

00 582

9



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**Caracterización físicoquímica del desecho minero (*jal*) La Valenciana,  
Guanajuato, previa y posterior a bioensayos diagnósticos enfocados a la  
generación de propuestas para su remediación**

TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. Jéssica Viridiana García Meza

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Facultad de  
**Ciencias  
Químicas**

TUTORA: María del Carmen Durán Domínguez

AÑO: 2003

1



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**PAGINACION  
DISCONTINUA**

**Sitio donde se desarrolló el trabajo**

Laboratorios del Programa de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental, Cepario y Laboratorios de Metalurgia de la Facultad de Química, UNAM. Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Ciencias, UNAM. Laboratorios Centro de Geociencias, Campus Juriquilla, UNAM. Laboratorios del Centro de Investigaciones en Química Inorgánica de Universidad de Guanajuato. Laboratorios del Departamento de Ecología Acuática y Ecotoxicología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Ámsterdam.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## AGRADECIMIENTOS

A con quienes fue posible iniciar, desarrollar, enriquecer y finalizar este trabajo. Gracias a su invaluable colaboración:

Dr. Luis Sosa, del Instituto de Investigaciones en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato

A la Sociedad Cooperativa Minera Santa Fe de Guanajuato por el permiso otorgado para la colecta de muestras

Dra. Lourdes Flores y el M. en C. Y. René Ramos-Arroyo, del Instituto de Geología, UNAM, por su asotería en las técnicas analíticas y por su apoyo en toma de muestras, respectivamente

Dra. Esthela Ramos y la M. en C. Carmen Sandoval, del Centro de Investigaciones en Química Inorgánica (CQI), Universidad de Guanajuato

Ing.-Metalúrgico Ciro Márquez, del Departamento de Ingeniería Metalúrgica, Facultad de Química, UNAM por los análisis de metales

Biol. Luciano Hernández, Q.F.B. Antonieta Silva y Laura Ramírez-Mauricio, del Cepario de la Facultad de Química, UNAM, por su colaboración en la identificación de microorganismos

### Especialmente:

A los miembros del Jurado, por su sensible deseo de mejorar este escrito: Gracias.

Al Prof. Dr. W.H.O. Ernts de la Vrije Universiteit van Amsterdam, Nederland

Al Prof. Dr. Wim Admiraal Del Departamento de Ecología y Ecotoxicología Acuática (AEE), Universiteit van Amsterdam, Nederland

### Muy especialmente:

Al Dr. Alejandro Carrillo, Centro de Geociencias, UNAM

Al Dr. Eberto Novelo, del Laboratorio de Ficología, Facultad de Ciencias, UNAM

A la Dra. Martha E. Sosa, Facultad de Química, UNAM

Por su apoyo, a la directora de la tesis, Ing.-Dra. Carmen Durán de Bazúa

Por las becas y apoyos económicos otorgados: Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Reg.117255) y a la Dirección General de Estudios de Postgrado, a través del Programa de Apoyo a Estudiantes de Postgrado (DGEP-PAEP) y la Coordinación del programa de maestría y Doctorado en Ciencia Químicas, UNAM.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A Lorenzo Manuel

A Guadalupe

A Sergio, Manuel, Enrique, Artemio y Ana

A Ietza, Verónica, Elena y Miguel

## RESUMEN

Durante las etapas de beneficio y extracción de metales presentes en minerales de baja ley se generan desechos mineros (jales), que son depositados en el ambiente, pese a contener metales tóxicos. La remediación de jales puede ser detonada empleando microorganismos tolerantes a metales. Muestras superficiales del jal Valenciana reciente (Guanajuato, México) se emplearon en bioensayos (BioE) con microorganismos, bajo condiciones estables de laboratorio y durante cinco meses. Antes de los BioE, las muestras se analizaron, mineralógica y físicoquímicamente. Se realizó la extracción secuencial de cinco pasos: fracciones intercambiables, carbonatos, óxidos de Fe y Mn, materia orgánica (MO)-sulfuros y residual, en muestras del jal antes y después de los BioE. Las soluciones extraídas y los lixiviados se analizaron por espectrofotometría de plasma-masas. Los resultados indican que el jal es un material heterogéneo, compuesto principalmente por cuarzo y silicatos, con bajos valores de MO, de sulfuros, capacidad de intercambio catiónico y permeabilidad hídrica. Es un sustrato ligeramente alcalino, dada la abundancia de carbonatos. La relación carbonatos-sulfuros (12:1), indican bajo potencial de generar drenajes ácidos. Se detectaron 30 elementos, 18 de los cuales fueron determinados mediante extracciones secuenciales y se verificó que, tales elementos están presentes en las fracciones no residuales, principalmente como óxidos de Fe-Mn. La concentración de Zn, As, Se y Pb totales y las formas intercambiables de Cu y Pb, sobrepasan los límites recomendables para suelos. Los lixiviados poseen muy baja concentración de los elementos. Los procesos químicos que controlan la especiación de los metales puede atribuirse a fenómenos superficiales que derivan en la formación de complejos inorgánicos (carbonatos, óxidos, sulfuros). En presencia de las biopelículas durante los BioE, las concentraciones de Ni, Cu, As, y Pb asociados a carbonatos, así como las de Cr, Ni y Cu en MO-sulfuros incrementaron significativamente, mientras que la lixiviación de Zn y Pb fue significativamente menor en los BioE que en muestras no colonizadas por biopelículas. Por lo anterior, y puesto que la presencia de biopelículas derivó en un incremento de la MO, se sugiere su empleo como el primer paso en la remediación de jales. Las biopelículas estaban conformadas por bacterias (18 especies), cianoprocariontes (10), algas (6), hongos (5) y levaduras (3). La tolerancia de algas y cianoprocariontes a metales parece ser consecuencia de un incremento en la producción de exopolisacáridos, así como por el papel de las biopelículas en la estabilización de metales.

Palabras clave Desechos mineros, Extracciones secuenciales, metales, Biopelículas, Algas tolerantes a metales, Biorremediación

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ABSTRACT

During the extraction of metals from ore deposits, high amounts of mine-tailing or *jales*, are produced, which are deposited in piles, although the presence of toxic elements. Mine tailings remediation could be detoxated using metal tolerant microorganisms, since they may solve the limiting characteristics for the healthy development of plants. The aim of this study was investigate the consequences of the microbial colonization on the chemical speciation of elements. Samples of Valenciana mine tailing surface (Guanajuato, Mexico) were used for long-term bioassays (BA), which consisted in promoting the microorganisms development on tailing samples, under stable laboratory conditions (moist, temperature and light) during five months. Before the BA, the tailing samples were analyzed to know their mineralogy and certain physicochemical characteristics. A five steps sequential extraction (exchangeable, carbonates/specifically adsorbed, Fe-Mn oxides, OM/sulfide, and residual) was performed, before and after the bioassays (BA). Extraction solutions and leachates were analyzed by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). The surface layer of the Valenciana tailing is a heterogeneous material, mainly composed by silicates, and with a low organic matter content, a relatively low cation exchange capacity, and a low vertical permeability. It has slightly alkaline character, due to the abundance of carbonates. The high carbonate-sulfide ratio (12:1) indicates low risk for generation of acid leachates. The chemical analyses indicate the presence of 30 elements. The results of the sequential extractions indicate that elements are present in non-residual fractions, mainly in Fe-Mn oxides fraction. The concentration of Zn, As, Se and Pb totals and Cu and Pb exchangeable are over the recommendable limits for soils, and the fractions available/mobilisables (exchangeable and specifically adsorbed) of these elements, were in high proportion (up to 20%). The results indicate low metals leachates of both, the control and BA. After the BA, Ni, Cu, As, and Pb in carbonates/specifically adsorbed, and Cr, Ni and Cu in OM-sulfides increase significantly. Also, leachates Pb and Zn were significant lower in BA than in non-colonized samples. Chemical processes of elements could be attributed to absorption onto inorganic complexes (carbonates and metal-oxides), while biofilm occurrence seems to enhance the complexation and the immobilization of Cr, Ni, Cu, Zn, As, and Pb. Because the biofilm colonization does not increase the bioavailable forms and, therefore, the leaching of the metals, but improves the OM contents (natural fertilization) and did not provoke pH variation, it was suggested their use during the first steps of the mine tailings remediation. The biofilms were composed by bacteria (18 species), cyanobacteria (10), algae (6), fungi (5) and yeast (3). The metal tolerance of algae seems to be a consequence of the increase in the exopolysaccharides production, as well as the active role of the biofilms on the metal stabilization.

**Keywords** Mine tailings; Sequential extraction; metals; Biofilms; Metal-Tolerant Algae Bioremediation

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## GLOSARIO

AD	Agua Destilada
ADI	Agua desionizada
BioE	Bioensayo
CE	Comunidad Europea
Ce	Conductividad eléctrica
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
CLSM	Microscopio láser confocal de barrido
DOF	Diario Oficial de la Federación
Dsv est	Desviación estándar
DRX	Difracción de rayos X
EAA	Espectrofotómetro de Absorción Atómica
EDTA	Ácido etilendiaminetetracético
F <sub>0</sub>	Fluorescencia mínima en la oscuridad
ICP-MS	Espectrofotómetro de plasma masas acoplados
LGEEPA	Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente
Lix	Lixiviado
MO	Materia orgánica
P.I.B.	Producto Interno Bruto
PICT	Tolerancia inducida en la comunidad por la contaminación
RU	Reino Unido
SPE	Sustancias poliméricas extracelulares
T1, T2...	Tratamiento 1, Tratamiento 2...
Φ <sub>II</sub>	Eficiencia fotosintética
Φ <sub>0</sub>	Campo cuántico máximo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ÍNDICE

	Pág.
Resumen / Abstract	i
Glosario	iii
I Introducción	1
1.1 Problemática	2
1.2 Hipótesis	8
1.3 Objetivos	9
II Antecedentes	10
2.1 Procesos edafogénicos	12
2.2 Biopelículas y suelos	14
2.3 Metales y microorganismos	15
2.3.1 Mecanismos de tolerancia a metales	16
2.3.2 Biotransformación de metales	18
2.4 Polímeros extracelulares y metales	19
2.5 Biopelículas y biomineralización	20
2.6 Desechos mineros y microorganismos	22
III Metodología	24
3.1 Zona de estudio	25
3.2 Colecta del jal	29
3.3 Experimentación	30
3.3.1 Caracterización de muestras de jal antes de los bioensayos	30
3.3.2 Bioensayos	33
3.3.3 Caracterización de muestras de jal después de los bioensayos	38
3.3.4 Ensayos toxicológicos	38
3.8. Análisis de resultados	42
IV Resultados	43
4.1. Caracterización preliminar de las muestras del jal	44
4.2. Caracterización de las muestras de jal después de los bioensayos	50
4.3. Microorganismos desarrollados en los bioensayos	55
4.4. Ensayo toxicológico con biopelículas autotróficas desarrollados en el jal	60

V	Discusiones	70
5.1.	El jal Valenciana reciente	71
5.1.1.	Principales características del jal Valenciana	71
5.1.2.	Ciertas características del jal Valenciana después de los bioensayos	76
5.2.	Microorganismos asociados al jal Valenciana	82
5.2.1.	Colonización de los microorganismos durante los bioensayos	82
5.2.2.	Características del sustrato y de los microorganismos	84
5.3.	Propuesta para la biorremediación del jal Valenciana	89
VI	Conclusiones	93
6.1.	Conclusiones	94
6.2.	Perspectivas	96
6.3.	Consideraciones finales	97
	Referencias	99
	Apéndices	115
A1.1	Cálculos para la reconstrucción mineralógica	116
A1.2	Índices de correlación	120
A2.1	Resultados de pruebas bioquímicas de bacterias y levaduras	124
A2.2	Descripciones de cianoprocariontes, clorofitas y diatomeas	131
A3	Técnicas analíticas	135
A3.1	Caracterización fisicoquímica del jal	135
A3.2	Técnicas microbiológicas	141
A3.3	Técnicas analíticas para ensayo de toxicidad en biofilme autotrófico	149
A3.4	Preparación de agua residual sintética	151
A4	Algunos datos sobre metales	151
A5	Productos generados durante la investigación	154

### ÍNDICE DE FIGURAS

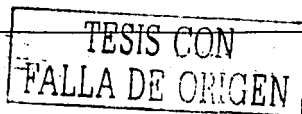
1.	Trabajos de operación minera	3
2.1	Resumen de procesos edafogénicos	13
2.2	Modelo descriptivo del proceso de mineralización de la superficie externa de la vaina celular de <i>Calothrix</i> sp. descrito por Phoenix <i>et al.</i> (2000)	21
3.1	Municipio de Guanajuato	26

