As (V). Para el caso del consorcio M2 se estableció un velocidad promedio de reducción de As (V) de $0.571 \mu\text{M/h}$ mientras que para la presencia de As (III) se estableció una velocidad promedio

de 0.512 $\mu\text{M/h}$, las cuales fueron similares a las velocidades obtenidas para el consorcio JH (0.516 $\mu\text{M/h}$ para la reducción de As (V) y 0.510 $\mu\text{M/h}$ para la presencia de As (III)).

Tabla 12.- Velocidades de reducción de As (V) y presencia de As (III) en sistemas concentración inicial de As de 250 μM para el consorcio M2.

[As (V)]	Especie de As	Pendiente	Tiempos (h)	No de puntos tomados	R	Velocidad ($\mu\text{M/h}$)
250 μM	As (V)	1	0-144	5	0.845	-0.499
		2	144-240	5	0.896	-0.765
		3	240-408	5	0.823	-0.451
	As (III)	1	0-144	5	0.810	0.413
		2	144-240	5	0.831	0.666
		3	240-408	5	0.848	0.457

Estudios en aguas anoxias de un lago hipersalino inoculadas con DAsRB, han determinado la reducción de 5 000 μM As (V) en un tiempo de 21 h con una tasa de reducción 640 $\mu\text{M/h}$ y una tasa de presencia de As (III) en solución de 504 $\mu\text{M/h}$, mientras que a concentraciones de 200 μM , las tasas de reducción de As (V) son 50 $\mu\text{M/h}$ y de producción de As (III) de 44 $\mu\text{M/h}$ en un periodo de 21 h, logrando la reducción de un 50% de una concentración de As (V) de 5 000 μM en 9 h, mientras que para 200 μM logro una reducción del 50 % en las primeras 2 h (Oremland *et al.*, 2000), dichas tasas de reducción de As son superiores a las alcanzadas por los consorcios microbianos JH y M2 a una concentración similar (250 μM), en los que se logró la reducción de un 50% del As (V) en el sistema a las 192 h para JH y 210 h para M2, esto indicaría que en los sistemas batch se generan procesos de reducción de As (V) más lentos que en estudios en los que se utilizan DAsRB, debido a que la reducción podría darse únicamente por procesos fisicoquímicos (oxidación incompleta de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$) y no por la presencia de DAsRB. Asimismo, en otros estudios, se han determinaron velocidades de reducción de As (V) de 20 $\mu\text{M/h}$ de una solución con concentración de 1 335 μM de As (V), la cual era alimentada continuamente en un biorreactor de película fija con presencia de BSR (Battaglia-Brunnet *et al.*, 2012), sin embargo, es importante mencionar que estos estudios son realizados en biorreactores en los cuales se tiene un control de las condiciones fisicoquímicas, con adiciones constantes de nutrientes, lo que hace que las tasas de remoción sean constantes, esto en comparación con las velocidades obtenidas en sistemas batch para los consorcios JH y M2, en las que las tasas de reducción

de As (V) son menores y varían en las distintas etapas de la cinética, siendo más lentas al final de la misma (Tabla 11 y 12).

Las altas concentraciones de H_2S_{biog} en los sistemas batch podrían generar que las velocidades de reducción de As (V) aumenten durante las primeras etapas de las cinéticas, algunos autores han determinado porcentajes del 49% de reducción de As (III) en forma de sulfuros de As en solución para un suelo con altas concentraciones de sulfuro, mientras que en sistemas con poca concentración de sulfuro han logrado la reducción de un 4% de As (III) en forma de sulfuros de As en un tiempo de 28 h a partir de una concentración inicial de As de 0.2 y 3.9 mM respectivamente, determinando tasas de reducción de As (V) de 103 $\mu M/h$ y 12 $\mu M/h$, lo que indica velocidades menores de reducción de As (V) en sistemas en los que la concentración de sulfuro es menor (Kulp *et al.*, 2006). Las velocidades de reducción de As (V) determinadas para los consorcios JH y M2 son muy similares entre sí a pesar de que la PHS es relativamente menor para el consorcio M2, lo que podría indicar que la presencia de altas concentraciones de H_2S_{biog} no afectan las velocidades de reducción de As (V), sin embargo, se debe tomar en cuenta que el mecanismo de reducción de As (V) a As (III) planteado para los sistemas batch, está basado en la oxidación incompleta de H_2S_{biog} a S elemental, lo que genera que cierta cantidad H_2S_{biog} en el sistema y que podría estar siendo consumido durante el proceso de reducción de As (V) no sea detectado. Asimismo, autores que han trabajado con sedimentos salinos concluyen que cuando la concentración de sal se acerca a niveles de saturación, los procesos metabólicos basados en receptores de electrones bioenergéticamente favorables (como el As (V)) pueden llegar a ser más importantes para el desarrollo microbiano (Kulp *et al.*, 2006), en el caso de los sistemas sulfato reductores, se ha determinado que valores de H_2S_{biog} ca. 14 mM resultan tóxicos para los microorganismos, lo que podría generar que en sistemas que presentan valores superiores a dicha concentración se empiece a utilizar el As (V) como aceptor terminal de electrones, como podría ser el caso de los sistemas batch de los consorcios JH y M2, en los que se determinaron concentraciones cercanas y/o superiores a 14 mM de H_2S_{biog} es sistemas con concentraciones iniciales de 10 y 250 μM de As (V), los tiempos en los que se registraron dichas concentraciones de H_2S_{biog} coinciden con el tiempo en el que las velocidades de reducción de As (V) son las más altas (entre las 144 y 210 h) (Tabla 11 y 12).

Para el caso de la cinética de especiación de As para una concentración inicial de 10 000 μM de As (V) (Figura 21 C), se observó que la concentración de As removido aumentó de manera considerable a las 210 h, esto coincide con el comienzo de una etapa de estabilización en la concentración de As (III) presente en el sistema, la cual se mantuvo constante después de este tiempo y hasta el final de la cinética. En este mismo tiempo (210 h) se observó una disminución en la concentración de As (V) y la concentración de As total, lo que evidencio una etapa de bioestabilización de As, la cual se mantuvo hasta el final de la cinética, este mismo comportamiento se observó en los sistemas correspondientes al consorcio JH. Se debe de tener en cuenta que solo se logró la remoción del 18% del As total adicionado al inicio de la cinética, ya que, es evidente un efecto tóxico por parte del As en el desarrollo microbiano, sin embargo, a esta concentración se logró la remoción de 140 ppm, en comparación con los sistemas con una concentración inicial de 250 μM de As (V), en los cuales se logró la remoción de 16 ppm. Lo que indica un proceso de producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ constante que a su vez genera la reducción de altas concentraciones de As (V) y la remoción del mismo en las primeras horas de la cinética, posteriormente, el efecto tóxico de As se hace evidente ya que, después de las 210 h, la PHS y la concentración de As (III) se mantienen bajas y constantes, este comportamiento fue similar para el consorcio JH. Al respecto, se ha evaluado la reducción de As (V) a As (III) en sedimentos anóxicos incubados en presencia de 10 000 μM de As (V), logrando la reducción del total de As (V) a los 15 días cuando utiliza únicamente sulfato como aceptor de electrones, mientras que cuando se utiliza lactato como donador de electrones se ha logrado la reducción de 8 000 μM de (V) en 3 días utilizando inóculos de bacterias que presentan procesos metabólicos enfocados a la reducción de As (Dowdle *et al.*, 1996), dichos valores de reducción de As (V) son superiores a los reportados en el presente estudio a una concentración similar de As (V), lo que deja de manifiesto el efecto tóxico que dicha concentración de As (V) tiene sobre los consorcios microbianos JH y M2, pero que demuestra que los consorcios microbianos JH y M2 no son consorcios con funciones específicas para la reducción de As (V), sino que son consorcios especializados en procesos de sulfato reducción que pueden ser utilizados en procesos de remoción de As por la resistencia que estos presentan a la toxicidad en sistemas inoculados con concentraciones $\leq 250 \mu\text{M}$ de As.

En biorreactores utilizados para la remoción de concentraciones de 7.5 μM de As (V) se ha reportado que la reducción de As (V) se presenta antes de empezar una etapa de acumulación de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$, esto debido a la poca concentración de As (V) (Kirk *et al.*, 2010), lo que indica que si se agregan concentraciones bajas de As y sulfato, la reducción de ambos se llevaría de forma paralela, esto se correlaciona con los sistemas con concentraciones iniciales de As (V) de 10 μM y 250 μM para los consorcios JH y M2, en los que la reducción de As (V) se empieza dar a partir de las 48 h de iniciada la cinética en ambos consorcios, tiempo en el cual también comienza el aumento en la PHS.

Los tiempos en los que se comienza a evidenciar el proceso de bioestabilización de As (V) por un aumento y pérdida de As (III) en los sistemas con concentraciones iniciales de As (V) $\leq 250 \mu\text{M}$ en presencia de los consorcios JH y M2 (194 y 210 h respectivamente), se relacionan con los tiempos que se han reportado en sistemas con concentraciones de hasta 20 000 μM de As (V) (220 h), sin embargo, las velocidades de reducción de As (V) para los consorcios JH y M2 siguen siendo bajas en comparación con sistemas en los que se emplean DAsRB (Hoeft *et al.*, 2004).

En base al análisis de correlación de Spearman realizado con los resultados de la PHS, el pH y la concentración de SSV para el consorcio M2, se determinó que las variables medidas no presentan una correlación estadísticamente significativa, este mismo resultado se obtuvo en los sistemas sin As para el consorcio JH ($p > 0.05$), lo que indica que en este tipo de sistemas cada una de las variables son independientes. Para los sistemas con concentración inicial de As de 10 y 250 μM se determinó una correlación positiva entre la concentración de As total y la concentración de As (V) en el sistema, asimismo, se estableció una correlación negativa entre la concentración de As total y la concentración en la PHS, y entre la concentración de As (V) y la concentración de en la PHS ($p < 0.05$), lo que indica que conforme la concentración de As total y As (V) disminuyen en el sistema, la concentración en la PHS aumenta, esta correlación no se determinó para los sistemas con dichas concentraciones en el consorcio JH, esto debido a que las variaciones en la PHS durante la bioestabilización de As son más evidentes y por tanto no presenta una correlación con el pH y la producción de SSV, lo que indicaría procesos de sulfato reducción diferentes a los generados por el consorcio M2 dado por diferencias en la diversidad microbiana que

presentan ambos consorcios, la cual fue analizada en secciones posteriores de este documento. Para los sistemas con una concentración inicial de 10 000 μM se determinó que existe una correlación positiva entre la concentración de As total y la concentración de As (V) en el sistema ($p < 0.05$), una correlación similar se encontró para el consorcio JH. La prueba de Wald-Wolfowitz para los sistemas del consorcio M2 estableció una diferencia significativa en la PHS con respecto a la concentración inicial de As adicionada a los sistemas, asimismo, solo se estableció una diferencia significativa entre el pH de los sistemas con una concentración inicial de 0 μM y 10 000 μM ($p < 0.05$). Para ambos consorcios y en base a la prueba de Wald-Wolfowitz, se estableció que las distintas concentraciones iniciales de As adicionadas presentan un efecto toxico significativo en la PHS con respecto a los sistemas que no fueron inoculados con As ($p < 0.05$), presentando un efecto toxico mayor conforme la concentración inicial de As en los sistemas aumenta.

6.2.3 Dinámica de la diversidad microbiana del consorcio microbiano JH durante la bioestabilización de As (V)

Para evaluar la dinámica de la población microbiana presente en los consorcios microbianos JH y M2 mediante la técnica DGGE, se realizó la extracción de los ANT y se evaluó su pureza mediante la relación de absorbancias 260/280, las cuales fueron de entre 1.22 y 2.14 para el consorcio JH y entre 1.37 y 1.83 para el consorcio M2 con concentraciones de ANT de entre 90 y 370 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para el consorcio JH y de entre 140 y 300 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para el consorcio M2.

En la Figura 22 se presentan los geles de agarosa al 8% en los cuales se observan los ANT extraídos de los sistemas batch, las electroforesis se realizaron para todas las extracciones realizadas, en base a la presencia de ANT se procedió a realizar la amplificación parcial del gen 16S RNA para cada muestra mediante PCR.

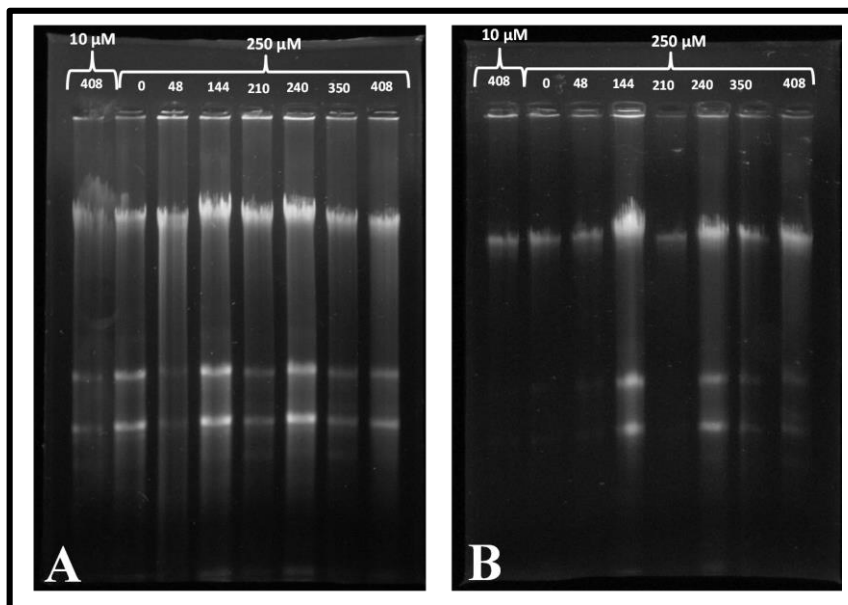


Figura 22.- Gel de agarosa al 8% de las muestras de ANT extraídos de los consorcios microbianos JH (A) y M2 (B). Corrimiento de electroforesis a 120 V durante 90 min.

