



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Resistencia de un consorcio fotosintético a
cadmio, manganeso y zinc para su remoción en
el tratamiento del drenaje ácido de mina**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA QUÍMICA METALÚRGICA**

PRESENTA

LETICIA HERNÁNDEZ ISABEL



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Antonio Huerta Cerdán
VOCAL: Profesor: Juan Manuel De La Rosa Canales
SECRETARIO: Profesor: Daniel Ramos Pérez
1.º SUPLENTE: Profesor: Samuel Kuperstein Aportela
2.º SUPLENTE: Profesor: Andrés Vela Avitua

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio Nacional de Geoquímica Ambiental, Instituto de Geología,
Universidad Nacional Autónoma de México, México.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Daniel Ramos Pérez

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Alicia Santana Silva

SUSTENTANTE:

Leticia Hernández Isabel

AGRADECIMIENTOS ACÁDEMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y Facultad de Química por abrir el panorama de mi futuro y convertirse durante más de cuatro años en mi primera casa.

Al Laboratorio de Geoquímica Ambiental-A a cargo del Dr. Francisco Martín Romero, perteneciente al Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía (LANGEM), por permitirme llevar a cabo en sus instalaciones este proyecto.

A mi asesor M. en C. Daniel Ramos Pérez, por cada uno de los conocimientos transmitidos durante la realización de este proyecto, por la asesoría en el desarrollo de las técnicas analíticas, la paciencia y dirección de esta tesis.

A mi supervisora técnica M. en C. Alicia Santana Silva, por asesorarme en las pruebas analíticas y por todas las ideas de redacción para mejorar este trabajo, por sus consejos y amistad.

A la Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández, por permitirme asistir a su clase de Biorremediación microbiana y realizar el análisis de caracterización microbiana de las muestras de drenaje ácido de mina de Taxco, Guerrero.

Al M. en C. Jaime Díaz Ortega y a la Dra. Elizabeth Solleiro Rebolledo, por permitirme hacer uso de su equipo de microscopía óptica, para el desarrollo de este proyecto.

A la QFB Fabiola Vega García por el apoyo en la coordinación de gestión de calidad en los equipos de LANGEM.

A mis profesores y H. Jurado, M. en C. Antonio Huerta Cerdán y M. en M. Juan Manuel De La Rosa Canales, por todos los conocimientos transmitidos durante la carrera y los aportes para mejorar en este trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Geoquímica Ambiental del Instituto de Geología, por las enseñanzas que me han dejado, en especial a la QFB Laura Esperanza Cristóbal Legorreta.

A todos los profesores del Departamento de Ingeniería Metalúrgica, por formarme y ser de inspiración para comenzar y terminar mis estudios.

*No existe una palabra, un texto o una
oración, que pueda definir un amor tan
increíble...*

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	3
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	5
GLOSARIO.....	7
RESUMEN	8
1 INTRODUCCIÓN.....	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo general.....	12
2.2 Objetivos particulares	12
3 HIPÓTESIS.....	13
4 MARCO TEÓRICO.....	14
4.1 Generación del Drenaje Ácido de Mina (DAM)	14
4.1.1 Factores que influyen en la generación de DAM.....	15
4.2 Problemática del DAM	16
4.3 Métodos de remediación de DAM	18
4.4 Uso de microorganismos para remover metales pesados de DAM	22
4.5 Consorcios microbianos fotosintéticos.....	24
4.5.1 Bioestimulación.....	25
4.6 Cianobacterias / microalgas: eliminación de contaminantes	25
4.7 Sitio de estudio	29
4.7.1 Problemática en Taxco, Guerrero	30
4.7.2 Estrategias de remediación en Taxco, Guerrero.....	31
4.7.3 Configuración de la planta piloto con filtros de caliza desarrollada en Taxco, Guerrero	33
5 MATERIALES Y EQUIPO.....	35
5.1 Materiales	35
5.2 Equipos.....	35
5.3 Reactivos	36

6	METODOLOGÍA.....	37
6.1	Muestreo y caracterización del DAM TRC proveniente de Taxco, Guerrero	38
6.1.1	Muestreo	38
6.1.2	Determinación de cationes mayoritarios y elementos traza	38
6.2	Caracterización microbiana.....	39
6.2.1	Bioestimulación.....	39
6.3	Tinción de Gram y observación en fresco. Diseño experimental.....	40
6.4	Pruebas de pH. Diseño experimental	41
6.5	Pruebas para cinética de crecimiento del CMF. Diseño experimental	42
6.6	Concentración inhibitoria de crecimiento del CMF a diferentes concentraciones de Cd, Mn y Zn. Diseño experimental	43
6.7	Prueba de remoción de metales (Cd, Mn, Zn) a las mejores condiciones de desarrollo del CMF. Diseño experimental.....	44
6.8	Análisis por cromatografía iónica.....	46
7	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	47
7.1	Muestreo y caracterización del DAM TRC proveniente de Taxco, Guerrero	47
7.2	Caracterización microbiana.....	49
7.3	Tinción de Gram y observación en fresco.....	52
7.4	Pruebas de pH.	54
7.4.1	Recuento celular en Cámara de Neubauer.....	54
7.4.2	Determinación de clorofila	56
7.5	Cinética de crecimiento del CMF	58
7.5.1	Recuento celular en Cámara de Neubauer.....	58
7.5.2	Determinación de clorofila	60
7.6	Concentración inhibitoria de crecimiento del CMF a diferentes concentraciones de Cd, Mn y Zn.	63
7.6.1	Concentración inhibitoria de cadmio en el crecimiento del CMF	64
7.6.2	Concentración inhibitoria de manganeso en el crecimiento del CMF.....	67
7.6.3	Determinación de clorofila	69
7.6.4	Concentración inhibitoria de zinc en el crecimiento del CMF.....	70
7.6.5	Efecto de la concentración de Cd, Mn y Zn en el tamaño de microalgas y cianobacterias.....	74

7.7	Remoción de Cd, Mn y Zn a las mejores condiciones de desarrollo del CMF	79
8	CONCLUSIONES	85
9	RECOMENDACIONES	86
10	REFERENCIAS	88
11	ANEXO	97
11.1	DETERMINACIÓN DE CLOROFILA	97

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Imágenes de la contaminación causada por DAM: A) Efluentes de DAM, (B) Desbaste de minerales eflorescentes secundarios en Marruecos, (C y D) DAM en Sudáfrica, (E) Lixiviación con cianuro, (F) Depósitos de sulfuros en Canadá generados por la minería [12].</i>	17
<i>Figura 2. Estrategias biológicas y abióticas para la remediación de aguas ácidas de drenaje de minas [11].</i>	19
<i>Figura 3. Localización del municipio de Taxco de Alarcón, Guerrero.</i>	29
<i>Figura 4. A) Patio de la bocamina 1412, B) Interior Socavón 1412, en ambas imágenes se puede observar las dimensiones de la generación de DAM, en Taxco, Guerrero.</i>	31
<i>Figura 5. Prueba de neutralización de DAM en Taxco, Guerrero con rocas calizas y lutita calcárea de la zona.</i>	31
<i>Figura 6. Tratamiento pasivo in situ en Taxco, Guerrero. Sistema de piletas que funcionan como barreras geoquímicas al paso de DAM.</i>	32
<i>Figura 7. Configuración del sistema de tratamiento pasivo in situ aplicado en Taxco, Guerrero.</i>	33
<i>Figura 8. Diagrama de flujo del desarrollo experimental.</i>	37
<i>Figura 9. % Relativo de microorganismos que constituyen el CMF aislado de Taxco, Guerrero.</i>	49
<i>Figura 10. A la izquierda, Chlorophyta, género Chlamydomonas (familia Chlamydomonadaceae) [4], a la derecha, se observa una imagen en cámara de Neubauer a 40X del CMF.</i>	50
<i>Figura 11. Comparación del desarrollo del CMF a diferentes valores de pH al finalizar el experimento.</i>	54
<i>Figura 12. Efecto del pH en la concentración de microalgas y cianobacterias.</i>	55
<i>Figura 13. Efecto del pH en el crecimiento del consorcio microbiano fotosintético por determinación de clorofila.</i>	56
<i>Figura 14. Cinética de crecimiento para microalgas en 9 días.</i>	59
<i>Figura 15. Cinética de crecimiento para cianobacterias en 9 días.</i>	60
<i>Figura 16. Experimento de cinética de crecimiento en diferentes días, A) Día 0, B) Día 6, C) Día 9.</i>	61
<i>Figura 17. Curva de crecimiento obtenida por extracción de clorofila.</i>	62
<i>Figura 18. Efecto de la concentración de Cd en el crecimiento de microalgas.</i>	65
<i>Figura 19. Efecto de la concentración de Cd en la concentración de cianobacterias.</i>	65
<i>Figura 20. Efecto de la concentración de Cd en el crecimiento del consorcio microbiano fotosintético.</i>	66
<i>Figura 21. Efecto de la concentración de Mn en el crecimiento de microalgas.</i>	68

<i>Figura 22. Determinación de la concentración de microalgas y cianobacterias a diferentes concentraciones de Mn.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 23. Efecto de la concentración de Mn en el crecimiento del consorcio microbiano fotosintético.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 24. Efecto de la concentración de Zn en el crecimiento de microalgas.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 25. Efecto de la concentración de Zn en el crecimiento de cianobacterias.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 26. Efecto de la concentración de Zn en el crecimiento del consorcio microbiano fotosintético.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 27. Observación en cámara de Neubauer del CMF, A) CMF a 238.7mg/L de Cd, a 40X, B) Microalga a 612mg/L de Cd a 40X.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 28. Observación en cámara de Neubauer del CMF, A) Microalga a 83.1mg/L de Mn, a 40X, B) Microalga a 177.3mg/L de Mn a 40X.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 29. Observación en cámara de Neubauer del CMF, A) Microalgas a 867.5mg/L de Zn, a 40X, B) Microalga a 2110mg/L de Zn a 40X.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 30. Remoción de Cd²⁺, Mn²⁺ y Zn²⁺, a diferentes condiciones del DAM TRC.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 31. A) Espectrofotómetro UV-Visible Thermo-Scientific, B) Muestras obtenidas de la extracción de clorofila del CMF.....</i>	<i>97</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Resumen de las opciones de tratamiento de DAM con sus ventajas y desventajas.</i>	20
<i>Tabla 2. Ejemplos de microorganismos que se han utilizado en la biorremediación de aguas contaminadas por cadmio.</i>	23
<i>Tabla 3. Ejemplos de microorganismos que se han utilizado en la biorremediación de aguas contaminadas por manganeso y zinc.</i>	24
<i>Tabla 4. Eliminación de metales pesados de las aguas residuales por consorcios de cianobacterias/microalgas y bacterias.</i>	27
<i>Tabla 5. Pruebas experimentales para determinar el pH óptimo de crecimiento del CMF.</i>	41
<i>Tabla 6. Pruebas experimentales de cinética de crecimiento del CMF.</i>	42
<i>Tabla 7. Concentración inhibitoria de Cd, Mn y Zn para CMF en DAM TRC bioestimulado con 5% de MBB.</i>	43
<i>Tabla 8. Concentraciones de Cd, Mn y Zn para su remoción de DAM TRC con bioestimulante (5% MBB), a las mejores condiciones de crecimiento.</i>	45
<i>Tabla 9. Determinación de cationes por ICP OES y IC, en el sistema de tratamiento de DAM en Taxco, Guerrero.</i>	47
<i>Tabla 10. Límites máximos permisibles para metales pesados [84].</i>	48
<i>Tabla 11. Caracterización por tinción de Gram del CMF, con adición de Cd, Mn y Zn.</i>	53
<i>Tabla 12. Conteo por cámara de Neubauer de microalgas y cianobacterias que conforman el CMF, para determinación de pH óptimo.</i>	55
<i>Tabla 13. Determinación de la concentración de clorofila obtenida a diferentes valores de pH.</i>	56
<i>Tabla 14. Determinación de la concentración de microalgas y cianobacterias en cámara de Neubauer para cinética de crecimiento.</i>	58
<i>Tabla 15. Determinación de clorofila para conocer la cinética de crecimiento del CMF.</i>	61
<i>Tabla 16. Concentración de cationes en el DAM TRC bioestimulado con 5 % MBB, analizado por IC.</i>	63
<i>Tabla 17. Concentración de microalgas y cianobacterias a diferentes concentraciones de Cd.</i>	64
<i>Tabla 18. Determinaciones de clorofila a del CMF a diferentes concentraciones de Cd.</i>	66
<i>Tabla 19. Concentración de microalgas y cianobacterias a diferentes concentraciones de Mn.</i>	67
<i>Tabla 20. Determinaciones de clorofila a, del CMF a diferentes concentraciones de Mn.</i>	69

<i>Tabla 21. Concentración de microalgas y cianobacterias a diferentes concentraciones de Zn por conteo en cámara de Neubauer.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabla 22. Determinación de clorofila a, a diferentes concentraciones de Zn.</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 23. Diámetros promedio de microalgas y cianobacterias a dos diferentes concentraciones de Cd.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabla 24. Diámetros promedio de microalgas y cianobacterias a dos diferentes concentraciones de Mn.</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 25. Diámetros promedio de microalgas y cianobacterias a dos diferentes concentraciones de Zn.</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 26. Cambio en la concentración de Cd²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Na²⁺, NH⁴⁺, K⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺ en el DAM TRC, al ser tratado con un consorcio microbiano fotosintético.</i>	<i>80</i>
<i>Tabla 27. Porcentaje de remoción de Cd, Mn y Zn a las diferentes condiciones de concentración.</i>	<i>82</i>

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

≈	Aproximadamente
σ	Desviación estándar
°C	Grados Celsius
<	Menor que
≤	Menor o igual que
<LD	Por debajo del límite de detección
μm	Micrómetros
μM	Micromolar
Acw ₀	Clima semicálido, con lluvias en verano, con presencia de canícula, % de lluvia invernal menor de cinco, verano fresco y largo
CMF	Consortio Microbiano Fotosintético
Conc.	Concentrado
DAM	Drenaje Ácido de Mina
DAM TRC	Drenaje Ácido de Mina Tratado con Rocas Calizas
EI	Efluente Industrial
EIG	Efluente de la Industria del Galvanizado
FRC	Filtro de Rocas Calizas
g	Gramos
IC	Cromatografía iónica (por sus siglas en inglés <i>Ionic Chromatography</i>)
ICP OES	Espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (por sus siglas en inglés <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy</i>)
GEI	Gas de Efecto Invernadero
L	Litro
MBB	Medio Basal de Bold
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal (por sus siglas en inglés <i>ribosomal Ribonucleic Acid</i>)
SEMARNAT	Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales
SG	Secuenciación Genética
sp.	Especie de
spp.	Especies (varias especies mismo género)
X	Aumento

GLOSARIO

Consortio microbiano: Se denomina consorcio a un sistema de dos o más miembros en el cual cada organismo hace algo en beneficio a otro [1].

Bioacumulación: Proceso de depósito gradual y durante un determinado tiempo, de una sustancia química en el organismo de un ser vivo, ya sea porque el producto es absorbido más rápidamente de lo que puede ser utilizado o porque no puede ser metabolizado [2].

Biomagnificación: Aumento progresivo de la concentración de un contaminante en los organismos vivos, a medida que se transfiere a través de la cadena alimenticia. [3].

Microalgas: Organismos microscópicos fotosintéticos, esto es, capaces de producir oxígeno a partir de la radiación solar. Esta actividad la llevan a cabo gracias a unas estructuras especiales denominadas cloroplastos, en las cuales se encuentran diversos pigmentos (clorofilas, ficobilinas, carotenos y xantofilas) capaces de atrapar la luz solar [4].

Cianobacterias: Las cianobacterias o algas verde azules son microorganismos fotoautótrofos, acostumbradas a vivir sin demasiadas exigencias nutricionales, pueden crecer en medios minerales y el CO₂ atmosférico constituye una excelente fuente de carbono (alimento) para ellas. En su morfología las cianobacterias pueden ser unicelulares, coloniales o filamentosas [5]. Presentan la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica, proceso por el cual se convierte la energía lumínica en química, liberándose oxígeno procedente de la ruptura de moléculas de agua [6].

Sorción: Interacción de un átomo, molécula o partícula con la superficie sólida de una interfaz sólido-líquido o una interfaz sólido-gas. Este término general incluye la absorción, la adsorción, la quimisorción y la fisorción [7].

RESUMEN

La minería en Taxco, Guerrero comenzó desde la época prehispánica, actualmente se encuentra inactiva debido a una huelga iniciada en el año 2007, como resultado de lo anterior el plan de cierre y post-operación no fue aplicado, aunado a la mala planeación de la disposición de los residuos generados de los procesos de beneficio para la obtención de Ag, Au, Cu, Pb y Zn, en la actualidad han presentado diversos problemas de contaminación a la biota de la zona, el principal: drenaje ácido de mina (DAM).

El DAM generado del Socavón 1412 (interior mina), ha sido tratado con rocas calizas y lutitas calcáreas de la zona, así como por un sistema de piletas que intercala filtros de rocas calizas (FRC) y sedimentadores, sin embargo, la eficiencia de remoción para metales como el Cd, Mn y Zn no ha sido suficiente para cumplir con la NOM-001-SEMARNAT-1996 en materia de metales pesados para descargas mensuales a ríos [8].

En el presente escrito se plantea una opción de tratamiento pasivo, basado en la biorremediación microbiana, en el que se ha evaluado la resistencia de un consorcio microbiano fotosintético (CMF) para la remoción de Cd, Mn y Zn en el drenaje ácido de mina, que ha sido previamente tratado con un sistema de rocas calizas, a fin de implementarlo en un sistema biogeoquímico que permita una disposición adecuada de las aguas tratadas.

Las condiciones más importantes para el desarrollo del CMF son: nutrientes, por lo que se bioestimuló el drenaje ácido de mina tratado con rocas calizas (DAM TRC), con 5% de medio basal de Bold (MBB), las mejores condiciones en las que el CMF alcanza su mayor crecimiento es, a pH 5.5 a los 8 días.

Conociendo las mejores condiciones de crecimiento se realizaron pruebas a diferentes concentraciones de Cd, Mn y Zn, para determinar la remoción de estos en el DAM TRC. Las concentraciones utilizadas en la prueba de remoción para los tres metales de interés fueron: 343.8 mg/L de Cd, 80.4 mg/L de Mn, 1773.4 mg/L de Zn y una combinación de los tres metales a 349.5 mg/L de Cd, 83.6 mg/L de Mn y

1719.6 mg/L de Zn.

Los porcentajes de remoción para el cadmio van de 8.3 a 11.6%, de manganeso de 0 a 10.2% y de zinc de 3.8 a 10.7% en 19 días, lo dicho hasta aquí supone que, si se realiza la bioestimulación del DAM TRC, el desarrollo del consorcio microbiano fotosintético permitirá disminuir la concentración de Cd, Mn y Zn, hasta alcanzar la concentración adecuada para su disposición en el río Taxco, en poco más de un año. Además de evidenciar la resistencia del CMF a altas concentraciones de Cd, Mn y Zn que podrían derivar en otras aplicaciones de este.

1 INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales pesados es seguramente uno de los problemas ambientales más serios. Industrias como la minero-metalúrgica, petroquímica, de producción de fertilizantes y pesticidas, curtidora, de producción de energía nuclear, entre otras, producen residuos que contienen metales pesados como (Cd, Cu, Cr, Co, Mn, Ni, Pb y Zn) los cuales, terminan transfiriéndose al medio ambiente debido a un incorrecto tratamiento o disposición final.

Los metales pesados pueden ser acumulados en los distintos eslabones de la cadena trófica, (bioacumulación), e incluso trasladados a sitios muy alejados del punto de origen de la contaminación, usualmente a través de cursos de agua (biomagnificación). Estos dos procesos traen consecuencias ambientales graves para el ecosistema y para la salud del hombre [9].

La peligrosidad de los metales pesados es aún mayor al no ser ni química ni biológicamente degradables. Actualmente, se conocen más sobre los efectos adversos de estos elementos tanto en la salud humana como en los animales y plantas. Los efectos de los metales sobre el funcionamiento de los ecosistemas varían considerablemente y son de importancia económica y de salud pública. Entre los mecanismos moleculares que determinan la toxicidad de los metales pesados se encuentran:

1. El desplazamiento de iones metálicos esenciales y bloqueo de sus grupos funcionales.
2. Modificación de la conformación activa de biomoléculas, enzimas y polinucleótidos.
3. Ruptura de la integridad de biomoléculas y modificación de otros agentes biológicamente activos [10].

En la actualidad diversos grupos de investigación han estudiado la utilización de microorganismos con el fin de biorremediar los sitios contaminados con metales pesados, y se ha demostrado la capacidad que poseen algunas algas, bacterias y hongos de sobrevivir a la exposición y al mismo tiempo la capacidad de remover metales pesados del medio.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la remoción de cadmio, manganeso y zinc del drenaje ácido de mina previamente tratado con filtros de roca caliza, mediante el uso de microalgas y cianobacterias presentes en un consorcio microbiano fotosintético, aislado de Taxco, Guerrero.

2.2 Objetivos particulares

- Obtener un CMF resistente a las condiciones del DAM de Taxco, Guerrero, mediante bioestimulación.
- Determinar la cinética de crecimiento del consorcio microbiano fotosintético, para encontrar el tiempo óptimo de crecimiento a las condiciones del DAM TRC bioestimulado.
- Determinar el pH óptimo de crecimiento del consorcio microbiano fotosintético, que será utilizado en las pruebas de remoción de Cd, Mn y Zn.
- Evaluar el efecto de la concentración de Cd, Mn y Zn en el crecimiento del consorcio microbiano fotosintético.
- Valorar la remoción de Cd, Mn y Zn por el consorcio microbiano fotosintético en el tratamiento del DAM TRC.

3 HIPÓTESIS

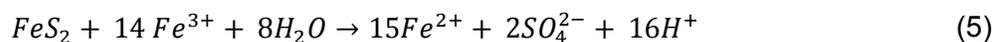
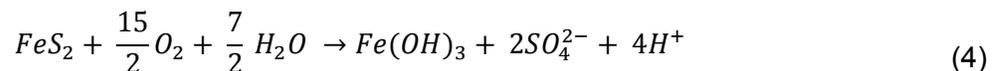
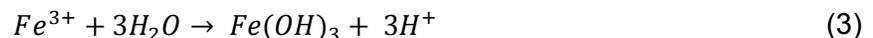
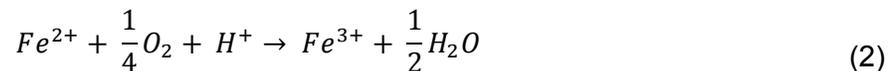
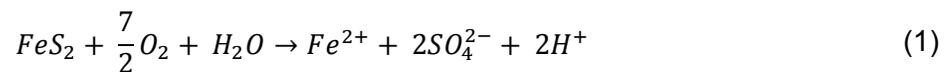
El uso de un consorcio microbiano fotosintético resistente a las condiciones del DAM tratado con rocas calizas puede mejorar la remoción de elementos como el cadmio, manganeso y zinc en un sistema de tratamiento si se logran determinar sus mejores condiciones de crecimiento.

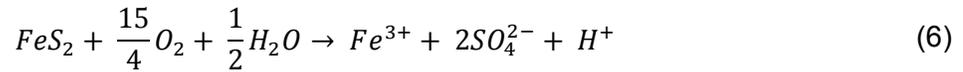
4 MARCO TEÓRICO

4.1 Generación del Drenaje Ácido de Mina (DAM)

El drenaje ácido de mina (DAM, por sus siglas en español) es un problema importante en todo el mundo, principalmente por aguas residuales ácidas ricas en azufre subproductos de una variedad de operaciones industriales tales como el procesamiento galvánico y el lavado de los gases de combustión en las centrales eléctricas, sin embargo, el principal productor de tales efluentes, la industria minera. Las aguas que drenan minas activas, en particular, abandonadas y desechos mineros a menudo son ácidas (a veces extremadamente) [11]. Una vez que se genera el DAM, es difícil controlar el proceso y el tratamiento requiere un alto costo.

El DAM causa impactos ambientales severos, particularmente en el suelo, los recursos hídricos y las comunidades acuáticas. La fuente principal de DAM es la oxidación de minerales sulfurados, que inicialmente se exponen al medio ambiente mediante intensas actividades mineras. En particular, entre los sulfuros metálicos, el mineral de pirita (FeS_2 , comúnmente conocido como el oro de los tontos) es uno de los principales minerales responsables de la generación de DAM debido a su facilidad de oxidación cuando se expone al oxígeno, agua y microorganismos. La oxidación de pirita está representada por diferentes reacciones en diferentes condiciones, las cuales se presentan a continuación:





Por ejemplo, las reacciones (1) - (6) representan los procesos principales y comunes para la oxidación de pirita. La reacción (1) muestra la oxidación de pirita bajo oxígeno molecular en presencia de exceso de agua a pH neutro. La reacción global para la oxidación de pirita (reacciones (1) - (3)) está representada por la reacción (4). La reacción (5) muestra la oxidación completa de la pirita donde el ion férrico actúa como agente oxidante, y también se considera una reacción más rápida que la reacción (1). Del mismo modo, la oxidación completa de la pirita en presencia de bajo contenido de agua está representada por la reacción (6) [12].

4.1.1 Factores que influyen en la generación de DAM

Los principales factores que determinan la tasa de generación de ácido son:

- pH.
- Temperatura.
- Contenido de oxígeno de la fase gaseosa, si la saturación es menor al 100%.
- Concentración de oxígeno en la fase de agua.
- Grado de saturación con agua.
- Actividad química de Fe^{3+} .
- Área superficial del sulfuro de metal expuesto.
- Se requiere energía de activación química para iniciar la generación de ácido.
- Actividad bacteriana.