3.2	Sistema de presas de jales Valenciana	27
3.3	Presas de jales antigua (a) y reciente (b) de Valenciana	28
3.4	Principales climas del Municipio de Guanajuato	29
3.5	Método de colecta de submuestras superficiales del jal Valenciana reciente (A) y mezcla de las mismas para obtener una muestra única (B)	30
3.6	Celdas de acrílico usadas para bioensayos con muestra superficial del jal Valenciana	34
3.7	Dispositivo empleado para evaluar la velocidad de drenado en muestras del jal con y sin biopelículas	35
4.1	Contenido de materia orgánica en muestras superficiales (S) y profundas (F) del jal, antes y después de bioensayos	47
4.2	Abundancia relativa de metales extraídos secuencialmente de muestras superficiales del jal Valenciana.	50
4.3	Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) de muestras superficiales (S) y profundas (F) del jal, antes y después de bioensayos	51
4.4	Abundancia relativa de metales extraídos secuencialmente de muestras superficiales del jal Valenciana después de los BioE.	53
4.5	Biopelículas desarrolladas en superficie de jal después de 5 semanas de iniciados los bioensayos	55
4.6	Área cubierta (%) por biopelículas sobre superficie de jal en los lotes con crecimientos visibles y durante las 21 semanas de experimentación	56
4.7	Cultivo en Sabouraud-agar con levadura aislada de bioensayos (tratamientos 1 y 2). Especie no identificada (morfotipo denominado "Coralito")	59
4.8	Concentración de carbohidratos en fracción difusa, fracción capsular y en la fracción intracelular después de uno y cinco días de exposición al Cu y al Zn	60
4.9	Concentración de Cu y Zn sorbidos en las fracciones difusa, capsular e intracelulares de carbohidratos en los tiempos 0 (Inicio), 1 día y 5 días de exposición al metal, para diferentes concentraciones de los metales adicionados	62
4.10	Clorofila total ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) al tiempo 0 (inicio o un día antes de la exposición al metal) y después de 1 y 5 días de exposición de las biopelículas al metal, para las diferentes concentraciones aplicadas	63
4.11	Clorofila total ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) de Chlorophyta y Cyanoprokarionte en biopelículas, para las diferentes concentraciones de metal ensayadas	64

4.12	Campo cuántico máximo ( $\phi_0$ ) de Chlorophyta (a) y $\phi_0$ de Cyanoprokariote (b), al inicio y después de cinco días de exposición al metal, para las diferentes concentraciones de metal ensayadas	65
4.13	Fotografías obtenidas con el microscopio laser-confocal de barrido usando tinción Con-A, de control y biopelículas tratadas con Cu 100 $\mu$ M, Zn 1000 $\mu$ M, y Cu 100 $\mu$ M + Zn 100 $\mu$ M	66
4.14	Transporte Relativo de Electrones, medida de la eficiencia fotosintética del fotosistema II ( $\phi_{PSII}$ ) inicial (día 0; barras blancas) y final (día 5; barras negras) de biopelículas expuestas al metal en las concentraciones ensayadas.	67
4.15	Curvas de respuesta de biopelículas en término eficiencia fotosintética $\phi_{PSII}$ a las dosis ensayadas de Cu (10 y 100 $\mu$ M), Zn (100 y 1000 $\mu$ M) y Cu+Zn (10 y 100 $\mu$ M)	68
5.1	Cambios en ciertas características del jal Valenciana después de la colonización de microorganismos durante los bioensayos	77

### ÍNDICE DE TABLAS

2.1	Ejemplo de bacterias quimioautótrofas-oxidantes que participan en ciclos biogeoquímicos de C, H, O, N, S y Fe	15
2.2	Elementos químicos clasificados según los requerimientos nutrimentales de microorganismos	16
4.1	Componentes minoritarios detectados en la muestra superficial del jal Valenciana reciente	44
4.2	Componentes mayoritarios (óxidos) de muestra superficial del jal Valenciana reciente y el suelo control	44
4.3	Reconstrucción mineralógica de muestra superficial del jal Valenciana reciente y el suelo control	45
4.4	Ciertas propiedades físicas y químicas de la muestra superficial del jal Valenciana reciente y el suelo control	46
4.5	Concentración de ciertos metales extraídos secuencialmente de la muestra superficial del jal Valenciana, antes de bioensayos	49
4.6	Tasa de volumen de agua drenada ( $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ) en muestras de jal Valenciana con y sin biopelículas	50



4.7	Concentración de ciertos metales extraídos secuencialmente de la muestra superficial del jal Valenciana después de bioensayos	54
4.8	Concentración de metales solubles extraídos con $\text{HNO}_3$ 1% en lixiviados generados durante bioensayos	54
4.9	Microorganismos fotóautótrofos desarrollados en tratamientos 1 y 2 de bioensayos sobre muestras del jal Valenciana	57
4.10	Bacterias desarrolladas en tratamientos 1 y 2 de bioensayos sobre muestras superficiales del jal Valenciana	58
4.11	Hongos y levaduras desarrollados en tratamientos 1 y 2 de bioensayos con muestras superficiales del jal Valenciana	59
4.12	Concentración de Cu y Zn ( $\mu\text{M}$ ) en medio de cultivo después de 1 y 5 días de exposición a los metales a las diferentes concentraciones probadas durante el ensayo de toxicidad	61

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUCCIÓN**

## PROBLEMÁTICA

El costo estimado del deterioro ambiental anual en México representa 10 puntos porcentuales del P.I.B. por contaminación y merma de la capacidad productiva causada por pérdida de los recursos naturales (SEMARNAP 2000). México produce 40 mil toneladas de residuos industriales al año tales como los generados por la industria minera. Sin embargo, la minería representa una de las industrias vitales en la economía nacional y de las más lucrativas como lo constatan algunos datos: hacia 1970, 28 de 32 entidades federativas del país se dedicaban a esta actividad (Vizcaino 1975); entre 1980-1990, la producción minera representó cerca del 50% de las exportaciones de materiales no combustibles (Williams y Sims 1993; SEDESOL-INE 1994). Hoy, el 5% del P.I.B. proviene de la minería, con 15 entidades sosteniendo la producción<sup>1</sup>, lo que permite que México se mantenga dentro de los principales productores de plata a nivel mundial (INEGI 2000). En esta trama, Guanajuato figura como uno de los centros mineros aurífero-argentíferos más productivos del país desde hace más de 450 años, conservando en la actualidad una notable posición en la explotación de oro (13% de la producción nacional) y ocupando el cuarto puesto en la extracción de plata (7- 8%)<sup>2</sup> (INEGI 2000).

No obstante, las consecuencias de índole ambiental impiden ver con buenos ojos el desarrollo de tal industria, ya que durante todas las fases de la actividad minera (exploración, construcción de la mina, extracción y *beneficio* de minerales, industrialización y comercialización de metales y abandono de instalaciones) se generan contaminantes de aguas (superficiales y subterráneas), suelo, aire, y otras alteraciones al medio (deforestación, erosión, desplome de tierras, abatimiento de recursos hídricos). En particular, durante el *beneficio*<sup>3</sup> se generan residuos sólidos conocidos en el ambiente minero como *jal* o *jale* (del Náhuatl, *xalli*: arenas finas; Santamaría 2000) o *colas*. El *jal* es, pues, la fracción no aprovechable, residual y de desecho procedente del beneficio<sup>4</sup>, que

<sup>1</sup> Baja California, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora y Zacatecas

<sup>2</sup> Los tres principales Estados productores de Ag son Zacatecas (34%), Chihuahua (15%) y Durango (13%); en el caso del Au, Durango (23%), Guanajuato (13%) y Zacatecas (4%) (INEGI 2000)

<sup>3</sup> En la Ley Minera "beneficio" se define como los trabajos de preparación, tratamiento, fundición de primera mano y refinación de productos minerales, en cualquiera de sus fases, con el propósito de recuperar u obtener minerales o sustancias, al igual que de elevar la concentración y pureza de sus contenidos

<sup>4</sup> La Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente -LEGEPA (DOF 1993a) define a los *jales* como residuos generados en las operaciones de separación y concentrado de minerales



es vertido-hidráulicamente en una hondonada extensa conocida como *presa de jales* o *jalero* (Fig. 1)<sup>5</sup>.

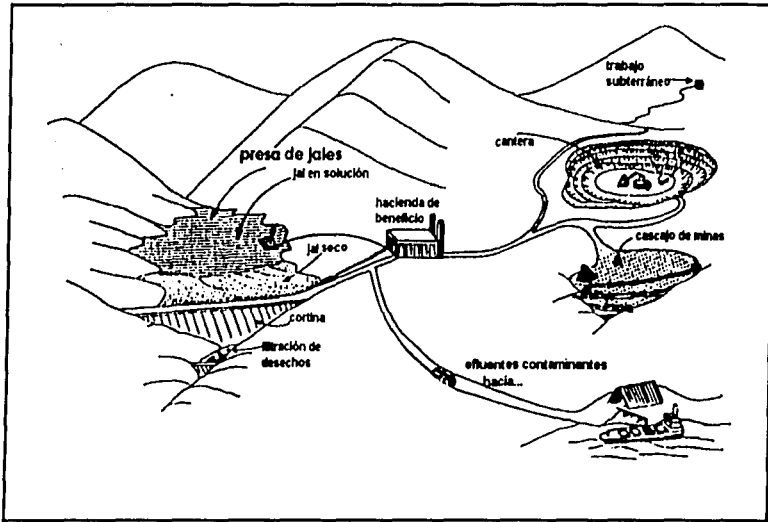


Fig. 1: Trabajos de operación minera (Según Ferguson y Erickson, 1988)

El beneficio mineral implica operaciones de preparación mecánica y procesamiento químico sobre mineral crudo, recién extraído, para sustraer del mismo los metales deseados, como Ag y Au. En Guanajuato y en otras zonas mineras de México, desde 1554 y durante los siglos XVII hasta inicios del siglo XX el beneficio se efectuaba mediante la técnica de *patio* o *amalgamación*, durante la cual se mezclaban los minerales con mercurio, óxidos de plomo, sales de cobre y *tequesquite*<sup>6</sup>, una combinación de cloruro, hidróxido y carbonato de sodio<sup>7</sup>. Hacia 1905, las compañías mineras de la región adoptaron un nuevo sistema de beneficio, por *cianuración*, procedimiento que permite

<sup>5</sup> En 1934 el río Guanajuato sufrió un asolvamiento, afectando el drenaje de la ciudad; este evento estimuló a las autoridades para impedir el vertido de jales en los ríos de la zona. Desde entonces, las empresas mineras comenzaron a usar las *presas de jales* (in Basulto 1984). No obstante, la calidad de las obras es dudosa (si son adecuadas para evitar secuelas al ambiente) (Chappel y Crow 2002). La LGEPA define a las *presas de jales* como las obras de ingeniería para el almacenamiento o disposición final de los jales

<sup>6</sup> Del Náhuatl, *teñi* piedra y *izquitl* brotar

<sup>7</sup> Un interesante y completo análisis del efecto de la técnica del patio en el ambiente a nivel local tanto como global, se encuentra en Camargo (2001)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

separar los metales preciosos disolviendo el mineral con soluciones de cianuro<sup>8</sup>. Muy pronto esta técnica se optimizó y además, se implementó otro proceso (años 30's) la *flotación*, método aún más eficiente, que, al igual que la cianuración, inicia con la molienda y trituración mecánica del mineral, hasta partículas de 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, reduciéndose el área superficial de las partículas sobre las cuales actuarán los diversos agentes químicos, mismos que permiten separar, lavar y hacer flotar hacia la superficie a los minerales de interés. Lo anterior se logra burbujeando y adicionando agentes espumantes (sustancias heteropolares, alcoholes aromáticos, glicóéteres y otros), detergentes, sales de cianuro y colectores como xantatos, ácidos, bases, sales. El proceso de *flotación* inicia cuando entran en contacto las partículas trituradas (*cabezas*) y los reactivos químicos; éstos las rodean selectivamente, haciéndolas hidrofóbicas; al bombear aire, las partículas del mineral suben a superficie, separándose del mineral estéril, ganga o *cola*, que tiende a caer al fondo. Los minerales concentrados, conteniendo los sulfuros de metales de valor, son recuperados de la superficie y el remanente (más del 90% del mineral) es bombeado hacia la presa de jales en forma de una pulpa con alto contenido de sólidos. Así, mientras en la cianuración los minerales de baja ley son disueltos, durante la flotación los minerales son concentrados.

Entonces, los jales son desechos heterogéneos, conformados por finas partículas minerales, que incluyen restos minerales, cantidades variables de metales originalmente presentes en el material procesado y restos de los reactivos químicos empleados durante el beneficio, tales como cianuros, en el caso de la cianuración, o espumantes, colectores u otros, en el caso de la flotación.

La creciente demanda de metales y minerales en las sociedades industriales, se ha traducido en una sobre explotación de yacimientos, algunos con minerales de baja ley<sup>9</sup>. Ésto, su vez, ha implicado la puesta en práctica de técnicas de beneficio aún más efectivas, con el concomitante incremento en la producción de colas. Ciertamente, en la actualidad se desecha más del 90% del material procesado (Cervantes y Aguilera 1992; Allan 1995). En el Distrito Minero de Guanajuato, por ejemplo, se estiman 150 millones de

<sup>8</sup> Ciertas bacterias, como *Chromobacterium violaceum*, generan cianatos, el reactivo empleado por las compañías mineras para extraer Au. No obstante, la actividad fotosintética de cianoprocariontes es suficiente para precipitar el Au de soluciones: en presencia de oxígeno y carbón en elevadas concentraciones, el Au floccula –sale de solución-, por lo que cualquier colonia de bacterias fotosintéticas puede participar en este fenómeno, pues producen compuestos ricos en carbón y altas concentraciones de oxígeno, quedando el Au depositado a lo largo de bancos y lechos de antiguas riveras, hoy secas (Margulis y Sagan 1986)

<sup>9</sup> La "ley" indica la cantidad del metal deseable en el mineral. Así por ejemplo, se estima que en los yacimientos de Guanajuato se posee menos del 1% de Au y Ag

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

toneladas de jales dispersos en un área de aproximadamente 100 km<sup>2</sup> en torno a la ciudad de Guanajuato (Carrillo-Chávez *et al.* 2003a; Carrillo-Chávez *et al.* 2003b)<sup>10</sup>.