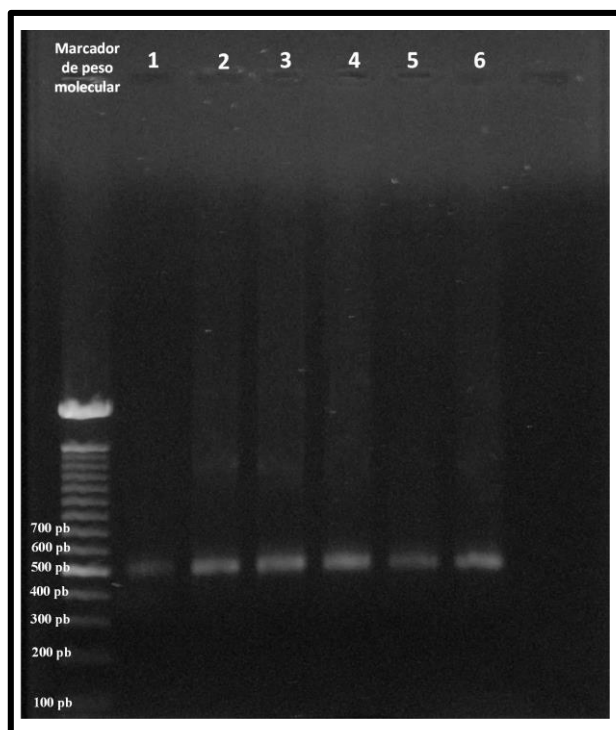


Figura 23.- Gel de agarosa al 8% de los de los productos de PCR obtenidos con los primers 357F-GC y 907 R (586 pb). El 1er. carril corresponde al marcador de peso molecular. Corrimiento de electroforesis a 120 V durante 90 min.

En la Figura 23 se presenta el gel de agarosa al 8% de algunos de los productos de PCR. Los productos de PCR fueron cuantificados a 260 nm, determinando concentraciones de 550 a 775 ng/ μ L en los productos de PCR obtenidos para el consorcio JH y concentraciones de 500 a 775 ng/ μ L para el consorcio M2.

A partir del fragmento amplificado por PCR de 586 pb de ANT de cada muestra, se realizó el perfil de DGGE con el objetivo de conocer los cambios en la comunidad microbiana presente en los sistemas batch a distintas concentraciones de As y en distintos tiempos de la cinética de bioestabilización (Tabla 2), en la Figura 24 A se muestran los perfiles de DGGE obtenidos para el consorcio JH, cada carril corresponde a una concentración inicial de As (V) y un tiempo específico de operación de los sistemas batch, y cada banda en el carril corresponde a un microorganismo o filotipo de la población microbiana presente en el consorcio microbiano a dicho tiempo (Muyzer *et al.*, 1993). El dendograma presentado en la Figura 24 B incluye los perfiles de DGGE obtenidos para todas las concentraciones iniciales de As (V) y tiempos de análisis de diversidad microbiana, adicionalmente se generó un dendograma para cada una de las concentraciones iniciales de As (V) (Figura 25).

Como se puede observar en los perfiles de DGGE presentados en la figura 24 A, se determinó la presencia de 5 bandas o filotipos diferentes en el consorcio JH, las cuales se presentaron en todas las concentraciones iniciales de As (V), y en todos los tiempos en los que se realizó la extracción de ANT, a excepción de los sistemas que contenían una concentración inicial de 10 00 μ M de As (V) en el tiempo 408 h, en este perfil de DGGE solo se apreciaron 3 bandas, el cambio en la estructura de la composición microbiana a esta concentración inicial de As podría estar relacionado con la toxicidad del metaloide, ya que a dicha concentración de As se determinaron las menores concentraciones en la PHS y de SSV en comparación con sistemas que tuvieron menor concentración inicial de As.

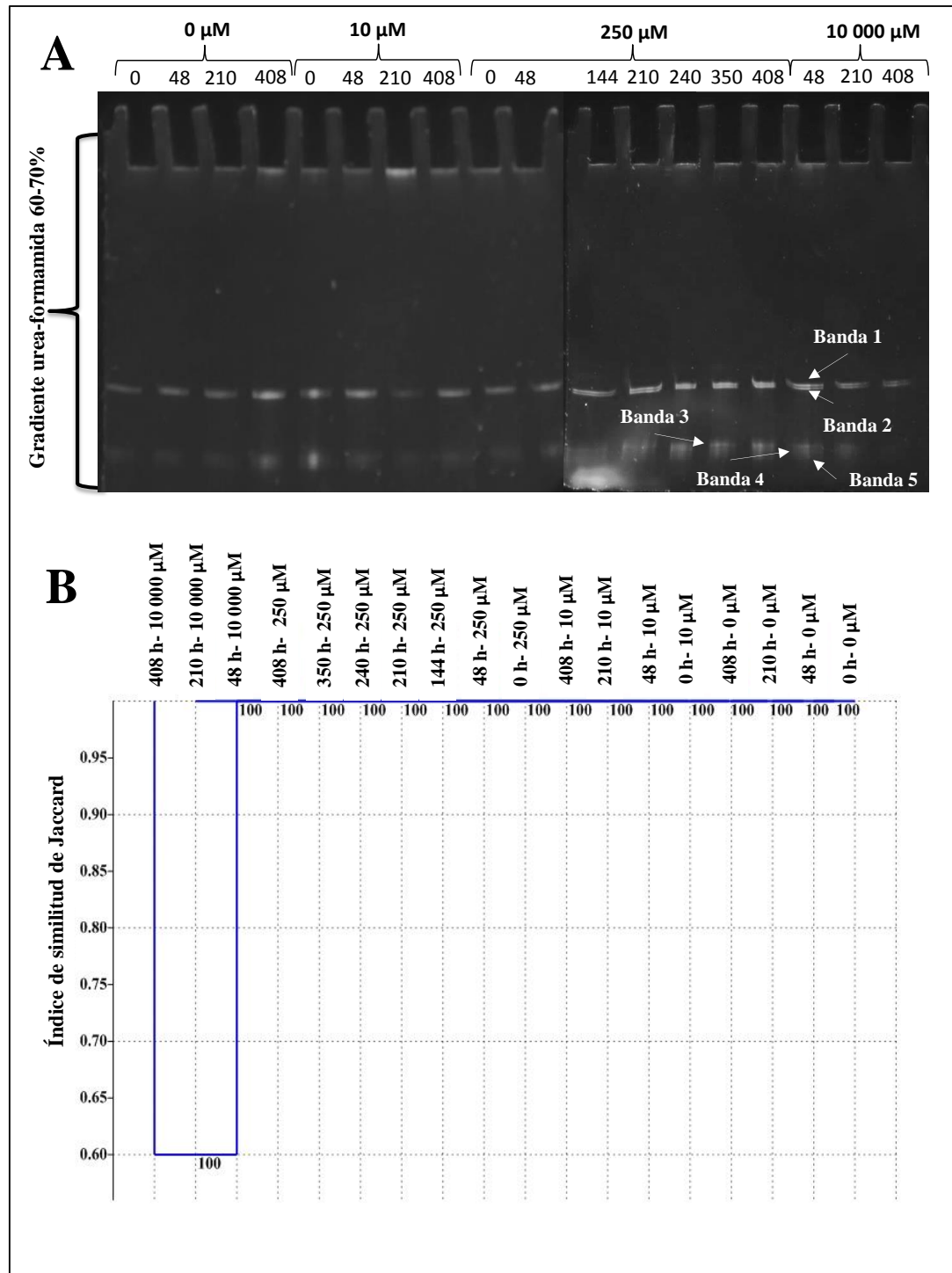


Figura 24.- Perfiles de DGGE obtenidos para el consorcio JH en un gradiente de desnaturalización de 60-70%, con un corrimiento a 65°C durante 6 h 35 min. (A) y análisis clúster utilizando el índice de similitud de Jaccard (B), Bootstrap de 500 réplicas.

En las imágenes de los perfiles de DGGE para el consorcio microbiano JH (Figura 24 A), se observó que las bandas 1 y 2 presentan un desplazamiento similar en el gel, por lo que se podría tratar de dos filotípos con estructura de pares de bases similares que pudieran pertenecer a un mismo género. Como se observa en el dendograma general presentado en la Figura 24 B, el porcentaje de similitud entre el perfil de DGGE obtenido a las 408 h en los sistemas con concentración inicial de 10 000 μM presenta un 60% de similitud en su diversidad con respecto a los perfiles de DGGE obtenidos en los demás tiempos de muestreo a dicha concentración inicial de As (V) (48 y 210 h), los cuales presentan un 100% de similitud. La similitud de los perfiles de DGGE está basada en el índice de similitud de Jaccard tomando en cuenta la presencia y ausencia de filotípos obtenido con la prueba DGGE. Los perfiles de DGGE obtenidos en los distintos tiempos de análisis para concentraciones iniciales de 0, 10 y 250 μM de As (V) presentan un índice de similitud basado en el índice de Jaccard del 100% lo que indica que la dinámica poblacional se mantiene constante y es independiente de la concentración inicial de As añadida, tratándose de un consorcio microbiano que lleva a cabo diversos procesos metabólicos en conjunto (entre los que se incluye la sulfato reducción) que generan condiciones para que la diversidad microbiana se mantenga durante la bioestabilización de As, de tal manera que la población del consorcio es capaz de tolerar las distintas condiciones fisicoquímicas que se generan en los sistemas desde el inicio hasta el final de la cinética.

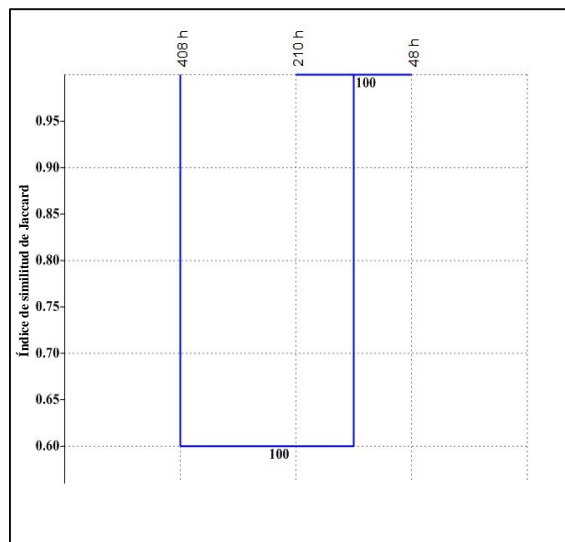


Figura 25.- Análisis clúster realizado mediante el índice de similitud de Jaccard para una concentración inicial de 10 000 μM (Bootstrap de 500 réplicas).

El dendograma presentado en la Figura 25 muestra un índice de similitud del 100% entre los perfiles de DGGE obtenidos a los tiempos 48 y 210 h para una concentración inicial de 10 000 μM de As (V), mientras que para el tiempo 408 h se determinó un índice de similitud del 60% en comparación con los demás perfiles de DGGE para esta concentración inicial de As. El perfil de DGGE correspondiente al tiempo 0 h para una concentración inicial de 10 000 μM no se pudo determinar, sin embargo, se consideró que el perfil obtenido a las 0 h es similar para las distintas concentraciones iniciales de As utilizadas. Los dendogramas de los perfiles de DGGE correspondientes a concentraciones iniciales de 0, 10 y 250 μM de As (V) no pudieron ser generados debido a que el consorcio JH presentó un 100 % de similitud en todos los tiempos en los que se analizó la diversidad microbiana a dichas concentraciones de As.

6.2.4 Dinámica de la diversidad microbiana para el consorcio M2 durante la bioestabilización de As (V)

Los perfiles de DGGE obtenidos para el consorcio microbiano M2 se presentan en la Figura 26 A para las distintas concentraciones iniciales de As (V) y los distintos tiempos de análisis. El consorcio microbiano M2 presentó un mayor número de bandas en comparación con el consorcio JH, en dicho consorcio se encontraron 9 filotipos diferentes y el número de bandas presentes en cada perfil de DGGE varió dependiendo de la concentración inicial de As (V) y el tiempo en el que se realizó la extracción de ANT para evaluar la diversidad microbiana (Figura 26 A).

Para el caso de los perfiles de DGGE obtenidos en los tiempos 0 h de cada concentración inicial de As (V), se determinó la presencia de 6 bandas (bandas control), asimismo, el dendograma presentado en la Figura 26 B muestra el agrupamiento de dichos perfiles de DGGE con un índice de similitud del 100 %. Asimismo, se observó la presencia de 4 bandas que aparecen en todas las concentraciones iniciales de As (V) y tiempos de análisis (banda 2, 5, 7 y 8), dichos filotipos son dominantes en el consorcio y podrían asociarse a filotipos encontrados en el consorcio JH, ya que dichas bandas presentan un corrimiento similar al encontrado en el consorcio JH cuando se utiliza un gradiente desnaturante de urea-formamida 60-70%.

Para los sistemas sin As, se observó un cambio en la estructura microbiana a las 48 h, en el cual se determinó la presencia de una nueva banda con la ausencia de 2 bandas que se presentaron en el perfil de DGGE correspondiente al tiempo 0 h. En el perfil de DGGE obtenido a las 350 h se observaron 6 bandas, una de los cuales es diferente al perfil del tiempo 0 h, al final de la cinética (408 h) se determinaron 5 bandas, lo que indicó la ausencia de un microorganismo al final del tiempo de monitoreo (banda 3) con respecto al perfil de DGGE obtenido a las 0 h, lo cual se asocia a las condiciones fisicoquímicas que presenta el sistema al final de la cinética, las cuales son diferentes a las que se presentaron al inicio de la misma.

Para el caso de los perfiles de DGGE obtenidos para los sistemas que presentan una concentración inicial de 10 μM de As (V), se observó la presencia de 7 bandas en el perfil de DGGE obtenido al tiempo 48 h, una de las cuales era diferente al perfil control, en el perfil del tiempo 210 h se presentaron 6 bandas, en este tiempo, únicamente la banda 9 no se presentó. Al final de la cinética se observaron 6 bandas (408h), en este perfil se observó nuevamente la banda 9. De igual manera que con el perfil obtenido al final de la cinética para los sistemas sin As, el perfil obtenido al final de la cinética no corresponde con el perfil control lo cual se asocia a condiciones fisicoquímicas diferentes a las que se presentan al inicio de la cinética. Para los perfiles de DGGE obtenidos de los sistemas que presentan una concentración inicial de 250 μM de As (V), en el tiempo 48 h solo se observó la presencia de 5 bandas, una de ellas diferente a las 6 presentes en el perfil control. En el perfil correspondiente al tiempo 144 h se observaron 5 bandas, 2 de ellas eran diferentes a las presentadas en el perfil de 48 h, posteriormente, en perfil a las 210 h se presentaron solo 4 bandas que corresponden a las encontradas a las 144 h (bandas dominantes en el consorcio), a las 240 h se presentaron 7 bandas, 3 de ellas fueron diferentes a las encontradas en el perfil correspondiente al tiempo 210 h. En el perfil correspondiente al tiempo 350 h se presentaron 6 bandas, las cuales corresponden a 6 de las 7 que se presentaron en el tiempo anterior (240 h). Al final de la cinética (408 h) se presentaron 7 bandas, de las cuales 6 son similares al tiempo anterior y solo 4 son similares al tiempo 0 h, lo que indica que posiblemente a este tiempo, de igual manera que en los perfiles de DGGE obtenidos a concentraciones de 0 y 10 μM de As (V) lo cual se asocia a las condiciones fisicoquímicas del sistema al final de la cinética.