Los factores químicos, biológicos y físicos son importantes para determinar la tasa de generación de ácido; los factores físicos, en particular la permeabilidad de la roca mineral de desecho, son particularmente importantes. Los vertederos con alta permeabilidad tienen un alto ingreso de oxígeno, lo que contribuye a mayores velocidades de reacción química, por lo tanto, temperaturas más altas y un aumento de la entrada de oxígeno a través de la convección. La mayoría de las pruebas de

Acidithiobacillus ferrooxidans han implicado la oxidación de pirita (FeS_2); sin embargo, la bacteria puede acelerar la oxidación de sulfuros de antimonio, galio, molibdeno, arsénico, cobre, cadmio, cobalto, níquel, plomo y zinc. Para que las bacterias prosperen, las condiciones ambientales deben ser favorables. Por ejemplo, *A. ferrooxidans* es más activo en agua con un pH menor a 3.2. Si las condiciones no son favorables, la influencia bacteriana sobre la generación de ácido será mínima. Esta aparente importancia de las condiciones ambientales explica la contradicción en la experimentación informada que muestra que la influencia bacteriana varía de mayor a menor. En situaciones donde la aceleración bacteriana es significativa, existen factores adicionales que determinan el grado de actividad bacteriana y la tasa asociada de generación de ácido. [13].

4.2 Problemática del DAM

El DAM plantea un grave problema de contaminación para las generaciones actuales y futuras, especialmente debido al bajo pH, altas concentraciones de metales disueltos potencialmente tóxicos, metaloides y sulfatos [14].

Entre los metales disueltos, el Fe^{2+} es el más abundante y común en la mayoría del DAM. El Fe^{2+} en el DAM reacciona con el oxígeno disuelto para producir precipitados de óxido de hierro, y puede sofocar la vida a lo largo del camino al incrustarse en los lechos de arroyos u océanos. En consecuencia, la vida acuática pequeña que se alimenta del fondo del océano o de los arroyos puede verse gravemente afectada y finalmente desaparecer [15]. Además, el problema no termina con la vida acuática pequeña; también tiene un impacto negativo en la cadena alimentaria.

Además, la formación de precipitado de hidróxido férrico agrava la condición al disminuir el pH y dañar la mayoría de los microorganismos existentes en él. Debido a la naturaleza corrosiva, el DAM interactúa con las rocas que contienen diferentes tipos de minerales y provoca fácilmente la solubilidad de los metales tóxicos. El agua generada en el DAM eleva el nivel de metal disuelto en la corriente de agua superficial receptora y afecta negativamente a la biota de la corriente [12].

El cobre y zinc son elementos traza en la vida de animales y plantas, pero en altas dosis son tóxicos [16]. Se conoce que metales como el cadmio, es altamente tóxico para plantas, animales y humanos, y que cuando está presente en formas biodisponibles, existe la bioacumulación tanto en organismos terrestres y acuáticos. Otros metales como arsénico, manganeso y mercurio, típicos productos del DAM son conocidos por ser carcinógenos, por causar dermatitis y desórdenes neurológicos [17]. En la Figura 1, se muestran imágenes de la contaminación causada por DAM en diferentes partes del mundo.



Figura 1. Imágenes de la contaminación causada por DAM: A) Efluentes de DAM, (B) Desbaste de minerales eflorescentes secundarios en Marruecos, (C y D) DAM en Sudáfrica, (E) Lixiviación con cianuro, (F) Depósitos de sulfuros en Canadá generados por la minería [12].

El tratamiento del DAM que se compone de varios metales tóxicos disueltos es demasiado complejo y costoso. Si el DAM no se maneja adecuadamente, causa una considerable degradación ambiental, contaminación del agua y del suelo, un grave impacto en la salud de las comunidades cercanas, pérdida de biodiversidad y ecosistema acuático [18].

4.3 Métodos de remediación de DAM

Dadas las dificultades prácticas que conlleva inhibir la formación de DAM en la fuente, a menudo, la única alternativa es minimizar el impacto que esta agua contaminante tiene en los arroyos y ríos receptores y en el entorno en general. Este enfoque implica medidas de control de la migración.

Los métodos de remediación se pueden clasificar dependiendo de la tecnología y materiales que se requieren en activos o pasivos, o por factores que intervienen, es decir si están regidos por factores vivos o sin vida en, abióticos y biológicos.

Los métodos de tratamiento activo incluyen la aplicación de productos químicos alcalinos para precipitar metales y otras técnicas como la adsorción [19, 20], el intercambio iónico [21] y la tecnología de membranas [22, 23].

Los sistemas de tratamiento pasivos como los humedales se caracterizan por utilizar elementos naturales que permiten regular el pH, además de procesos químicos y biológicos para retener los elementos metálicos en solución. Se basan en la energía suministrada por la luz solar y/o el medio ambiente. Los sistemas pasivos tienen la ventaja de que requieren relativamente poco mantenimiento (y costos recurrentes) que los sistemas activos, aunque pueden ser costosos y/o poco prácticos de configurar en primer lugar [11].

En realidad, todas las tecnologías de tratamiento pasivo requieren una cierta cantidad de costos de mantenimiento.

Una subdivisión más útil es entre aquellas tecnologías de remediación que dependen de actividades biológicas y aquellas que no lo hacen. Dentro de estos grupos principales, hay procesos que pueden describirse como activos o pasivos.

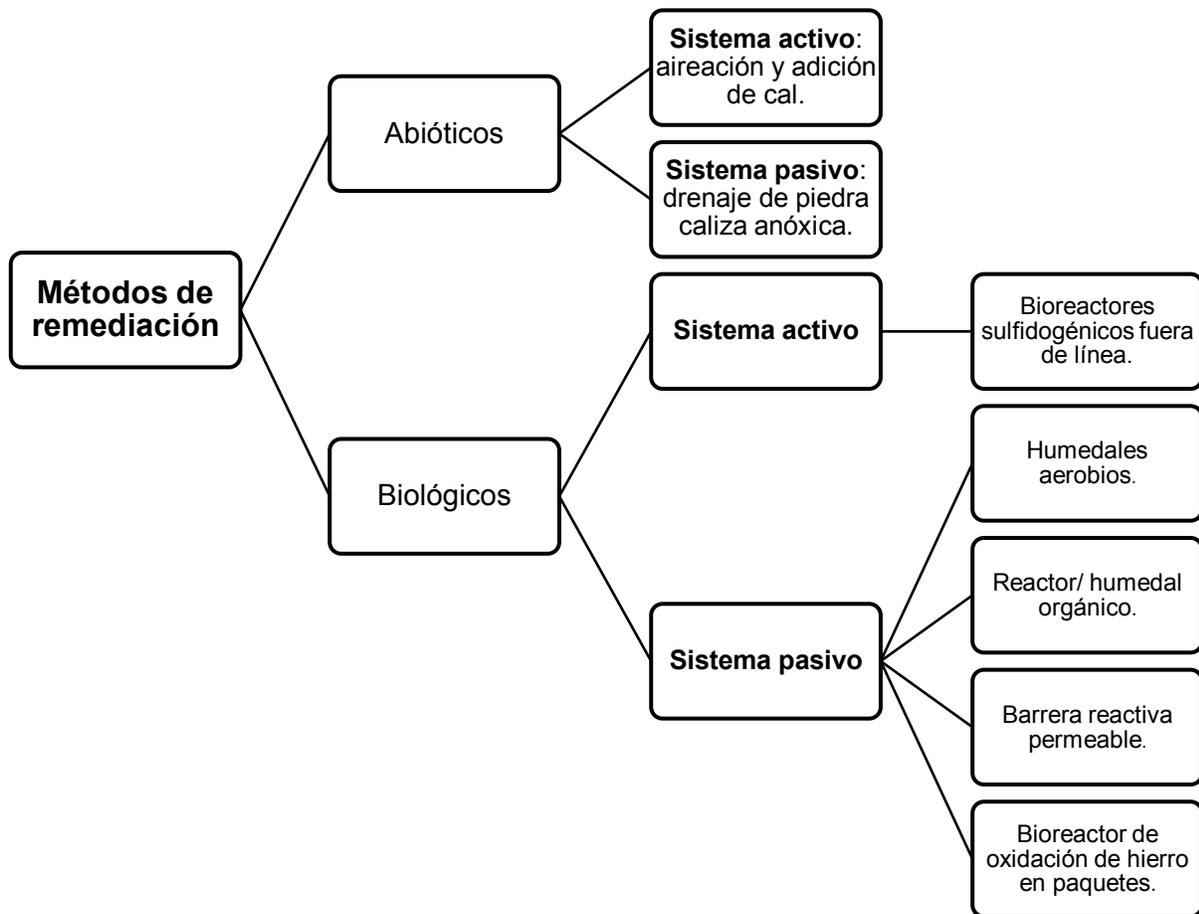


Figura 2. Estrategias biológicas y abióticas para la remediación de aguas ácidas de drenaje de minas [11].

En la figura 2 se han clasificado los principales métodos de remediación bióticos y abióticos, utilizando como subclasificación si son activos o pasivos.

La opción de tratamiento pasivo es más apropiada para la aplicación en minas abandonadas donde existe flujo continuo de agua de DAM [24], ya que tiene beneficios de bajo costo operativo y mantenimiento. La elección del tratamiento pasivo para remediar el DAM depende de la capacidad del sistema particular de producir alcalinidad y su eficiencia de eliminación de metales. Por ejemplo, metales como Zn y Mn no se eliminan fácilmente a un pH inferior a 6, por lo tanto, el tratamiento pasivo en el que se usan drenajes de piedra caliza no es el método de elección para la eliminación de altas concentraciones de Zn y Mn. Para la eliminación exitosa de la alta concentración de estos metales es la aplicación de

MgO o combinación de piedra caliza y MgO como un método alternativo en el tratamiento pasivo de DAM [25, 26].

La elección de las opciones de tratamiento de DAM está determinada por una serie de factores ambientales, de composición de DAM, de pH y económicos. En general, **no existe** una tecnología universal para el tratamiento del DAM, ya que la composición del DAM varía según sus fuentes, la elección del tratamiento de DAM y los residuos producidos durante el tratamiento también difieren. Sin embargo, algunos investigadores recomendaron que la tecnología de sustrato alcalino disperso para tratar el DAM con altas concentraciones de metales [12].

Actualmente, el interés de reducir el costo del tratamiento motivó a las investigaciones a buscar opciones de tratamiento de DAM de bajo costo. Por ejemplo, las aplicaciones de materiales naturalmente disponibles, subproductos industriales y sustratos orgánicos han surgido recientemente como opciones de tratamiento de bajo costo de DAM.

Las ventajas y desventajas de estas opciones de tratamiento y otras se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de las opciones de tratamiento de DAM con sus ventajas y desventajas.

Opciones de tratamiento	Ventajas	Desventajas	Referencias
Pasivo: carbonatos, cal, mármol, ceniza, compuesto de arcilla bentonita.	Rentable en relación con el tratamiento activo. Efectivo a pequeña escala.	La sobredosis puede movilizar contaminantes. Requiere agitación.	[27]
Biochar	Reducción ácida y toxicidad del metal.	Insignificante, dificultad de recuperación de recursos.	[28]
Harina de hueso	Rentable. Tratamiento pasivo efectivo de DAM.	Necesidad de calentar a 500°C, limpiar, comprimir, hervir y secar; dificultad de aumentar el pH.	[29]
Lodo BOS	Rentabilidad relativa por químicos alcalinos industriales.	Insignificantes.	[30]

(continúa)

Tabla 1. Resumen de las opciones de tratamiento de DAM con sus ventajas y desventajas. (continuación)

Opciones de tratamiento	Ventajas	Desventajas	Referencias
Desechos de celulosa + SRB	Rentabilidad relativa por químicos alcalinos.	Baja tasa de remoción de metal.	[31]
Estiércol de pollo +SBR	Mayor eficacia que el estiércol y el aserrín. Un producto costo-beneficio en relación con la cal o la piedra caliza	Adición alta de reactivos orgánicos.	[32]
Cenizas volátiles de carbón	Eficiente y rentabilidad relativa.	No adecuado para la recuperación de metales debido a la concentración elevada de un elemento radiactivo.	[33]
Concha triturada	Rentable.	No disponible, según los requerimientos; necesita ser triturada.	[34]
Composta de estiércol de vacas	Generación mínima de lodos tóxicos, costo efectivo relativo por químicos alcalinos.	Requerimiento de ajuste de pH para la remoción selectiva de metales.	[35]
<i>Bacillus drentensis</i> sp. muertos en polímero de polisulfona	No se requiere suministro continuo de nutrientes, efectivo a un pH más bajo para eliminación de metales tóxicos de DAM afectado aguas subterráneas.	Insignificante	[36]
Dunita	Rentable, elimina la mayoría de los metales del DAM.	Necesidad de trituración y tamizado.	[37]
Neutralización electroquímica	No se adicionan reactivos químicos para eliminar químicos. Formación de ácido sulfúrico.	La corrosión del cátodo puede ocurrir en presencia de exceso de Fe ³⁺ en DAM.	[38]
Algas verdes filamentosas	Rentable en relación con los productos químicos industriales alcalinos; podría ser reutilizado.	Adsorción dependiente del pH.	[40]
Zeolita	Buena capacidad de unión de metal y fácilmente disponible.	Baja eficiencia de remoción.	[41]
Electrodialisis	Más efectivo que el tratamiento convencional con cal.	Costoso, presencia de incrustaciones.	[39]
Escoria de acero en camas de lixiviación	Mejora de la alcalinidad.	Decremento de la alcalinidad a través del tiempo.	[42]

4.4 Uso de microorganismos para remover metales pesados de DAM

Varios microorganismos, como protozoos, bacterias, hongos y microalgas, han sido evaluados en cuanto a su capacidad para acumular metales pesados. La acumulación de metales por estos organismos implica la absorción en los compartimentos intracelulares mediante un proceso dependiente de la energía y la unión pasiva a la superficie de la célula (adsorción). Sin embargo, el término sorción, que abarca todos los mecanismos mediante los cuales los microorganismos vivos y muertos eliminan los iones metálicos del entorno externo [43], ha sido utilizado con frecuencia por investigadores anteriores.

Las microalgas se pueden usar como biosorbentes metálicos tanto en formas vitales como en formas desvitalizadas (muertas). Se ha demostrado que las microalgas muertas tienen una mayor capacidad de sorción de metal, pero algunos trabajadores informan que las células vivas son más eficientes para este propósito [44]. Para aplicaciones de eliminación de metales, se puede preferir el uso de biomasa muerta o desnaturalizada, ya que sus grandes cantidades están fácilmente disponibles. Además, la biomasa desvitalizada no está sujeta a la toxicidad del metal, por lo que se toleran altas concentraciones de metales y se obvian las necesidades de suministro de nutrientes y mantenimiento del cultivo.

Las algas y microalgas poseen muchas características que las hacen posibles candidatas en el terreno de la biorremediación de suelos y aguas contaminadas. A pesar de esto se han hecho pocos esfuerzos para utilizar su biomasa con el fin de remover iones metálicos de soluciones acuosas. Se conocen miles de especies de algas y sólo algunas han sido investigadas por su capacidad de sorción de metales y su potencia en el tratamiento de aguas residuales. Los experimentos de biosorción de metales se han realizado en algas verdes de agua dulce como *Chorella spp.*, *Cladophora spp.*, *Scenedesmus spp.* y *Chlamydomonas reinhardtii* entre otras [45].

La acumulación de metales por microorganismos, incluidas las algas, se conoce desde hace algunas décadas, pero solo ha recibido mayor atención en los últimos años debido a su potencial de aplicación en la protección ambiental o la recuperación de metales preciosos o estratégicos. La capacidad de acumulación de

metales de la biomasa de algas es comparable o, a veces, superior a la de los sorbentes químicos, en la Tabla 2 y Tabla 3, presentadas a continuación, se ha realizado una recopilación de ejemplos de microorganismos utilizados para la remoción de cadmio, manganeso y zinc de aguas contaminadas.

Tabla 2. Ejemplos de microorganismos que se han utilizado en la biorremediación de aguas contaminadas por cadmio.

Alga	Metal	Sorción [mg/g]	Concentración inicial [mg/L]	Eficiencia de remoción del metal (%)	Referencia
<i>Anabaena nodosum</i>	Cd	9.78	-	82	[46]
<i>A. nodosum</i>		91.04	-	72	[47]
<i>Ceramium rubrum</i>		8.21	-	72	[46]
<i>Chlorella vulgaris</i>		12.48	-	96	[48]
<i>Costera marina</i>		9.55	-	>90	[46]
<i>Ecklonia maxima</i>		83.5	-	13	[49]
<i>Fucus vesiculosus</i>		9.78	10	99	[46]
<i>Gigartina salicornia</i>		17.98	-	48	[50]
<i>G. acicularis</i>		9.67	10	40	[46]
<i>Gracilaria fisheri</i>		70.81	EIG	<99	[51]
<i>Laminaria digitata</i>		9.78	50µM	49	[46]
<i>L. japónica</i>		146.12	-	-	[52]
<i>Lyngbya taylorii</i>		41.59	-	-	[46]
<i>Nannochloropsis oculata</i>		100.04	-	-	[53]
<i>Padina</i> sp.		123.64	-	25	[54]
<i>Phaeodactylon tricorutum</i>		83.30	-	-	[53]
<i>Pilayella littoralis</i>		64.97	-	-	[55]
<i>Porphyridium cruentum</i>	8.88	-	-	[46]	

Tabla 3. Ejemplos de microorganismos que se han utilizado en la biorremediación de aguas contaminadas por manganeso y zinc.

Alga	Metal	Sorción [mg/g]	Concentración inicial [mg/L]	Eficiencia de remoción del metal (%)	Referencia
<i>A. subcylindrica</i>	Mn	-	EI	100	[56]
<i>N. muscorum</i>		-	EI	33	[56]
<i>Sargassum sp.</i>	Zn	-	98	99	[57]
<i>Spirulina sp.</i>		-	-	67	[58]
Yeast, granulado		-	EIG	<99	[59]
<i>Escherichia coli (ingenieril)</i>		-	500µM	99	[60]

EI: Efluente industrial, EIG: Efluente de la industria del galvanizado

4.5 Consorcios microbianos fotosintéticos

Los consorcios microbianos (CM) constituidos por microorganismos fotosintéticos (Cyanophyta) tienen una distribución muy amplia en la naturaleza, tanto en ambientes acuáticos como terrestres. Los CM resultan clave en los ciclos biogeoquímicos, lo que les confiere importancia ecológica dada la gran cantidad de estrategias metabólicas que pueden desarrollar. Desde el punto de vista tecnológico, los CM se han utilizado para la remoción de metales pesados y de contaminantes orgánicos presentes en aguas residuales, para la obtención de biodiesel y de energía eléctrica, y para la conversión de carbono y generación de biogás, han demostrado mayor eficiencia de síntesis de productos y conversión de nutrientes a menor costo, comparado con la utilización de cultivos puros. Otras ventajas del empleo de consorcios microbianos es su producción a gran escala, dado que los cultivos puros no son con frecuencia, económicamente factibles debido a los altos costos de mantenimiento, sustratos, esterilización, y recuperación de biomasa, entre otros factores. Muchos microorganismos en ambientes naturales no viven aislados, sino que forman parte de consorcios que tienen una dinámica

poblacional interna. La competencia por los recursos y la cooperación entre los microorganismos que integran un CM pueden determinar el éxito de su desempeño biotecnológico [61].

4.5.1 Bioestimulación

En algunos sitios contaminados con tal de acortar los tiempos de remediación necesarios, se decide acelerar los procesos naturales de atenuación, en concreto los de biodegradación (responsables de la reducción de la masa de contaminante) mediante la adición de estimulantes de la actividad microbiana: aceptores de electrones, nutrientes, o dadores de electrones. Es lo que se denomina técnicas de bioestimulación.

La bioestimulación implica la circulación de soluciones acuosas (que contengan nutrientes y/u oxígeno) a través del recurso contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos in situ [62].

Se ha demostrado que en la mayoría de los casos el factor limitante de los procesos de biodegradación es el agotamiento de aceptores de electrones más que el agotamiento de nutrientes como nitrógeno y fósforo. Entre los aceptores de electrones finales que se adicionan comúnmente al medio, se encuentran el oxígeno (comúnmente utilizado por los microorganismos para biodegradar aeróbicamente los hidrocarburos de petróleo) [62].

4.6 Cianobacterias / microalgas: eliminación de contaminantes

Las cianobacterias que poseen capacidades de fijación de dinitrógeno y microalgas que probablemente representan hasta el 27% de la biomasa microbiana del suelo total están muy extendidas en los ecosistemas del suelo y acuáticos. Estos organismos no solo ayudan a detectar la contaminación, sino que también transforman muchos contaminantes en el medio ambiente [63].

Las cianobacterias (particularmente las especies fijadoras de dinitrógeno de *Anabaena* y *Nostoc*) transformaron preferentemente el DDT en DDD (1,1-dicloro-2,2 bis (p-clorofenil) etano), mientras que las algas verdes (*Chlorococcum* spp.) convirtieron el DDT en DDE (1, 1-dicloro-2,2-bis (p-clorofenil) etileno). La toxicidad y transformación de contaminantes por cianobacterias o microalgas puede cambiar dependiendo de la especie. Cáceres et al., 2008 [64], observaron la transformación de un pesticida organofosforado, fenamifos (etil 4-metiltio-m-tolil isopropil fosforamidato) en su producto de oxidación primaria, fenamifos sulfóxido (FSO) por cinco especies diferentes de cianobacterias y cinco de algas verdes. Tanto el pesticida como sus metabolitos (FSO, fenamifos sulfona, fenamifos fenol, fenamifos sulfóxido fenol y fenamifos sulfona fenol) se bioacumularon en el alga terrestre *Chlorococcum* sp. mientras que solo se acumularon metabolitos en el alga acuática *Pseudokirchneriella subcapitata*. Las habilidades para transformar o degradar los contaminantes de las cianobacterias y microalgas se aprovechan de manera provechosa en las tecnologías de biorremediación de muchos sistemas contaminados [61].

Las paredes celulares de las microalgas y cianobacterias están compuestas de polisacáridos y carbohidratos que tienen grupos cargados negativamente (amino, carboxilo, hidroxilo o sulfuro). La mayoría de los metales están unidos a los grupos de ligandos con carga negativa, que es la base para la eliminación de metales de las aguas residuales. Además de este mecanismo de adsorción de metales sobre superficies celulares y polisacáridos extracelulares, puede producirse la absorción en las células, la incorporación a vacuolas o estructuras de aragonito (CaCO_3) y la precipitación en la superficie celular o internamente. Pero, los metales pesados son potentes inhibidores de la fotosíntesis, ya que pueden reemplazar o bloquear los átomos de metal protésicos en los sitios activos de ciertas enzimas. Asimismo, los grupos funcionales ácidos de las paredes celulares bacterianas también pueden unirse a concentraciones significativas de cationes acuosos, lo que puede afectar la especiación, distribución y movilidad de esos cationes. Las algas que crecen en las aguas residuales pueden proporcionar una estrategia simple a largo plazo para la

eliminación de contaminantes metálicos. Con este fin, se describió un proceso de tres pasos para la desintoxicación del uranio de las aguas residuales. Inicialmente, los ligandos en las paredes celulares de algas eliminan eficazmente U (VI) de las aguas residuales, seguido de la eliminación de partículas de algas U de la columna de agua a los sedimentos. Posteriormente, las células de algas muertas proporcionan carbono, nitrógeno y fósforo a las bacterias heterótrofas para la reducción final de U (VI) a U (IV) [61].

A continuación, en la Tabla 4, se han compilado ejemplos de consorcios algal-bacterianos utilizados en la remoción de metales.

Tabla 4. Eliminación de metales pesados de las aguas residuales por consorcios de cianobacterias/microalgas y bacterias.

Cianobacteria/ microalga	Bacteria	Fuente de aguas residuales	Metal y eficiencia de remoción	Sistema/ reactor usado	Referencia
<i>Spirulina platensis</i>	Bacteria sulfato- Reductora	Efluente de curtidora	Cobre 79.2% (500 mg/L) zinc 88.0% (500 mg/L) Hierro 100% (500 mg/L)	Estanque de algas de alta velocidad	[65]
<i>Chlorella sp.</i> <i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Stichococcus sp.</i> <i>Phormidium sp.</i>	<i>Rhodococcus sp.</i> <i>Kibdelosporangium aridum</i>	Aguas residuales contaminadas con aceite	Copper 62% (0.04 mg/L) nickel 62% (0.21 mg/L) zinc 90% (0.10 mg/L) hierro 64% (6.43 mg/L) manganeso 70% (0.20 mg/L)	-	[66]
<i>C. sorokiniana (biomasa)</i>	<i>R. basiliensis</i> (biomasa)	Medio Bristol con contaminantes	Cobre 57.5% (20 mg/L) a pH 5.0	Reactor cónico de vidrio	[67]
Algas de la planta de tratamiento de aguas residuales (biomasa)	Bacterias de la planta de tratamiento de aguas residuales (biomasa).	Soluciones metálicas artificiales que contienen cadmio y cobre.	Cobre 80% (100 mg/L) Cadmio 100% (100 mg/L) a pH 4.0	Columna de flujo continuo	[68]

Se encontró que el consorcio algal-bacteriano que comprende *C. sorokiniana* y *R. basilensis* metaboliza el salicilato con una posterior eliminación de metales pesados de las soluciones. El consorcio eliminó el cobre más eficientemente que el organismo individual a pH 5.0, y el níquel, el cadmio y el zinc se eliminaron de manera menos eficiente. La biomasa seca de una mezcla de cianobacterias y bacterias se utiliza para eliminar los metales pesados de las aguas residuales, y los metales se recuperan posteriormente por desorción. Se observó una remoción muy eficiente de cobre ($\approx 80\%$) y cadmio ($\approx 100\%$) de los desechos metálicos con una tasa de remoción máxima dentro de los 5 minutos del tiempo de contacto con la masa seca de un cultivo mixto de microalgas (*Scenedesmus* sp., *Tetraedron* sp., *Chlorella* sp., *Chlorococcus* sp.), Cianobacterias (*Chroococcus* sp., *Pseudoanabaena* sp., *Leptolyngby* sp.), Diatomeas (*Navicula* sp., *Nitzschia* sp., *Cyclotella* sp.) y bacterias en un biofiltro [68]. La adaptación fisiológica, los cambios genéticos o la sucesión de especies sensibles por bacterias más tolerantes contribuyen a la tolerancia del metal en las comunidades bacterianas. En respuesta de bacterias a metales, existe una correlación entre la estructura genética y fisiológica de las comunidades bacterianas y la composición de especies de la comunidad de algas, pero no el nivel de contaminación de metales. Existe un vínculo fuerte y específico de la especie entre las especies de bacterias y algas [59].