En virtud de su procedencia, origen y composición, Ortiz-Monasterio *et al.* (1987) incluyen a los jales en la categoría de "Desechos Industriales Peligrosos" y otros autores consideran a los jales como "agentes contaminantes peligrosos" (Vizcalno 1975; Bradshaw y Chadwick 1980; Kelly y Spottiswood 1990; Allan 1995; Lan *et al.* 1998), dada la presencia de metales que son depositados en el ambiente sin ninguna consideración de sus efectos nocivos. En particular, la contaminación de sustratos sólidos por metales parece ser virtualmente permanente; así, Babich y Stotzky (1985) comentan que, aún después de 30 años de que la actividad minera cesó en ciertas regiones del Mundo, se continúan detectando elevadas concentraciones de metales en los sedimentos de desecho o en cuerpos de agua cercanos a los mismos. Por su parte, Davranche *et al.* (2003) resumen los efectos negativos de los desechos ricos en metales en términos de: cambios en los sistemas hidrogeoquímicos, deterioro y contaminación de suelos, contaminación de cuerpos de agua superficiales y subterráneas y varios impactos de salud pública.

El riesgo ambiental de los jales ya ha sido considerado en la legislación mexicana en materia ambiental y por el propio sector minero. El Reglamento a la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA) en materia de Residuos Peligrosos, incluye en la norma ecológica NOM-053-ECOL-1993 a los jales mineros dentro de la categoría de "Residuos Peligrosos por su toxicidad al ambiente y dada la concentración de ciertos metales pesados" (DOF 1993b), por lo que *el beneficio de minerales y la disposición final de los residuos en presas de jales, son actividades y obras que requieren autorización* (DOF 2000), así como cumplir con criterios de construcción y operación *para garantizar la estabilidad de las presas de jales, evitar la contaminación de mantos freáticos y se proteja a la población de tolveneras* (SEDESOL-INE 1994). Sin embargo, pocos autores destacan *el daño y la destrucción de suelos provocados por la minería*, así como la inexistencia de normas o leyes que regulen y den carácter de obligatoriedad a la conservación y restauración de la capa edáfica (Bradshaw 1997; García-Meza 1999). Por último, las presas de jales son zonas que deben considerarse

<sup>10</sup> En Sudáfrica, la extracción de 800 toneladas de Au, por ejemplo, han generado más de 8 000 hectáreas de desechos (Bradshaw y Chadwick 1980)



como "parches" o "islas" de residuos tóxicos que rompen la continuidad y, por lo tanto, la integridad del ecosistema en el que se asientan.

Una descripción dual, los jales no se consideran solo como contaminantes peligrosos, sino también como recursos potencialmente útiles. Así, resultados de investigaciones desarrolladas en el Centro de Investigaciones de Química Inorgánica y en la Facultad de Química de la Universidad de Guanajuato, sugieren la posibilidad de recuperar de los jales óxidos de silicio, minerales no metálicos, tales como calcita y feldespatos, y metales preciosos (*in* Cervantes y Aguilera 1992; Cervantes *et al.* 1993)<sup>11</sup>. Cabe destacar que estas investigaciones representan ahora un importante antecedente de métodos de análisis químicos específicos para jales, así como de métodos de tratamiento para la recuperación (Cervantes y Aguilera 1992).

Por su parte, como desechos peligrosos, es claro que se requieren investigaciones encaminadas a la generación de propuestas para atender los desechos mineros, cuyos objetivos sean de largo alcance. Es decir, para proponer la biorremediación de las presas de jales, así también la biorrestauración del ambiente en el que se establecieron. En medios alterados por efecto de contaminantes, la remediación persigue minimizar sus efectos, evitar que los agentes tóxicos escapen, proveer de agentes que sirvan de centinela para prevenir la exportación de materiales tóxicos a ecosistemas aledaños y estimular la biotransformación de sustancias peligrosas, entre otros (Cairns 1991; Atkinson y Cairns 1994). Por su parte, la restauración ambiental implica recrear la estructura y función de un ecosistema dañado y alterado con el propósito de restablecer los procesos naturales de sucesión<sup>12</sup>, sin que ello sea sinónimo de retorno a las condiciones previas al disturbio; por lo que todo esfuerzo de restauración es un ejercicio de aproximación<sup>13</sup>.

<sup>11</sup> No obstante, de las diversas técnicas propuestas para su aprovechamiento, no se ha logrado implementar aquella que sea costeable

<sup>12</sup> Sucesión ecológica es el conjunto de cambios progresivos, a través del tiempo, en la comunidad de un ecosistema; dándose la sustitución de un tipo de comunidad por otra. La sucesión primaria tiene lugar en sitios carentes de vida o donde ésta ha sido completamente suprimida (lavas volcánicas, isla recién emergidas, dunas). En la sucesión secundaria, la vegetación de una zona ha sido eliminada de manera total o parcial, pero se conservan un suelo desarrollado y un número conveniente de semillas, esporas o restos vegetales que recolonizan la zona después del disturbio (talas, incendios, vientos). En ecología, la sucesión claramente indica una respuesta general a un disturbio independientemente de si el proceso es gradual o no (McCook 1994)

<sup>13</sup> Pese a no ser perfecta, la restauración busca restablecer las condiciones naturales, reconociendo el carácter dinámico en espacio y tiempo del ambiente; a diferencia de los objetivos de la restauración, la *rehabilitación* y la *recuperación* indican el reemplazo de cierto(s) atributo(s) original(es) por otro, generalmente de interés humano (Cairns 1991)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La remediación de ambientes donde se han establecido presas de jales frecuentemente han sido visualizadas como tareas de reforestación con un número limitado de especies (sólo tolerantes). Tal práctica no sólo compromete la diversidad vegetal sino que, además, es costosa por la condición necesaria de fertilizar el sustrato, limitada en sus alcances ya que no se da una biotransformación sino sólo acumulación de los tóxicos, que, al ser consumidos por herbívoros, hace que se biomagnifique su efecto<sup>14</sup> e, incluso, inoperante por la lixiviación de nutrientes adicionados. De hecho, Shu y Bradshaw (1995) recomiendan que las plantas *no deben estar en contacto con los desechos tóxicos a fin de evitar que asimilen metales*.

En el presente trabajo se asume como una responsabilidad que la remediación de jales implica atender desechos con diversas sustancias tóxicas como metales, cianuros y reactivos químicos diversos y zonas alteradas de manera drástica e inexorable por la completa desaparición del suelo. Por lo tanto, el trabajo debe enfocarse a la estabilidad de los agentes contaminantes o biorremediación y a la regeneración del suelo o biorrestauración o, si el suelo ya no existe, al establecimiento de una capa edáfica. Ambos intentos pueden ser atendidos simultáneamente con el empleo de microorganismos capaces de tolerar las características del medio en cuestión, propiciar la biotransformación de metales a formas químicas menos tóxicas, con elevados ritmos de crecimiento poblacional y que jueguen un papel determinante en la estabilización del sustrato y la formación de suelos. Dichos microorganismos colaboran en procesos biogeoquímicos en los que las plantas no participan o sólo en el perímetro que determinan sus raíces, en la rizosfera, sector donde se realiza una mayor transferencia de micronutrientes. Además, mientras las plantas son receptores pasivos de metales (Kabata-Pendias y Pendias 1992), pues tienden a acumularlos y transferirlos a otros organismos (Chaney *et al.* 2000; *in* Rai *et al.* 2002), los microorganismos son capaces de biotransformarlos y propiciar su remineralización, evitando la biomagnificación de sus efectos tóxicos vía cadena alimenticia.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<sup>14</sup> La remediación de jales mediante reforestación requiere de un pretratamiento del depósito, como fertilizar, que es tremendamente costoso. El establecimiento de plantas suele ser difícil ante la elevada salinidad, la presencia de tóxicos y la deficiencia de nutrientes (Ernst 1988; Vangronsveld *et al.* 1996). El uso de plantas que acumulan metales, puede ser letal para las especies herbívoras y provocar una biomagnificación del efecto tóxico vía cadena alimenticia (Lan *et al.* 1998; Carchwell *et al.* 2002)

## HIPÓTESIS

Microorganismos tolerantes a las características del desecho minero o jal Valenciana son capaces de desarrollarse bajo condiciones controladas sobre la superficie de muestras del jal, propiciando cambios en ciertas características físicas o químicas del jal.

## ESTRATEGIA DE TRABAJO PARA PROBAR LA HIPÓTESIS

Un proyecto de biorremediación, cuya meta sea la restauración ambiental, debe iniciar con un análisis diagnóstico del ambiente para evaluar su capacidad de sostener comunidades biológicas (Bradshaw y Chadwick 1980). En el caso específico de los jales, es indispensable conocer las características del sustrato; la caracterización debe incluir algunas propiedades físicas y químicas del material con la finalidad de originar información que ayude a decidir la conducción que deberá darse a los ensayos de remediación y que sirvan para valorar el estado inicial del jal ante su posible biotransformación. Para lograr esto, es indiscutible la necesidad de inducir el desarrollo de la microbiota sobre muestras de jales, estudiar su dinámica y evaluar los factores que promueven e inhiben su desarrollo y las alteraciones que la biocenosis generará. En efecto, ya que los seres vivos poseen la capacidad de alterar o modificar el ambiente en que se desarrollan, se debe analizar el estado en el que se encontrará el jal una vez desarrollada la microbiota, lo que permitirá evaluar el impacto que la presencia de ésta tendrá sobre las características del sustrato. El análisis de las modificaciones antes y después de los bioensayos se justifica dado su valor predictivo, y como antecedente para formular propuestas integrales de remediación de zonas jaleras.

Para estimular el desarrollo de microorganismos en jales, se puede partir de diferentes enfoques. Dadas experiencias previas (García-Meza 1999), en el presente trabajo, se presupone que los microorganismos están presentes en los jales en formas potenciales de latencia o resistencia, capaces de manifestarse cuando las condiciones del medio son las apropiadas; dichas condiciones pueden ser resultado de la manipulación experimental, como son la adición de nutrientes y la dotación periódica de agua. Un ejemplo de este tipo de manejo *in vitro*, es el estudio de cianoprocariontes y microalgas de suelo y aire, ficoflora que generalmente debe inducirse con la utilización de medios de cultivo (Novelo 1985).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivos generales***

- Identificar los efectos del desarrollo de microorganismos como bacterias y microalgas en ciertas características físicas y químicas de muestras del jal minero reciente de la Valenciana, Guanajuato
- Evaluar el papel que juegan los microorganismos en la estabilización de los elementos tóxicos y en la adición de materia orgánica, bajo diferentes condiciones experimentales o bioensayos
- Explicar la presencia de microorganismos en desechos mineros con relación a los mecanismos de tolerancia a metales
- Generar información y elementos de discusión para la remediación de zonas con presencia de jales

### ***Objetivos particulares:***

- Caracterizar física y químicamente el jal antes y después de los bioensayos
- Inducir el desarrollo de microalgas y bacterias en muestras de jal en los bioensayos
- Identificar bacterias y microalgas desarrollados en bioensayos
- Evaluar los cambios generados en las muestras de jal por la microbiota en bioensayos
- Describir las respuestas a Cu y Zn de especies algales aisladas del jal

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## **CAPÍTULO II**

### **ANTECEDENTES**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

*Es justo recordar que el conocimiento  
es un proceso dinámico, en construcción constante,  
cada fase del mismo es meta y punto de partida*

*J. González-Giz.*



Bacterias y microalgas promueven activamente la transformación y el flujo de materia y energía, modificando al ambiente en el que se desarrollan, hecho que inició desde el Archeano, hace 3,000 millones de años, con bacterias interactuando con minerales de las rocas más superficiales (Margulis y Sagan 1986). De tal magnitud son los efectos transformadores del microcosmos que la fotosíntesis oxigénica de cianoprocariontes modificaron la atmósfera primitiva de reductora a oxidante hace dos mil millones de años, en el Proterozoico temprano<sup>1</sup>. De manera paralela, los microorganismos responden relativamente rápido a perturbaciones ambientales, lo cual se explica considerando los acelerados ritmos de crecimiento poblacional<sup>2</sup> que posibilitan la generación de individuos con mutaciones favorables para subsistir ante los cambios del medio. Finalmente, tales microorganismos forman consorcios heterogéneos e intrincados, cooperando entre sí con enzimas y rutas metabólicas complementarias, generando alimento y energía para otros grupos biológicos, manera por la cual propician el reciclaje de elementos químicos, siendo, los microorganismos, el principal actor del ingrediente *bios* en los ciclos biogeoquímicos, evento que se magnifica al recordar su antigüedad, predominio y ubicuidad. Al reconocer tales hechos, se admite el potencial transformador y la capacidad de alterar de los microorganismos, en su devenir espacio temporal.