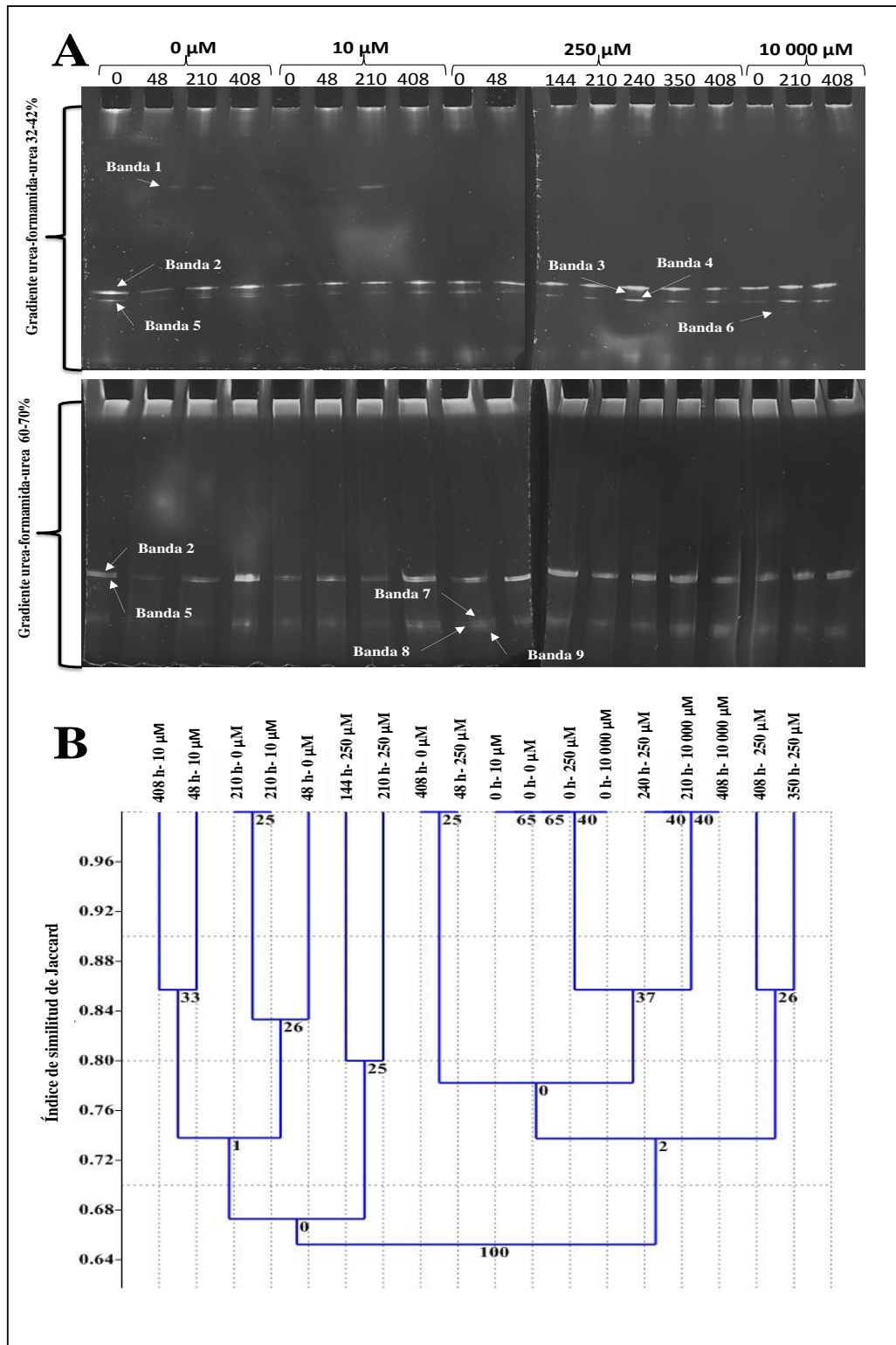


Figura 26.- Perfiles de DGGE obtenidos para el consorcio M2 en gradientes de desnaturalización de 32-42% y 60-70%, con un corrimiento a 65°C durante 6 h 35 min (A) y análisis clúster utilizando el índice de similitud de Jaccard (B), Bootstrap de 500 réplicas.

Para el caso de la evaluación de la diversidad microbiana a una concentración inicial de 10 000 μM de As (V), se observó la presencia de 7 bandas durante los perfiles a los tiempos 210 y 408 h (número máximo de bandas encontradas en un perfil de DGGE para el consorcio M2), una banda más que las encontradas en el perfil de DGGE obtenido al tiempo 0 h. Al final de la cinética no se determinaron cambios en la diversidad microbiana, ya que los perfiles obtenidos a las 210 y 408 h presentaron una similitud de 100%.

La banda número 3 se presentó en todos los perfiles correspondientes a los tiempos 0 h de cada concentración de As, sin embargo, esta banda no se presentó conforme transcurrió el tiempo durante la cinética cuando la concentración inicial de As era baja (0 y 10 μM), mientras que cuando la concentración de As (V) en los sistemas es alta (250 y 10 000 μM) dicha banda está presente, lo que indica que dicho filotipo se presenta cuando los sistemas están expuestos a concentraciones altas de As. De igual manera, se determinó que la banda 9 solo se presentó cuando los sistemas estuvieron en presencia de 10 y 250 μM de As (V), ya que esta no apareció en perfiles de DGGE para los sistemas sin As ni en los perfiles de la concentración más alta de As utilizada, este filotipo podría relacionarse con un microorganismo que se presenta en presencia de As, pero que es inhibido a concentraciones altas (10 000 μM).

El dendograma presentado en la Figura 27 A, para los perfiles de DGGE obtenidos de los sistemas sin As, muestra 2 grupos, uno que presenta una similitud del 80% entre los perfiles correspondientes a los tiempos 408 h y 0 h, y otro grupo con una similitud de 84 % que corresponde a los tiempos intermedios de muestreo (48 y 210 h), lo que indica una variación en la diversidad microbiana relacionada con la PHS presente en los sistemas, ya que en estos tiempos intermedios la PHS es alta. Esta variación en la diversidad microbiana es similar en los sistemas que presentan una concentración inicial de 10 μM de As (V) (Figura 27 B), a dicha concentración, el dendograma generado presenta 2 grupos, el primero agrupa los perfiles obtenidos al inicio y al final de la cinética con un 83% de similitud entre ambos perfiles, y en el segundo grupo se encuentran los perfiles obtenidos a los tiempos intermedios de análisis, con un 100% de similitud entre ambos perfiles, lo que indica un cambio de diversidad que se da, en este caso, por la presencia de As, ya que se presenta un agrupamiento entre los perfiles obtenidos en los sistemas que presentaron la concentración más alta y la

más baja de As, y otro agrupamiento entre los perfiles obtenidos a las 48 y 210 h, los cuales presentan las concentraciones intermedias de As presentes en los sistemas, dicho agrupamiento está dado por las concentraciones en la PHS y presentan una similitud del 100 %.

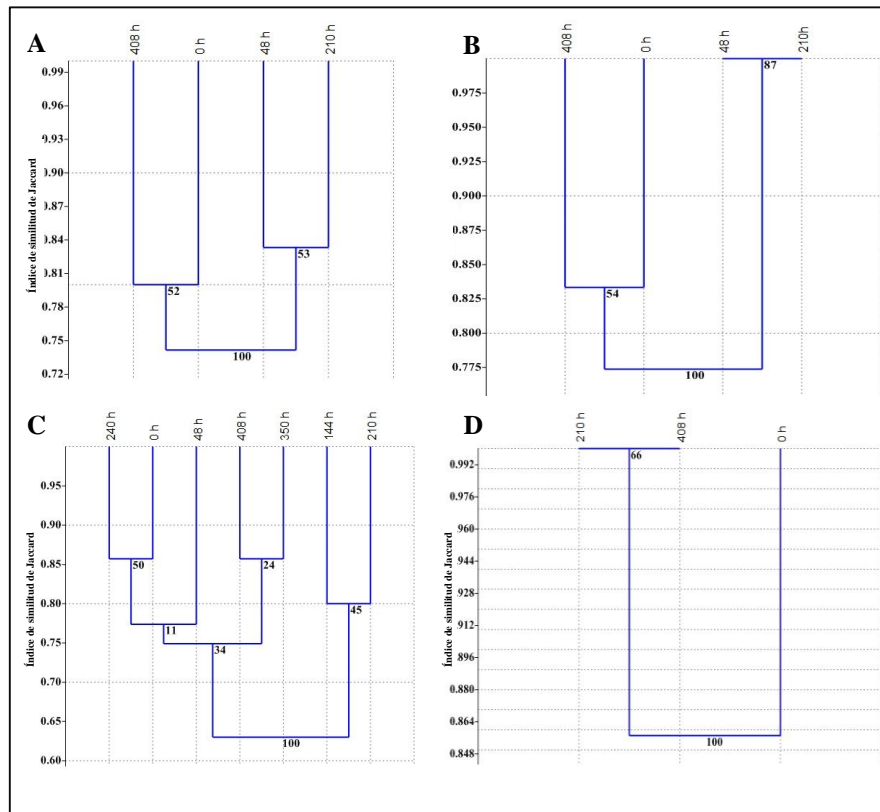


Figura 27.- Análisis clúster mediante el índice de similitud de Jaccard a concentración inicial de As de 0 mM (A), 0.01 mM (B), 0.25 mM (C) y 10 mM (D). Bootstrap de 500 réplicas.

En el dendrograma presentado en la Figura 27 C para los perfiles de DGGE obtenidos a una concentración inicial de 250 μ M de As (V), se observó un agrupamiento de los perfiles obtenidos al tiempo 144 h y 210 h con una similitud del 80% entre ellos, estos tiempos corresponden a una etapa de aumento en la PHS y el inicio de una disminución en dicha producción, relacionada con la bioestabilización de As. Asimismo, se observa un grupo formado entre los perfiles del tiempo 0 y 240 h, con una similitud del 86%, el cual indica que la diversidad microbiana en estos tiempos podría relacionarse con microorganismos sulfato reductores, ya que en dichos tiempos se presenta el inicio de una etapa de acumulación en la PHS, lo que justifica que el perfil obtenido en las 48 h sea tan cercano a dichos perfiles, ya

que en dicho tiempo el aumento en la PHS es considerable. Un agrupamiento entre los perfiles obtenidos a los tiempos 350 y 408 h con un índice de similitud del 86% entre ellos, indica que la diversidad al final de la cinética es similar, pero en contraste con el perfil obtenido al tiempo 0 h, esto asociado a que las condiciones fisicoquímicas en el sistema son diferentes al final de la cinética.

La Figura 27 D muestra el dendograma de la diversidad correspondiente a los sistemas del consorcio M2 con una concentración inicial de 10 000 μM de As (V), observando que los perfiles de DGGE obtenidos en los tiempos 210 y 408 h presentan un 100% de similitud y el perfil obtenido a las 0 h presenta una similitud del 86 % con respecto a los demás perfiles obtenidos, lo que indica que los microorganismos presentes a partir de las 210 h no cambian al final de la cinética, a diferencia del consorcio JH, en el cual se perdió diversidad a las 350 y 408 h para dicha concentración inicial de As (V).

Para el caso del consorcio M2, se determinó una variación de 2 a 3 bandas entre cada perfil durante la cinética en sistemas inoculados con concentraciones $\leq 250 \mu\text{M}$ de As (V), este cambio en la estructura microbiana durante la cinética podría estar dado por la concentración de As total en los distintos tiempos de muestreo y la concentración de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ presente en el sistema a dicho tiempo, esto en base a que los tiempos en los que se evaluó la diversidad microbiana se establecieron en base a las variaciones en la PHS durante las cinéticas de producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ presentadas en las sección 6.1 y que se confirmó que dichas variaciones se relacionan con procesos de reducción y remoción de As.

Estudios en sedimentos salinos con diferentes grados de contaminación por metales pesados así como trabajos en suelos impactados con DAM han reportado que sitios que presentan altas concentraciones de metales pesados (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni and Zn) afectan negativamente la abundancia de microorganismos y en la conformación de la estructura microbiana en comparación con sitios con menores concentraciones de metales pesados, asimismo, variaciones en las variables ambientales de los sitios tales como la temperatura del agua, pH y la concentración de sulfato son factores que generan variación en la estructura microbiana de cada sitio (Kim *et al.*, 2009, Machado *et al.*, 2012). Una biodisponibilidad de 0.7% de As, así como concentraciones altas de Pb, Cd y Zn (19 300, 64 y 4 331 mg/kg de suelo respectivamente) presentes en el suelo de donde fue aislado el

consorcio JH pudieron haber tenido influencia en la diversidad microbiana encontrada para dicho consorcio, esto en comparación con una mayor diversidad microbiana encontrada en el consorcio M2, el cual fue aislado de un sitio con biodisponibilidad de 0.4% de As y concentraciones menores de Pb, Cd y Zn (758, 50 y 2540 mg/kg de suelo) (Labastida *et al.*, 2012).

Autores como Anderson *et al.* (2009) han planteado la hipótesis de que las comunidades microbianas son moldeadas por las fuerzas selectivas en sus entornos locales, y que el estrés que provocan los metales genera que comunidades microbianas diferentes cambien a comunidades estructural y funcionalmente similares. El estrés que genera la presencia de As (V) en los consorcios JH y M2 no generó que estos consorcios convergieran en un perfil de diversidad y estructura similar, sin embargo, se observó un predominio de 4 filotípos similares para los dos consorcios microbianos, los cuales podrían ser microorganismos nativos que convergieron en los dos consorcios por las condiciones similares de nutrientes a las que se conservan estos consorcios.