4.7 Sitio de estudio

El estudio se efectuó con muestras provenientes del área minera de Taxco de Alarcón que se encuentra en la región norte del estado de Guerrero (Figura 3). Se localiza en la Provincia de la Sierra Madre del Sur, subprovincia 67 en la Depresión del Balsas, con un sistema de topoformas de sierras con cañadas. Debido a la fisiografía del municipio, se presenta una variedad de climas que van desde cálido hasta templado subhúmedo con lluvias en verano (Acw_0) según la clasificación climática de Köppen. En la zona de estudio, la época de lluvias abarca los meses de junio a octubre, con una precipitación máxima en septiembre de 275 mm, mientras que en la época de secas la precipitación promedio es de 21.2 mm en el mes de febrero [69, 70].

Los principales minerales sulfurosos en el área son pirita (10-15%), esfalerita (11%) y galena (4%). Entre los principales minerales de la ganga, se han reportado cuarzo, calcita y feldespato [71]. Otros minerales de sulfuro primarios en las venas en el área de Taxco son calcopirita, argentita, pirargirita, proustita y arsenopirita. El mineral también contiene pequeñas cantidades de goethita, hematita, cerusita, anglesita, melanterita y barita [70].

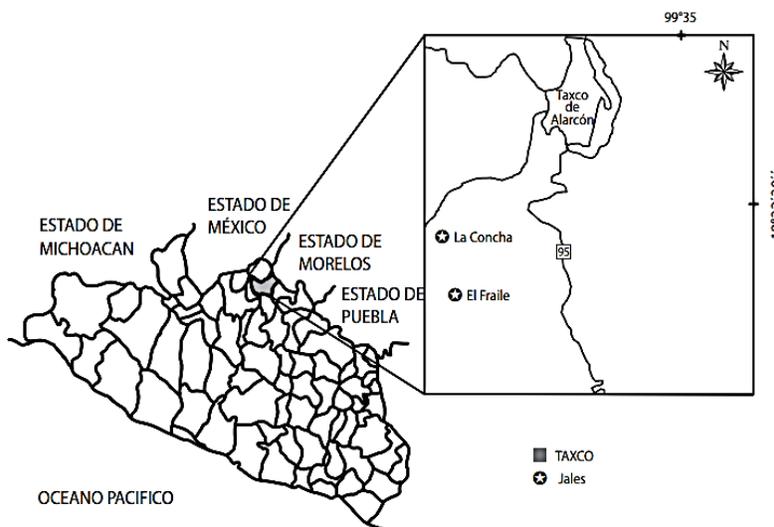


Figura 3. Localización del municipio de Taxco de Alarcón, Guerrero.

4.7.1 Problemática en Taxco, Guerrero

El distrito minero de Taxco es uno de los sitios mineros más antiguos de América que se remonta a la época prehispánica (antes de 1521). Sus minas fueron famosas en todo el mundo durante el siglo XVII por sus altas tasas de producción de plata, metales base (Zn, Cu, Pb) y metales preciosos (Ag, Au), sin embargo, actualmente las actividades en el sitio se encuentran inactivas [72]. Una consecuencia negativa de esta explotación intensiva de mineral fue la generación de grandes cantidades de desechos mineros sólidos, que se acumularon en depósitos de jales en los alrededores de las minas [73].

En Taxco, la interacción de los jales oxidados con el agua meteórica produce DAM y lixiviados ricos en metales, que drenan a los ríos Cacalotenango y Taxco; o estos lixiviados son utilizados por los habitantes como fuentes alternativas de suministro de agua doméstica [74, 75]. La dispersión aérea de partículas ha movido los contaminantes a los suelos y cultivos urbanos, aumentando su contenido de metales muy por encima de los niveles de fondo [76], y hay evidencia de afectación de jales en plantas nativas y de cultivos en el distrito [77, 78]. Finalmente, la afectación en humanos ha sido demostrada por [79], quienes encontraron que los niños que viven cerca de relaves en Taxco estaban expuestos a varios metales y que un alto porcentaje de ellos tenían niveles de Ni, Ba, Cr, Co, Cd, As, Hg y Pb por encima de los valores de referencia.

A principios del siglo XXI, el complejo minero de Taxco constaba de varias minas subterráneas (San Antonio, Guerrero y Remedios) y una planta de flotación que producía concentrados de Zn, Pb y ciertas cantidades de Ag y Au, sin embargo, la actividad minera se suspendió desde julio de 2007 debido a una huelga [80], lo cual ocasionó un serio problema de drenaje ácido de mina (DAM), el cual comenzó a salir del Socavón 1412, al pie de la presa de jales Guerrero, como se muestra en la Figura 4, con un volumen estimado de 820 galones/min. (3104 L/min) [81].



Figura 4. A) Patio de la bocamina 1412, B) Interior Socavón 1412, en ambas imágenes se puede observar las dimensiones de la generación de DAM, en Taxco, Guerrero.

4.7.2 Estrategias de remediación en Taxco, Guerrero

Según información previa del tratamiento del DAM en el sitio, se han aplicado estrategias de remediación por neutralización con rocas calizas y lutitas calcáreas de la zona.

En pruebas de laboratorio, se obtuvo una elevada eficiencia en la remoción de elementos como el Fe, Cd, As, Pb y Cu, pero baja en elementos como el Zn y Mn [82].



Figura 5. Prueba de neutralización de DAM en Taxco, Guerrero con rocas calizas y lutita calcárea de la zona.

En trabajos realizados a inicios del 2016, se desarrolló una planta piloto “in situ” con 5 módulos en serie de filtros de rocas calizas del sitio, como se observa en la Figura 5, alternados con sedimentadores, que lograron remover eficientemente Al, Fe y Cu

(≈100%) y de manera limitada Cd, Mn y Zn (60.5, 15.2 y 52.3 % respectivamente). Todos estos elementos se encontraron asociados a los sedimentos en las piletas en forma de hidróxidos, sulfatos u óxidos.



Figura 6. Tratamiento pasivo in situ en Taxco, Guerrero. Sistema de piletas que funcionan como barreras geoquímicas al paso de DAM.

A partir de los resultados obtenidos se desarrolló una planta piloto “in situ” como se muestra en la Figura 6, con módulos en serie de 3 filtros de rocas calizas, alternados con sedimentadores.

Sin embargo, elementos como el Cd, Mn y Zn no cumplen con la concentración adecuada para su disposición en aguas nacionales según lo establecido en la NOM -001-SEMARNAT-1996 en materia de metales pesados para descargas mensuales a ríos buscando la protección de la vida acuática, por tanto, es necesario proponer un sistema de remediación de bajo costo para disminuir la concentración de Cd, Mn y Zn al final del proceso.

4.7.3 Configuración de la planta piloto con filtros de caliza desarrollada en Taxco, Guerrero

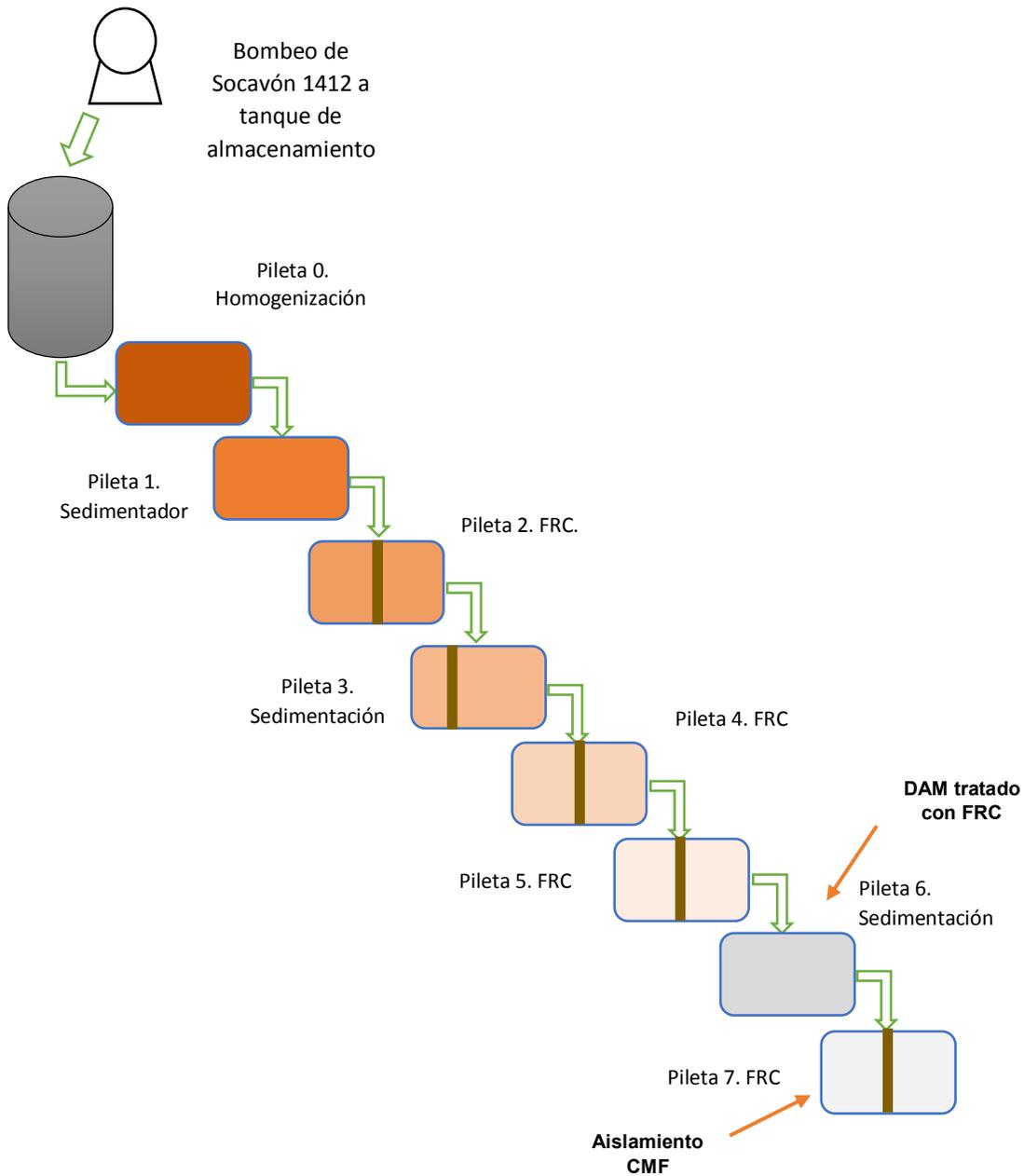


Figura 7. Configuración del sistema de tratamiento pasivo in situ aplicado en Taxco, Guerrero.

En la Figura 7 se ha representado el sistema de tratamiento in situ, que se ha llevado a cabo en Taxco, Guerrero, el sistema consta de 7 piletas que intercala

sedimentadores con filtros de roca caliza, en medio de cada una se colocó una mampara para aumentar el tiempo de retención en el sistema.

En cada parte del sistema se lleva a cabo una función importante: en la pileta 0, el DAM proveniente del bombeo de la bocamina realiza la función de homogeneizar y sedimentar materiales arcillosos, arenas y limos arrastrados en el DAM, en la pileta 1, se lleva a cabo la recolección de sedimentos procedentes de la mina y oxidación de trazas de Fe^{2+} , en la pileta 3, se da la precipitación de hierro en forma de oxihidróxidos e hidroxisulfatos, en la pileta 4, se realiza la recolección de óxidos e hidróxidos de hierro precipitados, en la pileta 5, se da la precipitación de Al, Cu y Zn en forma de hidróxidos de aluminio, mientras que en la pileta 6 se lleva a cabo la recolección de precipitados de Al, por último en la pileta 7 se promueve la disolución de la roca fosfórica para lograr precipitar Zn y Cd. Compuesto por capas consecutivas de rocas fosfórica y zeolita [8].

Basado en el sistema de tratamiento del DAM, y los resultados obtenidos de este, se determinó trabajar con el DAM de la pileta 6 y el consorcio microbiano fotosintético detectado en la pileta 7.

5 MATERIALES Y EQUIPO

5.1 Materiales

- Tubos de ensayo.
- Tubos Falcon de 50 mL.
- Matraces de Erlenmeyer de 100 y 250 mL.
- Matraces volumétricos de 10, 25, 50 mL y 1L.
- Tubos para centrífuga de 15 y 50 mL.
- Crioviales de 0.5 y 5 mL.
- Cámara de Neubauer.
- Portaobjetos.
- Puente de tinción.

5.2 Equipos

- Parrilla de calentamiento y agitación Daigger modelo Hotplate-Stirrer.
- Agitador orbital análogo Thermo Barnstead modelo MAXQ2000.
- Medidor de pH Ultra Basic UP2509C172.
- Cromatógrafo iónico IC Metrohm modelo 883 Basic IC plus.
- Baño Ultrasónico con heater y timer Cole Parmer modelo 08895-02.
- Balanza analítica OHAUS modelo Adventure Pro.
- Enfriador vertical 1 puerta Ojeda modelo RVP500.
- Pipeta automática Sartorius de 20-200 μ L.
- Pipeta automática de 500-5000 μ L.
- Pipeta automática de 1-10 mL.
- Centrifuga Refrigerada Centurion Pro-Research modelo PRO-K241R.
- Espectrofotómetro UV-Visible Thermo-Scientific modelo Evolution-201.
- HotBlock Environmental Expres, modelo SC154.
- Microscopio polarizable OLYMPUS BX51P.

5.3 Reactivos

- Alcohol etílico absoluto, CTR scientific.
- Hidróxido de sodio (NaOH), Sigma Aldrich, pureza 99.99%.
- Ácido clorhídrico (HCl), J.T. Baker, pureza 38%.
- Sulfato de cadmio (CdSO₄), Alyt Reactivos Analíticos, pureza 99.0%.
- Sulfato manganeso monohidratado (MnSO₄·H₂O), J. T. Baker, pureza 99.9%.
- Sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO₄·7H₂O), Sigma Aldrich, pureza 99.0%.
- Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), Productos Químicos Monterrey, pureza 99.8%.
- Cloruro de calcio (CaCl₂), Merck, pureza 98%.
- Sulfato de magnesio (MgSO₄), J. T. Baker, pureza 100%.
- Nitrato de sodio (NaNO₃), Sigma Aldrich, reactivo ACS.
- Fosfato dipotásico (K₂HPO₄), Productos Químicos Monterrey, pureza 99.8%.
- Cloruro de sodio (NaCl), Alyt Reactivos Analíticos, pureza 102%.
- Ácido bórico (H₃BO₃), Sigma Aldrich, pureza 99.99%.
- Hidróxido de potasio (KOH), J.T. Baker, pureza 86.60%.
- Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄·7H₂O), J. T. Baker, pureza 99.6%.
- EDTA, sal disódica dihidratada (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O), Sigma Aldrich, pureza 101.0%.
- Solución de cristal violeta al 1 %.
- Solución de safranina al 1 %.
- Solución decolorante (alcohol etílico y acetona 1:1).
- Lugol: Solución de I₂ / I⁻ (yodo / yoduro al 0.1 %).

6 METODOLOGÍA

A continuación, en la Figura 8, se visualiza el diseño experimental que se siguió para para caracterizar al CMF y realizar la prueba de remoción de Cd, Mn y Zn.

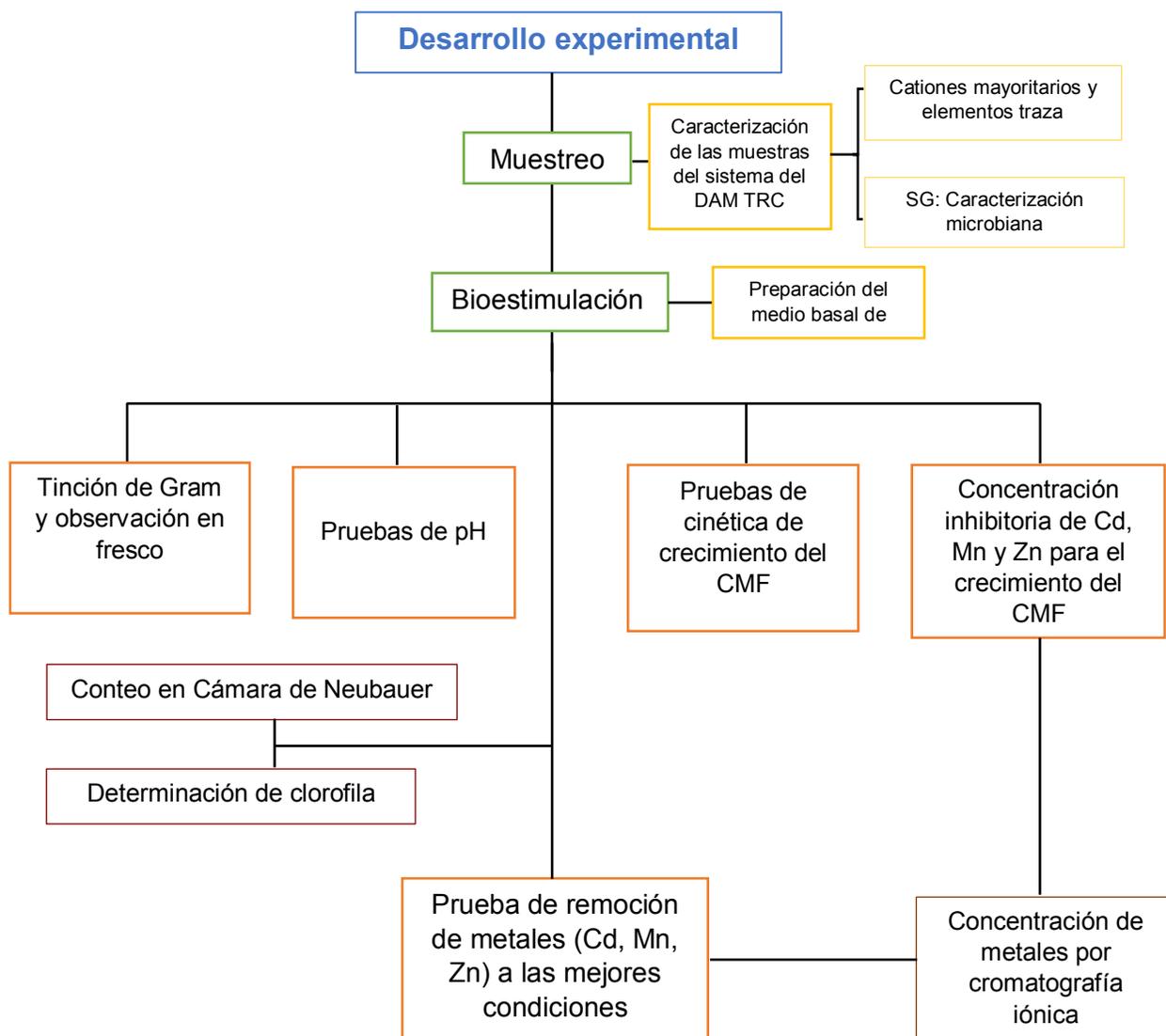


Figura 8. Diagrama de flujo del desarrollo experimental.

6.1 Muestreo y caracterización del DAM TRC proveniente de Taxco, Guerrero

A continuación, se describen las pruebas de caracterización del sistema de tratamiento de DAM, así como del DAM TRC de la pileta 6, que es con la que se realizarán todas las pruebas experimentales para encontrar las mejores condiciones de desarrollo del CMF y de remoción de metales.

6.1.1 Muestreo

Se colectó una muestra de cada pileta de sistema de tratamiento del DAM (Figura 7) desarrollado en Taxco, Guerrero.

Las muestras fueron filtradas por membranas de 0.45 μm y acidificadas con HNO_3 concentrado hasta un $\text{pH} \leq 2$ para el análisis de elementos solubles por ICP OES.

Para la determinación de elementos mayoritarios las muestras fueron únicamente filtradas por membranas de 0.45 μm .

Todas las muestras fueron preservadas en refrigeración a 5°C hasta su análisis.

6.1.2 Determinación de cationes mayoritarios y elementos traza

El análisis de cationes mayoritarios se llevó a cabo en un cromatógrafo de iones Metrohm 883 Basic ICPlus con un detector de conductividad.

Para el análisis de cationes Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , Zn^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} y Ca^{2+} , se utilizó una columna empacada con una fase estacionaria de sílica gel modelo MetrosepC4 250/4.0 con una fase móvil compuesta de HNO_3 y ácido oxálico.

Se determinó la concentración de Fe y Cd por ICP OES según las longitudes de onda especificadas en la normatividad mexicana [83], en un equipo Marca Agilent Technologies Modelo 5100 con un modo de lectura dual, equipado con un nebulizador concéntrico con un flujo de 0.07 L/min. Un flujo del plasma de 12 L/min y un flujo auxiliar de 1.7 L/min, en todos los casos se utilizó Ar de alta pureza marca Infra [8].

6.2 Caracterización microbiana

Conociendo que la muestra de la pileta 7 contenía un consorcio microbiano con capacidad de remoción de metales se realizó una caracterización microbiana.

La muestra fue filtrada por membrana de 0.22 μm . A los filtros con los microorganismos presentes se les aplicó un proceso de extracción del material genético, el cual fue amplificado por PCR y secuenciado por Illumina MiSeq para su identificación mediante el uso del gen 16 S rRNA. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante QIIME y comparadas mediante una base de datos de GreenGenes [8].

6.2.1 Bioestimulación

El Medio Basal de Bold se eligió como bioestimulante considerando que es un medio de algas de agua dulce que se ha utilizado para una variedad de cultivos de algas verdes sin la necesidad de extracto de suelo o vitaminas.

6.2.1.1 Preparación del Medio Basal de Bold (MBB)

Se preparó 1 L del Medio Basal de Bold que se utilizará como bioestimulador. En teoría las condiciones del cultivo deben semejarse al ambiente natural del CMF.

Componentes para el MBB	En un litro
KH_2PO_4	175 mg
CaCl_2	25 mg
MgSO_4	75 mg
NaNO_3	250 mg
K_2HPO_4	75 mg
NaCl	25 mg
H_3BO_3	11.42 mg
Solución de microelementos	1 mL
Solución 1	1 mL
Solución 2	1 mL

*Solución de microelementos	En un litro
ZnSO ₄	8.82 g
MnCl ₂	1.44 g
MoO ₃	0.71 g
CuSO ₄	1.57 g
Co (NO ₃) ₂	0.49 g

*La solución de micronutrientes no se preparó ya que el DAM que es el medio en el que se ha desarrollado el consorcio microbiano fotosintético cuenta los elementos que actúan como micronutrientes.

Solución 1	En un litro
Na ₂ EDTA	50 g
KOH	3.1 g
Solución 2	En un litro
FeSO ₄	4.98 g
H ₂ SO ₄ (Conc.)	1 mL

Se prepararon 5 L de DAM TRC + 5% de MBB, para esto se utilizaron 0.25 L de MBB y 4.75 L de DAM TRC. La solución se mantuvo en refrigeración a 5°C.

6.3 Tinción de Gram y observación en fresco. Diseño experimental

Se limpiaron 5 portaobjetos con acetona, en cada uno se colocaron las muestras identificadas: Blanco inoculado, Cd, Mn, Zn y Cd/ Mn/ Zn.

La muestra se fijó en el portaobjeto indicado de modo que no sea arrastrado durante el proceso de tinción, al terminar la fijación se pasó el portaobjeto 3 veces por flama. En el portaobjeto con la muestra, se colocó en el puente de tinción y se cubrió la superficie con solución de Cristal violeta (colorante primario) por 1 minuto. Pasado el minuto, se lavó con agua destilada.

La superficie del portaobjetos con muestra se cubrió con Lugol por 1 minuto. Se lavó nuevamente con agua destilada.

En la superficie con muestra se colocaron unas gotas del decolorante: alcohol-acetona, por 30 segundos. Al terminar se lavó con agua destilada.

Se cubrió la superficie con Safranina (contracolor), durante 1 minuto. Se lavó con agua destilada.

Se colocó el preparado en el puente de tinción en posición vertical, dejando que el exceso de agua escurriera y que seicara extendido.

El procedimiento anterior se realizó a cada muestra.

Una vez que las cinco muestras se secaron, se observaron en el Microscopio polarizable OLYMPUS, con objetivo de inmersión (100 X).