Al sugerir un ensayo para la biorremediación del jal Valenciana empleando bacterias y microalgas, se partió de consideraciones como las expuestas previamente. De manera adicional, se aceptaron ciertos supuestos, basados en experiencias previas y extraídas de la literatura, relativas al papel de estos microorganismos en la formación y consolidación de suelos o edafogénesis, su desarrollo e influencia en el ambiente edáfico, su reconocida tolerancia a metales en concentraciones superiores a los niveles traza y su expresión en cultivos con jales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<sup>1</sup> Hecho que representa el primer gran holocausto en la otrora biosfera, dada la elevada reactividad del oxígeno gaseoso

<sup>2</sup> Las bacterias pueden dividirse cada 20 minutos; tras cuatro días de crecimiento ilimitado se generarían  $2^{288}$  bacterias: número mayor al estimado por los físicos en cuanto al número de protones existentes en el Universo (<sup>2266</sup> Margulis y Sagan 1986)

## 2.1. PROCESOS EDAFOGÉNICOS

Se define *suelo* al cuerpo natural, material, dinámico en espacio y tiempo, producto de fuerzas destructivas y constructivas, que forma la capa superficial de la corteza terrestre, constituido por un esqueleto mineral básico, compuestos inorgánicos como sales y minerales<sup>3</sup>, compuestos orgánicos, aire, agua y seres vivos<sup>4</sup>, en proporciones que varían. Así, el origen y el desarrollo de los suelos es producto de interacciones entre litosfera, atmósfera, hidrosfera y biosfera, en una vasta orquestación de procesos biogeoquímicos interrelacionados (Fig. 2.1): los minerales constitutivos de rocas son intemperizados<sup>5</sup> física, química y bioquímicamente, hasta su simplificación y la generación de diversos compuestos, resultando, paulatinamente, en la génesis del suelo, proceso constructivo de naturaleza química y bioquímica, que propicia la consolidación de residuos, en mayor o menor grado. Ambos procesos, intemperización y consolidación de los residuos, están fuertemente determinadas por la naturaleza del material, el clima (humedad, temperatura, gases atmosféricos) y la presencia de seres vivos (Fig. 2.1)<sup>6</sup>.

La intemperización microbiológica por acidificación<sup>7</sup> y disolución, síntesis de complejos organometálicos<sup>8</sup> y coloides minerales y óxido-reducción, es un conjunto de procesos bioquímicos que alteran, a la larga, la configuración cristalina, las propiedades de carga,

<sup>3</sup> Por su origen, los mienaríes se agrupan en *minerales primarios*, parte del material parental que representan las fracciones más gruesas del mismo (limos, 0.02-0.002 mm y arenas, 2-0.02 mm) y *minerales secundarios* o por *minerales de arcilla* (2  $\mu$ m), formados *in situ*, no presentes en el material original, y que ejercen gran influencia en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (agregación de partículas, capacidad de intercambio iónico, fertilidad, retención de agua). La transformación físicoquímica de minerales primarios resulta en minerales secundarios. Por su composición, los minerales se dividen en *silicatos* y *no silicatos*, que corresponden a óxidos, hidróxidos, sulfatos, cloruros, carbonatos y fosfatos (Fitzpatrick 1980; Borremiszka 1982)

<sup>4</sup> Que varían desde microorganismos hasta plantas y diferentes grupos de animales, como artrópodos y vertebrados, incluido el ser humano. Se estima que un gramo de suelo agrícola (peso seco) contiene varios millones de bacterias, cientos de miles de hongos protistas y decenas de miles de protozoos y microalgas (Campbell 1977)

<sup>5</sup> Intemperización: Proceso natural e inevitable, de agotamiento y transformación de las rocas y minerales constituyentes en residuos no consolidados; hay dos tipos: Físicos y químicos. La intemperización física es un proceso mecánico que desintegra la roca maciza; los principales agentes de este tipo de intemperización son agua (lluvia, corrientes), temperatura (contracción y dilatación diferenciales en las capas superficiales de la roca), viento y presión. La intemperización química produce cambios en la naturaleza y composición de roca y minerales y sólo es posible por la acción hidralante y solvente del agua (los minerales hidratados son más blandos y las soluciones acuosas incrementan su acción intemperizadora por la presencia de bióxido de carbono, ácidos orgánicos e inorgánicos o sales). Otras reacciones de intemperización química son oxidación, reducción y carbonatación (Tamhava *et al.* 1978)

<sup>6</sup> Tamhava *et al.* (1978) y Fitzpatrick (1980) señalan cinco factores que intervienen en la génesis del suelo: Material parental, clima, seres vivos, topografía y, como cualquier proceso, tiempo. Los cuatro primeros son los más tangibles, que dependen entre sí en mayor o menor grado; por ejemplo: El tipo de vegetación se da en función del clima; la vegetación determina, a su vez, el grado de humedad sobre el suelo y la humedad propiciará reacciones de descomposición, hidratación o solubilización del material orgánico e inorgánico presentes

<sup>7</sup> Generándose ácidos orgánicos e inorgánicos; por ejemplo, ácidos sulfúrico, por oxidación de sulfuros, y nítrico, durante la nitrificación; la acidez propicia descomposición de minerales

<sup>8</sup> Un complejo organometálico consiste en un ión metálico central unido mediante enlaces coordinados a dos o más iones, los ligantes, de naturaleza orgánica (principalmente ácidos fúlvicos y húmicos), reemplazando moléculas de agua. La unión se realiza a través de uno o más átomos de carbono de un radical orgánico

la reactividad en superficie y la composición química de los minerales, particularmente de los arcillosos. A su vez, los minerales poseen actividad catalítica en las reacciones bioquímicas, dándose una transformación abiótica de compuestos orgánicos, como en ciertas reacciones de humificación<sup>9</sup> (Huang 1993). Además, al descomponer los restos orgánicos se liberan varios principios biogénicos de combinaciones orgánicas como N, S y P, con lo que se controla el abastecimiento de nutrimentos en el medio (Tamhove *et al.* 1978; Fitzpatrick 1980). De los procesos de biosíntesis de suelo resultan agregados estables que posibilitan la estructuración del suelo, mitigando la erosión de las partículas constitutivas. Dichos agregados se forman vía secreción de compuestos mucilaginosos o durante la descomposición de la MO (Durrell y Shields 1961; Tamhove *et al.* 1978; Fitzpatrick 1980). Así, las uniones entre MO, cationes polivalentes como Al, Fe y Ca y minerales arcillosos, generan complejos que actúan como agentes cementantes (Huang 1993). Otros cementantes son inorgánicos, como carbonatos, silicatos y sulfatos (Tamhove *et al.* 1978).

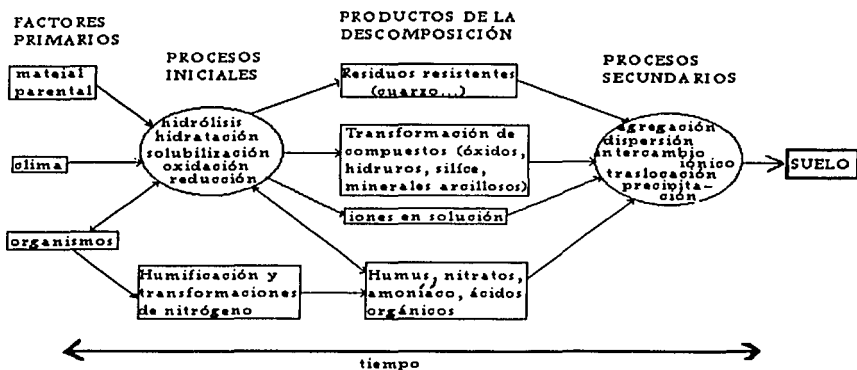


Fig 2.1. Resumen de procesos edafogénicos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<sup>9</sup> Constitución del humus superficial, por mecanismos tales como la polimerización oxidativa de polifenoles

## 2.2. BIOPELÍCULAS Y SUELOS

Las biopelículas, flóculos o parches consisten en un conjunto de microorganismos procariontes y eucariontes embebidos en una matriz extracelular tridimensional, tipo gel<sup>10</sup>, altamente hidratada, conformada por *sustancias poliméricas extracelulares* (SPE), cationes, partículas inorgánicas y biogénicas, coloides y compuestos disueltos: La matriz extracelular actúa como un microambiente funcional, independiente y relativamente estable, donde los microorganismos embebidos se mantienen más o menos inmóviles (Wingender *et al.* 1999; Percival *et al.* 2000).

Las biopelículas de suelos y rocas han sido objeto de numerosas investigaciones. Particularmente interesantes son los de zonas desérticas o semiáridas y que tienden a formarse durante los períodos de estiaje: cianoprocariontes y algas se asientan en el sustrato gracias al mucílago que agrupa y consolida partículas del suelo, formándose una capa mono o multiespecífica<sup>11</sup>, que posee la capacidad de absorber grandes cantidades de agua, resultando en cierta estabilidad hídrica que protege a los microorganismos de la desecación. Además, las costras retardan la erosión, aminoran temperaturas extremas del suelo, contribuyen en la fijación de nitrógeno, proporcionan oxígeno y son una fuente importante de MO y minerales (Booth 1941; Durrell y Shields 1961; Lund 1962; Cameron y Blank 1966; Campbell 1977; Novelo 1978).

El efecto desintegrador y los proceso de consolidación de partículas por las biopelículas líticas y edáficas, son importantes transformaciones edafogénicas. Así, Trueb (1888) enfatiza el papel de cianoprocariontes, pioneros tras la erupción volcánica en Krakatoa, explosión que dejó sin vegetación y suelo a la Isla. Campbell (1977) también destaca el papel de cianoprocariontes y algas verdes en la colonización de rocas y cenizas volcánicas como evento previo a la sucesión vegetal. Finalmente, en tierras erosionadas por estar sometidas a tala intensa, bacterias y algas costrosas son los primeros organismos en recolonizar el ambiente (Davey 1988). Es decir, en zonas de erosión severa, algunas plantas nativas son incapaces de reestablecerse sino hasta que el medio posea las características propicias; las bacterias y las algas asociadas inician la colonización, estructurando y fertilizando el sustrato<sup>12</sup> (Booth 1941; Saint-Clair *et al.* 1964; Campbell 1977; Novelo 1978).

<sup>10</sup> Sistema o entramado polimérico, tridimensional con un gran exceso de solvente, como agua (gel acuoso)

<sup>11</sup> Una o más especies

<sup>12</sup> Cabe añadir que la formación de costras algales fue comprobada experimentalmente por Bailey *et al.* (1973), quienes cuantificaron el porcentaje de partículas de suelo agrupadas en las costras

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las biopelículas autótrofas representan un sustrato ideal para el desarrollo de diversos organismos, como bacterias, mixomicetos, actinomicetos, protozoarios, nemátodos y musgos, con los que cianoprocariontes y algas establecen importantes relaciones y asociaciones ecológicas. Las bacterias toman parte vital en el proceso, ya que prácticamente todas las especies participan en los ciclos de la mayor parte de los elementos químicos (Tabla 2.1), propiciando también la generación y fertilización de suelos.

Tabla 2.1. Ejemplo de bacterias quimioautótrofas oxidantes que participan en ciclos biogeoquímicos de C, H, O, N, S y Fe (Modificado de Stanier *et al.* 1979)

Grupo (metabolismo)	Sustrato	Producto	Ejemplos
Bacterias fijadoras de nitrógeno	carbohidratos alcoholes, ácidos	CO <sub>2</sub>	<i>Rhizobium</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Azomonas</i> <i>Denxia</i>
Bacterias nitrificantes nitrito-oxidantes amonio-oxidantes	NO <sup>-2</sup> NH <sub>3</sub>	NO <sup>+3</sup> NO <sup>-2</sup>	<i>Nitrobacter</i> <i>Nitrosomonas</i>
Bacteria sulfurosas	H <sub>2</sub> S, S, S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Del grupo <i>Beggiatoa</i> ; <i>Thiobacillus</i>
Ferrobacterias	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	<i>Sphaerotilus</i> , <i>Gallionella</i>
Bacterias del hidrógeno	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>Hydrogenomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Nocardia</i>

### 2.3. METALES Y MICROORGANISMOS

Durante su desarrollo, los seres vivos precisan de elementos esenciales en cantidades muy pequeñas, del orden de unas cuantas partes por millón, que se designan como elementos traza, elementos menores, micronutrientes u oligoelementos (Tabla 2.2). Algunos de los elementos son constituyentes de biomoléculas, como Mg en clorofila, Ni en ureasa<sup>13</sup>, Cu en plastocianinas<sup>14</sup>, Mn en la superóxidodismutasa<sup>15</sup>, Zn en la RNAPolimerasa (Hughes y Poole 1989; Fishbein 1995). Una característica común de los microelementos es que, si bien su deficiencia limita severamente el crecimiento y la reproducción de los seres vivos, en cantidades superiores a los niveles traza, son tóxicos. Cabe decir que ciertos elementos son tóxicos, como Ag, Cd, Hg y Pb, independientemente de su concentración, pues carecen de función biológica relevante y tienden a competir o reemplazar a los elementos esenciales.