El número de filotípos encontrados en el consorcio M2 (9 filotípos), en comparación con JH (5 filotípos), así como la variación en la diversidad microbiana durante la cinética de bioestabilización de As (V), las variaciones en la PHS y un retardo en el proceso de bioestabilización de As (V), sugieren la presencia de bacterias hidrolíticas en el consorcio M2, las cuales, pueden ser identificadas con los primers utilizados en el presente trabajo (Anexo 3). Dichas bacterias hidrolíticas podrían actuar en conjunto con las BSR presentes en el consorcio M2, y podría explicar porque los procesos de remoción de As que presentan los consorcios JH y M2 son relativamente diferentes en cuanto a la concentración en la PHS y el retardo en el proceso de bioestabilización por parte del consorcio M2 en comparación con el consorcio JH. Al respecto, se ha reportado, en consorcios aislados de sitios que presentan contaminación por metales pesados y que llevan a cabo procesos de sulfato reducción, que la actividad de poblaciones microbianas secundarias podrían tener una relación con la comunidad de BSR, ya que en ambientes naturales, podrían ser degradadores iniciales de macromoléculas, proporcionando fuentes de carbono fácilmente degradables como donadores de electrones para las BSR. Asimismo, una PHS mayor para el consorcio JH en comparación con el consorcio M2, sugiere que los cambios en la estructura microbiana

presentada para el consorcio M2 al inicio de la cinética, también se podrían relacionar a la disponibilidad de nutrientes, la cual genera una competencia entre los diferentes grupos microbianos que en última instancia conducen a la supervivencia de sólo aquellos capaces de degradar estos nutrientes al inicio de la cinética cuyos productos metabólicos generan condiciones óptimas en los sistemas para llevar a cabo la precipitación de metales pesados (Kieu *et al.*, 2013). Dicho efecto se ha reportado en consorcios que presentan bacterias degradadoras de celulosa y polipeptidos pertenecientes al género *Clostridium* y *Bacteroides spp.*, actuando en conjunto con BSR del género *Desulfovibrio vulgaris*, el cual predomina durante los procesos de remoción de metales en los que se ha utilizado dicho consorcio (Pruden *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que cuando los consorcios microbianos presentan variaciones en su diversidad, los microorganismos dominantes en dicho consorcio serán los que estén relacionados con procesos de adaptación más eficientes, en el consorcio M2, se presentó un dominio de 4 bandas (banda 2, 5, 7 y 8) durante la cinética en todas las concentraciones iniciales de As (V), este dominio se presentó aun cuando se presentaron variaciones en las concentraciones de As y PHS en los sistemas, dichas bandas dominantes podrían relacionarse a BSR, ya que se ha reportado que consorcios microbianos procedentes de residuos mineros utilizados para la remoción de Zn presentan un predominio de 3 BSR independientemente de la concentración de Zn, sulfato y sulfuro durante un proceso de remoción (Dar *et al.*, 2009).

El índice de riqueza de Chao 2 indicó que para el caso del consorcio JH no existe variación en la riqueza de microorganismos que se presentan durante la cinética en cada una de las concentraciones iniciales, y su abundancia se ve disminuida cuando el consorcio se expone a concentraciones de 10 000 μM de As, mientras que para el consorcio M2, se determinó, mediante este índice que cuando el consorcio se expone a una concentración de As de 10 μM , este presenta mayor riqueza de microorganismos (índice de Chao-2 de 9), la cual es muy similar a la encontrada en los sistemas sin As (índice de Chao-2 de 8.5) y pierde riqueza cuando se expone a concentraciones 250 y 10 000 μM de As, determinando valores del índice de riqueza de Chao-2 de 8 y 7 respectivamente. Asimismo, los sistemas inoculados con concentraciones de 0 y 10 μM de As presentan una abundancia menor en comparación con los sistemas inoculados con 250 y 10 000 μM de As. Está perdida en la riqueza y un

aumento en la abundancia de microorganismos a concentraciones $\geq 250 \mu\text{M}$ de As se podría atribuir a la presencia de altas concentraciones de As en el sistema que inhibe la presencia de ciertos microorganismos durante la cinética de bioestabilización de As a dichas concentraciones.

La poca variación en la diversidad microbiana que presenta el consorcio JH podría indicar que se trata de un consorcio que lleva a cabo diversos procesos metabólicos en conjunto con procesos de sulfato reducción, en donde cada uno de los microorganismos actúa en conjunto con los demás durante el proceso de bioestabilización de As y en donde las altas concentraciones en la PHS durante las primeras horas de la cinética generan un ambiente que limita el desarrollo y la presencia de otro tipo de microorganismos durante la bioestabilización de As, trabajos previos han identificado consorcios microbianos que presentan procesos de sulfato reducción utilizados para la remoción de metales pesados en sistemas batch, los cuales presentan un dominio de BSR cuando se adiciona lactato como donador de electrones y que han sido aislados de sitios que presentan contaminación por metales pesados (Geets *et al.*, 2005; Altun *et al.*, 2014).

Aun cuando los sistemas para los consorcios JH y M2 presentaron las mismas condiciones de incubación, nutrientes y la concentración de As inicial, la diversidad microbiana presente en el consorcio M2 podría generar condiciones internas diferentes a las generadas por el consorcio JH, las cuales se relacionan con los cambios en las especies de As y sus concentraciones, así como con las concentraciones de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ en los sistemas. Los cambios en la diversidad microbiana dados por las diferentes condiciones de incubación han sido estudiados por Lara *et al.* (2012) en muestras de sedimentos con presencia As (III) (hasta $10\,000 \mu\text{M}$) o As (V) (hasta $100\,000 \mu\text{M}$), en dicho estudio, se determinó la presencia de microorganismos capaces de transformar el As para la conservación de energía, acumulación de As y producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$, además de tolerar altos niveles de As, factores que son importantes al momento de establecer sistemas de biorremediación en los que se utilizan consorcios microbianos y que están influenciados por las condiciones que presentan en los sistemas de estudio.

6.2.5 Análisis multidimensional no métrico (NMDS)

Los análisis NMDS realizados para el consorcio microbiano JH se presentan en la Figura 28. En la Figura 28 A, que presenta el análisis NMDS para una concentración inicial de 0 μM de As (V), se observó que los perfiles de DGGE obtenidos al final de la cinética (210 y 408 h) se encuentran más influenciados por las variables medidas (PHS, pH y SSV), esto en comparación con los perfiles correspondientes al inicio de la cinética (0 y 48 h) y con base a la orientación que presentan los ejes de las variables medidas y la distribución de los perfiles en el plano. El mayor grado de influencia está marcado por la PHS hacia el perfil correspondiente a las 210 h y presenta una asociación negativa con la orientación que presenta el perfil obtenido al tiempo 0 h, en el cual se determinó la menor concentración de PHS y representa el perfil de DGGE menos influenciado por las variables medidas por su ubicación en el plano. La influencia que presentan las variables de pH y SSV sobre los perfiles de DGGE es mínima en comparación con la influencia que presenta la PHS, los ejes de dichas variables se encuentran orientados positivamente hacia el perfil de DGGE obtenido a las 408 h.

Para el análisis NMDS a una concentración inicial de 10 μM de As (V) (Figura 28 B), al igual que para los sistemas con concentración inicial de 0 μM de As (V), se observa que las variables PHS, pH y SSV se asocian positivamente con los perfiles obtenidos a final de la cinética (350 y 408h); asimismo, se observa que la PHS presenta una mayor influencia en el perfil obtenido a las 210 h en comparación con la influencia que presenta en los sistemas sin As. Asimismo, se observa que los perfiles obtenidos en las primeras horas de la cinética (0 y 48 h) se encuentran influenciados por la variable As, ya que en estos tiempos se determinaron las mayores concentraciones de esta variable, dicha asociación es escasa, esto se determinó por la longitud que presenta dicho eje. Los ejes correspondientes al pH, la concentración de As y SSV presentan menor influencia que el eje correspondiente a la PHS basados en su magnitud, esto basado en la distribución de los perfiles de DGGE obtenidos a las 0, 48 y 408 h, siendo el perfil obtenido a las 0 h el menos influenciado.

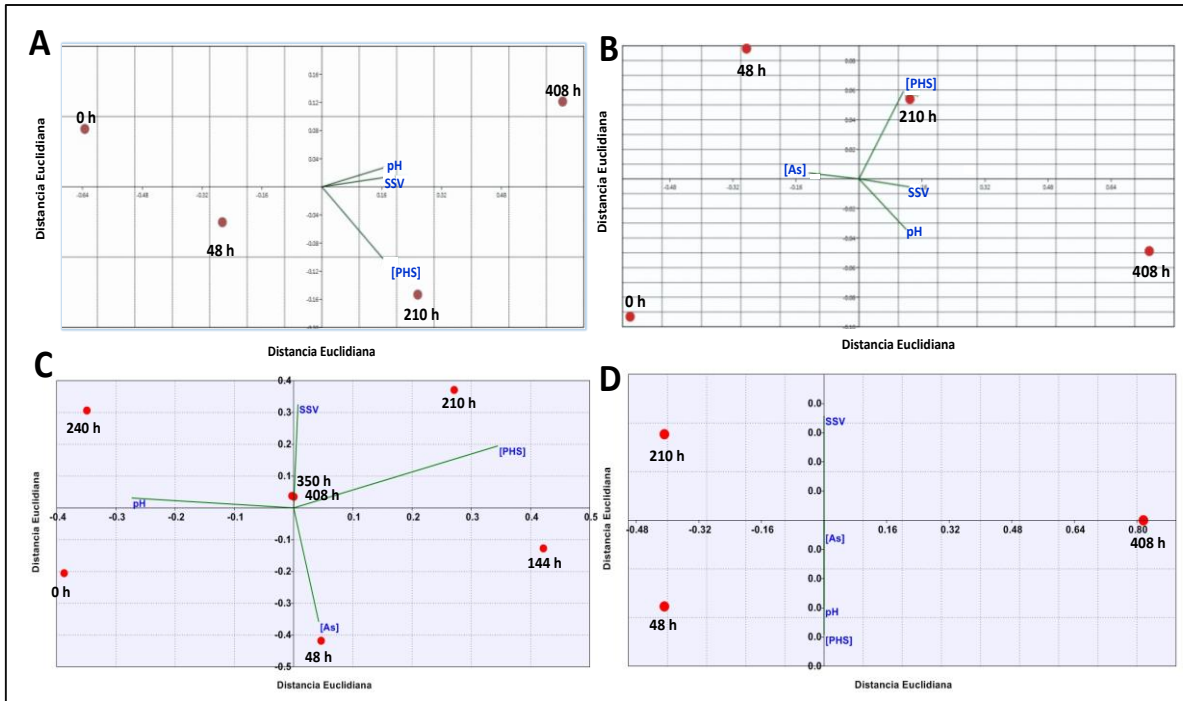


Figura 28.- Relación de variables con los perfiles de DGGE para el consorcio JH mediante un análisis de escalonamiento multidimensional no paramétrico a concentraciones iniciales de As de 0 μM (A), 10 μM (B), 250 μM (C) y 10 000 μM (D).

El análisis NMDS realizado para los perfiles de DGGE obtenidos a una concentración inicial 250 μM de As (V) (Figura 28 C), indica que las variables medidas (PHS, pH, As y SSV) se asocian de manera considerable con los perfiles de DGGE obtenidos a esta concentración inicial de As basados en la magnitud que presentan los ejes de las variables y en comparación con las magnitudes de los ejes de las variables en sistemas con menor concentración inicial de As. Asimismo, se observa un agrupamiento entre los perfiles obtenidos a las 350 y 408 h, los cuales son los más influenciados positivamente por la variable PHS, esta variable se asocia en menor medida con el perfil obtenido a las 210 h y de manera negativa con el perfil obtenido a las 0 h, el cual, únicamente se encuentra influenciado por la concentración de As. La magnitud que presentan los ejes de las variables son similares, lo que indica que los perfiles de DGGE hacia los que están orientados están asociados de manera considerable a la variable correspondiente, el eje correspondiente a la PHS es el que presenta mayor influencia en los perfiles correspondientes, esto en base a la proximidad que presentan los ejes de las demás variables a los ejes X o Y del plano, siendo la variable SSV la que presenta menor asociación con los perfiles en base a su orientación con respecto al eje X. Los

perfiles obtenidos a las 0 y 240 h se encuentran en un plano distante de los demás perfiles y ejes de variables, lo que indica escasa asociación con estos perfiles.

En el análisis NMDS realizado para una concentración inicial de 10 000 μM de As (V) que se presenta en la Figura 28 D, se observó que las variables medidas presentan escasa asociación con los perfiles de DGGE obtenidos, esto con base en los valores que estas adquieren con respecto al eje X, mientras que tomando en cuenta el eje Y, se observa que las variables que presentan mayor magnitud son la PHS y los SSV, las cuales generan la distribución en el plano de los dos perfiles obtenidos al inicio de la cinética. El perfil que presenta la menor asociación con las variables medidas es el perfil obtenido a las 408 h, el cual se encuentra en un plano distante con respecto a los demás perfiles obtenidos, recordando que únicamente en este tiempo y en esta concentración inicial de As (V) se presentó una variación en la comunidad microbiana presente en el consorcio JH.

Los análisis NMDS realizados para el consorcio microbiano M2 a las distintas concentraciones iniciales de As se presentan en la Figura 29. En la Figura 29 A para los sistemas que no presentan As, se observó cómo los perfiles obtenidos al inicio de la cinética (0 y 48 h) presentan escasa asociación con las variables PHS y pH, esto en base a su distribución en el plano con respecto al eje X, mientras que los dos perfiles obtenidos al final de la cinética (350 y 408 h) presentan asociación con las variables medidas, en específico, el perfil obtenido a las 210 h con la PHS y en menor magnitud, el perfil 408 h con el pH. La variable de SSV presenta escasa asociación con los perfiles de DGGE con base al eje X, sin embargo, tomando en cuenta los valores en el eje Y, se asocia con los perfiles obtenidos al final de la cinética, esto indica que las variables medidas son más determinantes al final de la cinética.

El análisis NMDS presentado en la Figura 29 B para los sistemas con una concentración inicial de As (V) de 10 μM , indica que el perfil de DGGE obtenido a las 48 h es el más influenciado por las variables PHS y pH, el cual corresponde a un tiempo o etapa de acumulación de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$, mientras que el perfil obtenido a las 408 h está influenciado por la variable de los SSV y negativamente por el eje de la concentración de As, este eje presenta la mayor magnitud de las variables medidas y presenta una asociación escasa con el perfil correspondiente al tiempo 0 h. Los perfiles de DGGE obtenidos a las 0 y 210 h son los menos

influenciados por las variables medidas, esto en base a la distribución que presentan en el plano con respecto a los ejes de las variables. La distribución en el eje de los cuatro perfiles de DGGE obtenidos a esta concentración de As indica que son distintos entre sí y que su distribución en el plano se ve afectada por las distintas variables medidas, en mayor medida por la concentración de As y la PHS.