Adicionalmente se realizó la observación de la muestra en fresco usando una cámara de Neubauer.

Las bacterias Gram positivas se observaron de color azul intenso o violeta. Las bacterias Gram negativas se observaron de color rojo o rosado.

6.4 Pruebas de pH. Diseño experimental

A fin de determinar el pH óptimo de crecimiento del CMF se realizaron cultivos en lotes con DAM TRC bioestimulado con el 5 % MBB como se muestran en la Tabla 5, a continuación.

Tabla 5. Pruebas experimentales para determinar el pH óptimo de crecimiento del CMF.

DAM TRC + 5 % MBB con inoculación de 1 mL CMF						
pH						
4	4.5	5	5.5	6	6.5	7

El volumen por experimento fue de: 25 mL (15)

En tubos falcon de 50 mL se colocó un volumen de 25 mL de la preparación de DAM TRC con bioestimulante (5% MBB), se esterilizaron todos los tubos por tindalización, cuando alcanzaron la temperatura ambiente, se ajustó el pH agregando HCl o NaOH, según fue necesario, siendo el pH inicial del DAM TRC de 5.1.

Cada tubo se inoculó con 1 mL de CMF aislado, y se colocó una torunda de algodón, cada prueba contó con su duplicado. Los tubos se mantuvieron en agitación constante a 250 rpm y a la luz del sol durante 10 días.

Se supervisó el crecimiento del CMF diariamente, transcurridos 10 días se tomaron muestras para determinar la concentración por cámara de Neubauer y determinación de clorofila.

La alícuota de muestreo consistió de 200 μ L para conteo en cámara de Neubauer y lo restante para determinación de clorofila.

Para el conteo de células por cámara de Neubauer se observa en el microscopio a 40 X, se realizó conteo por cuadruplicado.

Se determinó la concentración de clorofila producida por el CMF como método indirecto para la evaluación de su crecimiento (véase ANEXO I).

A partir de este experimento se determinó el pH óptimo para las siguientes pruebas.

6.5 Pruebas para cinética de crecimiento del CMF. Diseño experimental

Para conocer la cinética de crecimiento del CMF, se realizó el siguiente lote de experimentos, tomando en cuenta el pH óptimo de crecimiento de 5.5, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Pruebas experimentales de cinética de crecimiento del CMF.

pH 5.5
Blanco (DAM TRC+5 % MBB)
DAM TRC+ 5% BBM+ inoculación con 1 mL CMF

El volumen por experimento fue de: 100 mL (3)

En tres matraces Erlenmeyer de 250 mL se colocó un volumen de 100 mL de la preparación de DAM TRC con bioestimulante (5% MBB), las muestras se esterilizaron por tinalización, al finalizar se dejaron enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se inoculó la muestra y su duplicado con 1 mL de CMF y se les colocó una torunda de algodón, se tomó una muestra diaria por 9 días para conteo por cámara de Neubauer y una cada dos días para concentración de clorofila. Los tubos se mantuvieron en agitación constante a 250 rpm y a la luz del sol. La duración del experimento fue de 9 días.

La alícuota de muestreo consistió en tomar diariamente 200 μ L para conteo en cámara de Neubauer y 5 mL para determinación de clorofila.

Para el conteo de células por cámara de Neubauer se observó en el microscopio a 40 X y se realizó conteo por cuatriplicado.

Se determinó la concentración de clorofila producida por el CMF como método indirecto para la evaluación de su crecimiento (véase ANEXO I).

A partir de este experimento se determinaron las fases de crecimiento del consorcio microbiano fotosintético.

6.6 Concentración inhibitoria de crecimiento del CMF a diferentes concentraciones de Cd, Mn y Zn. Diseño experimental

Una vez determinados los parámetros más importantes de desarrollo del CMF, se realizó el siguiente lote de experimentos para encontrar la concentración inhibitoria de crecimiento a diferentes concentraciones de Cd, Mn y Zn, lo que se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Concentración inhibitoria de Cd, Mn y Zn para CMF en DAM TRC bioestimulado con 5% de MBB.

DAM TRC + 5 % MBB + inoculación con 0.2 μL CMF		
pH 5.5		
Cd [mg/L]	Mn [mg/L]	Zn [mg/L]
238	83	867
435	177.32	1000
612	207	1606
977	354	2110
-	-	2900

El volumen por experimento fue de: 25 mL (15)

Para la prueba de concentración inhibitoria de crecimiento del CMF, se realizaron pruebas a diferentes concentraciones de Cd, Mn y Zn, tomando en cuenta la concentración inicial del DAM producido en Taxco. Se prepararon soluciones a las concentraciones de la Tabla 7, tomando en cuenta la concentración inicial del DAM TRC bioestimulado con 5 % MBB (Tabla 16), se calcularon los gramos a adicionar de los reactivos (sulfato de cadmio, sulfato manganeso monohidratado y sulfato de

zinc heptahidratado) para aumentar la concentración a partir de la concentración que ya posee el DAM TRC. Se manejaron muestras control, un blanco (DAM TRC+ 5% BBM) y un blanco (DAM TRC+ 5 % BBM+ 0.2 µL CMF) inoculado, además de los duplicados de cada prueba de la Tabla 7.

En tubos falcon de 50 mL se colocó un volumen de 25 mL de DAM TRC con bioestimulante (5% MBB), las soluciones se esterilizaron por tindalización, cada tubo se inoculó con 0.2 µL del CMF, se tomó una muestra de 0.5 mL para análisis por cromatografía iónica, los resultados se utilizaron como concentración inicial de las pruebas. A los tubos se les colocó una torunda de algodón y se mantuvieron en agitación constante a 250 rpm y a la luz del sol. La duración del experimento fue de 9 días, al finalizar se tomó una muestra de 0.5 mL para cromatografía iónica.

La alícuota de muestreo consistió en 1 mL para cromatografía iónica, 200 µL para conteo en cámara de Neubauer y lo restante para determinación de clorofila.

Para el conteo de células por cámara de Neubauer se observó en el microscopio a 40 X y se realizó conteo por cuatriplicado.

Se determinó la concentración de clorofila producida por el CMF como método indirecto para la evaluación de su crecimiento (véase ANEXO I).

A partir de este experimento se eligieron las concentraciones de Cd, Mn y Zn a las que el CMF se desarrolló de manera adecuada, y se realizó un último experimento a las mejores condiciones (pH óptimo, cinética de crecimiento y concentración de Cd, Mn y Zn).

6.7 Prueba de remoción de metales (Cd, Mn, Zn) a las mejores condiciones de desarrollo del CMF. Diseño experimental

Con lo obtenido en los experimentos anteriores se planteó un último lote de experimentos, en el que se utilizaron las mejores condiciones de desarrollo para el CMF, lo anterior se simplificó en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones de Cd, Mn y Zn para su remoción de DAM TRC con bioestimulante (5% MBB), a las mejores condiciones de crecimiento.

pH 5.5 + inoculación de 1 mL de CMF			
Cd [mg/L]	Mn [mg/L]	Zn [mg/L]	Cd + Mn+ Zn [mg/L]
343.8	80.4	1773	349.5 Cd 83.6 Mn 1719 Zn

El volumen por experimento fue de: 100 mL (9)

Se prepararon soluciones a las concentraciones de la Tabla 8, tomando en cuenta la concentración inicial del DAM TRC registrado en la Tabla 16, se calcularon los gramos a adicionar de los reactivos (sulfato de cadmio, sulfato manganeso monohidratado y sulfato de zinc heptahidratado) para aumentar la concentración a partir de la concentración que ya posee el DAM TRC.

En matraces Erlenmeyer de 250 mL se colocó un volumen de 100 mL de DAM TRC bioestimulado con 5 % de MBB, las soluciones se esterilizaron por tindalización, se inoculó con 1 mL del CMF a cada tubo, cada tubo se cubrió con una torunda de algodón y contó con su duplicado. Como muestra control se tuvo un blanco (DAM TRC+ 5 % BBM).

Se tomó una muestra inicial de 0.5 mL para cromatografía iónica. Cada dos días se tomó una muestra para conteo por Cámara de Neubauer, para la determinación de clorofila y para cromatografía iónica. Los matraces se mantuvieron en agitación constante a 250 rpm y a la luz del sol 15 días para Cd, Zn y Mn por separado y 19 días para el experimento con la combinación de los tres metales del experimento. La alícuota de muestreo consistió de 200 µL diarios para conteo en cámara de Neubauer y 5 mL cada dos días para determinación de clorofila y cromatografía iónica.

Para el conteo de células por cámara de Neubauer se observó en el microscopio a 40 X y se realizó conteo por quintuplicado.

Se determinó la concentración de clorofila producida por el CMF como método indirecto para la evaluación de su crecimiento (véase ANEXO I).

6.8 Análisis por cromatografía iónica

Para la determinación de las concentraciones iniciales, intermedias y finales de los experimentos de inhibición y remoción de Cd, Mn y Zn se utilizó la técnica de cromatografía de iones, las muestras se leyeron en un cromatógrafo de iones 883 Basic IC plus.

Para la determinación de cationes se utilizó una columna empacada con una fase estacionaria de sílica gel modelo Metrosep C4 250/4.0 con una fase móvil compuesta de HNO₃ y ácido oxálico.

Se realizó una curva de calibración con un estándar multielemental High-Purity Standards de 7 puntos (0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20) mg/L.

Debido a que las pruebas se realizaron a altas concentraciones de Cd, Mn y Zn se utilizaron factores de dilución de 1/10 y 1/50 (0.1 y 0.02).

7 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los métodos de remediación que se han aplicado en la zona de Taxco, Guerrero han sido en su totalidad pasivos. En el caso particular del DAM generado por el socavón 1412, en el año 2016 se iniciaron pruebas de remediación con rocas calizas y lutitas calcáreas al no ser efectivo ya que el tiempo de vida de las rocas era de una semana, se implementó una planta piloto de filtros de rocas calizas al paso del caudal de DAM conformado de 7 piletas.

7.1 Muestreo y caracterización del DAM TRC proveniente de Taxco, Guerrero

A continuación, en la Tabla 9, se encuentra la caracterización química por ICP OES y cromatografía iónica del sistema de tratamiento del DAM, en la que se han reportado los cationes mayoritarios y elementos traza.

Tabla 9. Determinación de cationes por ICP OES y IC, en el sistema de tratamiento de DAM en Taxco, Guerrero.

Pileta	Cationes por IC								Metales por ICP OES	
	Li ⁺ (mg/L)	Na ⁺ (mg/L)	NH ₄ ⁺ (mg/L)	Zn ²⁺ (mg/L)	K ⁺ (mg/L)	Mn ²⁺ (mg/L)	Mg ²⁺ (mg/L)	Ca ²⁺ (mg/L)	Fe (mg/L)	Cd (mg/L)
P0	<0.05	23.19	<0.1	581.23	<0.03	44.4	232.88	281.5	41.716	4.449
P1	<0.05	23.48	<0.1	574.7	<0.03	33.18	231.48	270.68	46.683	4.259
P2	<0.05	23.25	<0.1	544.69	<0.03	38.37	222.25	261.26	56.497	4.24
P3	<0.05	23.36	<0.1	546.43	<0.03	41.94	236.77	377.7	0.245	4.235
P4	<0.05	23.55	<0.1	539.31	<0.03	41.97	235.57	376.48	0.239	4.072
P5	<0.05	23.69	<0.1	534.89	<0.03	42.99	239.92	468.47	0.055	4.19
P6	<0.05	24.42	<0.1	507.11	16.15	44.21	244.82	552.15	<0.003	3.837
P7	<0.05	26.09	<0.1	510.51	17.93	43.05	241.79	516.68	<0.003	4.132

Con lo obtenido en la Tabla 9, se pueden observar las concentraciones de inicio y a lo largo del sistema de tratamiento del DAM, la concentración de los metales de interés en este trabajo son Cd, Mn y Zn, sin embargo, se han reportado también los cationes mayoritarios Na⁺, K⁺, Ca⁺ y Mg⁺.

La pileta 0 que representa las concentraciones mayores de metales como Zn, Mn y Cd, siendo de 581.23 mg/L, 44.40 mg/L y 4.449 mg/L respectivamente, hasta llegar a la pileta 7, con concentraciones de 510.51 mg/L de Zn, 43.05 mg/L de Mn y 4.132 mg/L de Cd, es evidente la casi nula remoción de estos elementos a lo largo del sistema de tratamiento, en contraste con el Fe que llega a <0.003 mg/L a partir de la pileta 6. Mientras que para unos elementos como el Fe, el sistema funciona para otros como el Cd, Mn y Zn no es suficiente.

Consultando la NOM -001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, específicamente en lo reportado en la Tabla 10 para protección de vida acuática en la que se reporta el promedio mensual de 0.1 mg/L para cadmio y 10 mg/L para zinc, es evidente que las concentraciones de estos metales es alta y no puede disponerse con esas concentraciones al efluente más cercano que es el río Taxco.

Tabla 10. Límites máximos permisibles para metales pesados [84].

Parámetros [mg/L]	Ríos	
	Protección de vida acuática	
	Promedio mensual	Promedio diario
Cadmio	0.1	0.2
Zinc	10	20

En el presente trabajo realizaron pruebas para determinar si el CMF aislado de la zona de estudio puede ser utilizado para la remoción de Cd, Mn y Zn.

En el tratamiento que se ha llevado a cabo en Taxco, Guerrero, se detectó la presencia de microorganismos en la pileta 7, por lo que se ha estudiado la interacción de estos con el tratamiento de DAM y la posible remoción de elementos que se encuentran en altas concentraciones para una adecuada disposición a la descarga del río Taxco.

7.2 Caracterización microbiana.

Para caracterizar los microorganismos que constituyen el CMF se realizó un estudio de secuenciación rRNA 16S. Los resultados se encuentran en la Figura 9, en donde once géneros representan el 93% de la composición del CMF, mientras 31 géneros el 7%, cada una está en una proporción menor al 1%, por lo que se han reportado las más distintivas.

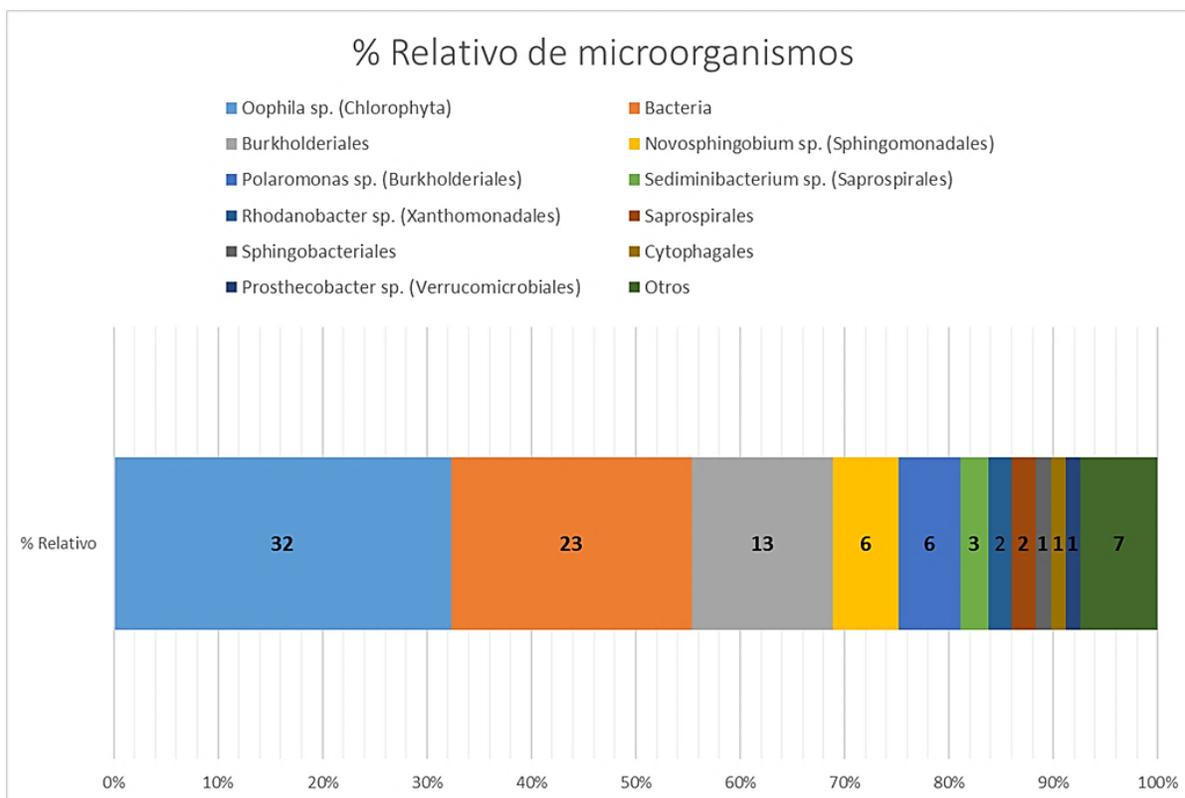


Figura 9. % Relativo de microorganismos que constituyen el CMF aislado de Taxco, Guerrero.

Las más representativas la *Oophila sp.* con un 32% de la familia *Chlamydomonadaceae*, microalgas fotosintéticas tunicadas, en las que encontramos una pared o membrana delgada de una sola pieza, esta especie ha sido identificada en otros estudios de biorremediación de rellenos sanitarios con materia orgánica, nutrientes, metales pesados, compuestos recalcitrantes y xenobióticos [85].

Los microorganismos identificados como *bacteria* con un 23% de la composición total, no se encontraron en la base de datos utilizada, pero se ha relacionado con las *cianobacterias* las cuales son organismos eficientes en la conversión de energía solar y producen una gran variedad de metabolitos, se ha reportado su existencia en aguas contaminadas [86], el orden *Burkholderiales* con un 13% son bacterias Gram negativas de metabolismo aerobio en [87], fueron identificadas en DAM, mientras *Polaromonas sp.* su presencia ya ha sido reportada en la rizosfera de plantas bioacumuladoras de Cd y Zn como *A. haleri* [88].

En la actualidad se estudia el uso de estos microorganismos para aprovechar sus características para la remoción de metales pesados. Los sitios contaminados con DAM constituyen modelos ideales para comprender los mecanismos que permiten a los microorganismos desarrollarse y evolucionar en condiciones adversas y por lo tanto generar estos ecosistemas especiales.

Una vez caracterizado el CMF, se procedió a la observación en el microscopio para identificar las especies morfológicamente.



Figura 10. A la izquierda, *Clorophyta*, género *Chlamydomonas* (familia *Chlamydomonadaceae*) [4], a la derecha, se observa una imagen en cámara de Neubauer a 40X del CMF.

En la Figura 10 se ha realizado una comparación de lo reportado en la literatura y lo observado en el microscopio. A la derecha una imagen del DAM TRC bioestimulado con 5% de MBB e inoculado con el CMF, en el recuadro rojo se puede notar la similitud de las *Chlamydomonas* sp. a la izquierda algas verdes unicelulares biflageladas, de 10 μm de diámetro, con lo observado en el CMF, en el recuadro azul se ha señalado una especie más pequeña la cual ha sido referida a las cianobacterias.

Las *Chlamydomonas* sp. y las *cianobacterias* son las que representan la mayor composición del CMF y las que han sido identificadas en el microscopio, se ha determinado utilizar la técnica de conteo por cámara de Neubauer, ya que, el CMF está compuesto por microorganismos que no se pueden observar a simple vista y la determinación de clorofila para cuantificar su desarrollo, dado que, ambas especies son fotosintéticas.

A lo largo de este trabajo se nombrará microalgas a la *Chlamydomonas* sp y *cianobacterias* a las más pequeñas.

7.3 Tinción de Gram y observación en fresco

Para identificar el grupo de bacterias al que pertenece el CMF, se realizó una tinción de Gram, los resultados se encuentran en la Tabla 11, en la que se puede observar la coloración que obtuvo cada muestra, las bacterias Gram positivas tienden a una coloración azul oscuro a morado y las bacterias Gram negativas se observan de color rosa a rojo.

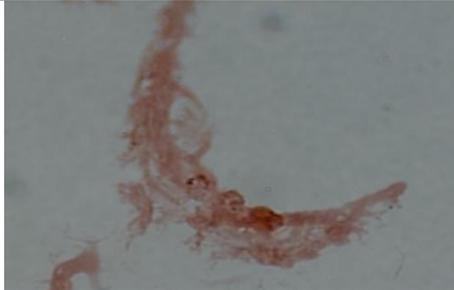
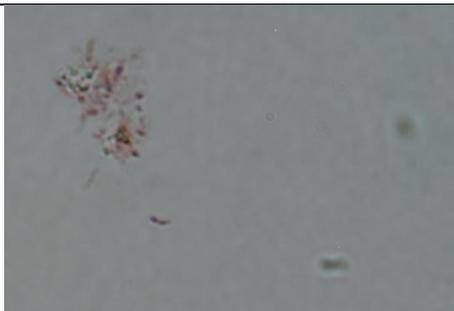
Las muestras representativas para esta prueba fueron el DAM TRC y con Cd, Zn y Mn del día 10 de la prueba de remoción, cada muestra inoculada con el CMF.

La muestra a la que se le añadió Mn presenta ambas coloraciones, en el centro se puede notar un color azul oscuro y a los alrededores rojizo por lo que la muestra está compuesta por bacterias Gram positivas y Gram negativas, contrastando con las demás que tiene una coloración rojiza en su totalidad por lo que las bacterias que conforman el CMF son bacterias Gram negativas.

La característica clave que diferencia una bacteria Gram negativa de una bacteria Gram positiva es la composición y estructura de la pared celular. La pared celular de las bacterias Gram negativas está formada por dos membranas lipídicas, una interna (citoplasmática) y otra externa, con un espacio entre ellas denominado espacio periplasmático en el que se dispone una capa de una sustancia llamada peptidoglicano. Las bacterias Gram positivas no cuentan con membrana externa y la capa de peptidoglicano es generalmente mucho más gruesa.

La tinción de Gram es solo una técnica diferencial e inicial para identificar dos grandes grupos de bacterias, en este caso, como se ha analizado en la caracterización microbiana los grupos de microorganismos identificados pertenecen al grupo de las bacterias Gram negativas, de esta manera, la tinción de Gram permite confirmar esta característica del CMF.

Tabla 11. Caracterización por tinción de Gram del CMF, con adición de Cd, Mn y Zn.

Muestra inoculada CMF	Imagen a 100 X	Clasificación
DAM TRC		Presencia de cocos Gram negativos
Cd		Presencia de cocos Gram negativos
Mn		Presencia de cocos Gram negativos y algunos Gram positivos
Zn		Presencia de cocos Gram negativos
Cd/Mn/Zn		Presencia de cocos Gram negativos y algunos Gram positivos

7.4 Pruebas de pH

El experimento se realizó a siete valores de pH diferentes, siendo el del DAM TRC de 5.1 que se tomó como muestra control.

Puesto que se busca no solo disminuir la concentración de metales, sino que el pH sea cercano al neutro y adecuado para el CMF se realizaron las pruebas en el intervalo de pH 4.0 a pH 7.0, con incrementos de 0.5 unidades.

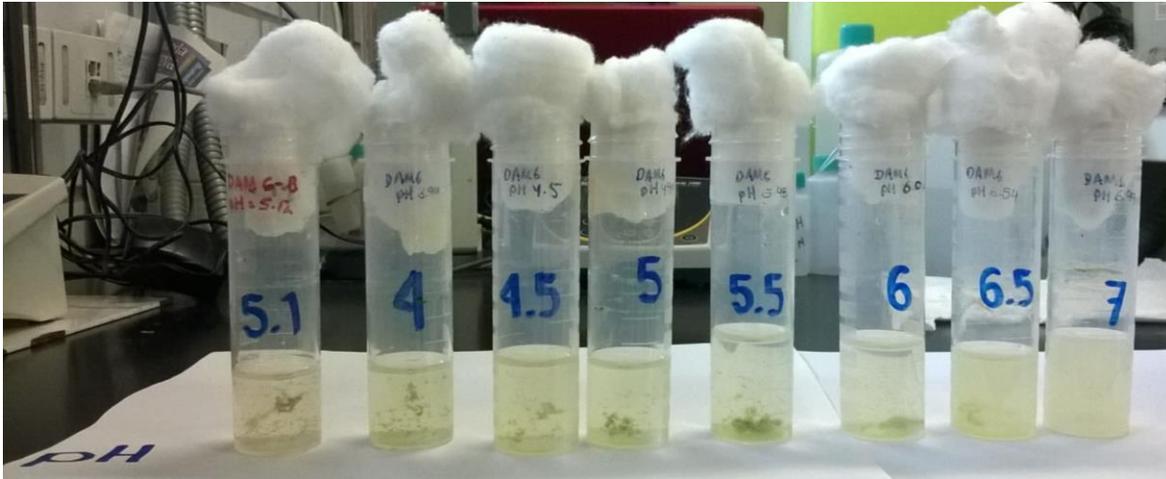


Figura 11. Comparación del desarrollo del CMF a diferentes valores de pH al finalizar el experimento.

En la Figura 11, se muestra la configuración de la prueba de pH al día 9, a simple vista es notorio que el tubo Falcon a pH 5.5 es en el que se ha desarrollado más el CMF, mientras que va aumentando el pH el crecimiento disminuye y se observa turbidez, sin embargo, se tomarán otros parámetros para determinar cuál es el pH óptimo de crecimiento; el conteo por cámara de Neubauer y la determinación de clorofila.

7.4.1 Recuento celular en Cámara de Neubauer

Las celdas de la cámara de Neubauer permiten realizar varias lecturas a la vez, así que se realizaron 4 conteos a cada pH, los promedios se han resumido en la Tabla 12, que se encuentra a continuación.