<sup>13</sup> Ureasa: Enzima que cataliza la hidrólisis de urea en amonio y CO<sub>2</sub>

<sup>14</sup> Plastocianinas: Proteínas involucradas en el flujo de electrones durante la fotosíntesis, intermedias entre los fotosistemas II y I

<sup>15</sup> Metaloproteína que cataliza la reducción del radical O<sup>2-</sup>; presente en bacterias, cloroplastos y mitocondrias

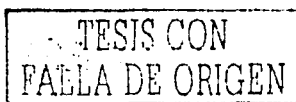


Tabla 2.2. Elementos químicos clasificados según los requerimientos nutrimentales de microorganismos (In: Hughes y Poole 1989)

Li	Be																				B	C	N	O	F
Na	Mg																				Al	Si	P	S	Cl
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br									
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I									
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At									
Fr	Ra																								

Elementos esenciales o macronutrientes	Micronutrientes	Elementos tóxicos o no esenciales
--	-----------------	-----------------------------------

Cuando se hallan en niveles tóxicos, los metales pueden causar muerte celular, al igual que los elementos tóxicos. La toxicidad se manifiesta en diversos eventos, tales como la facultad de reemplazar metales nativos (p.e.: el  $Al^{3+}$  desplaza al  $Mg^{2+}$ , desactivando enzimas dependientes del Mg), modifican la conformación y las funciones de proteínas y ácidos nucleicos (la unión del Cd al DNA modifica sustancialmente su estructura; el Cu puede reaccionar con enzimas ricas en -SH, rompiendo los sitios activos), entorpecen reacciones metabólicas medulares (p.e.: la fosforilación oxidativa) o trastornan la permeabilidad de membranas, como la Ag que inhibe el ingreso de Zn o el Cu que interfiere en la permeabilidad de membrana celular (Stauber y Florence 1987; Hughes y Poole 1989; Fishbein 1995). La toxicidad de metales depende de factores diversos, entre los que destacan la sensibilidad, el estado fisiológico y los mecanismos desintoxicantes de los microorganismos, la composición química y biológica del medio, la presencia de otros iones, especialmente cationes, y el estado de oxidación de los metales como iones libres o en combinación química como ácidos o bases de Lewis<sup>18</sup> (Stokes 1983; Morgan y Stumm 1995).

### 2.3.1. MECANISMOS DE TOLERANCIA A METALES

#### **Mecanismos extracelulares**

Un ejemplo notable de la desintoxicación extracelular es en bacterias sulfurosas que, al liberar  $H_2S$  favorecen la formación de sulfuros metálicos insolubles, no tóxicos para sí o para otros microorganismos (Dvorak *et al.* 1992; Olson y Panigrahi 1995). O bien, la coprecipitación de diversos Cd, Cr, Ni, Pb y Zn con óxidos de Fe que propicia la bacteria

<sup>18</sup> En la célula, los ácidos de Lewis están representados por los metales y las bases de Lewis por grupos donadores de S, O y N

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

*Clostridium* sp. (Francis y Dodge 1990) o diversos tipos de cianoprocariontes y algas (Podda *et al.* 2000. Ver 2.4). Asimismo, los cationes metálicos pueden ser adsorbidos en el contorno celular por sitios cargados negativamente y que forman parte de moléculas de pared y membrana celulares, así como de los compuestos extracelulares<sup>17</sup>. Es importante destacar que la composición de la membrana y pared celular representa el primer mecanismo de tolerancia a metales; así, las bacterias Gram negativas tienden a ser más tolerantes que las Gram positivas (Hughes y Poole 1989).

### **Mecanismos intracelulares**

Los metales pueden ingresar a la célula por diversos mecanismos, como la fagocitosis (en vacuolas). Sin embargo, el principal mecanismo es el transporte activo mediado por moléculas portadoras de naturaleza proteica<sup>18</sup>. La concentración del metal en citoplasma dependerá de la disponibilidad de los ligantes, el ritmo y la eficiencia del transporte transmembranal, su acumulación y la posibilidad de que el metal sea expelido (Hughes y Poole 1989; Summers y Silver 1978; Morgan y Stumm 1995; Olson y Panigrahi 1995).

Una vez en el citoplasma, el metal puede ser transformado químicamente, lo que determinará la naturaleza de los efectos fisiológicos en el microorganismo (Morgan y Stumm 1995). Así, en citoplasma, la desintoxicación puede deberse a eventos tales como la unión de metales a proteínas intracelulares (Stokes 1983; Gekeler *et al.* 1988; Kaplan *et al.* 1995), o bien a metalotioneínas y quelatantes. Las metalotioneínas son pequeñas proteínas intracelulares de bajo peso molecular y elevada proporción de cisteína<sup>19</sup>, comunes en eucariontes y que pueden unirse a metales como Cd, Zn, Cu, Ag, Au y Hg, propiciando la desintoxicación, homeostasis y transferencia de metales: las microalgas *Chlorella vulgaris* y *C. ellipsoidea* desencadenan la síntesis de metalotioneínas cuando las células son expuestas a Zn y Cd. Existen proteínas tipo metalotioneínas en procariontes, como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. aureginosa*,

<sup>17</sup> Resulta interesante mencionar que, mediante ingeniería genética se ha logrado inducir que las células bacterianas sinteticen y exporten péptidos ricos en aminoácidos con grupos nucleofílicos (como la cisteína) que poseen la capacidad de retener elementos tóxicos como Cd y Cu extracelularmente (Kotirba *et al.* 1999). Ver 2.4

<sup>18</sup> Por ejemplo: Mn, Zn, Cd, Co y Ni pueden reemplazar al Mg de proteínas involucradas en el transporte de fosfatos para acceder al citoplasma; Co, Mn y Ni ingresan al citoplasma de *Bacillus subtilis* gracias a la formación de un complejo de citrato; el Cd usa el sistema de transporte del Mn para acceder al citosol de microorganismos y los aniones de arsenato y vanadato ingresan como lo hacen los iones fosfato

<sup>19</sup> La cisteína es un aminoácido con un grupo sulfhídrico (tiol), agente nucleofílico, muy reactivo y susceptible a la oxidación, que tiende a formar enlaces con los metales tales como Hg<sup>+</sup> y Ag<sup>+</sup> (formando mercaptanos)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Synechococcus*, *Escherichia coli* y otras bacterias (in Hughes y Poole 1989; Maeda *et al.* 1990b)<sup>20</sup>.

Otro mecanismo intracelular que confiere tolerancia a metales en bacterias, es la tolerancia mediada por *plásmidos*. Un plásmido es una molécula de DNA con capacidad de replicarse de manera autónoma e incluye un factor que transfiere resistencia a bactericidas, antibióticos y metales y que puede ser transmitido de una célula bacteriana a otra (Novick y Roth 1968; Hasnain y Nasim 1992; Taghavi *et al.* 2001; Tom-Petersen *et al.* 2001). Es importante destacar, sin embargo, que los genes responden a su entorno bioquímico inmediato, por lo que son las alteraciones de este entorno lo que resulta relevante en la interacción metal-célula (Goodwin 1998).

### 2.3.2. BIOTRANSFORMACIÓN DE METALES

La biotransformación de metales se refiere a la capacidad que tienen los microorganismos de provocar cambios en estado de óxido reducción de los metales, mediados por variables tales como la presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos, agentes biológicos, pH, temperatura, potencial redox, luz solar, cantidad y composición del agua, suelo o sedimentos (Olson y Panigrahi 1995; Summers y Silver 1978). Summers y Silver (1978) dividen en dos grandes categorías los mecanismos mediante los cuales los microorganismos biotransforman elementos metálicos: (1) oxidación y reducción de formas inorgánicas y (2) conversión de formas inorgánicas a orgánicas o viceversa.

El primero se ilustra con: la reducción del  $Hg^{2+}$  por microalgas del género *Chlamydomonas* y diversas bacterias Gram negativas y Gram positivas (*Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Serratia* y *Thiobacillus ferrooxidans*); oxidación del arsenito ( $As^{3+}$ ) a arsenato ( $As^{5+}$ ) por bacterias de los géneros *Achromobacter*, *Xanthomonas*, y *Pseudomonas* y, finalmente, *Thiobacillus ferrooxidans* participa en diversas reacciones redox, tales como las oxidaciones de  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  y de minerales de As (arsenopirita,  $FeS_2$ ,  $FeAs_2$ ), entre otros.

El segundo mecanismo de transformación de metales se ejemplifica con la metilación<sup>21</sup> y dimetilación<sup>22</sup> de ciertos metales (As, Cd, Hg, Pb, Se y Sn, entre otros) en la que

<sup>20</sup> Resulta interesante agregar que, empleando las técnicas de DNA recombinante se ha inducido la síntesis de una mayor producción de metalotioneínas en bacterias, las que incrementan su capacidad de bioabsorber Cd(II) en proporciones suficientes, como para permitir el crecimiento de la planta del tabaco, *Nicotiana benthamiana*, en suelos contaminados con 150  $\mu M$  de Cd por kilogramo de suelo (Barkay y Schaefer 2001)

<sup>21</sup> Metilación o alquilación: adición de un radical metilo o alquilo, en general, una molécula

<sup>22</sup> También denominada volatilización



participan varios microorganismos, como microalgas<sup>23</sup> y, especialmente, hongos y bacterias (Brierley *et al.* 1989; Trevors 1989; Maeda *et al.*, 1990a; Suzuki *et al.* 1992; Von Burg y Greenwood 1995; Newman *et al.* 1997; Iwahori *et al.* 2000). Es importante señalar que algunas metilaciones resultan en compuestos más tóxicos.

La formación de quelatos es otro caso muy común de transformación de metales. Éstos son complejos en los que el metal se coordina a dos átomos donadores, resultando un complejo cíclico, muy estable, de baja constante de disociación, que reduce la toxicidad del metal libre<sup>24</sup>. Por ejemplo, algunos compuestos extracelulares de algas (péptidos y ácidos orgánicos) forman anillos de quelatación con iones de Cu, que les permite crecer aún en presencia de elevadas concentraciones de este metal alguicida (Fogg, 1962).

## 2.4. POLÍMEROS EXTRACELULARES Y METALES

Las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) representan del 50 al 90% del total de la MO de las biopelículas y consisten en polisacáridos, proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, (fosfo)lípidos y otras moléculas orgánicas formadas por polimerización, que presentan sustitutos orgánicos (acetilicos, succínicos, pirúvicos y otros) e inorgánicos (p.e. sulfatos) (Nalewajko 1977; Kotrba *et al.* 1999; Wingender *et al.* 1999). Las SPE varían en su composición, pero siempre se trata de macromoléculas polianiónicas, solubles en agua o disueltas en soluciones salinas que se unen a membrana celular mediante enlaces covalentes, establecidos con polímeros de superficie celular.

Las funciones que juegan las SPE en las biopelículas son diversas y de vital importancia para la estructura de la misma, ya que conforman una matriz adhesiva que permite la adhesión de la biopelícula al sustrato o colonización, posibilitan la asociación celular contribuyendo a la formación de colonias y agregados celulares, incrementa la posibilidad de acceder a nutrientes, aseguran un alto grado de hidratación en la vecindad inmediata de las células, protegiéndolas en condiciones de sequedad, representan una barrera funcional que protege de los valores extremos de pH, temperatura, desecación, congelación y de depredadores, entre otros (*sensu* Sutherland 1999; Wingender *et al.* 1999; Wolfaardt *et al.* 1999; Percival *et al.* 2000).

<sup>23</sup> Por ejemplo, la metilación de As por la microalga *Chlorella vulgaris*

<sup>24</sup> Ejemplos de estos anillos son la clorofila con Mg como ion central y la hemoglobina con Fe

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En especies tolerantes a tóxicos, la secreción de SPE representa una barrera funcional que reduce la asimilación de biocidas, antibióticos, anticuerpos y **cationes tóxicos**, cual si capas orgánicas que atrapan y retienen los elementos tóxicos (bioadsorción). De hecho, algunas SPE actúan como agentes quelatantes (Stokes 1983), por lo que son aprovechados para remover metales pesados de ambientes acuáticos, mediante biomasa viva o muerta de bacterias, hongos y algas (Brierley *et al.* 1989; Hughes y Poole 1989; Maeda *et al.* 1990b; Morgan y Stumm 1995; Olson y Panigrahi 1995).

La bioadsorción de cationes metálicos en SPE involucra reacciones de intercambio iónico, dada la elevada cantidad de grupos funcionales cargados negativamente (Sutherland 1984), representados por grupos fosfóricos (fosfodiésteres), carboxílicos (carbohidratos ácidos, proteínas), sulfhídricos (proteínas) e hidroxílicos (carbohidratos) (Sutherland 1984; Kaplan *et al.* 1987). La adsorción es una fase rápida, reversible y mediada por mecanismos electrostáticos, no energéticos, que depende de la selectividad entre el ión metálico y el ligante, que a su vez está subordinada a: concentración del metal, síntesis, liberación y disponibilidad del ligante;<sup>25</sup> presencia de otros iones, cantidad de MO y de microorganismos, factores estéricos y ciertas características del medio, como pH y potencial rédox (Kaplan *et al.* 1987; Crist *et al.* 1981).

## 2.5. BIOPELÍCULAS Y BIOMINERALIZACIÓN

Algunos procesos de mineralización son, en esencia, procesos biológicos (biomineralización), que sólo se llevan a cabo en presencia de microorganismos (Parnar *et al.* 2000). La biomineralización se refiere a la formación de precipitados metálicos insolubles por interacción microbiana con productos metabólicos de microorganismos y sulfuros, hidróxidos, fosfatos y carbonatos, favoreciendo la formación de minerales y las dinámicas geoquímicas (Beveridge 1989; Podda *et al.* 2000; Barkay y Schaefer 2001). Para explicar este proceso, que mejor que recurrir al trabajo de Phoenix *et al.* (2000), elegante e inteligible, como un ejemplo del papel de los microorganismos en la mineralización. El objeto de estudio de los investigadores fue la cianoprocarionte filamentosa *Calothrix* sp., aislada de aguas termales en Krisuvik, Islandia. Se incubó a *Calothrix* en una solución de SiO<sub>2</sub> y en una solución de Fe-SiO<sub>2</sub> por 12 días, al cabo de los cuales se había desarrollado una costra de SiO<sub>2</sub> de 5 y de 10  $\mu$ m de espesor.