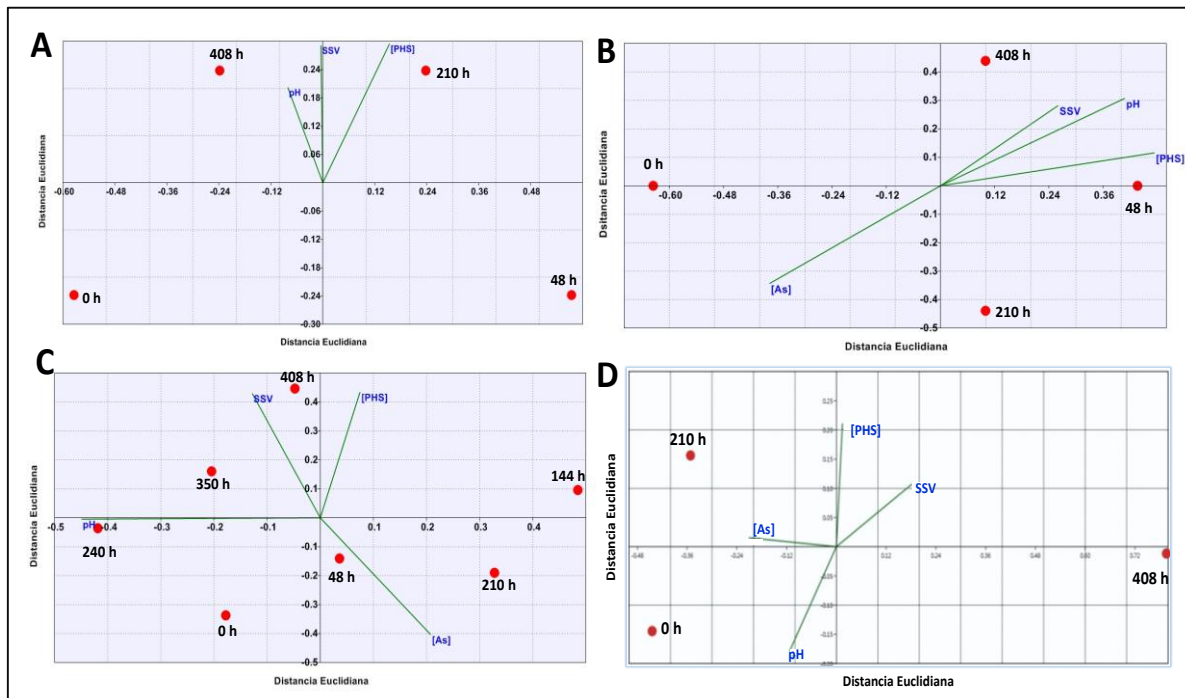


Figura 29.- Relación de variables con los perfiles de DGGE para el consorcio M2 mediante un análisis de escalonamiento multidimensional no paramétrico a concentraciones iniciales de As de 0 μM (A), 10 μM (B), 250 μM (C) y 10 000 μM (D).

El análisis NMDS presentado en la Figura 29 C para los sistemas con una concentración inicial de 250 μM de As (V), muestra que los perfiles de DGGE obtenidos a las 350 y 408 h se distribuyen en el plano en base a los valores en la producción de SSV, estos dos perfiles difieren en la presencia y ausencia de 1 banda y presentan las concentraciones más altas de SSV. Mientras que el eje del pH presenta una asociación positiva con el perfil de DGGE obtenido a las 240 h, pero dicho perfil presentan escasa asociación con las demás variables medidas. Los perfiles de DGGE correspondientes a las 48 y 210 h se distribuyen en el plano en base a la concentración de As y presentan una asociación negativa con los perfiles obtenidos al final de la cinética (350 y 408 h), estos perfiles solo difieren en la presencia y

ausencia de 1 banda. Mientras que el eje de la PHS se orienta al cuadrante donde se presentó el perfil de DGGE correspondiente a las 144 h, tiempo previo al primer proceso de bioestabilización de As y se asocia negativamente con el perfil obtenido a las 0 h, siendo ambos perfiles, distantes en la diversidad que presentan. El perfil de DGGE obtenido al tiempo 0 h es el perfil menos influenciado por las variables medidas. La distribución en los diferentes cuadrantes del plano que presentan los perfiles de DGGE indican la influencia de las variables medidas en la diversidad que presentó el consorcio M2 durante las distintas etapas del proceso de bioestabilización de As, asociadas en mayor medida con la concentración de As en los sistemas.

Para los sistemas con una concentración inicial de 10 000 μM de As (V), el análisis NMDS (Figura 29 D) muestra que los perfiles de DGGE obtenidos a los distintos tiempos presentan poca asociación con las variables medidas, esto en base a la magnitud que presentan los ejes de las variables medidas, siendo la PHS y el pH las de mayor magnitud. La distribución de los perfiles de DGGE a las 0 y 210 h presentan una escasa asociación con la concentración de As total y el pH, y para el caso del perfil obtenido a las 0 h se observó una influencia negativa por parte de la PHS y la concentración de SSV, en este tiempo se determinaron las concentraciones más bajas de dichas variables. En base la distribución en el plano del perfil de DGGE obtenido a las 408 h se estableció que dicho perfil es el que presentó menor asociación con las variables, demostrando una inhibición en la actividad microbiana al final de la cinética a esta concentración inicial de As.

Cuando el consorcio microbiano M2 se expuso a una concentración de 10 000 μM , la variación en la diversidad microbiana fue poca con respecto a la variación presentada en sistemas con concentraciones iniciales $\leq 250 \mu\text{M}$ de As (V), lo que sugiere que las concentraciones totales de As son importantes para determinar la diversidad en la comunidad microbiana de los consorcios JH y M2, explicando la poca variación en la diversidad microbiana que se presentó el consorcio M2 y la pérdida de diversidad para el consorcio JH cuando se expusieron a concentraciones altas de As. Al respecto, se ha reportado una presión selectiva en la comunidad microbiana dada por concentraciones de 10 000 μM de As (V) presente en sistemas utilizados para la remoción de dicho metaloide, determinando cambios en la población conforme la concentración de As (V) disminuye en los sistemas por acción

de bacterias respiradoras de As (Lear *et al.*, 2007), mientras que en sedimentos con concentraciones bajas de As (ca. 13 μM) se ha determinado una mayor diversidad microbiana en comparación con sedimentos contaminados con concentraciones menores de As (Jiang *et al.*, 2014). Para el caso de los sistemas de los consorcio M2 con concentración inicial de 10 000 μM de As (V) se observó que la PHS fue mínima y constante cuando la diversidad no tuvo variación, observando que la concentración en la PHS es un factor importante en la diversidad que se presenta en dichos sistemas con respecto al tiempo.

Los perfiles de DGGE obtenidos para el consorcio M2, con respecto al tiempo de muestreo, genera perfiles diferentes entre cada concentración inicial de As (V), con la aparición o desaparición de una o dos bandas en los mismos tiempos de muestreo pero a diferente concentración inicial de As, esto podría estar influenciado por la concentración inicial de As adicionada al sistema o por variables como el pH o la concentración en la PHS, la cual es diferente dependiendo de la concentración inicial de As (V) adicionada, se ha reportado que pHs ligeramente alcalinos pH y alta concentración de sulfuro en solución generan un retardo en la precipitación de As a concentraciones de hasta 0.26 μM (Altun *et al.*, 2014). Las variaciones en el pH reportadas en el presente trabajo para los consorcios JH y M2 a una concentración de 10 μM indican que en los sistemas se generan procesos que regulan dicho parámetro, manteniendo un pH entre 6.4 y 7 durante la cinética, lo que pudo haber generado procesos de bioestabilización eficientes a dicha concentración inicial de As ya que este intervalo de pH es óptimo para el desarrollo microbiano de BSR y formación de polisulfuros de As (Widdel y Hansen, 1992; Battaglia-Brunet *et al.*, 2012). El proceso de bioestabilización de As generado por el consorcio M2 presenta un retardo de aproximadamente 24 h con respecto al tiempo en el que se empieza a presentar el proceso para el consorcio JH a una concentración inicial de 250 μM de As. Este retardo se asocia a las concentraciones en la PHS generadas por el consorcio JH, las cuales son mayores que las determinadas para el consorcio M2 en el que la diversidad microbiana lleva a cabo diversos procesos catabólicos de la fuente de carbono (lactato) y por tanto un retardo en los procesos de sulfato reducción durante la cinética, lo que genera que la producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ sea menor. Estos procesos catabólicos generan productos intermedios dados por la oxidación de lactato y sabiendo de antemano que las BSR muestran preferencia por el lactato como fuente

principal de carbono, la diversidad microbiana que presenta el consorcio M2 genera una competencia por este sustrato (Moestedt *et al.*, 2013).

Un aumento en las concentraciones de variables como la PHS y/o una disminución en la concentración de As en los sistemas con concentraciones $\leq 250 \mu\text{M}$ de As (V) generaron cambios en la diversidad microbiana del consorcio M2, lo que indica una presión selectiva en la diversidad dado por las variaciones en la concentración de As y PHS, sin embargo, el número de bandas durante la cinética se mantuvo relativamente constante (entre 5 y 6 bandas), este comportamiento indica que la población varía con respecto al tiempo pero que el número de bandas en el sistema se mantiene, lo que difiere con estudios en los que se ha evaluado la composición microbiana con concentraciones de altas y variables de As, en los que se reporta una relación inversa entre el número de bandas y la concentración de As en las muestras (Dhiraj *et al.*, 2014).

Trabajos previos han reportado una disminución en la comunidad microbiana y su actividad por el aumento en la toxicidad de sulfuros de As dado por la falta de nutrientes en barreras reactivas permeables para la remoción de As (Wilopo *et al.*, 2008). Para los consorcios JH y M2 a concentraciones $\leq 250 \mu\text{M}$ de As (V), no se observó una pérdida en la diversidad microbiana al final de cada cinética que pudiera estar relacionado con la falta de nutrientes, lo que indica que los nutrientes no fueron una limitante para que se generaran las variaciones en la diversidad microbiana y los procesos de bioestabilización de As.

7. CONCLUSIONES

El proceso de bioestabilización de As (V) generado por consorcios microbianos JH y M2 presentó 3 etapas, las cuales son: un proceso de producción y acumulación de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$, una reducción de As (V) a As (III) asociada con la oxidación incompleta del sulfuro a S elemental, y; una etapa en la que co-existen el $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$, y As (III), esta serie de etapas se repitió de forma cíclica durante la cinética de producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ hasta alcanzar valores de precipitación dependientes de la concentración inicial de As (V) que van de 12 a 93 % para el consorcio JH y de 12 a 94 % para el consorcio M2. En la cinética de producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ en presencia de As (III) se observa que existe una producción constante de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ a concentraciones de 1, 10, 100 y 250 μM , sin embargo, existe una inhibición considerable en la producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ a concentraciones de 1 000, 10 000 y 100 000 μM de As en comparación con la producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ en presencia de As (V) a dichas concentraciones. El efecto toxico que presenta el As (III) en la producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ generó menores porcentajes de precipitación a una concentración cercana al IC_{50} (ca. 72 %) en comparación con los porcentajes de precipitación obtenidos cuando los sistemas son inoculados con As (V) (ca. 87%).

Los valores de IC_{50} para As (V) y As (III) en este estudio indican que los consorcios microbianos JH y M2 pueden ser expuestos a concentraciones ca. 232 y 200 μM de As (V) y As (III) respectivamente antes de limitar su desarrollo y que se correlacionan con las fracciones bioaccesibles y móviles de As de los suelos de donde fueron aislados dichos consorcios. Asimismo, se observó un incremento en la tasa de r_{max} para una concentración cercana al valor IC_{50} para los sistemas inoculados con (V) y se evidenció de bioprecipitación extracelular de nanocluster de sulfuros de As (tipo oropimente y rejalgar) y partículas de S, lo que podría explicar la tolerancia que ambos consorcios presentan a altas concentraciones de As (V), por lo que el mecanismo de tolerancia sugerido en este estudio incluye, principalmente, un incremento en la producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ a una concentración específica de As y la bioprecipitación extracelular de sulfuros metálicos en asociación con la producción de S elemental. Esto en base a que las partículas de S no fueron encontradas en los sistemas inoculados con As (III).

Los resultados en la especiación de As indican que las velocidades de reducción de As (V) y aparición de As (III), a la concentración más cercana al IC_{50} , son similares para ambos consorcios, determinado una velocidad de reducción promedio de As (V) ca. $0.54 \mu\text{M/h}$ y una velocidad de aparición de As (III) de $0.51 \mu\text{M/h}$. Las velocidades de reducción de As (V) y aparición de As (III) son máximas en el intervalo de tiempo en el cual se presenta una disminución en la concentración de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$, evidenciado que el proceso de estabilización de As (V) se presenta en dicho intervalo por la co-existencia de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ y As (III) en el sistema, asimismo, se estableció que los consorcios JH y M2 no presentan procesos metabólicos relacionados con la reducción biológica de As, sino que se trata de un proceso fisicoquímico mediado por la reducción de sulfato, determinando que son consorcios especializados en procesos de sulfato reducción que pueden ser utilizados en procesos de remoción de As por la resistencia que estos presentan a la toxicidad de dicho metaloide. Asimismo, el análisis estadístico demostró que existe un efecto significativo en la producción de $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ con respecto a la concentración inicial de As (V) añadida a los sistemas.

La presencia de 5 filotípos diferentes en el consorcio JH, así como mayores tasas de r_{max} en comparación con el consorcio M2, indican que es un consorcio microbiano que lleva a cabo diversos procesos metabólicos entre los que se incluye la sulfato reducción y que es capaz de tolerar los cambios en las condiciones fisicoquímicas que se generan dentro del sistema durante el proceso de bioestabilización de As (V), ya que, se determinó que los 5 filotípos no presentan cambios en su riqueza y actúan en conjunto durante la bioestabilización de As a concentraciones $\leq 250 \mu\text{M}$. Sin embargo, a una concentración inicial de As (V) de $10\,000 \mu\text{M}$ el consorcio JH pierde diversidad al final de la cinética debido al efecto tóxico que presentan las altas concentraciones de As (III) y las condiciones fisicoquímicas que este genera en el sistema.

El consorcio M2 presentó 6 filotípos diferentes al inicio de las cinéticas de bioestabilización de As (V) y se observó que las variaciones en la diversidad microbiana durante las cinéticas en sistemas con concentraciones de As (V) $\leq 250 \mu\text{M}$, se correlacionan con las variaciones en las concentraciones de As (V), As (III) y $\text{H}_2\text{S}_{\text{biog}}$ en las distintas etapas de la cinética. Cuando el consorcio M2 se expone a concentraciones de 0 y $10 \mu\text{M}$ de As (V) presenta mayor riqueza y menor abundancia de microorganismos que cuando se exponen a

concentraciones $\geq 250 \mu\text{M}$ de As (V) dado por el efecto toxico de altas concentraciones de este metaloide. En este consorcio se determinó la presencia de 4 microorganismos dominantes y la posible presencia de microorganismos asociados a diversos procesos catabólicos de sustratos orgánicos en determinadas etapas de la cinética, las cuales actúan en conjunto con las BSR, pudiendo generar un retardo y menores concentraciones en la PHS que provocan mayores tiempos para que se evidencien los procesos de bioestabilización de As en los sistemas inoculados con este consorcio.

8. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

En este estudio se proponen un mecanismo fisicoquímico de bioestabilización de As mediado por un proceso biológico de sulfato reducción, asimismo se determinaron los efectos que tiene este metaloide en el desarrollo microbiano de los consorcios JH y M2, y su dinámica poblacional durante el proceso de bioestabilización, sin embargo, es necesario realizar actividades que permitan complementar las observaciones y conclusiones que se han generado hasta el momento, entre ellas se recomienda:

- Determinar los géneros de los microorganismos presentes en los consorcios microbianos JH y M2 mediante la secuenciación de las distintas bandas obtenidas por la técnica DGGE.
- Determinar la presencia de bacterias capaces de llevar a cabo la reducción desasimilatoria de As como un mecanismo de resistencia mediante la evaluación de la presencia de genes específicos (*arrAB*) para la reducción de As (V) en los consorcios JH y M2.
- Evaluar la eficiencia en la bioestabilización de As cuando los consorcios microbianos son expuestos a condiciones similares a las que presenta el DAM en biorreactores continuos.
- Mediante la utilización de otros métodos multivariados se podría explicar de manera simultánea el efecto de las variables sobre la diversidad microbiana en los diferentes tratamientos, por lo que se recomienda ampliar su uso.
- Utilizar métodos semicuantitativos o cuantitativos para realizar estimaciones más precisas en la dinámica microbiana que presentan los consorcios JH y M2, basados en la comprobación de los cambios de abundancia y riqueza determinados en el presente trabajo.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abulencia, C., Wyborski, García, J., Podar, M., Chen, W., Chang, S. H., . . . Hazen, T. C. (2006). Environmental whole-genome amplification to access microbial populations in contaminated sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (5): 3291–330.
- Ahmann, D., Krumholz, L., Hemond, H., & Lovley, D. (1997). Microbial Mobilization of Arsenic from Sediments of the Aberjona Watershed. *Environmental Science Technology*, 31, 2923-2930.
- Altun, M., Sahinkayab, E., Durukana, I., Bektasa, S., & Komnitsas, K. (2014). Arsenic removal in a sulfidogenic fixed-bed column bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 269: 31–37.
- Anderson, J., Hooper, M., Zak, J., & Cos, S. (2009). Molecular and Functional Assessment of Bacterial Community Convergence in Metal-Amended Soils. *Microb Ecol*, 58:10–22.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzconni, L., Campos, L., Guwy, A., & Jenicek, P. (2006). Anaerobic Biodegradation, Activity and Inhibition (ABAI). *Institute of Environment & Resources, Technical University of Denmark*.
- Armienta, M., & Segovia, N. (2008). Arsenic and Fluoride in the groundwater of Mexico. *Environmental Geochemistry Health*, 30:345–353.
- Azpetia-Ramos, H. (2011). *Evaluación de la bioestabilización de arsénico en suelos impactados por actividad minero-metalúrgica*. Tesis para obtener el grado de maestría en ingeniería de minerales. UASLP.
- 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; 3923- 3933.
- Bouskill, N., Barker-Finkel, J., Galloway, T., Handy, R., & Ford, T. (2010). Temporal bacterial diversity associated with metal-contaminated river sediments. *Ecotoxicology*, 19:317–328.
- Bundschuh, J., Jean, J. S., Liu, C., López, D., Armienta, M. A., Guilherme, L. R., . . . Toujaguez, R. (2012). One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. *Science of the Total Environment*, 429, (2012) 2–35.

- Cabrera, G., Pérez, R., Gómez, J., Ábalos, A., & Cantero D. (2006). Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. *Journal of Hazardous Materials*, A135: 40-46.
- Canty, M., Hiebert, R., & Harrington-Baker, M. (2001). Innovative, in situ use of sulfate reducing bacteria to remove heavy metals from acid mine drainage. *Proceedings of the 2001 International Containment and Remediation Technology Conference and Exhibition*, June 10-13, 2001, Orlando, FL.
- Cao, J., Zhang, G., Mao, Z., Li, Y., Fang, Z., & Yang, C. (2012). Influence of electron donors on the growth and activity of sulfate-reducing bacteria. *International Journal of Mineral Processing*, 106–109: 58–64.
- Castro de Esparza, M. L. (2006). Removal of arsenic from drinking water and soil bioremediation. En A. M. In: Bundschuh J, *Natural arsenic in groundwater of Latin America* (págs. p. 16–7.). Mexico City 20–24 June 2006: Abstract Volumen International Congress.
- Chang, Y., Nawata, A., Jung, K., & Kikuchi, S. (2012). Isolation and characterization of an arsenate-reducing bacterium and its application for arsenic extraction from contaminated soil. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 39:37–44.
- Cheng, H., Hu, Y., Luo, J., Xu, B., & Zhao, J. (2009). Geochemical processes controlling fate and transport of arsenic in acid mine. *Journal of Hazardous Materials*, 165: 13–26.
- Chong, C., Annie-Tan, G., Wong, R., Riddle, M., & Tan, I. (2009). DGGE Wngerprinting of bacteria in soils from eight ecologically diVerent sites around Casey Station, Antarctica. *Polar Biol*, 32:853–860.
- Chou, H., Huang, J., Chen, W., & Ohara, R. (2008). Competitive reaction kinetics of sulfate-reducing bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic filters. *Bioresource Technology*, 99: 8061–8067.
- Church, C., Wilkin, R., & Alpers, C. (2007). Microbial sulfate reduction and metal attenuation in pH 4 acid mine water. *Geochemical Transactions*, 8(10), 1–14.
- Concha, G., Vogler, G., Lezcano, D., Nermell, B., & Vahter, M. (1998). Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. *Toxicological Sciences*, 44 (2):185–90.
- Cord-Ruwisch. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulphides in cultures of sulphate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 4, 3-36.

- Costa, M., & Duarte, J. (2005). Bioremediation of acid mine drainage using acidic soil and organic wastes for promoting sulphate-reducing bacteria activity on a column reactor. *Water, Air, and Soil Pollution*, 165: 325–345.
- Dann, A., Cooper, R., & Bowman, J. (2009). Investigation and optimization of a passively operated compost-based system for remediation of acidic, highly iron- and sulfate-rich industrial waste water. *Water Research*, 43: 2302–2316.
- Dar, S., Bijmans, M., Dinkla, I., Geurkink, B., & Len, P. (2009). Population Dynamics of a Single-Stage Sulfidogenic Bioreactor Treating Synthetic Zinc-Containing Waste Streams. *Microb Ecol*, 58:529–537.
- Dhiraj, P., Pinaki, S., Sufia, K., & Taraknath, P. (2014). Molecular survey on bacterial diversity in arsenic contaminated subsurface sediment in west Bengal, India. *Journal of Environmental Research And Development*, Vol. 9 No. 01: 15:24 .
- Dolla, A., Fournier, M., & Dermoun, Z. (2006). Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology*, 126: 87–100.
- Doshi, S. (2006). Bioremediation of acid mine drainage using sulfate-reducing bacteria. *U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Office of Superfund Remediation and Technology Innovation*, Washington, D.C.
- Dowdle., P. R., Laverman, A. M., & Oremland, R. S. (1996). Bacterial dissimilatory reduction of Arsenic(V) to Arsenic(III) in anoxic sediments. *Applied and environmental microbiology*, p. 1664–1669.
- Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Rice, W. E., Greenbe, A. E., & APHA. (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *APHA, AWWA, WEF, Baltimore*, 20th ed.
- Ficklin, W. (1983). Separation of arsenic (III) and arsenic (V) in ground waters by ion-exchange. *Talanta*, Vol 1, Num. 5: 171:173 .
- Field, J., Sierra-Alvarez, R., Cortinas, I., Feijoo, G., & Moreira, M. (2004). Facile reduction of arsenate in methanogenic sludge. *Biodegradation*, 15: 185–196.
- Figuroa, L. (2005). Microbial ecology of anaerobic biosystems treating mining influenced waters. *Presented at the Mine Water Treatment Technology Conference*, Pittsburgh, PA, August 15-18, 2005.
- Gallegos-Garcia, M., Mendez, R., & Celis, L. (2009). Precipitation and Recovery of Metal Sulfides From Metal Containing Acidic Wastewater in a Sulfidogenic Down-Flow Fluidized Bed Reactor. *Biotechnology and Bioenginee*, Vol. 102, No. 1: 91-100.

- Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., & Vangronsveld, J. (2006). DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfatereducing bacteria. *J Microbiol Methods*, 66:194–205.
- Gillan, D., Danis, B., Pernet, P., Joly, G., & Dubois, P. (2005). Structure of Sediment-Associated Microbial Communities along a Heavy-Metal Contamination Gradient in the Marine Environment. *Applied and environmental microbiology*, Vol 71 No. 2, 679:690.
- Hoeft, S., Kulp, T., Stolz, J., & Oremland, R. (2004). Dissimilatory Arsenate Reduction with Sulfide as Electron Donor: Experiments with Mono Lake Water and Isolation of Strain MLMS-1, a Chemoautotrophic Arsenate Respirer. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol. 70, No. 5 p. 2741–2747.
- Jian Lu, Wu, J., Chen, T., Wilson, P., Qian, J., & Hao, X. (2012). Valuable Metal Recovery During the Bioremediation of Acidic Mine Drainage Using Sulfate Reducing Straw Bioremediation System. *Water Air Soil Pollut*, 223:3049–3055.
- Jiang, Z., Li, P., Wang, Y., Li, B., Deng, Y., & Wang, Y. (2014). Vertical distribution of bacterial populations associated with arsenic mobilization in aquifer sediments from the Hetao plain, Inner Mongolia. *Environ Earth Sci*, 71:311–318.
- Johnson, D., & Hallberg, K. (2005). Acid mine drainage remediation options: A review. *Science of the Total Environment*, 338(1–2), 3–14.
- Jong, T., & Parry, D. (2003). Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research*, 37: 3379–3389.
- Jong, T., & Parry, D. (2004). Adsorption of Pb(II), Cu(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II), Fe(II), and As(V) on bacterially produced metal sulfides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275: 61–71.
- Kaksonen, A., Plumb, J., Franzmann, P., & Puhakka, J. (2004). Simple organic donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal and sulfate containing wastewater. *FEMS Microbiology Ecol*, 47, 279–289.
- Kieu, H., Horn, H., & Muller, E. (2013). The effect of heavy metals on microbial community structure of a sulfidogenic consortium in anaerobic semi-continuous stirred tank reactors. *Bioprocess Biosyst Eng*.
- Kikot, P., Viera, M., Mignone, C., & Donati, E. (2010). Study of the effect of pH and dissolved heavy metals on the growth of sulfate reducing bacteria by a fractional factorial design. *Hydrometallurgy*, 104: 494–500.

- Kim, J., Koo, S., Kim, J., Lee, E., Lee, S., & Ko, K. (2009). Influence of acid mine drainage on microbial communities in stream and groundwater samples at Guryong Mine, South Korea. *Environ Geol* , 58:1567–1574.
- Kirk, M., Roden, E., & Cro, L. (2010). Experimental analysis of arsenic precipitation during microbial sulfate and iron reduction in model aquifer sediment reactors. *Geochimica et Cosmochimica, Acta* 74:2538–2555.
- Kocar, B., Borch, T., & Fendorf, S. (2010). Arsenic repartitioning during biogenic sulfidization and transformation of ferrihydrite. *Geochimica et Cosmochimica* , 74: 980–994.
- Kolmert, A., Henrysson, T., Hallberg, R., & Mattiason, B. (1997). Optimization of sulphide production in an anaerobic continuous biofilm process with sulphate reducing bacteria. *Biotechnology Letters*, Vol 19, No 10: 971–975.
- Koschorreck, M. (2008). Microbial sulphate reduction at a low pH. *FEMS Microbiol Ecol*, 64: 329–342.
- Kulp, T., Hoefft, E., Miller, L., Saltikov, C., Murphy, J., Han, S., & Oremland, R. (2006). Dissimilatory Arsenate and Sulfate Reduction in Sediments of Two Hypersaline, Arsenic-Rich Soda Lakes: Mono and Searles Lakes, California. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 72, No. 10 : 6514-6526.
- Labastida-Núñez, I., Flores-Moreno, A., & Briones-Gallardo, R. (2007). Selecting samples in treatability tests for metallic stabilization.. Assessment of fate, impact and indi. *Candela, L. et al. (Eds) WATER POLLUTION in natural Porous media at different scales. Assessment of fate, impact and indicators. WAPO, Serie: Hidrología y aguas subterráneas No. 22. Instituto Geológico y Minero de España. Madrid, España, p 157 – 163.*
- Labastida-Núñez, I., Lázaro, I., Celis, L., Razo-Flores, E., Cruz, R., & Briones-Gallardo, R. (2013). Kinetic of biogenic sulfide production for microbial consortia isolated from soils with different bioaccessible concentrations of lead. *International Journal of Environmental Science and Technology*, Vol (10), p 827-836.
- Lara , J., Gonzalez , L., Ferrero, M., & Diaz, G. (2012). Enrichment of arsenic transforming and resistant heterotrophic bacteria from sediments of two salt lakes in Northern Chile. *Extremophiles* , 16:523–538.
- Lear, G., Song, B., Gault, A., Polya, A., & Lloyd, R. (2007). Molecular Analysis of Arsenate-Reducing Bacteria within Cambodian Sediments following Amendment with Acetate. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 72, No.4, p. 1041–1048.