Tabla 12. Conteo por cámara de Neubauer de microalgas y cianobacterias que conforman el CMF, para determinación de pH óptimo.

pH	Número de microalgas	Número de cianobacterias	Microalgas			Cianobacterias		
			Promedio [células/mm ³]	Promedio [células/mL]	σ [células/mL]	Promedio [células/mm ³]	Promedio [células/mL]	σ [células/mL]
4	6	12	60	60,000	1.41	120	120,000	2.71
4.5	5	15	50	50,000	1.26	150	150,000	1.83
5	5	17	50	50,000	1.29	170	170,000	4.97
5.5	6	16	60	60,000	0.82	160	160,000	4.08
6	7	13	70	70,000	3.32	130	130,000	3.37
6.5	5	11	50	50,000	2.63	110	110,000	5.19
7	4	14	40	40,000	2.16	140	140,000	4.79

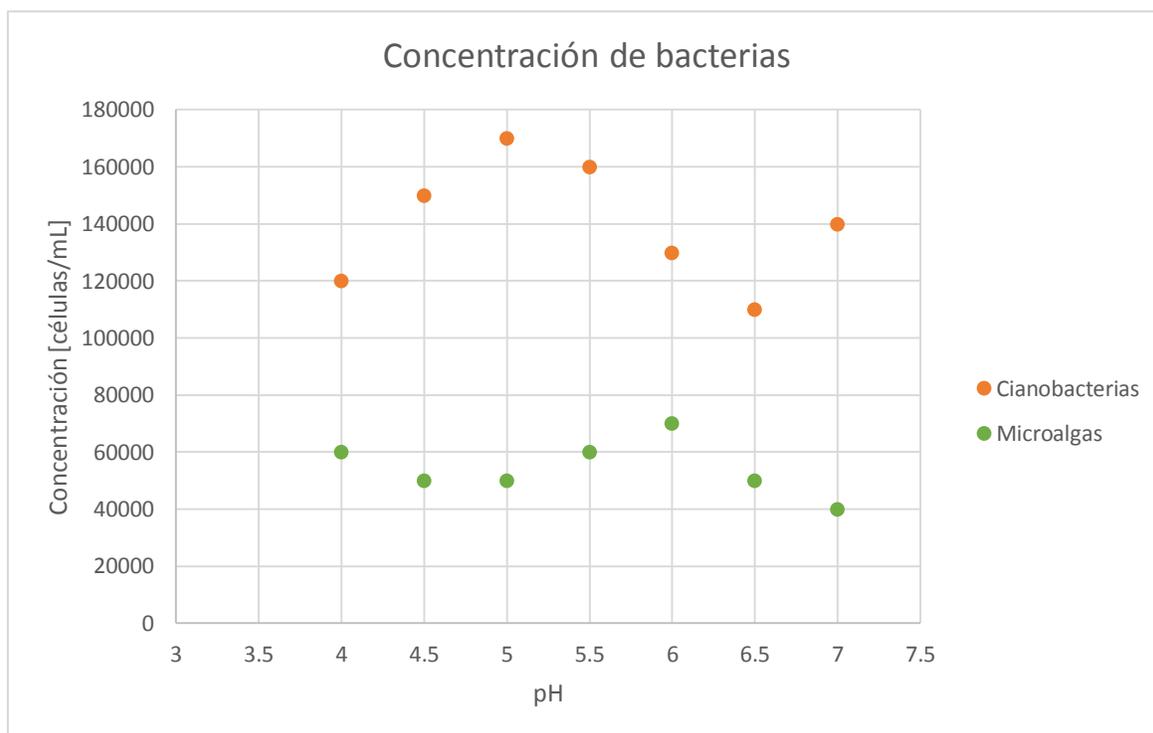


Figura 12. Efecto del pH en la concentración de microalgas y cianobacterias.

En la Figura 12, se muestra el efecto del pH sobre el crecimiento de microalgas y cianobacterias, es importante la tendencia de un máximo de crecimiento a pH 5 para cianobacterias y pH 6 para microalgas, ambas se comportan de manera similar al aumentar o disminuir el pH del óptimo el crecimiento disminuye.

7.4.2 Determinación de clorofila

Para definir el pH óptimo de desarrollo del CMF, se tomaron en cuenta los resultados de conteo por cámara de Neubauer y los de determinación de clorofila, estos últimos mostrados en la Tabla 13.

Tabla 13. Determinación de la concentración de clorofila obtenida a diferentes valores de pH.

pH	Clorofila a [mg/m ³]	Clorofila a[mg/mL]	σ [mg/mL]
4	0.2239	2.24E-07	4.57E-08
4.5	0.2447	2.45E-07	8.00E-09
5	0.2285	2.29E-07	0.00E+00
5.5	0.4317	4.32E-07	8.00E-09
6	0.1616	1.62E-07	1.56E-08
6.5	0.1293	1.29E-07	8.00E-09
7	0.1062	1.06E-07	3.58E-09

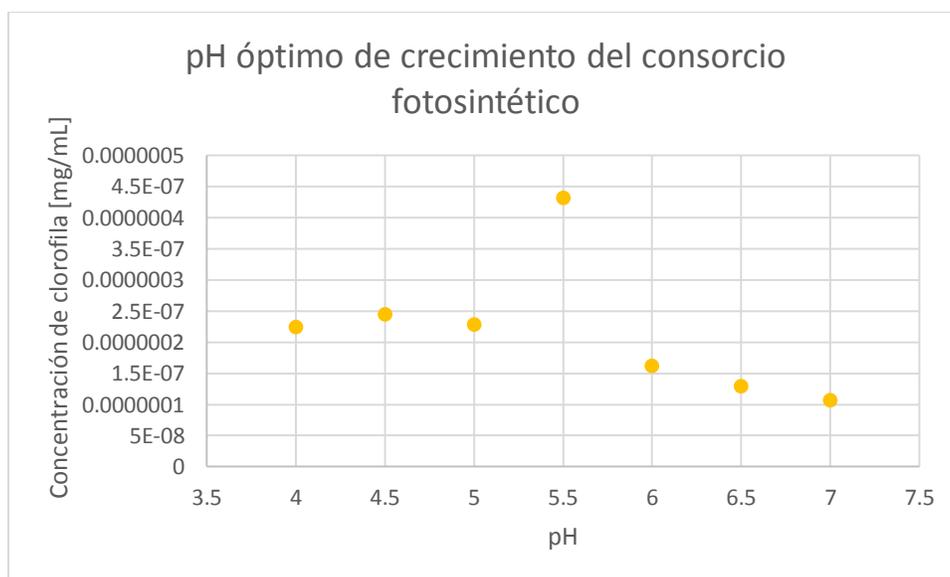


Figura 13. Efecto del pH en el crecimiento del consorcio microbiano fotosintético por determinación de clorofila.

Para las pruebas de pH se dejó crecer el consorcio microbiano fotosintético a distintos pH siendo el intervalo de 4 a 7. En la Figura 13 se puede notar una concentración baja de clorofila a pH de 4 a 5, mientras que a pH 5.5 se presentó el máximo de 4.32×10^{-7} mg/mL, y en las pruebas restantes de pH 6 a 7 la concentración de clorofila fue mínima, por lo que el pH óptimo según las extracciones de clorofila del consorcio microbiano fotosintético es a pH 5.5.

En la prueba de extracción de clorofila el pH óptimo de crecimiento, se presentó a pH 5.5, ya que cada microorganismo tiene un pH óptimo de crecimiento diferente, como se mencionó anteriormente, y según se observa en los resultados obtenidos de concentración de microorganismos en cámara de Neubauer en la Figura 12, se decidió utilizar el pH al que el CMF en conjunto presenta la mayor concentración, es decir, lo obtenido con determinación de clorofila.

El valor del pH óptimo de 5.5 se definió para las siguientes pruebas.

7.5 Cinética de crecimiento del CMF

A partir de la determinación del pH óptimo de crecimiento de 5.5, se realizaron los experimentos para determinar la cinética de crecimiento del CMF.

7.5.1 Recuento celular en Cámara de Neubauer

Los resultados de las observaciones diarias y recuento microscópico por cámara de Neubauer se encuentran en la Tabla 14.

Tabla 14. Determinación de la concentración de microalgas y cianobacterias en cámara de Neubauer para cinética de crecimiento.

Tiempo [días]	Microalgas [células/mL]	σ [células/mL]	Cianobacterias [células/mL]	σ [células/mL]
1	2,500	5,000	52,500	26,458
2	7,500	8,292	32,500	33,040
3	2,500	5,000	40,000	14,142
4	7,500	9,574	325,000	26,458
5	10,000	8,165	275,000	55,678
7	7,500	5,000	590,000	176,446
8	37,500	15,000	630,000	46,368
9	20,000	8,165	530,000	114,891

La relación de concentración entre microalgas y cianobacterias es diferente, el conteo de cianobacterias es mayor, aunque su tamaño es inferior al de las microalgas, por lo que se han graficado de manera separada, asimismo se busca identificar si su cinética de crecimiento es diferente debido a que con la técnica de conteo por Cámara de Neubauer se pueden diferenciar ambas especies, lo que no es posible con determinación de clorofila.

El crecimiento microbiano consta de 4 etapas, en la primera la fase de adaptación denominada A) *fase lag*, en la que no hay un aumento significativo en la densidad celular, la segunda de crecimiento B) *exponencial fase log* en la que se alcanza la máxima velocidad de crecimiento, la tercera el periodo estacionario C) *fase*

estacionaria no hay cambios de densidad celular en relación al tiempo y la cuarta D) *fase de decaimiento* en la que predominan los microorganismos muertos. Para fines de este proyecto, el CMF se debe mantener en la fase log, por esta razón el tiempo de crecimiento óptimo se tiene que encontrar en tal fase.

Se identificaron las 4 etapas para ambos constituyentes del CMF, es decir microalgas y cianobacterias.

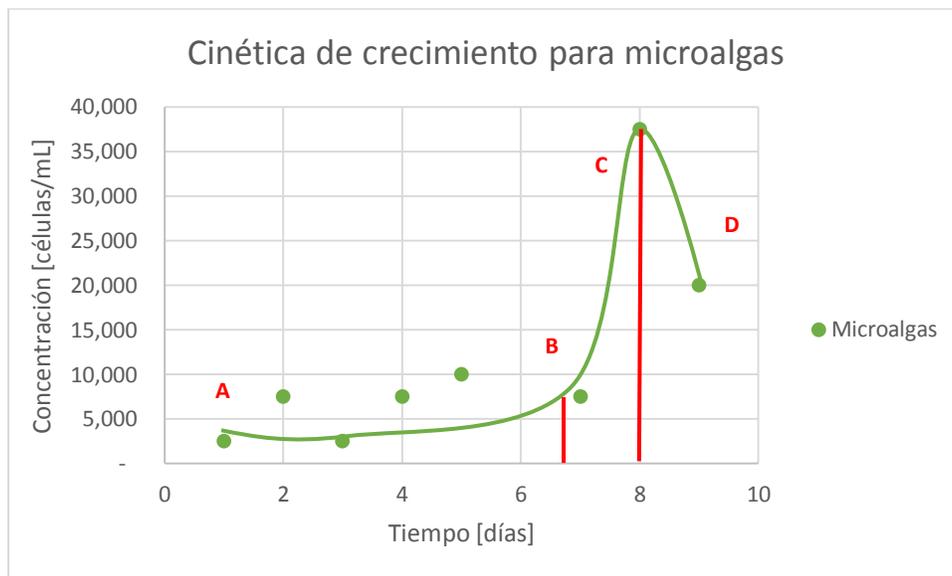


Figura 14. Cinética de crecimiento para microalgas en 9 días.

- A) Fase lag (0-6 días)
- B) Fase log (7-8 días)
- C) Fase estacionaria (8-9 días)
- D) Fase de muerte (9 días)

La Figura 14 representa la curva de crecimiento para las microalgas a partir del día 1 con 2,500 células/mL el CMF comienza a aumentar su densidad, hasta llegar al día 6 en el que se observa un cambio significativo de crecimiento y alcanza el máximo con 37,500 células/mL al día 8, la fase estacionaria es casi nula, de manera inmediata comienza la etapa de muerte al día 9, la concentración es de casi la mitad, con 20,000 células/mL.

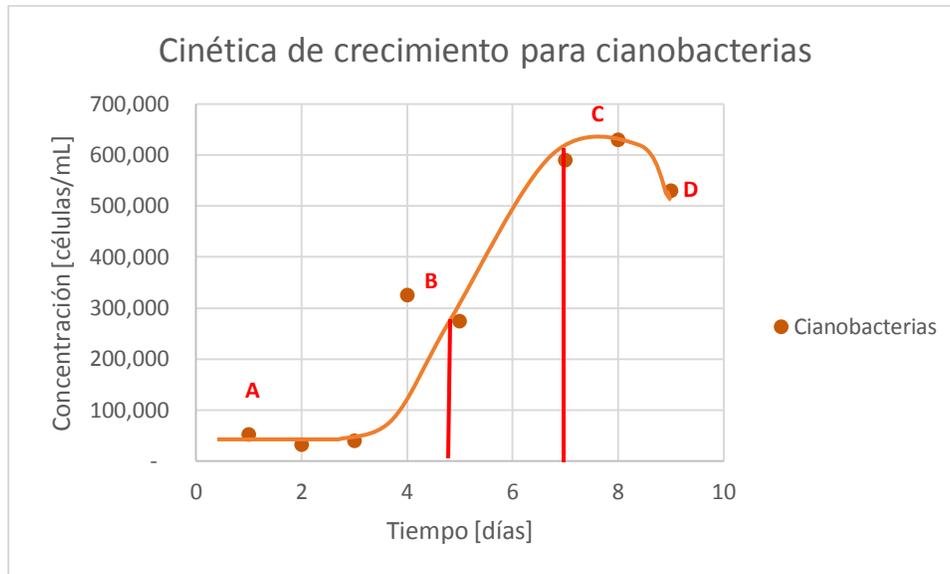


Figura 15. Cinética de crecimiento para cianobacterias en 9 días.

- A) Fase lag (0-5 días)
- B) Fase log (5-7 días)
- C) Fase estacionaria (7-8 días)
- D) Fase de muerte (9 días)

La curva de crecimiento para las cianobacterias se encuentra en la Figura 14, la fase de adaptación inicia con 52,500 células/mL y termina en el día 5, alcanza un máximo de 590,000 células/mL en el día 7, manteniendo la fase estacionaria hasta el día 8, la fase de muerte comienza el día 9 y se determinan 530,000 células/mL.

Las curvas de crecimiento para las especies mayoritarias del CMF son diferentes en la fase lag, la etapa log comienza en el día 5 para cianobacterias y el día 6 para microalgas, mientras que el máximo crecimiento para las cianobacterias es al día 7 y se mantiene hasta el día 8, las microalgas pasan sin mucha diferencia las dos etapas en el día 8, coincidiendo ambas en la fase de decaimiento al día 9.

7.5.2 Determinación de clorofila

Con lo observado en el conteo por cámara de Neubauer el experimento se detuvo al día 9, en la Figura 16 se observa el avance del experimento de cinética de crecimiento a simple vista, el día 0 no se observa ninguna coloración, el día 6 la

coloración verde característica del CMF es significativa, mientras que en el día 9 fue notable la disminución de la coloración verde de las microalgas y cianobacterias.

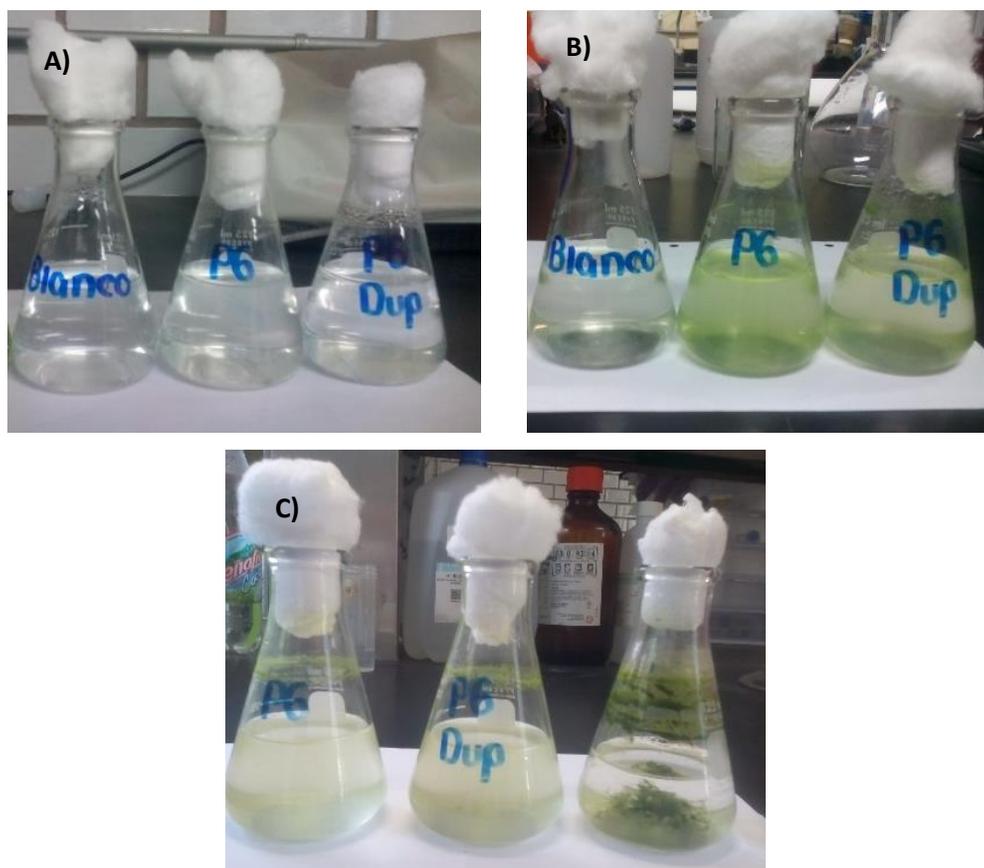


Figura 16. Experimento de cinética de crecimiento en diferentes días, A) Día 0, B) Día 6, C) Día 9.

En la Tabla 15 se encuentran los resultados obtenidos en la determinación de clorofila, los días 1,2,4,6,8 y 9.

Tabla 15. Determinación de clorofila para conocer la cinética de crecimiento del CMF.

Tiempo [Días]	Clorofila a [mg/m^3]	Clorofila a [mg/mL]	σ [mg/mL]
1	0.0000	0.00E+00	0
2	0.0000	0.00E+00	0
4	0.0014	1.39E-09	2.34E-24
6	0.0014	1.39E-09	2.34E-24
8	0.0055	5.51E-09	3.63E-11
9	0.0048	4.85E-09	9.79E-10

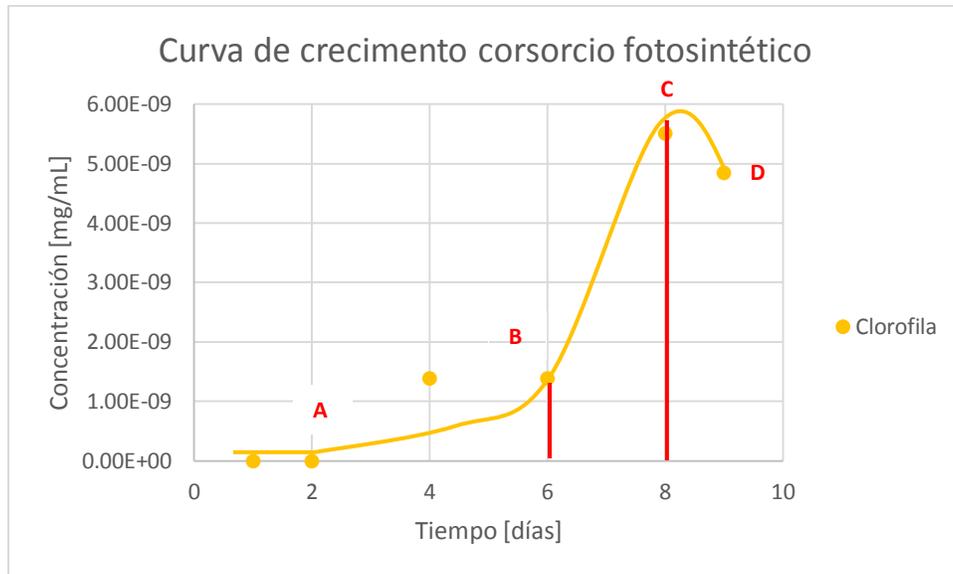


Figura 17. Curva de crecimiento obtenida por extracción de clorofila.

- A) Fase lag (0-6 días)
- B) Fase log (6-8 días)
- C) Fase estacionaria (8-9 días)
- D) Fase de muerte (9 días)

La curva de crecimiento del CMF mostrada en la Figura 17, es similar a las obtenidas de manera separada con el conteo por cámara de Neubauer, los días de diferenciación de fases coinciden con la curva de crecimiento de las microalgas.

A partir del día 6 el CMF comienza con el crecimiento exponencial hasta llegar a un máximo en día 8, la fase de muerte comienza a partir del día 9.

Con lo obtenido anteriormente se ha establecido que el día 8 se alcanza el máximo crecimiento y la fase estacionaria del CMF, representando el equilibrio entre las células vivas y muertas, sin embargo, el tiempo de muerte se alcanza rápidamente al día 9.

7.6 Concentración inhibitoria de crecimiento del CMF a diferentes concentraciones de Cd, Mn y Zn.

Para conocer la concentración inhibitoria de crecimiento del CMF a concentraciones altas de Cd, Mn y Zn, se ha analizado de manera separada a cada elemento.

Tomando en cuenta que el DAM TRC sobrepasa los niveles permitidos de los elementos de estudio, se ha aumentado la concentración de estos, debido a que en épocas de lluvias el DAM proveniente del socavón 1412 aumenta considerablemente, lo que no ha permitido que las estrategias de remediación que se han aplicado con anterioridad sean eficientes en cuanto a la remoción de Cd, Zn y Mn, pues no se tienen condiciones controladas, esto también podría ser una limitante en la implementación de estrategias de biorremediación, ya que la concentración de estos elementos puede llegar a ser un factor de inhibición que perjudique al sistema de remoción de metales del DAM, por tal motivo, la identificación de la concentración inhibitoria de estos elementos en el DAM, es de relevancia.

Las condiciones más relevantes que se deben conocer para el desarrollo del CMF son nutrientes, pH, cinética de crecimiento, exposición a la luz del sol, aireación y concentración inhibitoria de crecimiento con Cd, Mn y Zn, estos parámetros se pueden aplicar de manera real en un sistema de tratamiento pasivo y son lo que se han manejado en todos los experimentos.

Al inicio se analizó la muestra de DAM TRC bioestimulado con 5 % del MBB por IC, para conocer la concentración inicial con la que cuenta el DAM, los resultados se encuentran en la Tabla 16.

Tabla 16. Concentración de cationes en el DAM TRC bioestimulado con 5 % MBB, analizado por IC.

	Li ⁺	Na ⁺	NH ⁴⁺	Zn ²⁺	K ⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Cd ²⁺	Ca ²⁺
Concentración promedio [mg/L]	1.28	25.30	0.79	295.56	7.79	20.42	130.07	<LD	269.96

Los cationes de interés son el Cd, Mn y Zn, el Cd se encuentra por debajo del límite de detección del equipo, para el caso del Mn²⁺ la concentración promedio es de 20.42 mg/L y para el Zn²⁺ de 259.56 mg/L. estas concentraciones han sido tomadas en cuenta para determinar las concentraciones que se usaron para conocer la concentración inhibitoria del CMF.

7.6.1 Concentración inhibitoria de cadmio en el crecimiento del CMF

Se usaron 4 concentraciones diferentes de Cd, 232 mg/L, 435 mg/L, 612 mg/L y 977.6 mg/L, las concentraciones iniciales de Mn y Zn se mantienen constantes.

7.6.1.1 Recuento celular en cámara de Neubauer

El cadmio es un elemento muy dañino para la biota en general, las concentraciones reportadas anteriormente en el DAM TRC, el cadmio aparece por debajo del límite de detección, pero se han detectado concentraciones de 21mg/L según lo reportado por Ramos, 2018 [8]

En la Tabla 17 se encuentran los promedios obtenidos en la observación por cámara de Neubauer al día 9 del experimento.

Tabla 17. Concentración de microalgas y cianobacterias a diferentes concentraciones de Cd.

Concentración Cd [mg/L]	Microalgas		Cianobacterias	
	Promedio [células/mL]	σ [células/mL]	Promedio [células/mL]	σ [células/mL]
238.72	18000	8366.60	394000	58137.77
435.27	2000	4472.14	564000	63874.88
612.20	2000	4472.14	374000	74699.40
977.60	0	0.00	554000	84734.88

Para observar el comportamiento de las microalgas y cianobacterias se han representado gráficamente lo obtenido en la Tabla 17, la Figura 18 para microalgas y en la Figura 19 para cianobacterias.

Las microalgas presentan una tendencia muy marcada cuando aumenta la concentración de Cd rápidamente se observa una disminución considerable de células. Cuando la concentración de Cd es menor de 239 mg/L se encuentran

18,000 células/mL, al aumentar drásticamente a 978 mg/L las condiciones no han permitido que las microalgas se desarrollen, se ha alcanzado la dosis letal, ver figura 18.