<sup>25</sup> Que, a su vez, depende del estado fisiológico del microorganismo

La silificación sucede principalmente en la cara externa de la vaina celular y en las SPE. La mineralización resultó de la unión de coloides de  $\text{SiO}_2$ , previamente formados. Phoenix y colaboradores notaron que la biomineralización extracelular en SPE y vaina prevenía el ingreso de Fe al citoplasma y la mineralización de la pared celular y citoplasma, sin limitar afectar a *Calothrix* sp., que continuaba fotosintéticamente activa. Procesos similares de biomineralización en el contorno celular se han documentado en algas clorofitas filamentosas de aguas ácidas (Lawrence *et al.* 1998).

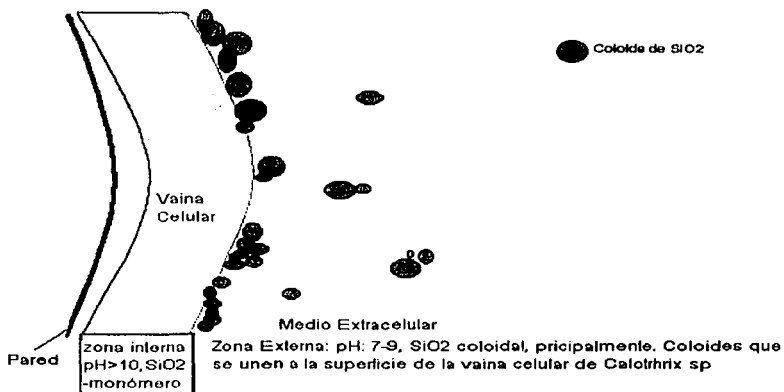


Figura 2.2. Descripción del proceso de mineralización de la superficie externa de la vaina celular de *Calothrix* sp. *sensu* Phoenix *et al.* (2000): La producción de iones  $\text{OH}^-$  en la fotosíntesis alcaliniza moderadamente el medio exterior (7-9). En este intervalo de pH, el  $\text{SiO}_2$  adyacente predomina como coloide, que se une electrostáticamente a la superficie externa de la vaina, sin ingresar a matriz. En la interfase matriz-zona externa de la pared celular, el pH asciende a 10. A este pH, se incrementan las formas solubles y los monómeros de  $\text{SiO}_2$ , que no tienden a unirse a la superficie orgánica. pH externo: 7-9

La biomineralización sucede en la superficie celular y en SPE, tanto en microorganismos heterótrofos (Beveridge y Murray 1980), como autótrofos (Podda *et al.* 2000), sin que se afecte la actividad metabólica de los microorganismos (Phoenix *et al.* 2000). Por el contrario, se ha constatado que la presencia de minerales hidróxido-metálicos (Cr, Fe, Mn y Al) en torno las células algales, reducen la toxicidad de ciertos metales (Stauber y Florence 1987; Lawrence *et al.* 1998; Admiraal *et al.* 1999; Wilson *et al.* 2001). Stauber y Florence (1987), por ejemplo, afirman que el efecto tóxico del Cu en

la diátomea *Nitzschia closterium*, disminuye en presencia de hidróxidos metálicos de metales trivalentes como Mn, Fe, Cr y Al o divalentes como Mn y Co, al formarse una capa extracelular de minerales que adsorbe Cu antes de que éste pueda ingresar al citoplasma. Lawrence *et al.* (1998), Phoenix *et al.* (2000) y Sabater *et al.* (2000) argumentan que la biomineralización permite generar una reserva de nutrientes fácilmente intercambiables, mitigar los efectos de las radiaciones fotoinhibitorias, evitar la desecación, dado el carácter coloidal de los precipitados, y proteger a los microorganismos de tóxicos y predadores.

## 2.6. DESECHOS MINEROS Y MICROORGANISMOS

Dado que ciertas especies de algas y bacterias han sido reconocidas por su tolerancia a elevadas concentraciones de metales y por su capacidad de adsorberlos, se ha propuesto reiteradamente su empleo como indicadores biológicos de metales (Keeney *et al.* 1976) y para el tratamiento de ambientes afectados por tales elementos (Beveridge y Murray 1976 y 1980; Darnall *et al.* 1986; Bradshaw y Chadwick 1980; Bender *et al.* 1994; Kotrba *et al.* 1999; Sosa *com. pers.*). De hecho, cianoprocariontes y algas han sido empleados de manera comercial para remover metales de efluentes mineros (Badell y Darnall 1990; Vymazal 1990).

En los últimos años se han intensificado los trabajos sobre microorganismos de desechos mineros. John (1993) examinó la composición de poblaciones de diátomeas en lagos en los que se descargaban tales residuos. En aguas contaminadas por desechos mineros, Podda *et al.* (2000) observaron el desarrollo de *Scytonema* sp. (cianoprocarionte) y *Chlorella* sp. (clorofita) y Takamura *et al.* (1989) reportan seis especies de Chlorococcales (clorofitas) que califican de tolerantes a Cu, Cd y Zn, mientras que *Cladophora* sp. (clorofita) ha sido observada en desechos mineros (Nord y Wixon 1979). Finalmente, Babich y Stotzky (1985) comentan que tan solo 63 grupos taxonómicos de algas bentónicas, han sido reportadas en cuerpos de agua cercanos a zonas de desechos mineros. Así mismo, ciertas especies de bacterias, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus cerus*, *Bacillus* spp., y de hongos como *Aspergillus* sp., *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., han sido documentadas como residentes de zonas afectadas por desechos mineros (Babich y Stotzky 1985; Chappell y Craw 2002).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los estudios de algas residentes en desechos mineros de Guanajuato tienen sus antecedentes en los estudios desarrollados por Rodríguez *et al.* (1997) y Ramos-Arroyo (1993), quienes verifican la presencia de algas en desechos y reconocen su potencial de eventual uso biotecnológico, para el tratamiento de zonas afectadas por desechos mineros. Esto último ha motivado a diversos grupos de investigación para conocer los microorganismos residentes o asociados a diversos jales. Los resultados indican que microorganismos tales como cianoprocariontes, clorofitas y diatomeas, hongos deuteromicetos como *Cryptococcus*, *Penicillium* y *Fusarium*, hongos zigomicetos como *Rhizopus* y *Mucor*, así como diversas bacterias, son residentes comunes en desechos mineros de Guanajuato (Ramos-Arroyo 1993; García-Meza *et al.* 1995; Rodríguez *et al.* 1997; García-Meza 1997 y 1999; Cano-Canchola *com. pers.*; Sosa-Luna *com. pers.*).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**CAPÍTULO III**  
**METODOLOGÍA**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.1. ZONA DE ESTUDIO

El Distrito Minero de Guanajuato (Fig. 3.1), a 350 km NE de la Ciudad de México, es una importante comarca que ocupa 2200 km<sup>2</sup> dentro de la provincia fisiográfica de la Mesa Central en la Sierra de Guanajuato. La Sierra de Guanajuato es una estructura anticlinal de 100 km de largo, 20 km de ancho, con tendencia noroeste. El Distrito representa la zona central del cinturón de mineralización, poli-metálico (Ag-Pb-Zn), que corre paralelo al flanco este de la Sierra Madre Occidental, desde Taxco (México centro-sur) pasando por Guanajuato (México central), hasta Santa Bárbara, Chihuahua (norte de México) (Carrillo-Chávez *et al.* 2003b). El Distrito de Guanajuato es famoso por la presencia de yacimientos minerales tipo vetas, tales como "La Luz", "Veta de la Sierra" y, la más extensa, "La Veta Madre", cada sistema con diferente mineralogía, que tienen un origen común: los fluidos mineralizantes que precipitaron minerales de ganga tales como cuarzo, calcita y feldspatos y sulfuros como piritita (FeS<sub>2</sub>), calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>), estaerelita ((Zn,Fe)S), galena (PbS) y cinabrio (HgS), principalmente (Ramos 1991; Ramos-Arroyo y Siebe 1998).

A 4 kilómetros al norte de la Ciudad de Guanajuato, cabecera municipal y capital del estado de Guanajuato (21°01'-21°14' N y 101°15'-101°26' O, 2008 msnm), se localiza el depósito de desechos mineros de Valenciana, en la zona baja de la Sierra de Guanajuato, con una altitud promedio de 2100 msnm (Fig. 3.1). Para llegar a estos depósitos, se toma la primera brecha descendente sobre el km 4 de la carretera No. 110, Guanajuato-Dolores Hidalgo. Tales jales deben su nombre a su ubicación, cercanos a la mina y al poblado de La Valenciana.

El sistema de jales de Valenciana se integra por tres presas, dos continuas (presas 1 y 2) y una escalonada (presa 3), dada la accidentada topografía de la zona (Fig. 3.2). Cada presa representa un episodio de acumulación: conforme la presa en uso llegaba a sus límites de relleno, se iniciaba la adecuación del terreno para establecer la nueva, colindante con la anterior. El sistema de presas de jales de Valenciana representa 20 millones de toneladas, cubriendo un área de 4.5 km<sup>2</sup> de 10 a 15 m de profundidad, con remanentes generados por el beneficio por flotación de minerales de diversas minas de la zona: Valenciana, Cata, Rayas, San Vicente, Sirio y San Ignacio, ubicadas las 5 primeras sobre la Veta Madre y, las dos últimas, sobre la Veta La Luz. Todas son explotadas por la Sociedad Cooperativa Minero-Metalúrgica Santa Fe de Guanajuato. Dicha compañía

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

procesa cerca de 750 ton/día de mineral por flotación (Carrillo-Chávez *et al.* 2003b), lo que se traduce en, por lo menos, 710 ton/día de desechos (considerando el 95% de residuos obtenidos por cada tonelada de mineral procesado).

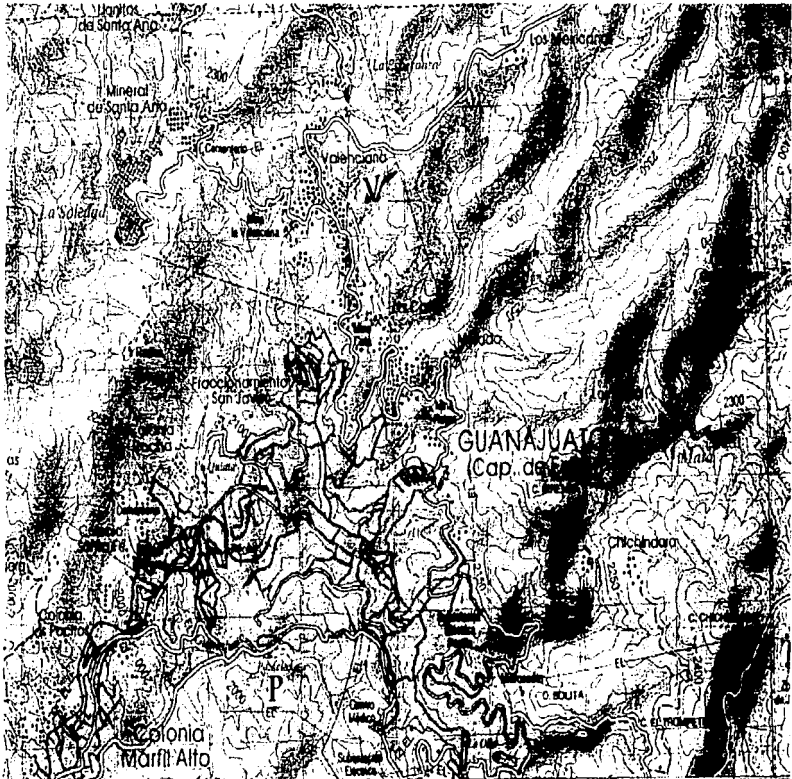


Figura 3.1. Municipio de Guanajuato. V: Ubicación de las presas de jales Valenciana (Comisión de Estudios del Territorio Nacional, Cartas de uso de Suelo, mapa F14-C-43. Escala 1:50 000)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



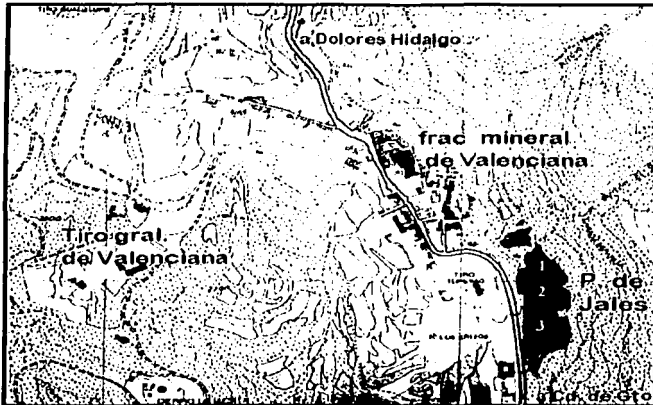


Figura 3.2. Sistema de presas de jales de Valenciana (Escala 1: 5000)

Según Ramos (1991), en las vetas mencionadas predominan cuarzos y aluminosilicatos diversos, así como elevados porcentajes de calcita: 10 a 25% en la Veta La Luz y 10% en la Veta Madre.