- Leung, M. (2004). Bioremediation: Techniques for Cleaning up a mess. *BioTeach Journal / Vol. 2 /*, 18-22; www.bioteach.ubc.ca.
- Liamleam, W., & Annachhatre, A. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnol Adv.*, 25, 452-463.
- Lu, J., Cheni, T., Wua, J., & Wilson, C. (2011). Acid tolerance of an acid mine drainage bioremediation system based on biological sulfate reduction. *Bioresource Technology*, 102: 10401–10406.
- Machado, A., Magalhães, C., Mucha, A., Almeida, C., & Bordalo, A. (2012). Microbial communities within saltmarsh sediments: Composition, abundance and pollution constraints. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 99: 145-152.
- Macy, M., Santini, J., & Paulin, V. (2000). Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Arch Microbiology*, 173 : 49–57.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2000). Brock: Biología de los microorganismos. 8 ed., Prentice Hall, España.
- Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., & Naudi, R. (2008). The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, 34: 265–276.
- Marquez, R. M. (2008). *Modificación de la bioaccesibilidad de residuos mineros en presencia de materia orgánica empleando bacterias reductoras de sulfato*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.: Tesis de Maestría del Programa multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales.
- Marrugan, A. (2004). Measuring biological diversity. Victoria, Australia: Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company.
- McMahon, J., & Daugulis, A. (2008). Gas phase H₂S product recovery in a packed bed bioreactor with immobilized sulfate-reducing bacteria. *Biotechnol Lett*, 30:467–473.
- Miao, Z., Brusseau, M., Carroll, K., & Carre, C. (2012). Sulfate reduction in groundwater: characterization and applications for remediation. *Environ Geochem Health*, 34:539–550.
- Moestedt, J., Paledal, S., & Schnurer, A. (2013). The effect of substrate and operational parameters on the abundance of sulphate-reducing bacteria in industrial anaerobic biogas digesters. *Bioresource Technology*, 132: 327–332.
- Mohan, D., & Pittman, C. (2007). Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents – a critical review. *J. Hazard. Mater.*, 142,1–53.

- Mondal , P., Bhowmick , S., Chatterjee, D., Figoli, A., & Van der Bruggen, B. (2013). Remediation of inorganic arsenic ingroundwater for safe water supply: A critical assessment of technological solutions. *Chemosphere*, 92, 157–170.
- Muyzer , G., & Smalla , K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73:127–41.
- Muyzer, G., & Stams, A. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev Microbiology*, 6:441-454.
- Muyzer, G., De Waal, E., & Uitterlinden, G. (1993). Profiling of microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 59: 695-700.
- Nevatalo, L., Mäkinen, A., Kaksonen, A., & Puhakka, J. (2010). Biological hydrogen sulfide production in an ethanol–lactate fed fluidized-bed bioreactor. *Bioresource Technology* , 101: 276–284.
- Newman, D. K., Beveridge, T. J., & Morel, F. M. (1997b). Precipitation of Arsenic Trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 63, No. 5 2022-2028.
- Newman, D. K., Kennedy, E. K., & Coates, J. D. (1997a). Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Arch Microbiol*, 168 : 380–388.
- Niggemyer, A., Stackebrandt, & Spring, S. (2001). Isolation and Characterization of a Novel As(V)-Reducing Bacterium: Implications for Arsenic Mobilization and the Genus *Desulfitobacterium*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 5568-5580.
- Nordstrom, D. K. (2002). Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Public health Science*, 296:2143–2145.
- Nriagu, J., Bhattacharya, P., Mukherjee, A., & Bundschuh, J. (2007). Arsenic in soil and groundwater :an over view. En P. M. In:Bhattacharya, *Arsenic in Soil and Groundwater Environment*. (págs. ,pp.3–60.). Amsterdam: Elsevier.
- Onstott, T., Chan, E., & Polizzotto, M. (2011). Precipitation of arsenic under sulfate reducing conditions and subsequent leaching under aerobic conditions. *Applied Geochemistry*, 26: 269–285.
- Oremland, R., Stolz, J., Dowdle, P., Hoeft, S., Sharp, J., & Miller, L. (2000). Bacterial dissimilatory reduction of arsenate and sulfate in meromictic Mono Lake, California. *Geochimica et Cosmochimica*, Vol. 64, No. 18, pp. 3073–3084.

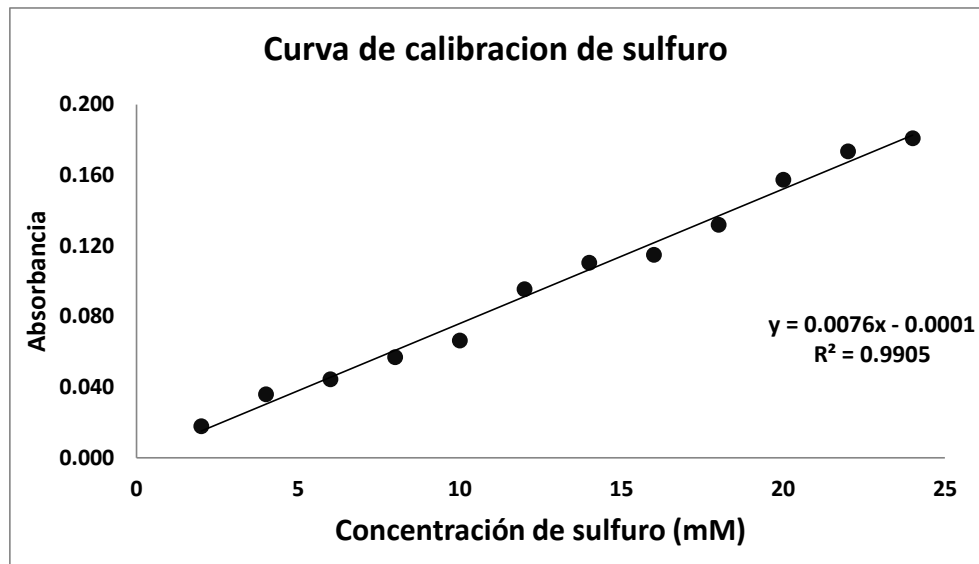
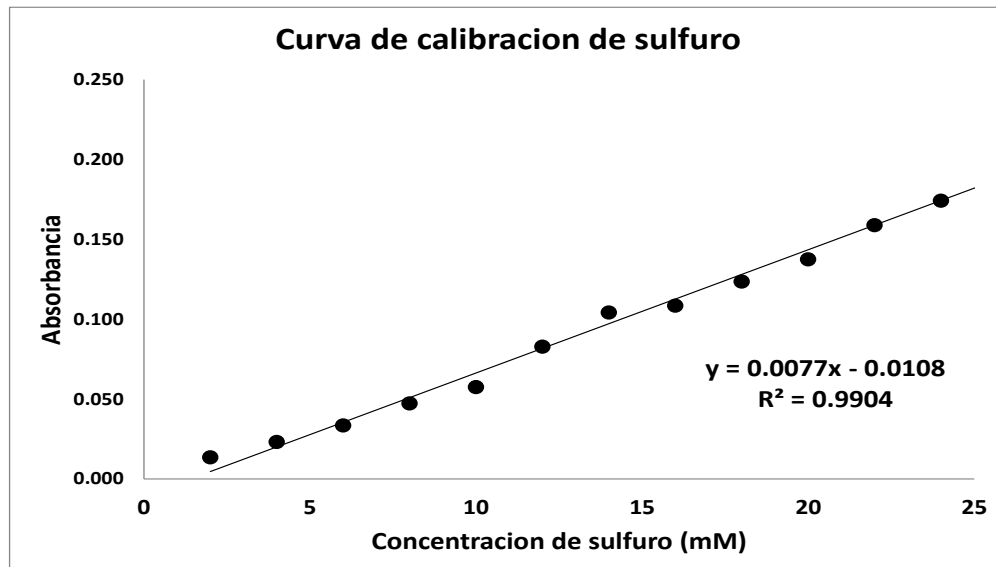
- Ortiz, I., Auria, R., Sigoillot, J., & Revah, S. (2003). Enhancing phenanthrene biomineralization in a polluted soil using gaseous toluene as a cosubstrate. *Environ Sci Technol*, 37(4):805–810.
- Oude-Elferink, S. J., Visser, A., & Hulshoff-Pol, L. W. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol Rev*, 15, 119-136.
- Piña-Salazar, E. (2010). *Desarrollo de biopelículas en un reactor de lecho fluidificado de flujo descendente a diferente relación DQO/sulfito y tiempo de residencia hidráulico*. San Luis Potosí: Tesis de grado: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT).
- Postgate, J. (1984). The sulphate reducing bacteria. 2da. ed., *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Pruden, A., Messner, N., Pereyra, L., & Hanson, R. (2007). The effect of inoculum on the performance of sulfate reducing columns treating heavy metal contaminated water. *Water Research*, 41: 904–914.
- Quillet, L., Besaury, L., Popova, M., Paissé, S., Deloffre, J., & Ouddan, B. (2011). Abundance, Diversity and Activity of Sulfate-Reducing Prokaryotes in Heavy Metal-Contaminated Sediment from a Salt Marsh in the Medway Estuary (UK). *Mar Biotechnol*.
- Rabus, R., Hansen, T., & Widdel, F. (2006). Dissimilatory sulfate and sulfur reducing prokaryotes. En *The prokaryotes. A handbook on the biology bacteria: ecophysiology and biochemistry* (págs. 659-768). New York: Springer-Verlag.
- Razo, I., Carrizales, L., Castro, J., Díaz-Barriga, F., & Monroy, M. (2004). Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water air soil poll*, 129-152.
- Rocha-Amador, D., Navarro, M., Carrizales, L., & Morales, R. (2007). Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water. *Cad Saude Publica*, 23 (Suppl 4):S579–87.
- Routh, J., Bhattacharya, A., Saraswathy, A., Jacks, G., & Bhattacharya, P. (2007). Arsenic remobilization from sediments contaminated with mine tailings near the Adak mine in Västerbotten district (northern Sweden). *Journal of Geochemical Exploration*, 92: 43–54.
- Sanz, J., & Kochling, T. (2007). Molecular biology techniques used in waster treatment: an overview. *Process Biochem*, 42:119–33.
- Smedley, P., & Kinniburgh, D. (2002). A review of the source,behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl.Geochem.*, 17,517–568.

- Soda, S., Yamamura, S., Zhou, H., Ike, M., & Fujita, M. (2006). Reduction Kinetics of As (V) to As (III) by a Dissimilatory Arsenate-Reducing Bacterium, *Bacillus* sp. SF-1. *Biotechnology ad bioengineering* , Vol. 93, No. 4:.
- Stolz , J., & Oremland, R. (1999). Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiology Reviews* , 23: 615-627.
- Teclu, D., Tivcheva, G., Laingb, M., & Wallisa, M. (2008). Bioremoval of arsenic species from contaminated waters by sulphate-reducing bacteria. *Water research* , 42: 4885–4893.
- Thomson, M., Simonton, S., & Barton, L. (2001). Stability of arsenic and selenium inmovilized by insitu microbial reduction. *Conference on Environmental Research*.
- Tsakamoto, T., Killion, H., & Miller, G. (2004). Column experiments for microbial treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. *Water Research*, 38:1405-1418.
- Uhrie, J., Drever, J., Colberg, P., & Nesbitt, C. (1996). In situ immobilization of heavy metals associated with uranium leach mines by bacterial sulfate reduction. *Hydrometallurgy* , 43: 231-239.
- Vaxevanidou, K., Giannikou, S., & Papassiopi, N. (2012). Microbial arsenic reduction in polluted and unpolluted soils from Attica, Greece. *Journal of Hazardous Materials* , 241– 242: 307– 315.
- Visser, A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate-containing wastewater. *Tesis Doctoral, Wageningen Agricultural University, The Netherlands*.
- Wang, S., & Zhao, X. (2009). On the potential of biological treatment for arsenic contaminated soils and groundwater. *Journal of Environmental Management*, 90, 2367–2376.
- Widdel, F., & Hansen , T. (1992). The dissimilatory sulfate and sulphur bacteria. En A. Balows, H. G. Truper, & M. Dworkin, *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications* (págs. 583-624). Springer-Verlag.
- Wilopo, W., Sasaki, K., & Hirajima, T. (2008). Identification of Sulfate- and Arsenate-Reducing Bacteria in Sheep Manure as Permeable Reactive Materials after Arsenic Immobilization in Groundwater. *Materials Transactions*, Vol. 49, No. 10, pp. 2275-2282.

ANEXOS

Anexo 1

Curva de calibración para determinación de sulfuro en solución (Método turbidimétrico de Cord Ruwish, 1985)



Anexo 2

Análisis estadísticos realizados en el programa STATISTICA v10.

Análisis de correlación de Spearman para el consorcio JH.

Análisis de correlación para los sistemas sin As (V).

Spearman Rank Order Correlations (JH final) MD pairwise deleted Marked correlations are significant at p <.0500			
Variable	PHS	pH	SSV
PHS	1.000000	0.156415	0.800000
pH	0.156415	1.000000	0.800000
SSV	0.800000	0.800000	1.000000

Análisis de correlación para los sistemas con una concentración de 10 µM de As (V).

Spearman Rank Order Correlations (JH final) MD pairwise deleted Marked correlations are significant at p <.05000						
Variable	PHS	Concentrac on final de As	As (V)	As (III)	pH	SSV
PHS	1.000000	-0.46429	-0.64286	0.214286	0.185640	1.00000
Concentracion final de As	-0.464286	1.00000	0.96429	0.357143	-0.678571	-1.00000
As (V)	-0.642857	0.96429	1.00000	0.250000	-0.571429	-1.00000
As (III)	0.214286	0.35714	0.25000	1.000000	-0.571429	-0.20000
pH	0.185640	-0.67857	-0.57143	-0.571429	1.000000	1.00000
SSV	1.000000	-1.00000	-1.00000	-0.200000	1.000000	1.00000

Análisis de correlación para los sistemas con una concentración de 250 µM de As (V).

Spearman Rank Order Correlations (JH final) MD pairwise deleted Marked correlations are significant at p <.05000						
Variable	PHS	Concetracior final de As	As (V)	As (III)	pH	SSV
PHS	1.000000	-0.34965	-0.39860	0.293706	-0.174825	0.64286
Concetracion final de As	-0.349650	1.00000	0.97203	0.461538	-0.461538	-1.00000
As (V)	-0.398601	0.97203	1.00000	0.426573	-0.489510	-1.00000
As (III)	0.293706	0.46154	0.42657	1.000000	-0.916084	-0.42857
pH	-0.174825	-0.46154	-0.48951	-0.916084	1.000000	0.39286
SSV	0.642857	-1.00000	-1.00000	-0.428571	0.392857	1.00000

Análisis de correlación para los sistemas con una concentración de 10 000 μM de As (V).

Variable	Spearman Rank Order Correlations (JH final) MD pairwise deleted Marked correlations are significant at $p < .05000$					
	PHS	Concetracion final de As	As (V)	As (III)	pH	SSV
PHS	1.000000	-0.035714	0.000000	0.000000	-0.217163	0.316228
Concetracion final de As	-0.035714	1.000000	0.964286	-0.714286	0.357143	-0.948683
As (V)	0.000000	0.964286	1.000000	-0.750000	0.535714	-0.948683
As (III)	0.000000	-0.714286	-0.750000	1.000000	-0.571429	0.948683
pH	-0.217163	0.357143	0.535714	-0.571429	1.000000	-0.948683
SSV	0.316228	-0.948683	-0.948683	0.948683	-0.948683	1.000000

Análisis de correlación de Spearman para el consorcio M2.