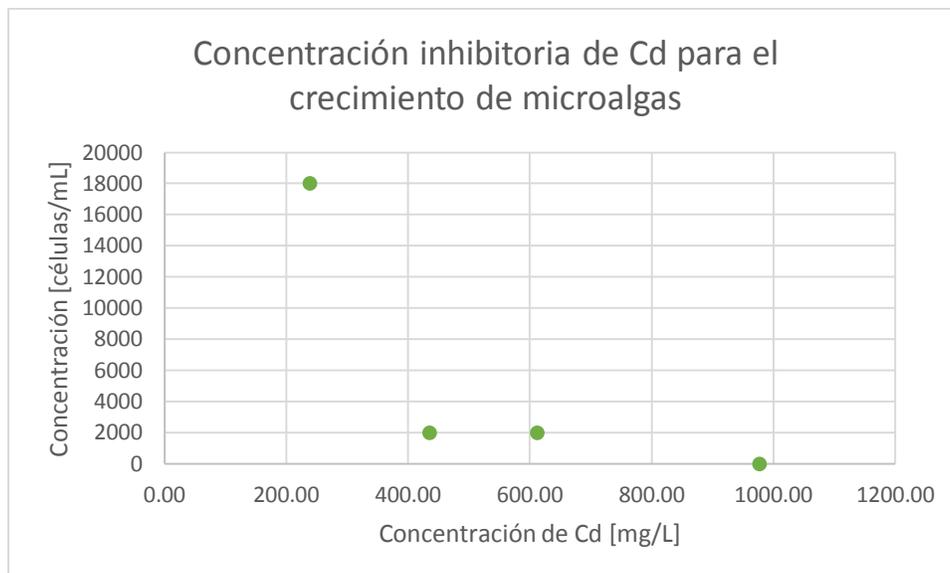


Figura 18. Efecto de la concentración de Cd en el crecimiento de microalgas.

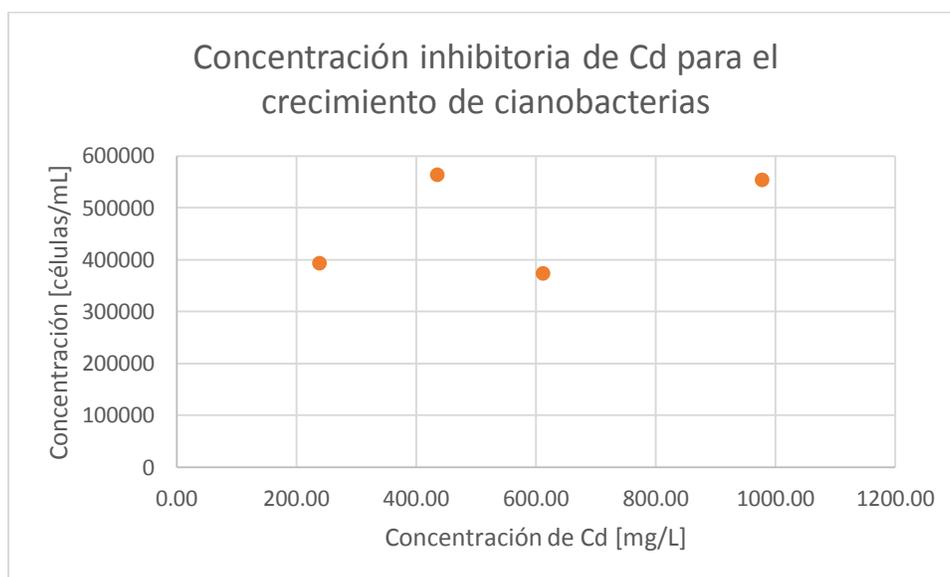


Figura 19. Efecto de la concentración de Cd en la concentración de cianobacterias.

Las cianobacterias al contrario de las microalgas, no se ven afectadas al aumentar la concentración de Cd, la concentración máxima es de 564,000 células/mL a 435 mg/L de Cd, esto se puede observar en la Figura 18.

7.6.1.2 Determinación de clorofila

Para complementar los resultados del conteo por cámara de Neubauer, se realizó la prueba de determinación de clorofila. Los resultados se encuentran a continuación en la Tabla 18.

Tabla 18. Determinaciones de clorofila a del CMF a diferentes concentraciones de Cd.

Concentración Cd [mg/L]	Promedio [mg/m ³]	Promedio [mg/mL]	σ [mg/L]
238.72	0.0092	9.23E-09	1.60E-09
612.20	0.0046	4.62E-09	3.20E-09
977.60	0.0011	1.11E-09	2.87E-24

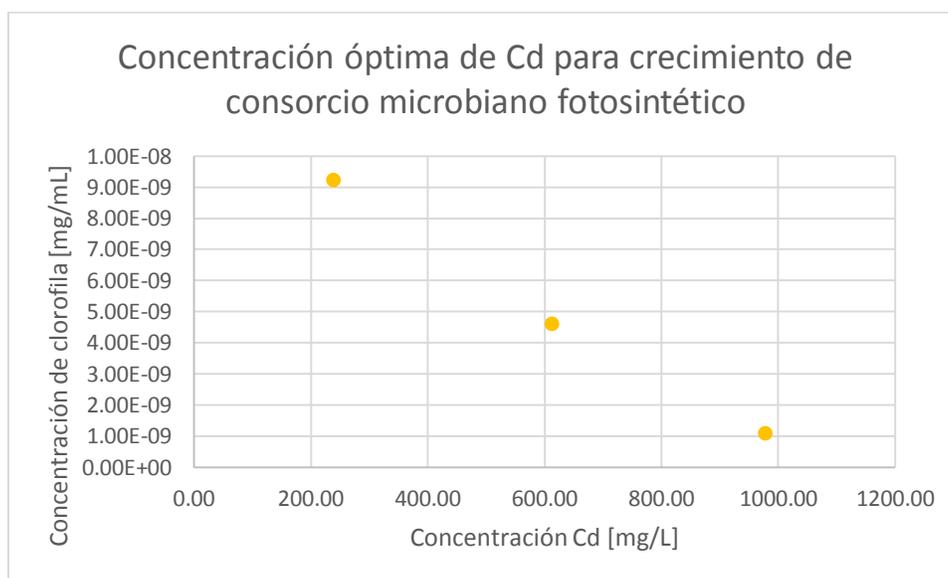


Figura 20. Efecto de la concentración de Cd en el crecimiento del consorcio microbiano fotosintético.

En la Figura 20 se observa el efecto del Cd en el CMF de manera general, se tiene una tendencia similar al de las microalgas al aumentar la concentración de Cd, la concentración de clorofila disminuye, de esta manera se puede notar la influencia de las microalgas en la determinación de clorofila, la concentración de cianobacterias no es suficiente para mantener su color verde característico.

La concentración adecuada para el desarrollo del CMF es de 238.72 mg/L de Cd.

7.6.2 Concentración inhibitoria de manganeso en el crecimiento del CMF

Para el caso de las pruebas de concentración inhibitoria se eligieron 4 concentraciones diferentes de Mn, 83.14 mg/L, 177.32 mg/L, 207.49 mg/L y 354.77 mg/L, la concentración de Cd y Zn se mantuvieron iguales a la inicial del CMF bioestimulado con 5 % del MBB.

7.6.2.1 Recuento celular en cámara de Neubauer

A continuación, en la Tabla 19 se muestran los promedios de microalgas y cianobacterias observadas en el microscopio

Tabla 19. Concentración de microalgas y cianobacterias a diferentes concentraciones de Mn.

Concentración Mn [mg/L]	Microalgas		Cianobacterias	
	Promedio [células/mL]	σ [células/mL]	Promedio [células/mL]	σ [células/mL]
83.14	14000	5477.23	588000	121119.78
177.32	24000	20736.44	648000	63403.47
207.49	8000	8366.60	450000	69282.03
354.77	2000	4472.14	314000	43358.97

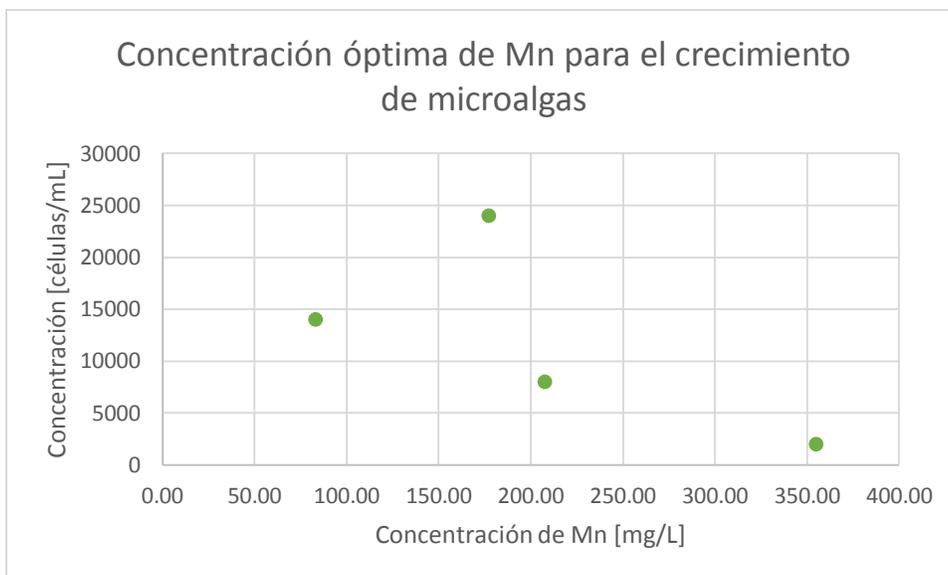


Figura 21. Efecto de la concentración de Mn en el crecimiento de microalgas.

En la Figura 21 se observa el efecto del Mn, en el desarrollo de las microalgas, a la concentración de 83 mg/L de Mn la concentración de células es de 5,477.23 células/mL, el máximo se encuentra a 177.32 mg/L Mn con 648,000 células/mL, a partir de aquí al aumentar la concentración de Mn el número de células disminuye, a 350 mg/L de Mn el número de cianobacterias es de 314,000 células/mL menos de la mitad del máximo.

El efecto del Mn a diferentes concentraciones para las cianobacterias se observa en la Figura 22, se comporta de manera similar a las microalgas, a la misma concentración de 177.32 mg/L se encuentra el máximo conteo celular de 648 células/mL, al aumentar más la concentración de Mn la concentración de cianobacterias disminuye, sin embargo, aún se mantienen viables, lo cual indica que estos microorganismos pueden resistir concentraciones elevadas de este elemento.

Además, es de notar que para el caso del Mn las microalgas y cianobacterias se comportan de la misma manera al aumentar su concentración.

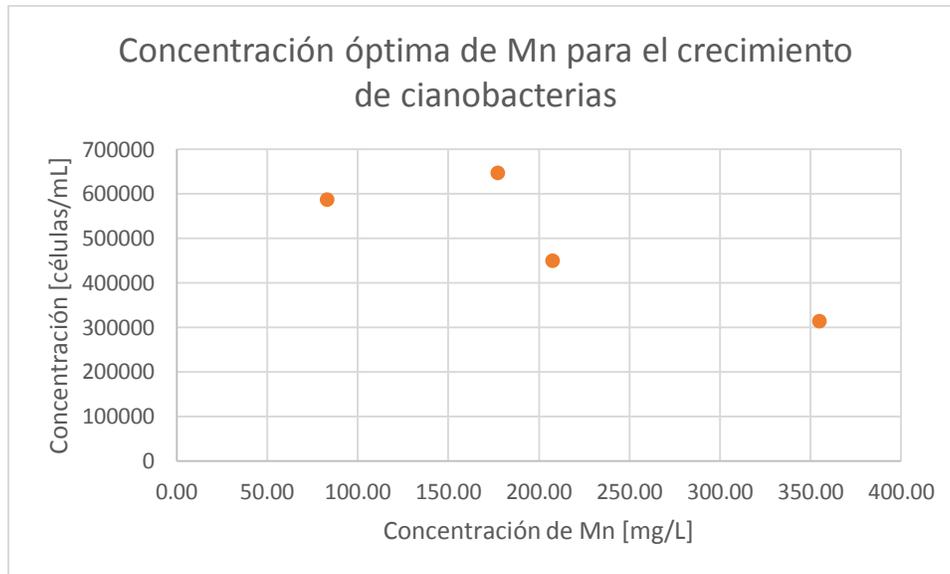


Figura 22. Determinación de la concentración de microalgas y cianobacterias a diferentes concentraciones de Mn.

7.6.3 Determinación de clorofila

La determinación de clorofila del CMF permite conocer el comportamiento en conjunto del CMF a las concentraciones de Mn, los resultados se han colocado en la Tabla 20, a continuación.

Tabla 20. Determinaciones de clorofila *a*, del CMF a diferentes concentraciones de Mn.

Concentración Mn [mg/L]	Clorofila a promedio [mg/m ³]	Clorofila a promedio [mg/mL]	σ [mg/L]
83.14	0.0185	1.85E-08	2.86E-09
177.32	0.0028	2.77E-09	1.10E-23
207.49	0.0028	2.77E-09	7.65E-24
354.77	0.0035	9.23E-10	1.60E-09

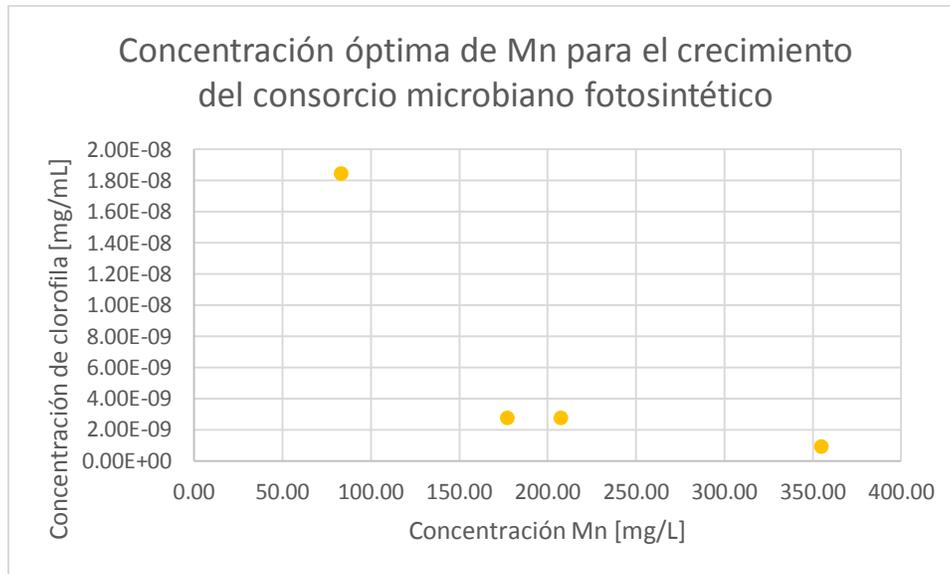


Figura 23. Efecto de la concentración de Mn en el crecimiento del consorcio microbiano fotosintético.

El efecto de la concentración de Mn, para el CMF se observa en la Figura 23, al aumentar la concentración de Mn, la concentración de clorofila disminuye considerablemente, la máxima concentración de clorofila es de 1.85×10^{-8} mg/mL, a la concentración más baja usada en la prueba siendo de 83.14 mg/L.

Al comparar los resultados de recuento de cámara de Neubauer y determinación de clorofila y considerando que nos interesa el adecuado desarrollo del CMF se eligió utilizar la concentración de 83.12 mg/L de Mn para la prueba de remoción, pues la determinación de clorofila muestra de manera conjunta el desarrollo del CMF.

7.6.4 Concentración inhibitoria de zinc en el crecimiento del CMF

La prueba se realizó a 5 concentraciones diferentes de Zn siendo 867 mg/L, 1000 mg/L, 1606 mg/L, 2110 mg/L y 2900 mg/L mientras que el Cd y Mn se mantuvieron constantes, es decir a la concentración de inicio.

7.6.4.1 Conteo en cámara de Neubauer

Los resultados de la concentración de microalgas y cianobacterias se han reportado en la Tabla 21.

Partiendo de una concentración de 260 mg/L, y teniendo en cuenta que la pileta 0 presenta una concentración de 600 mg/L, se plantean concentraciones superiores para asegurar el que CMF resistirá condiciones adversas.

Tabla 21. Concentración de microalgas y cianobacterias a diferentes concentraciones de Zn por conteo en cámara de Neubauer.

Concentración Zn [mg/L]	Microalgas		Cianobacterias	
	Promedio [células/mL]	σ [células/L]	Promedio [células/mL]	σ [células/mL]
867.24	20,000	7,071.07	804,000	135,388.33
1000.00	17,500	5,000.00	650,000	59,160.80
1606.89	15,000	5,773.50	637,500	60,156.05
2110.42	24,000	8,944.27	650,000	76,811,457.48
2900.96	14,000	8,944.27	642,000	100,846.42

Al aumentar de manera importante la concentración de Zn se esperaba que el CMF no se desarrollara en el DAM TRC, pero al transcurrir los 9 días del experimento se observó la coloración verde característica.

En las Figuras 24 y 25 se observa gráficamente el comportamiento de las microalgas y cianobacterias respectivamente, al aumento en la concentración de Zn.

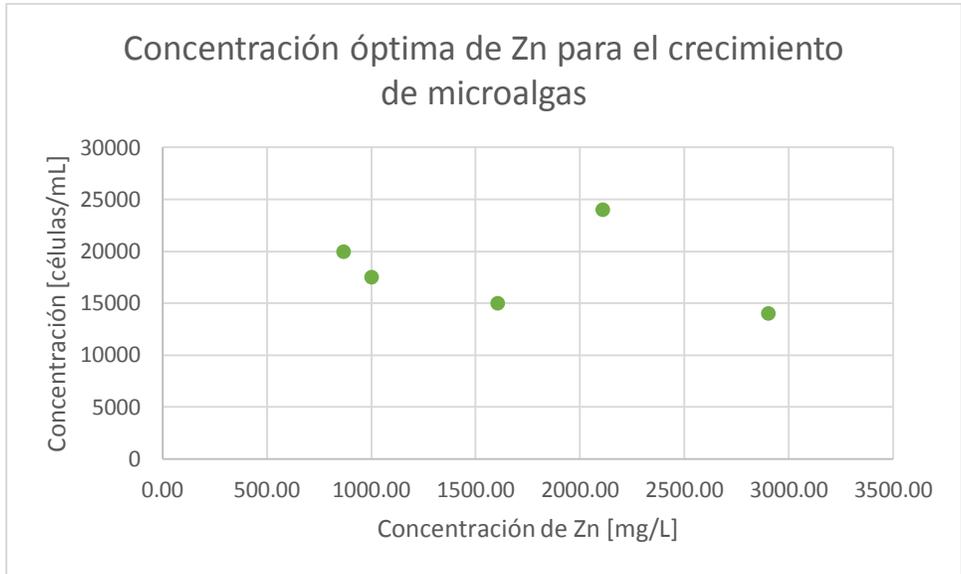


Figura 24. Efecto de la concentración de Zn en el crecimiento de microalgas.

La concentración de microalgas a 867 mg/L de Zn es de 20,000 células/mL, al aumentar la concentración de Zn el número de células disminuye observando el máximo a 2,110 mg/L de Zn donde la concentración es de 24,000 células/mL, a la concentración más alta el número de células disminuye siendo la menor en toda la gráfica de 14,000 células/mL a 2,900 mg/L de Zn.

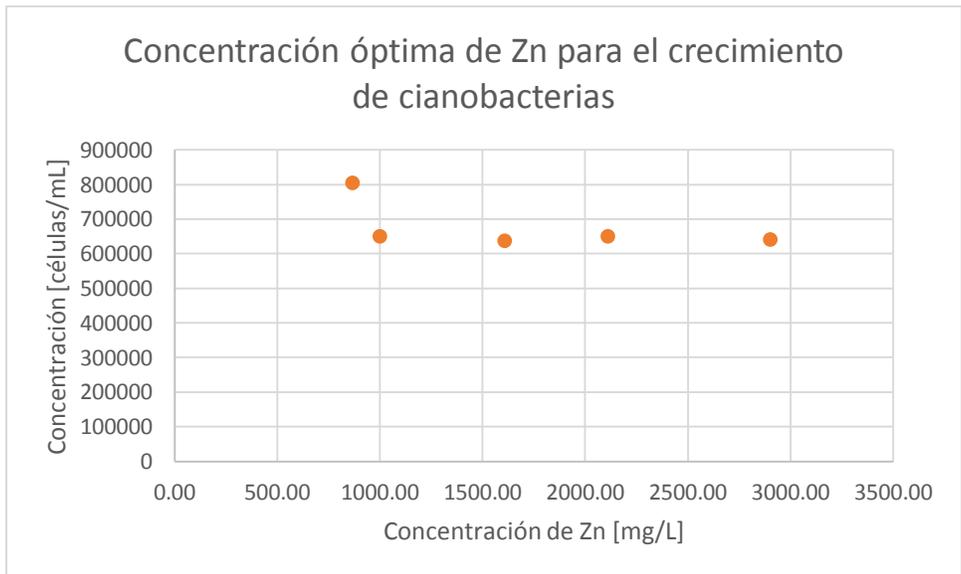


Figura 25. Efecto de la concentración de Zn en el crecimiento de cianobacterias.

Respecto a las cianobacterias se observa una tendencia diferente, al aumentar la concentración de Zn, el número de células disminuye, siendo a 867mg/L, la máxima concentración con 804,000 células/mL, mientras que a las concentraciones posteriores el CMF se mantiene casi constante con un número de células poco superior a 650,000 células/mL.

7.6.4.2 Determinación de clorofila

Para comparar los resultados que se obtuvieron en el conteo por cámara de Neubauer se ha realizado determinación de clorofila, los datos se encuentran en la Tabla 22, la cual se muestra a continuación.

Tabla 22. Determinación de clorofila a, a diferentes concentraciones de Zn.

Concentración Zn [mg/L]	Clorofila a promedio [mg/m ³]	Clorofila a promedio [mg/mL]	σ [mg/L]
867.24	0.027	2.68E-08	3.20E-09
1000.00	0.015	1.48E-08	1.60E-09
1606.89	0.003	4.62E-09	1.60E-09
2110.42	0.009	9.23E-09	1.60E-09
2900.96	0.003	3.69E-09	1.60E-09

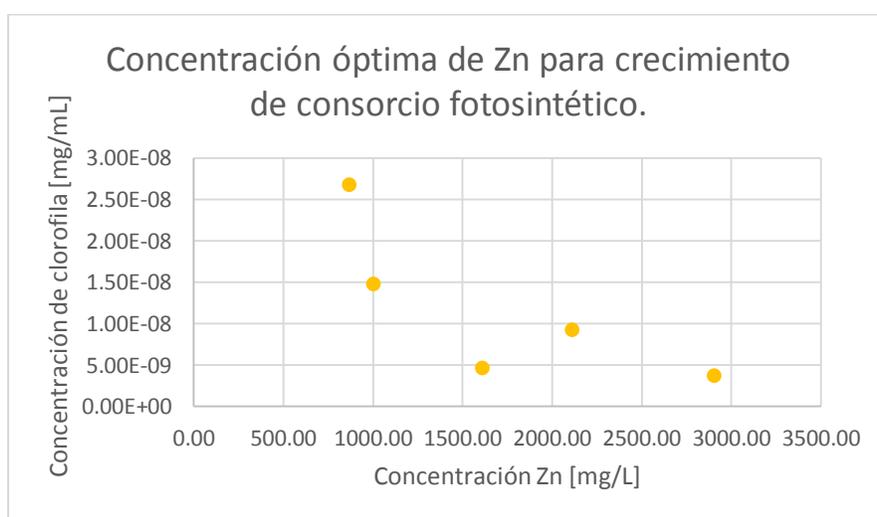


Figura 26. Efecto de la concentración de Zn en el crecimiento del consorcio microbiano fotosintético.

Como se observa en la Figura 26, en relación al comportamiento del CMF a las diferentes concentraciones de Zn probadas, al aumentar la concentración de Zn, la concentración de clorofila disminuye, siendo la mayor concentración de clorofila de 2.68×10^{-8} mg/mL a 2110 mg/L, después de lo cual, se vuelve a observar un aumento de clorofila, pero menor a la mitad del máximo, por tanto, se eligió esta concentración para las siguientes pruebas.

7.6.5 Efecto de la concentración de Cd, Mn y Zn en el tamaño de microalgas y cianobacterias

Otro aspecto que no se había tomado en cuenta, pero es significativo es el efecto de la concentración de Cd, Zn y Mn, en el tamaño de las microalgas y cianobacterias, de esta manera se podrá relacionar el recuento en cámara de Neubauer y la determinación de clorofila.

Al realizar el recuento por cámara de Neubauer también es posible medir el tamaño de las microalgas y cianobacterias, al notar que en algunos casos el tamaño de ambas variaba, se decidió realizar mediciones a algunas concentraciones, teniendo en cuenta que el tamaño promedio para las microalgas en el DAM TRC es de 10.059 μm y el de cianobacterias de 2.521 μm .

7.6.5.1 Cadmio

La concentración a la que el CMF tiene el máximo crecimiento fue a 238.7 mg/L, en la Tabla 23 se encuentran los diámetros promedio de microalgas y cianobacterias a dos concentraciones diferentes.

Tabla 23. Diámetros promedio de microalgas y cianobacterias a dos diferentes concentraciones de Cd.