La presa número tres fue la elegida para el presente trabajo (Fig. 3.3), por ser la más reciente, en desuso desde 1997. La presa de jales bajo estudio es un confinamiento de 0.5 ha, bordeado por una cortina de concreto al extremo norte, un declive (barranco) hacia el sur y laderas montañosas al este y oeste; estas últimas aportan al desecho fracciones de rocas, partículas del suelo, restos orgánicos e, incluso, determinan la presencia de algunas especies vegetales tolerantes. Una característica particular de la presa seleccionada es que, una vez vertidos los desechos del beneficio quedó una acumulación de arenas cerca del punto de vaciado en el sur y arcillas hacia los extremos noreste, norte y noroeste, que migraron al permanecer en suspensión y por efecto del gradiente topográfico (Ramos-Arroyo y Siebe 1998). Durante la estación de lluvias, pequeños charcos o cuerpos de agua se forman sobre la superficie.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Figura 3.3. Presa de jales recientes de Valenciana

En el municipio de Guanajuato se distinguen dos tipos de clima: templado subhúmedo con lluvias en verano y lluvias aisladas en invierno en las zonas de mayor altitud y, en las regiones más bajas, semicálido, subhúmedo con lluvias esporádicas en invierno y más regulares durante el verano (Fig. 3.4). La temperatura media anual es de 17.9°C, con máximas en verano de 30°C y mínimas en invierno de -3°C. La precipitación media anual varía entre 659 y 691 mm. Los vientos dominantes poseen una dirección este noroeste y velocidad media anual de 4.6 m/seg, que tiende a intensificarse durante los primeros meses del año (INEGI 1993).

El sistema de jales Valenciana se localiza en una zona intermedia entre las partes bajas y altas del municipio<sup>1</sup> y el sustrato está sometido a fluctuaciones bruscas de

<sup>1</sup> La altura máxima promedio de las elevaciones en el Municipio de Guanajuato se estima en 2400 msnm

temperatura, dada la ausencia de plantas u otros elementos de sombra y la intensa radiación solar durante el día, particularmente en estaciones secas, de otoño a primavera. Finalmente, cabe decir que en el Distrito los suelos presentan estructuras blocosas, de consistencia friable (disgregable) a muy firme y la textura varía de franco-arenosa a arcillo-limosa (Guiza 1949; INEGI 1993; Ramos-Arroyo *com pers.*).

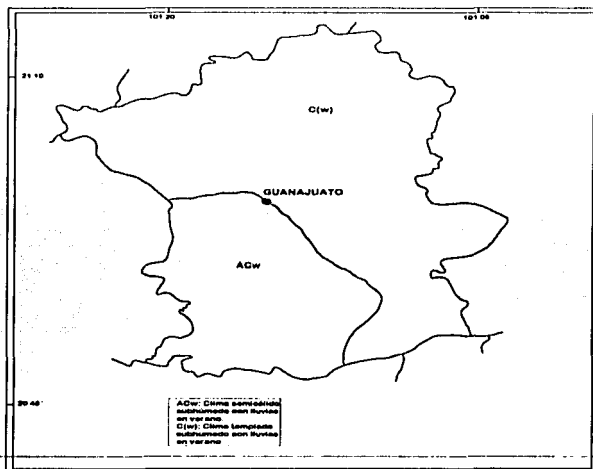


Figura 3.4. Principales climas del Municipio de Guanajuato (INEGI, 1993; Escala 1:1 000 000)

### 3.2. COLECTA DEL JAL

Se realizó una primera visita al depósito de jales de Valenciana el 18 de septiembre de 1999, con la finalidad de seleccionar el método y sitio de muestreo. Se reconoció la heterogeneidad del jal en textura al tacto, color, grado de humedad. Esta heterogeneidad es consecuencia de los episodios de relleno durante las diferentes épocas del año y la periodicidad, la inclinación del terreno, los elementos que colindan al jalero y, muy particularmente, las características de procedencia y composición del material procesado. La colecta del material se realizó en noviembre 4 de 1999, de la siguiente manera: en la parte centro-proximal de la presa se escogieron 10 puntos de colecta en torno a un círculo de 15 m de diámetro; en cada punto se tomaron muestras superficiales, de hasta

1 cm de profundidad. Todas las submuestras fueron reunidas y mezcladas, para obtener una única y homogénea, la muestra final se distribuyó en bolsas de polietileno, para su manipulación. De la misma forma, se colectó suelo control de la zona (Fig. 3.5).

Se eligió el sitio de muestreo por poseer características tales como mayor proporción de arcillas, de textura más fina y con mayor proporción de carbonatos en el lado opuesto al punto de vaciado. Así mismo, la colecta en la parte central aseguró la ausencia de elementos contaminantes de laderas cercanas, como rocas y materia orgánica.

La elección del método de colecta se realizaron bajo la asesoría del Dr. Y. René Ramos (Instituto de Geología, UNAM). Se buscó colectar un número adecuado de muestras y que cada una fuese representativa, al ser tomada a intervalos regulares. Además, este método de colecta permitió obtener una estimación válida de la media de las propiedades del sustrato y reducir el efecto de la varianza en una matriz heterogénea, a partir de un solo análisis (Dick *et al.* 1996). Se realizó una sola colecta pues no se requerían análisis temporales.

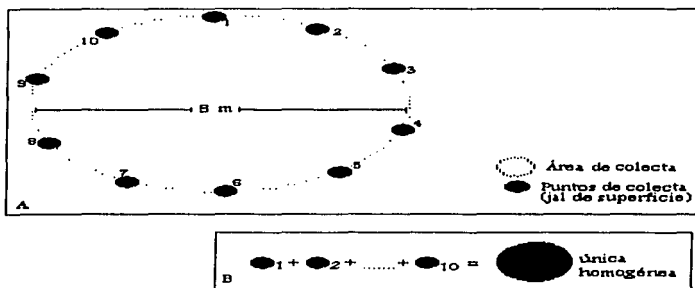


Figura 3.5. Método de colecta de submuestras superficiales del jal Valenciana reciente (A) y mezcla de las mismas para obtener una muestra única (B)

### 3.3. EXPERIMENTACIÓN

#### 3.3.1. CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS DE JAL ANTES DE LOS BIOENSAYOS

##### *Análisis físicoquímicos*

Se obtuvo el porcentaje de los óxidos de elementos mayoritarios, Si, Al, Fe, Ca, Mg, Na y K, por fusión de la muestra con metaborato de litio y ácido bórico a 950°C, se determinó la concentración de los elementos indicados por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) y se calculó el porcentaje de los óxidos según las relaciones estequiométricas correspondientes (Ramos 1991). Se realizó un análisis semicuantitativo

de los principales minerales no amorfos por difracción de rayos X (DRX) (Difractómetro SIEMENS D-500; ver Apéndice A1). La matriz de comparación para la DRX consistió en datos previamente obtenidos de muestras originales de residuos mineros generados por la Sociedad Cooperativa Minero Metalúrgica Santa Fé de Guanajuato, la cual tiene la siguiente composición por DRX: cuarzo (58%), ortoclasa (11%), albita (10%), calcita (7%), clorita (2%), caolinita (1%), pirita (2%), hematita (<1%) (sensu Ramos 1991 y Ramos *com. pers.*). Se estableció la reconstrucción mineralógica con los datos obtenidos de los análisis anteriores, así como de la ecuación balanceada de la reacción de oxidación total de cada uno de los minerales detectados (Apéndice A1. *Sensu* Ramos 1991).

Los análisis anteriores se realizaron en los laboratorios del Centro de Investigación en Química Inorgánica (CIQI) de la Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, bajo la dirección de la Dra. Esthela Ramos, la asesoría de la M. en C. Carmen Sandoval. Particularmente, la DRX para el análisis de componentes cristalinos de las muestras del desecho minero, fue desarrollado por la M. en C. Yolanda Gallaga, responsable de la DRX del CIQI, siguiendo los protocolos establecidos en el mismo.

Se determinaron textura, utilizando un hidrómetro por el método de Bouyoucos (*in* Black 1965), color, densidad aparente, densidad real, porosidad, pH y conductividad eléctrica (Ce) según Richards (1974), capacidad de intercambio catiónico (CIC) (Bower 1952; adecuado para EAA por Sandoval *com. pers.*), porcentaje de materia orgánica (MO) mediante pérdida de peso por calcinación a 400°C y por titulación (Walkley 1974); P total según Chapman y Pratt (1961), presencia de carbonatos por efervescencia con ácido, porcentaje de carbonatos alcalino-térreos por titulación (Richard 1974). Las determinaciones de densidad, porosidad, pH, Ce, CIC, contenido de carbonatos y contenido MO, se realizaron en los laboratorios del CIQI de la Universidad de Guanajuato. El análisis elemental y la determinación de fósforo se llevaron a cabo en las instalaciones del PIQAYQA de la Facultad de Química, UNAM.

Se realizó un análisis semicuantitativo de elementos metálicos extraídos con HNO<sub>3</sub> al 50%, por espectrometría de plasma masa inductivamente acoplados (ICP-MS). Empleando reactivos específicos como agentes para la extracción, se determina la proporción de las fases en las que puede encontrarse un metal: en solución, formas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

intercambiables<sup>2</sup>, formas precipitadas<sup>3</sup>, como parte de minerales o en la biofase). De esta manera, se cuantificó por EAA la concentración de Cr, Ni, Cu, Zn, Cd y Pb extraídos con HNO<sub>3</sub>+HCl, con HNO<sub>3</sub> 1:1, metales biodisponibles extraídos con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0.05 M, pH 7, extraídos con CH<sub>3</sub>COOH y solubles en agua (Page *et al.* 1982; Archer y Hodgson 1987). La determinación de los metales señalados por EAA fue realizada por el Ing. Ciro Márquez, en el Departamento de Metalurgia de la Facultad de Química, UNAM.

Asimismo, se determinó la concentración de <sup>9</sup>Be, <sup>47</sup>Ti, <sup>51</sup>V, <sup>52</sup>Cr, <sup>53</sup>Cr, <sup>55</sup>Mn, <sup>57</sup>Fe, <sup>59</sup>Co, <sup>60</sup>Ni, <sup>63</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn, <sup>75</sup>As, <sup>82</sup>Se, <sup>97</sup>Mo, <sup>114</sup>Cd, <sup>121</sup>Sb, <sup>205</sup>Tl y <sup>208</sup>Pb mediante ICP-MS de cada fracción obtenida por extracción secuencial, según el esquema de Tessier *et al.* (1979) y modificado por Li *et al.* (1995). Las fracciones fueron: (i) intercambiable, (ii) unida a carbonatos y específicamente adsorbida, (iii) unida a óxido de Fe y Mn, (iv) unida a MO y sulfuros, y (v) residual, correspondiente a las formas presentes en estructuras cristalinas de minerales primarios y secundarios, que representa los metales presentes en estructuras internas de minerales. La suma de estas cinco fracciones se consideró la concentración total de cada elemento. Los detalles del proceso de extracciones secuenciales se detalla en el Apéndice A3.1. y en Li *et al.* (1995). El espectrofotómetro ICP-MS (PQ3 VG-Elemental), fue empleado para el análisis de las fracciones extraídas secuencialmente. Los análisis fueron hechos por duplicado.

La extracción secuencial de las muestras se realizó en el PIQAYQA de la Facultad de Química, UNAM. La cuantificación de metales por ICP-MS se realizó en el Laboratorio de Geoquímica de la Universidad de Wyoming bajo la dirección del Dr. Alejandro Carrillo-Chávez, del Centro de Geociencias, UNAM (*Campus* Juriquilla).

Todas las técnicas analíticas mencionadas se describen en el Apéndice A3.1.

### ***Inducción de la expresión de microalgas***

Se preparó 1 litro de medio basal Bold (MBB, *sensu* Nicholson y Bold, 1965 *in*: Stein, 1973. Apéndice A3.2) en agar al 2% y se repartió en cajas de Petri esterilizadas. En cada caja se espolvoreó 1 g del jal. Se partió de un lote de 10 cajas, que fueron colocadas en un cuarto a temperatura controlada entre 20-25°C y sometidos a fotoperíodos de 16/8 hrs. Después de 15 días se observaron los primeros crecimientos visibles de algas y hacia la tercera semana se inició la identificación de las especies. Una vez concluida la

<sup>2</sup> Unidos a sitios de arcillas, materia orgánica, complejos quelados

<sup>3</sup> En carbonatos, sulfuros, hidróxidos u otros

observación, las poblaciones de las especies identificadas se resembraron en matraces Erlenmeyer con MBB-sin EDTA<sup>4</sup>, para su posterior difusión en los bioensayos (BioE) experimentales.

El trabajo previamente descrito se llevó a cabo en el Laboratorio de Ficología de la Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Eberto Novelo.

### 3.3.2 BIOENSAYOS

En diez celdas de acrílico de 24 cm de altura, 20.5 cm de ancho y 40 cm de largo (Fig. 3.6) se vertió jal hasta obtener una capa de 5 cm de altura, para un volumen total de aproximadamente 4000 cm<sup>3</sup>.

Las celdas fueron colocadas en un cuarto a temperatura controlada (26±2°C) y adecuando un sistema de iluminación con lámparas de luz de día (15 watts) sobre cada una, con fotoperíodos de 14/10 horas.

Ocho celdas se emplearon para el desarrollo experimental (cuatro tratamientos por duplicado) y dos controles, como se indica a continuación:

BioE T1	BioE T2	BioE T3	BioE T4	CONTROL
jal + fotoautótrofos + agua corriente esterilizada	jal + fotoautótrofos + agua residual sintética	jal estéril + fotoautótrofos (sin agua)	jal estéril + agua corriente esterilizada	jal estéril (sin fotoautótrofos sin agua)

Los tratamientos anteriores se eligieron con el objetivo de probar si el o los factores limitantes para el desarrollo de la microbiota eran el agua o los compuestos orgánicos disueltos en ella.