Análisis de correlación para los sistemas sin As (V).

Variable	Spearman Rank Order Correlations (M2 final) MD pairwise deleted Marked correlations are significant at $p < .0500$		
	PHS	pH	SSV
PHS	1.000000	0.256142	0.800000
pH	0.256142	1.000000	0.948683
SSV	0.800000	0.948683	1.000000

Análisis de correlación para los sistemas con una concentración de 10 μM de As (V).

Variable	Spearman Rank Order Correlations (M2 final) MD pairwise deleted Marked correlations are significant at $p < .05000$					
	PHS	Concetracion final de As	As (V)	As (III)	pH	SSV
PHS	1.000000	-0.857143	-0.96429	0.285714	-0.249123	1.00000
Concetracion final de As	-0.857143	1.000000	0.92857	0.035714	-0.414431	-0.80000
As (V)	-0.964286	0.928571	1.00000	-0.107143	-0.378394	-1.00000
As (III)	0.285714	0.035714	-0.10714	1.000000	-0.540562	0.40000
pH	-0.249123	-0.414431	-0.37839	-0.540562	1.000000	0.94868
SSV	1.000000	-0.800000	-1.00000	0.400000	0.948683	1.00000

Análisis de correlación para los sistemas con una concentración de 250 µM de As (V).

Variable	Spearman Rank Order Correlations (M2 final) MD pairwise deleted Marked correlations are significant at p <.05000					
	PHS	Concetracion final de As	As (V)	As (III)	pH	SSV
PHS	1.000000	-0.636364	-0.741259	0.419580	0.000000	0.321429
Concetracion final de As	-0.636364	1.000000	0.951049	0.153846	-0.307692	-0.464286
As (V)	-0.741259	0.951049	1.000000	0.048951	-0.342657	-0.464286
As (III)	0.419580	0.153846	0.048951	1.000000	-0.524476	0.500000
pH	0.000000	-0.307692	-0.342657	-0.524476	1.000000	-0.285714
SSV	0.321429	-0.464286	-0.464286	0.500000	-0.285714	1.000000

Análisis de correlación para los sistemas con una concentración de 10 000 µM de As (V).

Variable	Spearman Rank Order Correlations (M2 final) MD pairwise deleted Marked correlations are significant at p <.05000					
	PHS	Concetracion final de As	As (V)	As (III)	pH	SSV
PHS	1.000000	0.090094	0.126131	0.162169	-0.397887	0.316228
Concetracion final de A	0.090094	1.000000	0.964286	-0.607143	0.464286	-0.948683
As (V)	0.126131	0.964286	1.000000	-0.714286	0.428571	-0.948683
As (III)	0.162169	-0.607143	-0.714286	1.000000	-0.428571	0.632456
pH	-0.397887	0.464286	0.428571	-0.428571	1.000000	-0.632456
SSV	0.316228	-0.948683	-0.948683	0.632456	-0.632456	1.000000

Pruebas de rachas de Wald-Wolfowitz para el consorcio microbiano JH

Pruebas utilizando la PHS como variable dependiente.

Comparación entre tratamientos [As] µM	Prueba de Wald-wolfowitz	
	<i>p</i>	Dif. Sig.
0 vs 10	0.003	Si
0 vs 250	0.003	Si
0 vs 10 000	0.0001	Si
10 vs 250	0.003	Si
10 vs 10 000	0.0003	Si
250 vs 10 000	0.0003	Si

Pruebas utilizando el pH como variable dependiente.

Comparación entre tratamientos [As] μM	Prueba de Wald-Wolfowitz	
	<i>p</i>	Dif. Sig.
0 vs 10	0.676	No
0 vs 250	0.676	No
0 vs 10 000	0.21	No
10 vs 250	1	No
10 vs 10 000	0.094	No
250 vs 10 000	0.673	No

Pruebas utilizando los SSV como variable dependiente.

Comparación entre tratamientos [As] μM	Prueba de Wald-Wolfowitz	
	<i>p</i>	Dif. Sig.
0 vs 10	0.219	No
0 vs 250	0.444	No
0 vs 10 000	0.126	No
10 vs 250	0.219	No
10 vs 10 000	0.126	No
250 vs 10 000	0.445	No

Pruebas de Walf-Wolfowitz para el consorcio microbiano M2

Pruebas utilizando la PHS como variable dependiente.

Comparación entre tratamientos [As] μM	Prueba de Wald-Wolfowitz	
	<i>p</i>	Dif. Sig.
0 vs 10	0.003	Si
0 vs 250	0.003	Si
0 vs 10 000	0.0001	Si
10 vs 250	0.03	Si
10 vs 10 000	0.0001	Si
250 vs 10 000	0.0003	Si

Pruebas utilizando el pH como variable dependiente.

Comparación entre tratamientos [As] μM	Prueba de Wald-Wolfowitz	
	<i>p</i>	Dif. Sig.
0 vs 10	0.676	No
0 vs 250	0.676	No
0 vs 10 000	0.036	Si
10 vs 250	0.21	No
10 vs 10 000	0.676	No
250 vs 10 000	1	No

Pruebas utilizando los SSV como variable dependiente.

Comparación entre tratamientos [As] μM	Prueba de Wald-Wolfowitz	
	<i>p</i>	Dif. Sig.
0 vs 10	0.219	No
0 vs 250	0.445	No
0 vs 10 000	0.445	No
10 vs 250	0.445	No
10 vs 10 000	0.445	No
250 vs 10 000	1	No

Anexo 3

Índice de riqueza de Chao-2

Análisis para el consorcio microbiano JH

[As] μM	Especies totales	Especies únicas	Especies duplicadas	Índice de Chao-2
0 μM	5	0	0	5
10 μM	5	0	0	5
250 μM	5	0	0	5
10 000 μM	5	0	2	5

Análisis para el consorcio microbiano M2

[As] μM	Especies totales	Especies únicas	Especies duplicadas	Índice de Chao-2
0 μM	8	1	1	8.5
10 μM	8	1	2	9
250 μM	8	0	2	8
10 000 μM	7	0	1	7

Anexo 4

Alineamientos realizados en el programa BLAST del NCBI para evaluar la diversidad microbiana que amplifica mediante los primers 357F-GC y 907R.

Alineamientos realizados para bacterias sulfato reductoras

		357F GC		907 R	
<i>Desulfurella acetivorans strain A63</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1 CCGTCAATTCMTTGTAGTTT 20
	Sbjct	348	CCTACGGGAGGCAGCAG 364	Sbjct	935 CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 916
<i>Desulfuromonas acetoxidans strain DSM 684 16S ribosomal RNA gene</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1 CCGTCAATTCMTTGTAGTTT 20
	Sbjct	354	CCTACGGGAGGCAGCAG 370	Sbjct	941 CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 922
<i>Desulfobacula toluolica strain Tol2 16S ribosomal RNA gene</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1 CCGTCAATTCMTTGTAGTTT 20
	Sbjct	348	CCTACGGGAGGCAGCAG 364	Sbjct	935 CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 916
<i>Desulfovibrio piezophilus CITLV30 strain nov CITLV30</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1 CCGTCAATTCMTTGTAGTTT 20
	Sbjct	344	CCTACGGGAGGCAGCAG 360	Sbjct	927 CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 908
<i>Desulfocapsa sulfexigens strain DSM 10523</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1 CCGTCAATTCMTTGTAGTTT 20
	Sbjct	346	CCTACGGGAGGCAGCAG 362	Sbjct	933 CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 914
<i>Desulfocurvus thunnarius strain Olac 40</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1 CCGTCAATTCMTTGTAGTTT 20
	Sbjct	329	CCTACGGGAGGCAGCAG 345	Sbjct	912 CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 893
<i>Desulfomonile tiedjei strain DSM 6799</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1 CCGTCAATTCMTTGTAGTTT 20
	Sbjct	338	CCTACGGGAGGCAGCAG 354	Sbjct	925 CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 906
<i>Desulfococcus oleovorans Hxd3 strain Hxd3</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1 CCGTCAATTCMTTGTAGTTT 20
	Sbjct	350	CCTACGGGAGGCAGCAG 366	Sbjct	937 CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 918
<i>Desulfurivibrio alkaliphilus strain AHT2</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1 CCGTCAATTCMTTGTAGTTT 20
	Sbjct	344	CCTACGGGAGGCAGCAG 360	Sbjct	933 CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 914
<i>Desulfobacterium autotrophicum strain DSM 3382 16S</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1 CCGTCAATTCMTTGTAGTTT 20
	Sbjct	348	CCTACGGGAGGCAGCAG 364	Sbjct	935 CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 916

Alineamientos para bacterias acetogénicas

		357F GC			907 R	
<i>Acetobacter lambici</i> <i>strain</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct	284	CCTACGGGAGGCAGCAG 300	Sbjct	844	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 825
<i>Gluconacetobacter</i> <i>takamatsuzukensis</i> <i>strain T61213-20-1a</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct	284	CCTACGGGAGGCAGCAG 300	Sbjct	844	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 825
<i>Acidiphilium</i> <i>multivorum strain</i> <i>AIU301</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct	313	CCTACGGGAGGCAGCAG 329	Sbjct	873	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 854
<i>Acetobacter fabarum</i> <i>strain LMG 24244</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct	284	CCTACGGGAGGCAGCAG 300	Sbjct	844	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 825
<i>Acetobacter ghanensis</i> <i>strain LMG 23848</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct	284	CCTACGGGAGGCAGCAG 300	Sbjct	844	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 825
<i>Acetobacter</i> <i>peroxydans strain</i> <i>JCM 25077</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct	284	CCTACGGGAGGCAGCAG 300	Sbjct	844	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 825
<i>Acetobacter</i> <i>orleanensis strain</i> <i>JCM 7639</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct	284	CCTACGGGAGGCAGCAG 300	Sbjct	844	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 825
<i>Komagataeibacter</i> <i>swingsii strain JCM</i> <i>17123</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct	284	CCTACGGGAGGCAGCAG 300	Sbjct	844	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 825

Alineamientos para bacteria hidrolíticas de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Bacteroides*

		357F-GC			907 R	
<i>Desulfitobacterium</i> <i>hafniense strain</i> <i>DCB-2</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct	458	CCTACGGGAGGCAGCAG 474	Sbjct	1045	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 1026
<i>Clostridium</i> <i>saccharobutylicum</i> <i>strain NCP 262 1</i>	Query	1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query	1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct	331	CCTACGGGAGGCAGCAG 347	Sbjct	891	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 872

<i>Eubacterium acidaminophilum strain a1-2 1</i>	Query 1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query 1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct 347	CCTACGGGAGGCAGCAG 363	Sbjct 903	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 884
<i>Clostridium saccharobutylicum strain NCP 262</i>	Query 1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query 1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct 331	CCTACGGGAGGCAGCAG 347	Sbjct 891	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 872
[<i>Bacteroides</i>] pectinophilus strain N3	Query 1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query 1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct 348	CCTACGGGAGGCAGCAG 364	Sbjct 909	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 890
<i>Syntrophococcus sucromutans strain S195</i>	Query 1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query 1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct 342	CCTACGGGAGGCAGCAG 358	Sbjct 902	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 883
<i>Desulfitobacterium dehalogenans strain JW/IU-DC1</i>	Query 1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query 1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct 358	CCTACGGGAGGCAGCAG 374	Sbjct 945	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 926
<i>Eubacterium xylanophilum strain ATCC 35991</i>	Query 1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query 1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct 370	CCTACGGGAGGCAGCAG 386	Sbjct 930	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 911
[<i>Clostridium</i>] sticklandii strain DSM 519	Query 1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query 1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct 328	CCTACGGGAGGCAGCAG 344	Sbjct 884	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 865
<i>Bacteroides fragilis YCH46 strain YCH46</i>	Query 1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query 1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct 351	CCTACGGGAGGCAGCAG 367	Sbjct 928	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 909
<i>Bacteroides stercorisoris strain JCM 17103</i>	Query 1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query 1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct 334	CCTACGGGAGGCAGCAG 350	Sbjct 911	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 892
<i>Bacteroides faecichinchillae strain JCM 17102</i>	Query 1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query 1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct 336	CCTACGGGAGGCAGCAG 352	Sbjct 913	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 894
<i>Bacteroides cellulosilyticus strain JCM 15632</i>	Query 1	CCTACGGGAGGCAGCAG 17	Query 1	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 20
	Sbjct 334	CCTACGGGAGGCAGCAG 350	Sbjct 911	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 892

Anexo 5

Tabla de velocidades de reducción de As (V) y presencia de As (III) para el consorcio JH.

[As (V)]	Especie de As	Pendiente	Tiempos (h)	No de puntos tomados	R	Velocidad ($\mu\text{M/h}$)
10 μM	As (V)	1	0-210	4	0.994	-0.0216
		2	210-408	4	0.965	-0.0039
	As (III)	1	0-210	4	0.983	0.0244
		2	210-408	4	0.897	0.0054
250 μM	As (V)	1	0-168	6	0.984	-0.709
		2	168-280	6	0.947	-0.661
		3	280-408	3	0.960	-0.180
	As (III)	1	0-168	6	0.974	0.714
		2	168-280	6	0.869	0.657
		3	280-408	3	0.947	0.159
10 000 μM	As (V)	1	0-210	4	0.982	-6.309
		2	210-408	4	0.664	-3.762
	As (III)	1	0-210	4	0.953	6.135
		2	210-408	4	0.784	4.723

Tabla de velocidades de reducción de As (V) y presencia de As (III) para el consorcio M2.

[As (V)]	Especie de As	Pendiente	Tiempos (h)	No de puntos tomados	R	Velocidad ($\mu\text{M/h}$)
10 μM	As (V)	1	0-140	3	0.939	-0.0451
		2	140-240	3	0.949	-0.0051
		3	240-408	3	0.985	-0.0153
	As (III)	1	0-140	3	1	0.0276
		2	140-240	3	0.820	0.0080
		3	240-408	3	0.949	0.0079
250 μM	As (V)	1	0-144	5	0.840	-0.499
		2	144-240	5	0.896	-0.765
		3	240-408	5	0.823	-0.451
	As (III)	1	0-144	5	0.810	0.413
		2	144-240	5	0.831	0.666
		3	240-408	5	0.848	0.457
10 000 μM	As (V)	1	0-210	4	0.946	-9.693
		2	210-408	4	0.976	-2.150
	As (III)	1	0-210	4	0.937	7.832
		2	210-408	4	0.982	2.304