Cd²⁺ [mg/L]	Diámetro promedio [μm]	
	Microalgas	Cianobacterias
238.7	8.142	2.129
612.2	5.812	1.845

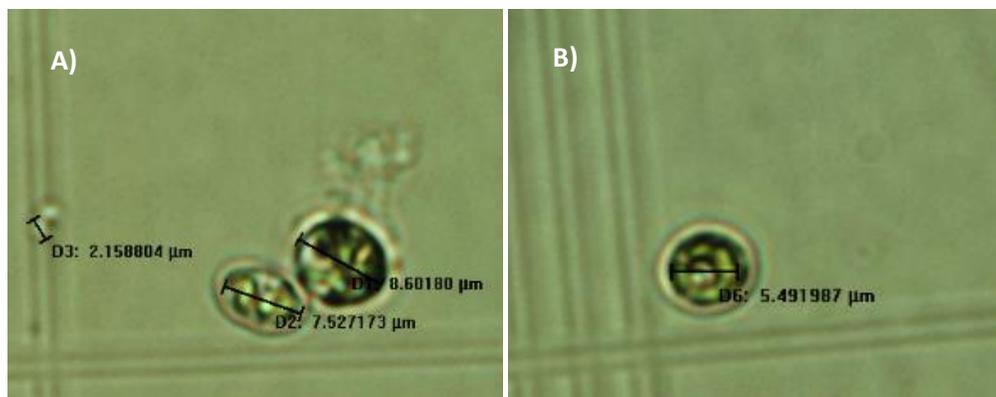


Figura 27. Observación en cámara de Neubauer del CMF, A) CMF a 238.7mg/L de Cd, a 40X, B) Microalga a 612mg/L de Cd a 40X.

El tamaño promedio de las microalgas a 238.7mg/L de Cd es de 8.142 μm , casi 2 μm menos que el tamaño inicial de las microalgas, mientras que a 612.2mg/L de Cd, el tamaño de las microalgas es casi de la mitad del tamaño original con un diámetro promedio de 5.812 μm , lo anterior se puede observar en la Figura 27.

Los efectos del Cd no solo se dan en el tamaño, como ya se analizó anteriormente también afectan el desarrollo ya que a concentraciones superiores a 612mg/L de Cd las microalgas son muy escasas o no se desarrollan. Sin embargo, cabe resaltar que estas concentraciones son muy altas y se esperaría que aún a 238.7 mg/L las microalgas no crecieran.

Por otra parte, el efecto de la concentración de Cd en las cianobacterias es muy diferente, a 238.7 mg/L de Cd el diámetro promedio es de 2.129 μm y a 612.2 mg/L de 1.845 μm , a pesar de ser muy pequeñas las cianobacterias siguen creciendo a 1000 mg/L de Cd.

7.6.5.2 Manganese

La concentración óptima de crecimiento del CMF con Mn es de 83.1 mg/L, en la Tabla 24 se han reportado los diámetros promedio del CMF a tres concentraciones diferentes de Mn.

Tabla 24. Diámetros promedio de microalgas y cianobacterias a dos diferentes concentraciones de Mn.

Mn ²⁺ [mg/L]	Diámetro [µm]	
	Microalgas	Cianobacterias
83.1	7.510	1.882
177.3	7.499	1.539

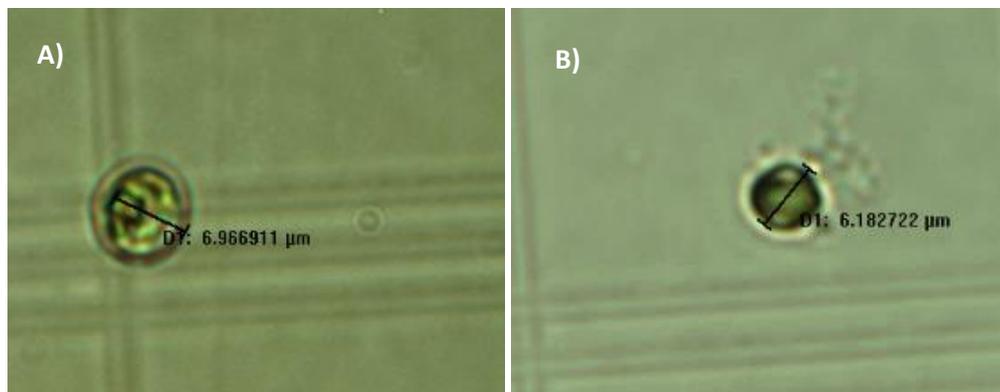


Figura 28. Observación en cámara de Neubauer del CMF, A) Microalga a 83.1mg/L de Mn, a 40X, B) Microalga a 177.3mg/L de Mn a 40X.

El efecto del Mn en el tamaño de las microalgas es visible como se observa en la Figura 28, el tamaño inicial de las microalgas en el DAM TRC es de 10.049 µm, mientras que a 83.1 mg/L, el diámetro promedio es de 7.510 µm y a 177.3 mg/L de 7.499 µm, al aumentar la concentración de Mn el tamaño de las microalgas se mantiene casi constante.

Aunque el tamaño de las microalgas ya no se ve afectado al aumentar la concentración, sí el número de microalgas, de esta manera al realizar determinación de clorofila no coincide con la observación con cámara de Neubauer.

En el caso de las cianobacterias el tamaño inicial es de 2.521 µm, a 83.1 mg/L el diámetro ha disminuido a 1.882 µm y a 177.3 mg/L 1.539 µm, al continuar aumentando la concentración de Mn el diámetro disminuye.

7.6.5.3 Zinc

La concentración adecuada a la que el CMF es a 867.2 mg/L, no obstante, las microalgas se comportan de manera muy diferente a lo obtenido con determinación de clorofila.

En la Tabla 25 se muestran los diámetros para microalgas y cianobacterias a diferentes concentraciones de Zn.

Tabla 25. Diámetros promedio de microalgas y cianobacterias a dos diferentes concentraciones de Zn.

Zn ²⁺ [mg/L]	Diámetro [μm]	
	Microalgas	Cianobacterias
867.5	9.662	1.978
1606	7.676	2.174
2110	6.134	1.763

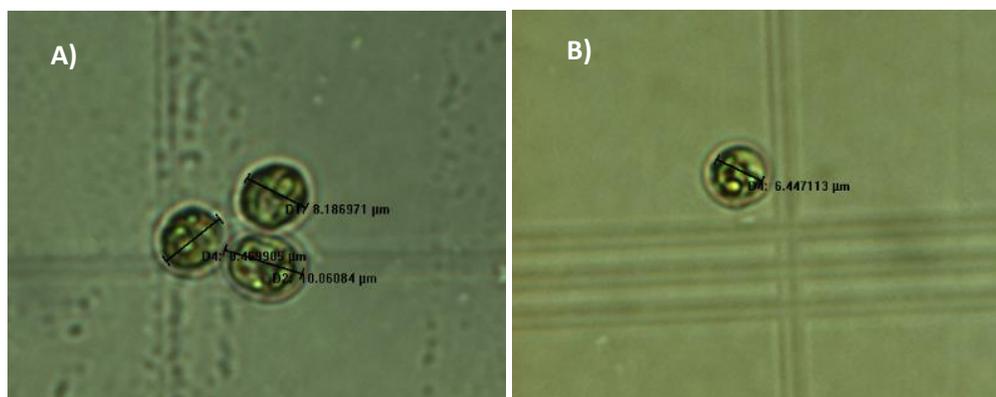


Figura 29. Observación en cámara de Neubauer del CMF, A) Microalgas a 867.5mg/L de Zn, a 40X, B) Microalga a 2110mg/L de Zn a 40X.

El tamaño de las microalgas no disminuyó drásticamente con la concentración más baja de Zn utilizada, si es comparado con lo obtenido con Cd y Mn, ya que a la concentración de 867.5 mg/L su diámetro es de 9.662 μm casi 0.5 μm que el tamaño normal de las microalgas, en cambio al aumentar la concentración de Zn a 1606 mg/L el tamaño disminuyó a 7.676 μm, y a 2110 mg/L a 6.134 μm, esto se puede observar en la Figura 29.

Para las cianobacterias a 867.5 mg/L de Zn el diámetro disminuyó a 1.987 μm , poco más de 0.5 μm , a 1606 mg/L el diámetro es de 2.174 μm , 0.347 μm menos que las microalgas del DAM TRC, a 2110mg/L las cianobacterias disminuyeron su diámetro a 1.763 μm .

Para la prueba de retención se decidió utilizar la concentración de 1606 mg/L de Zn, para determinar el porcentaje de remoción a esa concentración debido a que al inicio del tratamiento el DAM TRC presentaba concentraciones de Zn promedio de 1303 mg/L de Zn, y como las concentraciones tanto de Cd y Mn han sido superiores a las presentadas por al DAM TRC se estableció utilizar tal concentración.

7.7 Remoción de Cd, Mn y Zn a las mejores condiciones de desarrollo del CMF

Las condiciones óptimas para que el CMF se desarrolle a su máximo se aplicaron en esta prueba.

El pH se llevó a 5.5 al inicio de la prueba, no fue necesario mantener un control de este durante el experimento, pues finalizar la prueba, el pH se encontró alrededor de 6, por esta razón puede ser no necesario aumentar el pH a 5.5 cuando se realice la prueba piloto, ya que el DAM TRC tiene un pH de 5.1 y el CMF permite que el DAM TRC aumente aproximadamente 0.5 unidades de pH.

El tiempo de residencia es otra condición importante, la prueba se mantuvo durante 15 días para Cd, Mn y Zn separados y 19 días para la combinación de los tres elementos, cabe destacar que durante toda la prueba se mantuvo en agitación constante y a la luz del sol para garantizar el crecimiento del CMF.

En la Tabla 26, se encuentran los resultados de la prueba de retención de metales, se muestreo regularmente cada lote, iniciando en el día 0, para mantener un control a lo largo de la prueba hasta el día 15.

El lote Cd/Mn/Zn se mantuvo 19 días, la razón se debe a que se observó que la cinética de crecimiento era más lenta, debido a que el CMF no se desarrolló como en los casos en la que solo se aumentó la concentración de un metal.

La muestra control, es el DAM TRC, que no ha sido inoculada con el CMF. La muestra DAM TRC bioestimulada e inoculada con el CMF mostrará el comportamiento de este a la concentración real del DAM en Taxco. Se probaron cuatro concentraciones diferentes, en el primero se llevó la concentración de Cd a 343.8 mg/L, Mn y Zn se mantuvieron constantes, para Mn la concentración utilizada fue de 80.4mg/L, Cd y Zn se mantuvieron constantes, en el tercero la concentración de Zn fue de 1773.4 mg/L, Cd y Mn se mantuvieron constantes, por último se decidió realizar una prueba en la que los tres metales se encontraran a altas concentraciones, las cuales fueron de 349.5 mg/L de Cd, 83.6 mg/L de Mn y 1719.6 mg/L de Zn.

Tabla 26. Cambio en la concentración de Cd^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Na^{2+} , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} en el DAM TRC, al ser tratado con un consorcio microbiano fotosintético.

Muestra	Día de muestreo	Cd^{2+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Na^{2+}	NH_4^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}
DAM TRC (Blanco)	1	<LD	22.0	287.1	23.5	1.1	7.9	123.8	258.0
	2	<LD	22.6	291.3	23.3	0.5	7.3	125.3	260.5
	10	<LD	21.2	276.7	21.4	0.8	6.0	119.5	235.7
	13	<LD	20.2	262.2	20.2	<LD	5.9	113.0	232.7
	15	<LD	20.3	261.4	22.3	1.3	3.1	114.4	232.8
	16	<LD	20.2	288.8	22.6	2.9	9.2	117.2	240.8
DAM TRC inoculado	1	<LD	23.0	302.8	25.5	0.1	8.6	128.0	264.1
	2	<LD	22.6	300.7	26.1	<LD	8.1	129.8	269.9
	4	<LD	23.3	301.3	22.8	<LD	6.5	129.3	284.4
	6	<LD	20.3	287.1	31.7	0.2	7.8	129.1	261.7
	10	<LD	22.2	291.2	21.8	<LD	5.5	123.4	257.8
	13	<LD	21.2	284.5	21.5	0.1	6.0	118.3	245.7
	15	<LD	22.5	273.8	20.6	<LD	5.1	116.1	240.3
Cd	1	343.8	21.7	285.5	24.3	<LD	7.4	123.3	258.2
	2	341.7	21.8	285.2	23.8	<LD	7.6	122.6	255.4
	4	333.5	21.2	277.0	22.6	<LD	6.4	119.7	248.7
	6	330.6	23.2	272.1	21.8	<LD	5.9	115.6	245.0
	10	332.2	21.4	277.2	24.6	<LD	6.4	121.3	251.4
	13	330.8	21.6	277.3	22.6	1.9	5.9	120.3	250.5
	15	315.2	20.3	262.0	25.9	<LD	5.8	113.7	237.1
Mn	1	<LD	80.4	311.0	27.5	0.3	8.3	134.0	282.2
	2	<LD	81.5	308.4	24.8	<LD	7.7	126.4	265.3
	4	<LD	83.1	313.6	24.1	0.1	6.3	133.8	266.0
	6	<LD	81.5	281.8	23.5	1.0	6.5	122.0	250.9
	10	<LD	83.9	292.1	25.6	0.9	6.4	126.6	262.1
	13	<LD	82.2	284.1	23.7	<LD	5.8	124.1	257.8
	15	<LD	83.5	281.1	26.3	<LD	6.5	124.3	251.6
Zn	1	<LD	21.9	1773.4	27.4	<LD	6.3	132.0	270.4
	2	<LD	23.8	1762.2	26.0	0.5	7.0	127.7	271.0
	4	<LD	32.7	1724.8	24.9	<LD	6.4	128.4	264.4
	6	<LD	22.4	1686.9	23.1	<LD	1.8	127.1	257.9
	10	<LD	21.8	1691.7	25.8	<LD	5.5	129.0	279.8
	13	<LD	17.5	1612.4	22.6	<LD	4.8	135.4	246.6
	15	<LD	20.2	1589.9	25.3	2.0	5.9	120.1	252.0
Cd,Mn,Zn	1	349.5	83.6	1719.6	49.3	0.8	8.4	129.7	267.7
	2	343.9	82.8	1724.8	45.4	0.9	8.0	127.6	265.4
	4	335.6	85.5	1659.4	45.5	0.6	7.4	122.7	257.2
	6	329.0	83.6	1604.2	40.0	<LD	4.8	118.5	249.5
	13	327.7	78.8	1617.8	44.1	0.5	6.1	121.0	252.3
	16	326.5	79.1	1596.0	39.7	0.3	5.3	118.6	248.2
	19	309.1	75.1	1536.2	38.1	2.9	5.2	114.2	238.0

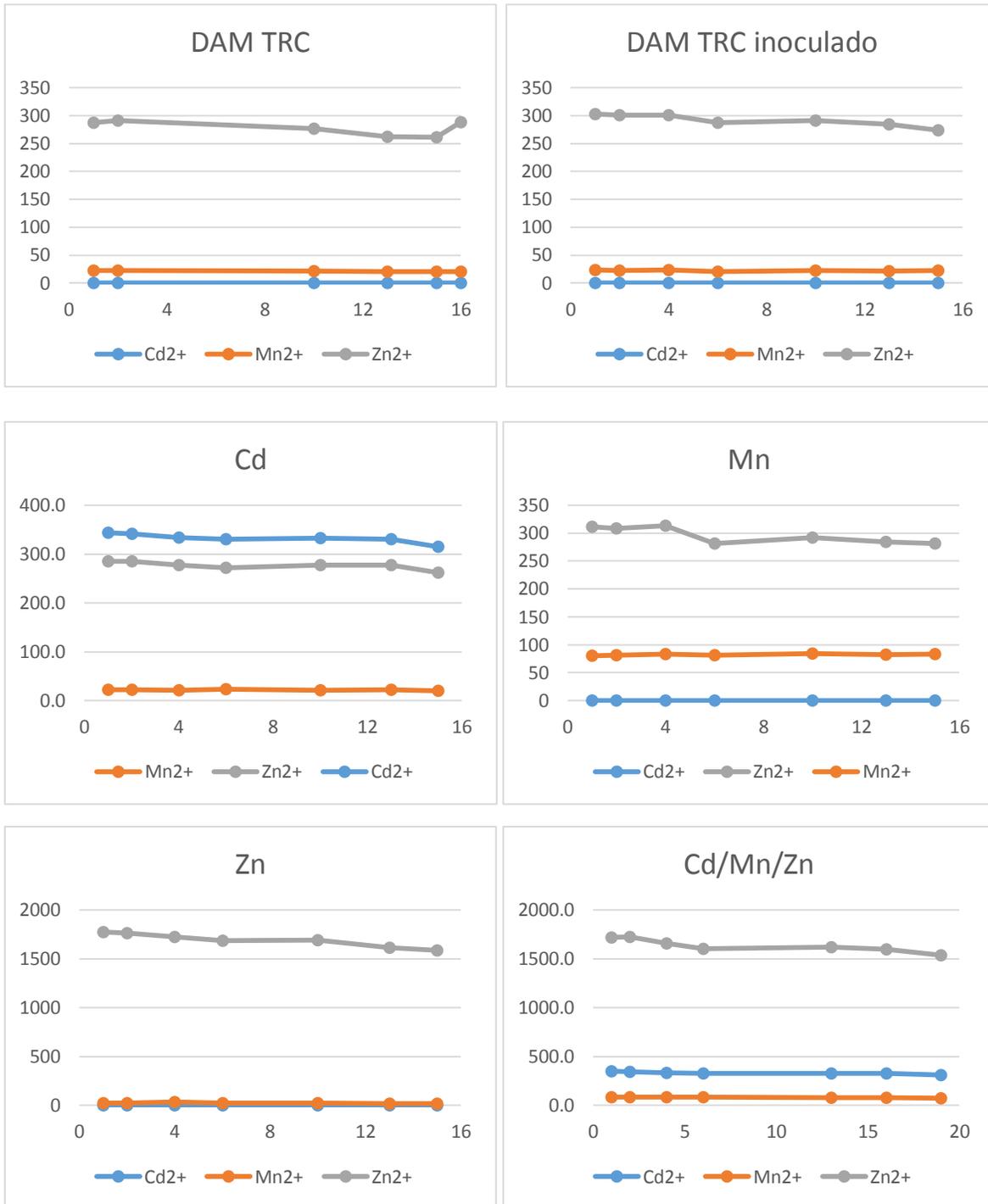


Figura 30. Remoción de Cd²⁺, Mn²⁺ y Zn²⁺, a diferentes condiciones del DAM TRC.

La Figura 30, es la representación gráfica de la Tabla 26, se puede visualizar de una mejor manera, la disminución de las concentraciones de Cd, Mn y Zn, en relación a la muestra blanco, los cambios en la concentración no son significativos, la muestra que ha sido inoculada pero no se han realizado cambios en la concentración, se observa una tendencia diferente en cuanto al Zn, a partir del día 2 y de manera consecuente en los siguientes días la concentración va del día 1 con 302.8 mg/L al día 15 con 273.8 mg/L.

Por otra parte, las muestras en las que se ha variado la concentración de los tres metales de estudio, se observa un cambio de concentración más significativo, sobre todo en la que se ha aumentado la concentración de Cd/Mn/Zn, que se mantuvo en constante agitación y a la luz del sol durante 19 días, debido a que la cinética de crecimiento fue más lenta que en los otros casos, sin embargo es en la que la concentración de los metales ha disminuido más.

Para comparar el porcentaje de remoción de las diferentes concentraciones manejadas se ha realizado la Tabla 27, en la que se ha comparado la concentración del día 0 al día 15 y 19 según sea el caso.

Tabla 27. Porcentaje de remoción de Cd, Mn y Zn a las diferentes condiciones de concentración.

Muestra	%Remoción		
	Cd ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺
DAM TRC blanco	0.0	0.0	3.8
DAM TRC inoculado	0.0	2.1	9.6
Cd	8.3	8.2	8.2
Mn	0.0	0.0	9.6
Zn	0.0	7.6	10.3
Cd/Mn/Zn	11.6	10.2	10.7

El beneficio de realizar la bioestimulación del DAM TRC con el MBB, se puede comparar entre las muestras DAM TRC blanco y DAM TRC inoculado, pues al

inocular la muestra el desarrollo del CMF es factible y la remoción del Mn y Zn aumenta de 0.0 a 2.1% para Mn y de 3.8% a 9.6% para Zn.

El Cd presenta buenos porcentajes de remoción en las dos pruebas en las que se aumentó su concentración, con 8.3%, en la que el Mn y Zn se mantuvieron a la concentración del DAM TRC, y de 11.6% para la prueba en la que se aumentó la concentración de los tres metales.

Para el caso del Mn, su comportamiento es variable, puesto que en la prueba que se aumentó su concentración a 80.4 mg/L, el porcentaje de remoción es cero, en cambio cuando se aumenta la concentración de Cd, Zn y los tres metales juntos la remoción de Mn puede llegar al 10.2 %.

El Zn es el metal que tiene el mejor comportamiento en las pruebas, en todas hay una disminución de su concentración siendo la mayor de 10.7 %, en la que los tres metales han aumentado su concentración.

De esta manera se puede asumir que el CMF actúa de una mejor manera cuando los tres metales están a altas concentraciones y se puede tener otras variaciones en las que el Cd y el Zn pueden estar en altas concentraciones.

En cuanto a los mecanismos por los cuales, se lleva a cabo la remoción de estos elementos, se puede considerar lo encontrado por Subashchandrabose, et al., 2011 [61], que mencionan que estos microorganismos pueden retener estos metales en su pared celular por adsorción superficial debido a la presencia de grupos cargados negativamente, además de otros mecanismos como es la absorción y retención dentro de estructuras como las vacuolas o la precipitación en la superficie celular o interna. Por lo anterior, es posible hacer uso de la acción biológica del CMF para disminuir la concentración de Cd, Mn y Zn en el DAM TRC, para mejorar el sistema biogeoquímico que se ha estado desarrollando como prueba piloto para la remediación del DAM en Taxco, Guerrero.

El uso del CMF como un tratamiento de remediación pasivo para el DAM TRC, es una opción viable, aunque la remoción Mn y Zn, no es suficiente en las pruebas

realizadas, es bien sabido que los tratamientos pasivos conllevan tiempo, si el CMF se dejara actuar por 148 días para Zn y 407 días para Mn, la concentración de ambos metales sería adecuada para su disposición al río Taxco.

La resistencia del CMF a Cd, Mn y Zn, es sumamente buena, pueden sobrevivir a concentraciones altas de estos elementos y puede ser una opción otros tratamientos de DAM.

8 CONCLUSIONES

- El tiempo óptimo de crecimiento del CMF en el que se alcanza el máximo crecimiento con bioestimulación es de 8 días. El MBB, permite que el CMF se desarrolle a partir del día 1 de inoculación.
- Se lograron observar las fases de crecimiento para el CMF aislado de Taxco, Guerrero, encontrando $t_{\text{adaptación}}$: 0 a 5 días, $t_{\text{crecimiento exponencial}}$: 5 a 7 días, $t_{\text{estacionario}}$: 7 a 8 días y $t_{\text{decaimiento}}$: 9 días.
- Se encontró que el consorcio presenta un pH óptimo de 5.5, similar al de las aguas de DAM tratadas con calizas.
- Se determinó que las mejores concentraciones de desarrollo del CMF son 343.8 mg/L para Cd, 80.4 mg/L para Mn y 1773.4 mg/L para Zn. A partir de las concentraciones de 600 mg/L para Cd, 170 mg/L para Mn y 2000 mg/L para Zn, se observa un efecto negativo en su crecimiento.
- El porcentaje de remoción en 15 días para el DAM TRC es de 2.1 % para Mn y de 9.6 % para Zn.
- El porcentaje de remoción en 19 días cuando se aumenta la concentración de los tres metales de estudios en el DAM TRC es de 11.6 % para Cd, 10.2 % para Mn y 10.7 % para Zn.
- De manera general los porcentajes de remoción para el cadmio van de 8.3 a 11.6 %, de manganeso de 0 a 10.2 % y de zinc de 3.8 a 10.7 % en 19 días

9 RECOMENDACIONES

La implementación de una prueba piloto a las condiciones que requiere el CMF, en el sistema de remediación que se está utilizando en Taxco, Guerrero, es necesario para conocer si su desarrollo y porcentaje de remoción se mantendrán.

Por otro lado, el uso del CMF puede traer otros beneficios, en el tema del aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera, que supone un problema ambiental y económico a nivel mundial.

Uno de los mecanismos que ha utilizado la economía ambiental para tratar de mitigar las emisiones de gases efecto invernadero (GEI) a nivel mundial, es por el mercado de bonos de carbono. Una de las tecnologías disponibles para combatir este problema consiste en la biofijación de CO₂ con microalgas [89].

Las microalgas son adecuadas para la eliminación directa del CO₂ en gases de combustión, porque son los únicos organismos capaces de utilizar altas concentraciones de este gas y de adaptarse a ambientes extremos (temperatura, salinidad, pH, etc.). Por otro lado, el pequeño tamaño de estos seres fotosintéticos y su alta relación superficie/volumen permite una fácil y rápida difusión de nutrientes y CO₂ desde el seno del medio de cultivo hasta la célula, reduciendo, además, el gasto energético de agitación y posibilitando cultivos de alta densidad [90].

Las microalgas y cianobacterias son plantas microscópicas que normalmente crecen suspendidas en agua y realizan los mismos procesos fotosintéticos que las plantas superiores terrestres: la conversión de agua y CO₂, utilizando la energía de la luz solar, en oxígeno y biomasa. Sin embargo, de todos los organismos capaces de fijar o acumular CO₂, microalgas y cianobacterias cobran una importancia especial debido a que presentan ciertas ventajas únicas.

Son los únicos organismos fotosintéticos capaces de utilizar directamente el CO₂ de una corriente de gases de combustión, como puede ser el de centrales térmicas (a base de carbón, fuel o metano), sin necesidad de tratamientos previos, ya que son resistentes a altas concentraciones de CO₂. A diferencia de los cultivos vegetales o

árboles, las microalgas mejoran su productividad con el aumento, hasta cierto límite, de la concentración de CO₂ respecto a la atmosférica. Poseen un potencial de productividad mucho mayor que el de las plantas superiores y otras plantas acuáticas. Para su producción pueden utilizarse ciertos recursos que no son adecuados para la agricultura, como aguas salobres, agua marina y aguas residuales y suelos arcillosos, duros o salinizados, por lo que no compiten con la agricultura respecto a los usos del suelo y el agua [89].

Actualmente existe un renovado interés en la investigación con microalgas debido a los problemas ambientales y económicos que augura el cambio climático y la prevista escasez de petróleo, y es que las microalgas tienen el potencial de fijar grandes cantidades de CO₂ en su biomasa y ésta de ser transformada a biocombustibles.

En México actualmente se cuenta con una plataforma llamada MéxiCO₂ en la cual las empresas podrán comenzar a invertir en los proyectos que se generen para cumplir con los objetivos de disminución de GEI a través de la compensación con el financiamiento en estos proyectos y la emisión de bonos de carbono para aquellos inversores que decidan participar.

La información antes mencionada nos hace resaltar la importancia que el CMF puede tomar si se utiliza, no solo para disminuir la concentración de metales como el Cd, Mn y Zn, sino buscando al mismo tiempo utilizar sus propiedades de fijación de CO₂, y obtener un financiamiento por medio de los bonos de carbono y cubrir los costos que conlleva el tratamiento de remediación del DAM.

10 REFERENCIAS

- [1] J. T. Brock, M. T. Madigan, J. Martinko y J. Parker, *Biology of the microorganisms*, New York: PPH, 2003.
- [2] J. Marcovecchio, V. Moreno y A. Perez, «Metal accumulation in tissues of sharks from the Bahía Blanca Estuary, Argentina.,» *Marine Environmental Research*, vol. 31, pp. 263-274, 1991.
- [3] D. Rodríguez, P. Castillo y C. Aguilar, *Glosario de términos en salud ambiental*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Lima: ECO, 2003.
- [4] A. López, S. Juana y R. Barrientos, *La colección de microalgas dulceacuícolas y marinas de la Península de Yucatán*, Mérida, Yucatán: UADY, 2005, p. 13.
- [5] I. Calderon, M. N. Trujillo, Ramírez y Eustacio, «¿Cianobacterias que comen petróleo?,» *Ciencia y Mar*, vol. 54, pp. 47-52, 2014.
- [6] V. R. S. Gupta, A. S. Kumar, V. Chaudhary y R. Prasanna, «New insights into the biodiversity applications of cyanobacteria (blue-green algae),» *Prospects and challenges*, vol. 2, n° 2, pp. 279-297, 2013.
- [7] Sociedad Nuclear Española, «Sociedad Nuclear Española,» 2010. [En línea]. Available: <https://www.sne.es/es/recursos/diccionario-de-terminos-nucleares/sorcion>. [Último acceso: 18 Diciembre 2018].
- [8] D. Ramos, «: Desarrollo de tratamientos biogeoquímicos emergentes “in situ” para el control del Drenaje Ácido de Mina (DAM) en Taxco, Guerrero,» UNAM. Posgrado en Ciencias de la Tierra, CDMX, 2018.
- [9] J. Wang y C. Chen, «Biosorbents for heavy metals removal and their future,» *Biotechnology Advances*, vol. 27, n° 2, pp. 195-226, 2009.
- [10] T. A. Davis, B. Volesky y A. Mucci, «A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae,» *Water Research*, vol. 37, n° 18, pp. 4311-4330, 2003.
- [11] D. B. Johnson y K. B. Hallberg, «Acid mine drainage remediation options: a review,» *Science of the Total Environment*, vol. 338, pp. 3-14, 2005.
- [12] K. K. Kefeni, T. A. Msagati y B. B. Mamba, «Acid mine drainage: Prevention, treatment options, and resource,» *Journal of Cleaner Production*, vol. 151, pp. 475-493, 2017.

- [13] A. Akcil y S. Koldas, «Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies,» *Journal of Cleaner Production*, vol. 14, pp. 1139-1145, 2006.
- [14] H. Anawar, «Sustainable rehabilitation of mining waste and acid mine drainage using geochemistry, mine type, mineralogy, texture, ore extraction and climate knowledge,» *Journal of Environmental Management*, vol. 158, pp. 111-121, 2015.
- [15] Y. Han, S. Youm, C. Oh, Y. Cho y J. Ahn, «Geochemical and eco-toxicological characteristics of stream water and its sediments affected by acid mine drainage,» *Catena*, 2015.
- [16] V. G. W. & S. T. Savinov, «Cadmium, zinc, copper, arsenic, selenium and mercury in seabirds from the Barents Sea: levels, inter-specific and geographical differences,» *Science of the Total Environment*, vol. 306, nº 1-3, pp. 133-158, 2003.
- [17] T. Akabzaa, T. Armah y B. Baneong-Yakubo, «Prediction of acid mine drainage generation,» *Environmental Geology*, vol. 52, nº 5, p. 957–964, 2006.
- [18] S. Albanese, B. De Vivo, A. Lima, G. Frattasio, B. Kríbek, I. Nyambe y V. Majer, «Prioritising environmental risk at the regional scale by a GIS aided technique: the Zambian Copperbelt Province case study,» *Journal of Chemistry*, vol. 144, pp. 433-442, 2014.
- [19] F. Fu y Q. Wang, «Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review,» *Journal of Environmental Management*, vol. 92, pp. 407-418, 2011.
- [20] T. Motsi, N. Rowson y M. Simmons, «Kinetic studies of the removal of heavy metals from acid mine drainage by natural zeolite,» *International Journal of Mineral Processing*, vol. 101, pp. 42-49, 2011.
- [21] R. W. Gaikwad, R. S. Sapkal y V. S. Sapkal, «Removal of Copper Ions from Acid Mine Drainage,» *Journal Water Resource and Protection*, vol. 2, pp. 984-989, 2010.
- [22] A. Alkudhria, N. Darwish y N. Hilal, «Membrane distillation: A comprehensive review,» *Desalination*, vol. 287, pp. 2-18, 2012.
- [23] B. C. Ricci, C. D. Ferreira, A. O. Aguiar y M. C. Amaral, «Integration of nanofiltration and reverse osmosis for metal separation and sulfuric acid recovery from gold mining effluent,» *Separation and Purification Technology*, vol. 164, pp. 11-21, 2015.

- [24] H. Lukacs y L. Ortolano, «West Virginia has not directed sufficient resources to treat acid mine drainage effectively,» *The Extractive Industries and Society*, vol. 2, pp. 194-197, 2015.
- [25] M. A. Caraballo, T. S. Rötting, M. Francisco, J. Miguel Nieto y Carlos Ayora, «Field multi-step limestone and MgO passive system to treat acid mine drainage with high metal concentrations,» *Applied Geochemistry*, vol. 24, pp. 2301-2311, 2009.
- [26] F. Macías, M. A. Caraballo y J. M. Nieto, «Environmental assessment and management of metal-rich wastes generated in acid mine drainage passive remediation systems,» *Journal of Hazardous Materials*, Vols. %1 de %2229-230, pp. 107-114, 2012.
- [27] R. P. López, J. Cama, J. M. Nieto, C. Ayora y M. W. Saaltink, «Attenuation of pyrite oxidation with a fly ash pre-barrier: Reactive transport,» *Applied Geochemistry* 24, pp. 1712-1723, 2009.
- [28] V. Masindi, «A novel technology for neutralizing acidity and attenuating toxic chemical species from acid mine drainage using cryptocrystalline magnesite tailings,» *Journal of Water Process Engineering*, vol. 10, pp. 66-77, 2016.
- [29] S. Jaina, B.P. Baruah y P. Khare, «Kinetic leaching of high sulphur mine rejects amended with biochar: Buffering implication,» vol. 71, pp. 703-709, 2014.
- [30] A. Jafaripour, N. A. Rowson y G. S. Ghataora, «Utilisation of residue Gas Sludge (BOS sludge) for removal of heavy metals from Acid,» *International Journal of Mineral Processin*, vol. 144, pp. 90-96, 2015.
- [31] R. Choudhary y A. S. Sheoran, «Performance of single substrate in sulphate reducing bioreactor for the treatment of acid mine drainage,» *Minerals Engineering*, vol. 39, pp. 29-35, 2012.
- [32] Z. Mingliang y W. Haixia, «Organic wastes as carbon sources to promote sulfate reducing bacterial activity for biological remediation of acid mine drainage,» *Minerals Engineering*, vol. 69, pp. 81-90, 2014.
- [33] G. Madzivire, P. P. Maleka, V. R. Vadapalli, W. M. Gitari, R. Lindsay y L. F. Petrik, «Fate of the naturally occurring radioactive materials during treatment of acid mine drainage with coal fly ash and aluminium hydroxide,» *Journal of Environmental Management*, vol. 133, pp. 12-17, 2014.

- [34] M. Masukume, M. S. Onyango y J. P. Maree, «Sea shell derived adsorbent and its potential for treating acid mine drainage,» *International Journal of Mineral Processing*, vol. 133, pp. 52-59, 2014.
- [35] Z. Mingliang, «Adsorption study of Pb(II), Cu(II) and Zn(II) from simulated acid mine drainage using dairy manure compost,» *Chemical Engineering Journal*, vol. 172, pp. 361-368, 2011.
- [36] I. Kim, M. Lee y S. Wang, «Heavy metal removal in groundwater originating from acid mine drainage using dead *Bacillus drentensis* sp. immobilized in polysulfone polymer,» *Journal of Environmental Management*, vol. 146, pp. 568-574, 2014.
- [37] I. Demers, M. Mbonimpa, M. Benzaazoua, M. Bouda, S. Awoh, S. Lortie y M. Gagnond, «Use of acid mine drainage treatment sludge by combination with a natural soil as an oxygen barrier cover for mine waste reclamation: Laboratory column tests and intermediate scale field tests,» *Minerals Engineering*, vol. 107, pp. 43-52, 2017.
- [38] B. Dorin y N. J. Bunce, «Acid mine drainage: electrochemical approaches to prevention and remediation of acidity and toxic metals,» *Journal of Applied Electrochemistry*, vol. 45, pp. 1239-1254, 2015.
- [39] A. Rojo, H. K. Hansen y J. Del Campo, «Electrodialytic remediation of copper mine tailings with sinusoidal electric field,» *Journal of Applied Electrochemistry*, vol. 40, n° 6, pp. 1095- 1100, 2010.
- [40] E. Bakatula, E. Cukrowska, I. Weiersbye, L. Mihaly-Cozmuta, A. Peter y H. Tutu, «Biosorption of trace elements from aqueous systems in gold mining sites,» *Journal of Geochemical Exploration*, vol. 144, pp. 492-503, 2014.
- [41] O. Salam, N. Reiad y M. ElShafei, «A study of the removal characteristics of heavy metals from wastewater by low-cost adsorbents,» *Journal of Advance Technology*, vol. 24, pp. 297-303, 2011.
- [42] E. R. Goetz y R. G. Riefler, «Performance of steel slag leach beds in acid mine drainage treatment,» *Chemical Engineering Journal*, vol. 240, pp. 579-588, 2014.
- [43] T. R. Muraleedharan y C. Venkobachar, «Mechanism of Biosorption of Copper (II) by *Ganoderma lucidum*,» *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 35, n° 3, pp. 320-325, 1990.

- [44] M. Torres, J. Goldberg y T. E. Jensen, «Heavy metal uptake by polyphosphate bodies in living and killed cells of *Plectonema boryanum* (cyanophyceae),» *Microbios*, vol. 96, nº 385, pp. 141-147, 1998.
- [45] S. Mehta y J. Gaur, «Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects,» *NCBI*, vol. 25, nº 3, pp. 52-113, 2005.
- [46] E. Sandau, P. Sandau y O. Pulz, «Heavy metal sorption by microalgae,» *Engineering in Life Sciences*, vol. 16, nº 4, pp. 227-235, 1996.
- [47] K. Chong y B. Volesky, «Metal biosorption equilibria in a ternary system,» *NCBI*, vol. 49, nº 6, pp. 629-638, 1996.
- [48] E. Sandau, P. Sandau, O. Pulz y M. Zimmermann, «Heavy metal sorption by marine algae and algal by-products,» *Engineering in Life Sciences*, vol. 16, nº 2-3, pp. 103-119, 1996.
- [49] D. Fenga y C. Aldrich, «Adsorption of heavy metals by biomaterials derived from the marine alga *Ecklonia maxima*,» *Hydrometallurgy*, vol. 73, nº 1-2, pp. 1-10, 2004.
- [50] M. Hashim y K. Chu, «Biosorption of cadmium by brown, green, and red seaweeds,» *Chemical Engineering Journal*, vol. 97, nº 2-3, pp. 249-255, 2004.
- [51] Y. Chaisuksant, «Biosorption of cadmium (II) and copper (II) by pretreated biomass of marine alga *Gracilaria fisheri*,» *Environmental Technology*, vol. 24, nº 12, pp. 1501-1508, 2003.
- [52] P. Yin, Q. Yu, Z. Lin y P. Kaewsarn, «Biosorption and desorption of cadmium(II) by biomass of *Laminaria japonica*,» *Environmental Technology*, vol. 22, nº 5, pp. 509-514, 2001.
- [53] J. Zhou, P. Huang y R. Lin, «Sorption and desorption of Cu and Cd by macroalgae and microalgae,» *Environmental Pollution*, vol. 101, nº 1, pp. 67-75, 1998.
- [54] P. X. Sheng, L. H. Tan, J. P. Chen y Y. P. Ting, «Biosorption Performance of Two Brown Marine Algae for Removal of Chromium and Cadmium,» *Journal of Dispersion Science and Technology*, vol. 25, nº 5, pp. 679-686, 2005.
- [55] E. N. V. M. Carrilho y T. R. Gilbert, «Assessing metal sorption on the marine alga *Pilayella littoralis*,» *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 2, pp. 410-415, 2000.

- [56] M. M. El-Sheekh, W. A. El-Shouny, M. F. H. Osman y E.-G. W.E., «Growth and heavy metals removal affinity of *Nostoc muscorum* and *Anabaena subcylindrica* in sewage and industrial wastewater effluent,» *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 19, nº 2, pp. 357-365, 2005.
- [57] A. J. P. Esteves, E. Valdman y S. G. F. Leite, «Repeated removal of cadmium and zinc from an industrial effluent by waste biomass *Sargassum* sp.,» *Biotechnol Lett*, vol. 22, pp. 499-502, 2000.
- [58] K. Chojnacka, A. Chojnacki y H. Go´recka, «Trace metal removal by *Spirulina* sp. from copper smelter and refinery effluent,» *Hidrometallurgy*, vol. 73, nº 1-2, pp. 147-153, 2004.
- [59] D. Brady, A. Stoll y J. R. Duncan, «Biosorption of heavy metal cations by non-viable yeast biomass,» *Environmental Technology*, vol. 15, nº 5, pp. 429-438, 1994.
- [60] S. W. Bang, D. S. Clark y J. D. Keasling, «Cadmium, lead, and zinc removal by expression of thiosulfate reductase gene from *Salmonella typhimurium* in *Escherichia coli*,» *Biotechnology Letters*, vol. 22, nº 16, pp. 1331-1335, 2000.
- [61] S. R. Subashchandrabose, B. Ramakrishnan, M. Megharaj, K. Venkateswarlu y N. R., «Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential,» *Biotechnology Advances*, vol. 29, pp. 896-907, 2011.
- [62] D. Van, «Remediation Technologies Screening Matriz and Reference Guide,» Technology Innovation Office. EPA, 1997.
- [63] R. C. Burns y R. W. F. Hardy, Nitrogen fixation in bacteria and higher plants, New York: Springer-Verlag Berlin, 1975.
- [64] T. Cáceres, M. Megharaj y R. Naidu, «Toxicity and transformation of fenamiphos and its metabolites by two micro algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorococcum* sp.,» *Science of the Total Environment*, vol. 398, nº 1-3, pp. 53-59, 2008.
- [65] P. Rose, G. Boshoff, R. van Hille, L. Wallace, K. Dunn y J. Duncan, «An integrated algal sulphate reducing high rate ponding process for the treatment of acid mine drainage wastewaters,» *Biodegradation*, vol. 9, nº 3-4, p. 247-257, 1998.
- [66] E. Safonova, I. A. Dmitrieva y K. Kvitkoa, «The interaction of algae with alcanotrophic bacteria in black oil decomposition,» *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 27, nº 1-2, pp. 193-201, 1999.

- [67] R. Muñoz, M. T. Alvarez, A. Muñoz, E. Terrazas, B. Guieysse y B. Mattiasson, «Sequential removal of heavy metals ions and organic pollutants using an algal-bacterial consortium,» *Chemosphere*, vol. 63, n° 6, pp. 903-911, 2006.
- [68] S. Loutseti, D. Danielidis, A. Economou-Amilli, C. Katsaros, R. Santas y P. Santas, «The application of a micro-algal/bacterial biofilter for the detoxification of copper and cadmium metal wastes,» *Bioresource Technology*, vol. 100, n° 7, pp. 2099-2105, 2009.
- [69] Z. d. Cserna y C. Fries, «Hoja Taxco 14 Q-h (7), Geología de los Estados de Guerrero, México y Morelos: México D.F.,» Cartas Geológicas de México series 1: 100,000 , CDMX, 1981.
- [70] F. Romero, M. Armienta y G. González, «Solidphase control on the mobility of potentially toxic elements in an,» *Applied Geochemistry*, vol. 22, n° 1, pp. 109-127, 2007.
- [71] (. M. M. S. A. IMMSA, «Yacimientos minerales metálicos del Distrito Minero de Taxco,» Reporte Interno, Taxco, Guerrero-México, 1973.
- [72] Servicio Geológico Mexicano, «Panorama Minero del Estado de Guerrero,» p. 13, 2016.
- [73] A. Dótor, M. A. Armienta, O. Talavera y J. Ruiz, «Geochemical behavior of Cu and sulfur isotopes in the tropical mining region of Taxco, Guerrero (southern Mexico),» *Chemical Geology*, vol. 471, pp. 1-12, 2017.
- [74] M. Armienta, O. Talavera, G. Villaseñor, E. Espinosa, I. Pérez, O. Cruz, N. Ceniceros y A. Aguayo, «Environmental behaviour of metals from tailings in shallow rivers: Taxco, central Mexico,» *Applied Earth Science*, vol. 113, pp. B76-B82, 2004.
- [75] O. Talavera Mendoza, M. Yta, R. Moreno, A. Dótor, N. Flores Mundo y C. Duarte Gutierrez, «Mineralogy and geochemistry of sulfide-bearing tailings from silver mines in the Taxco, Mexico area to evaluate their potential environmental impact,» *Geofísica Internacional*, vol. 44, n° 1, pp. 49-64, 2005.
- [76] M. Castro De Dios, Caracterización Químico-Mineralógica de los Sedimentos de los Ríos Taxco y Cacalotenango, en la Región Minera de Taxco Gro., como una Guía para Evaluar los Mecanismos de Dispersión de Desechos Mineros, Universidad Autónoma de Guerrero: Bachelor Thesis, 2002, p. 80.
- [77] E. Díaz-Villaseñor, Transferencias de metales entre suelo y plantas de maíz (*Zea mays* L.), sembradas en terrenos impactados por jales mineros en la

región de Taxco, Guerrero, Master Thesis ed., Universidad Autónoma de Guerrero, 2006.

- [78] E. Ruiz-Huerta y M. Armienta-Hernández, «Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros,» *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, vol. 28, nº 2, pp. 103-117, 2012.
- [79] M. Moreno, L. Acosta-Saavedra, D. Meza-Figueroa, E. Vera, M. Cebrian, P. Ostrosky-Wegman y E. Calderon-Aranda, «Biomonitoring of metal in children living in a mine tailings zone in southern Mexico: a pilot study,» *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 213, pp. 252-258, 2010.
- [80] Grupo Mexico, «Informe Anual 2007,» GM, 2007.
- [81] Industrial Minera Mexico, «Trabajos de restauración presas de jales de Taxco de Alarcón, Gro.,» de *XV Taller de Intercambio de experiencias CAMIMEX-SEMARNAT-PROFEPA-CONAGUA*, 2017.
- [82] D. Corrales Pérez, Evaluación de diferentes materiales geológicos para el tratamiento pasivo del drenaje ácido de minas, en Taxco-Guerrero, D.F.: Universidad Autónoma de México, 2015, p. 287.
- [83] SEMARNAT, «NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/,» *Diario Oficial de la Federación*, 02 03 2007.
- [84] SEMARNAT, «NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-001-SEMARNAT 1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas y bienes nacionales,» Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, México, 2003.
- [85] A. Sardi-Saavedra, E. Peña-Salamanca, C. Madera-Parra y V. Cerón-Hernández, «Diversidad de las comunidades de algas asociadas a un sistema algal de alta tasa,» *Latin American Journal of Aquatic Research*, vol. 44, nº 1, pp. 113-120, 2016.
- [86] M. Peinador, «Las cianobacterias como indicadores de contaminación orgánica,» *Revista de Biología Tropical*, vol. 47, nº 3, 1999.
- [87] V. M. M. Salgado, Biodiversidad microbiana en drenaje ácido de minas y suelos contaminados con metales y sus aplicaciones biotecnológicas, España: Universidad de Oviedo, 2017.

- [88] E. Muehe, P. Weigold, I. Adaktylou, B. Planer-Friedrich, U. Kraemer, A. Kappler y S. Behrens, «Rhizosphere Microbial Community Composition Affects Cadmium and Zinc Uptake by the Metal-Hyperaccumulating Plant *Arabidopsis halleri.*,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 81, pp. 2173-2181, 2015.
- [89] L. Martínez García, Eliminación de CO₂ con microalgas, Tesis doctoral ed., España: Universidad de León, 2009.
- [90] Y. Watanabe, N. Ohmura y H. Saiki, «Isolation and determination of cultural characteristics of microalgae which functions under CO₂ enriched atmosphere,» *Energy Conversion and Management*, vol. 33, nº 5-8, pp. 545-552, 1992.
- [91] C. Lorenzen, «Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations,» *Limnology and Oceanography*, vol. 12, p. 343–346, 1967.

11 ANEXO

11.1 DETERMINACIÓN DE CLOROFILA

La clorofila a es el pigmento principal en las plantas, indicador de biomasa de microalgas. Para su determinación se realizó el siguiente procedimiento:

1. Los extractos verdes de muestra, se transfirieron a tubos de centrifuga de 50 mL, cubiertos totalmente con papel aluminio para evitar la degradación de los pigmentos, se agregaron 5 mL de etanol al 98 % que funcionó como extractante, durante 24 horas.
2. Después de terminada la extracción se centrifugó la muestra a 3500 rpm, 20 °C durante 10 minutos.
3. El extracto se colocó en un matraz aforado de 10 mL y se adicionó lo faltante de etanol hasta llegar a aforo.
4. Se midió la absorbancia del extracto en un equipo de espectrofotometría UV-visible de muestra a 750 nm (E_{750o}) y 665 nm (E_{665o}) frente a un blanco de etanol al 98 % (Figura 31).

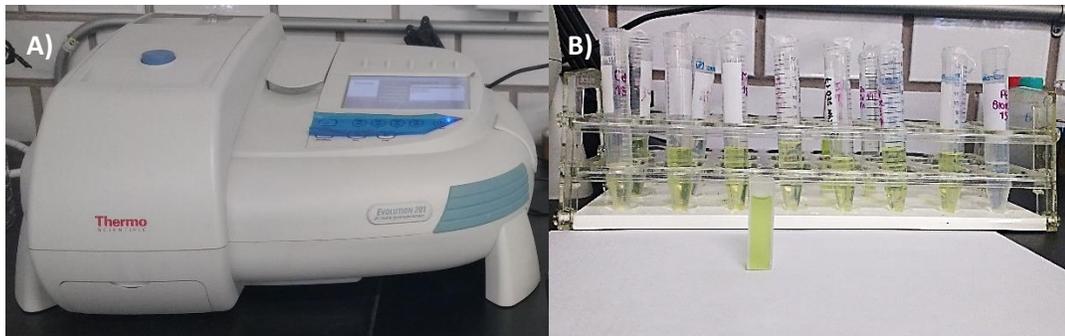


Figura 31. A) Espectrofotómetro UV-Visible Thermo-Scientific, B) Muestras obtenidas de la extracción de clorofila del CMF.

5. Se agregaron 0.2 mL de ácido clorhídrico al 1% v / v y se mezcló para homogeneizar la muestra.
6. Se dejó reposar de 2 a 5 minutos.
7. Se midió nuevamente la absorbancia a 750 nm (E_{750a}) y 665 nm (E_{665a}) contra un 98% de etanol usado como blanco.

8. Se calculó la concentración de clorofila según la ecuación de Lorenzen, 1967 [91]:

$$\text{Clorofila } a = 11.4 * K * ((E_{665o} - E_{750o}) - (E_{665a} - E_{750a})) * V_e / L * V_f \quad 7$$

Dónde:

L = trayectoria de luz de cubeta en [cm].

V_e = Volumen de extracción en [mL].

V_f = Volumen filtrado [L].

R = relación de absorbancia máxima de E_{665o} / E_{665a} en ausencia de feopigmentos
= 1.7

K = R / (R - 1) = 2.43.

Las concentraciones están en unidades [mg·m⁻³].

Se verificó el retraso de la reacción después de la acidificación (absorbancia estable).