El agua residual sintética se preparó manteniendo una proporción 15:1:0.1 de C:N:P y ajustando a un valor de pH de 7 con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N, según el caso (Apéndice A3.4). Se diseminaron los microorganismos fotótrofos aislados previamente en los lotes que los incluían asperjando las poblaciones contenidas en MBB líquido sin EDTA.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

<sup>4</sup> La presencia de EDTA y Fe disminuye el efecto tóxico a metales (ver 3.3.4)

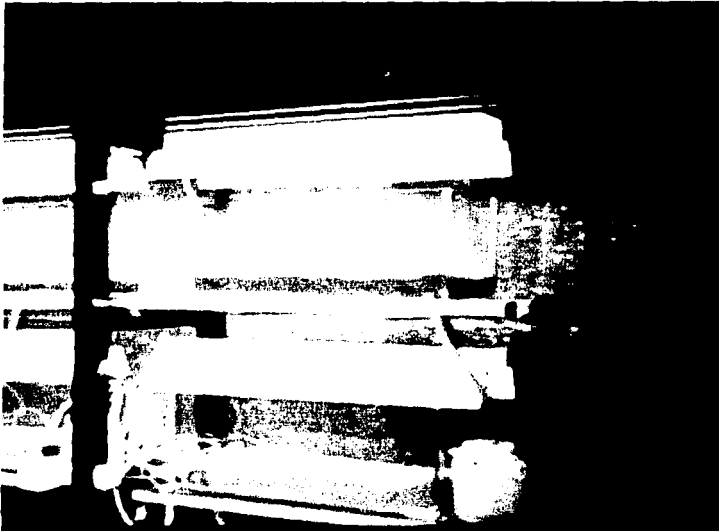


Fig. 3.6. Celdas de acrílico usadas para bioensayos con muestra superficial del jal Valenciana

Los BioE se sostuvieron por un período de cinco meses, durante los que se regaron con 100-200 mL del agua correspondiente, primero diario y después de tres meses, cada segundo día. Se midió el área cubierta por las biopelículas sobre la superficie del jal una vez por semana, en los lotes con crecimientos visibles.

Al adicionar agua a cada uno de los BioE que la incluían como parte del tratamiento, se advirtió que ésta drenaba con mayor rapidez en las celdas **sin** biopelículas. Por ello, se decidió evaluar si la presencia de microorganismos retardaba la infiltración del agua adicionada, empleando un dispositivo como el de la Figura 3.7. El experimento se realizó por triplicado.

De manera paralela, se inició el asilamiento y la identificación de bacterias, algas y, al constatar su presencia, de hongos y levaduras. La identificación de los microorganismos se realizó tomando muestras superficiales, particularmente de las zonas que presentaban crecimientos visibles.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



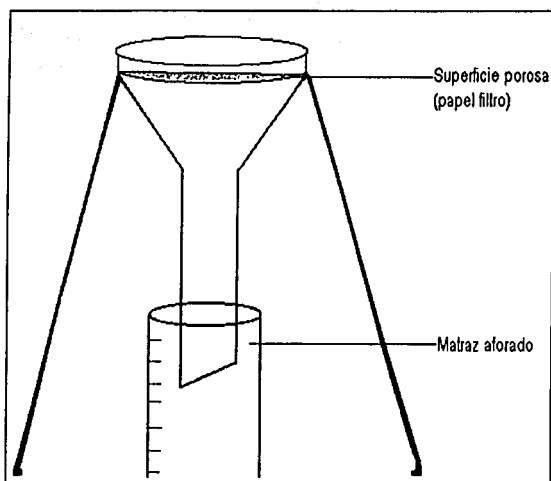


Figura 3.7. Dispositivo empleado para evaluar la velocidad de drenado en muestras del jal con y sin biopelículas. Las muestras del jal se colocan sobre la superficie porosa (papel filtro Wathmann). El agua adicionada (cantidad total conocida, ml), es recuperada en un matraz, mientras se mide el tiempo de drenado

### **Identificación de cianoprocarlontes y microalgas**

Se realizaron observaciones directas y periódicas en microscopio de contraste de fase a 1000X, integrando la descripción, el dibujo y las mediciones morfométricas pertinentes para cada ejemplar. Las observaciones se hicieron sobre material vivo. La determinación de las especies se realizó bajo la asesoría del Dr. Novelo, del Laboratorio de Ficología de la Facultad de Ciencias de la UNAM y con ayuda de claves y descripciones especializadas (Desikachary 1959; Komárek y Fott 1983; Prescott *et al.* 1981; Anagnostidis y Komárek 1988; Bourrelly 1970; Bourrelly 1972; Ettl y Gärtner 1988; Krammer y Lange-Bertalot 1991a, 1991b; Novelo 1998). No se trabajaron sinonimias. La información referente a ambientes, formas de vida y distribución fue extraída directamente de la literatura citada y ampliada con la base de datos para algas dulceacuícolas, mantenida por Novelo (1998).

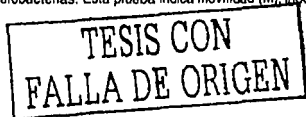
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **Identificación de bacterias**

Para la identificación de bacterias aerobias, se tomaron muestras superficiales (0 a 2 cm de profundidad) de aproximadamente 1 g del jal de los BioE; cada muestra fue colocada en un tubo de ensaye con caldo de caseína y soya (Caldo Casoy) y se incubó durante 24 horas a 35°C. Una vez que los crecimientos bacterianos fueron evidentes, se tomó de cada tubo una muestra del líquido mediante una pipeta Pasteur y se vertió sobre medio fenil-etanol agar (FEA), en medio sólido de gelosa y sangre (Gel-S) y en medio sólido McConkey (Mc) y se incubaron por 24 horas a 35°C. De las cajas con crecimientos bacterianos, se tomaron muestras de las colonias presentes, iniciándose la segregación de las cepas para la obtención de cultivos puros (monoespecíficos), registrando el medio en el que cada colonia se desarrolló (FEA, Gel-S ó Mc). En esta etapa del trabajo, se realizaron tinciones Gram cada vez que fue necesario, con la finalidad de discernir entre las bacterias Gram positivas de las negativas, así como para verificar la pureza de las colonias. La separación final de las cepas se realizó utilizando medio cerebro-corazón (BHI, siglas en inglés); las cepas bacilares Gram negativas fueron segregadas en medio agar Tergitol-7. Una vez obtenidos los monocultivos o cultivos puros, se realizaron los siguientes análisis de rutina, con el objetivo de decidir el tipo de estudios bioquímicos posteriores: Tinción Gram, ensayos para catalasa, oxidasa, nitratos, citrato de Simmons, ureasa, oxidación/fermentación de glucosa, SIM<sup>5</sup>, Klieger y Voges-Proksauer/rojo de metilo. Con los datos obtenidos en las determinaciones preliminares, se decidió realizar pruebas específicas, como gelatina nutritiva, caldo nutritivo, agar-leche descremada, agar-almidón, agar-tiosulfato-citrato-sales biliares, crecimiento a 42°C, esculina, urea, ornitina, glucosa, fructosa, xilosa, manosa, manitol, lactosa, sacarosa, salicina, pigmentación en agar Müller-Hinton a 37 y 42°C; así como pruebas derivadas de API-STAPH, específico para estafilococos, y API-20E, para bacilos Gram negativos, entre otras (Apéndice A3.2).

La identificación de bacterias anaerobias inició con la toma de aproximadamente 1 g de muestras superficiales del jal; cada muestra se vertió en la parte más profunda de un tubo de ensaye con medio de tioglicolato semisólido. Se colocaron los tubos en las jarras de incubación para bacterias anaerobias y se incubaron durante 48 horas a 35°C. Después, se tomó una muestra de los crecimientos con una pipeta Pasteur que se vertió sobre medio FEA, en medio sólido Gel-S y en medio sólido MC; se repitió la técnica de

<sup>5</sup> Para diferenciar enterobacterias. Esta prueba indica movilidad (M), indol (I) y presencia de ácido sulfhídrico, H<sub>2</sub>S (S)



incubación para bacterias anaerobias. Finalmente, las colonias desarrolladas se resembraron, iniciando así la segregación de las cepas para la obtención de cultivos monoespecíficos o puros en medio BHI-agar y con ayuda de la técnica de tinción Gram. Las cepas puras fueron observadas para determinar respuesta a la tinción Gram y posible formación de exo o endosporas. Asimismo, se realizaron las pruebas del RAPID-ID32A y la de catalasa, empleando los medios y los métodos de cultivo específico para bacterias anaerobias (Apéndice A3.2).

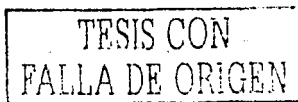
El aislamiento de bacterias y las pruebas bioquímicas para su identificación se realizaron en el Cepario de la Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección del Biol. Luciano Hernández y el apoyo de la Tec. Lab. Laura Ramírez-Mauricio.

### **Identificación de hongos y levaduras**

Se vertió 1 g de jal en 10 mL de medio líquido Sabouraud específico para hongos y levaduras, contenido en tubos de ensaye. Los tubos inoculados fueron colocados en la incubadora a 21°C durante 3-5 días, al cabo de los cuales se inició la separación de las colonias de hongos y levaduras presentes, usando cajas Petri con medio agar-Sabouraud (Apéndice A3.2). La identificación de los hongos se realizó mediante observación directa al microscopio óptico (400X y 1000X), empleando el colorante azul de lactofenol o azul de algodón para resaltar las estructuras vegetativas y reproductoras, así como las técnicas de microcultivo con medio Czapek. Las características generales de la colonia, de las hifas y de las estructuras reproductoras, fueron consideradas para determinar los géneros.

La identificación de las levaduras se elaboró registrando las características macroscópicas y microscópicas de las cepas desarrolladas en agar Sabouraud, usando el colorante cristal violeta (1000X, microscopio óptico). Aunado a lo anterior, se llevaron a cabo las siguientes pruebas bioquímicas: resiembra en medio selectivo para la identificación de especies del género *Candida* (Sanofi-Pasteur), desarrollo de pseudohifas en medio agar CORN, formación de ascosporas<sup>6</sup> resembrando las cepas en medio V8 y en medio de agua peptonada con zanahoria (Apéndice A3.2) y empleo del API-C20AUX específico para levaduras, que consiste en un conjunto de pruebas estandarizadas que indican la respuesta de levaduras ante diversos carbohidratos.

<sup>6</sup> Del griego, askós: Saco. Esporas haploides que se desarrollan en el interior de células en forma de sacos o ascas, después de una división meiótica



Las pruebas descritas fueron realizadas bajo la asesoría de la QFB Antonieta Silva del Cepario de la Facultad de Química, UNAM. La identificación final de hongos y levaduras fue realizada por la QFB Antonieta Silva.

### 3.3.3. CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS DE JAL DESPUÉS DE LOS BioE

Una vez finalizados los BioE, la muestra de jal de cada celda fue recolectada en bolsas de plástico. Las muestras del jal y los frascos con los lixiviados recuperados durante los BioE con riego se almacenaron a -4°C para los análisis posteriores.

Se repitieron algunos de los análisis realizados antes de los BioE: color, textura, densidad real y aparente, porosidad, pH, CIC, por ciento de MO y carbonatos, así como incluyendo la concentración de <sup>9</sup>Be, <sup>47</sup>Ti, <sup>51</sup>V, <sup>52</sup>Cr, <sup>53</sup>Cr, <sup>55</sup>Mn, <sup>57</sup>Fe, <sup>59</sup>Co, <sup>60</sup>Ni, <sup>63</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn, <sup>75</sup>As, <sup>82</sup>Se, <sup>97</sup>Mo, <sup>114</sup>Cd, <sup>121</sup>Sb, <sup>205</sup>Tl y <sup>208</sup>Pb, en las diferentes fracciones obtenidas mediante extracción secuencial (ver apartado 3.3.1) empleando el ICP-MS. Se obtuvo el porcentaje de biodisponibilidad de los metales considerando la concentración total y las fracciones intercambiables (Apéndice A3).

Finalmente, se determinó la concentración de metales solubles en lixiviados generados en los BioE irrigados, por lectura directa de muestras acidificadas con HNO<sub>3</sub> 10% ultrapuro (García-Meza 1999) empleando el ICP-MS.

La extracción secuencial se realizó en las instalaciones del PIQAYQA de la Facultad de Química, UNAM. Las determinaciones de metales por ICP-MS se realizaron en el Laboratorio de Geoquímica de la Universidad de Wyoming, con la dirección del Dr. Alejandro Carrillo-Chávez, del Centro de Geociencias, UNAM, *Campus Juriquilla*.

### 3.3.4. ENSAYO TOXICOLÓGICO

#### **Montaje del experimento**

Se colectaron las biopelículas autotróficas desarrolladas en el jal de los BioE. Las biopelículas estaban conformados principalmente por las especies *Phormidium* sp. (Cyanoprokariota) y *Chlorococum* sp. (Chlorophyceae). Las especies se identificaron por observaciones directas al microscopio (Olympus BH-2). Para la determinación de los géneros se usó la propuesta de Anagnostidis y Komárek (1988) para Cyanoprokariota, y la de Bourrelly (1972) en el caso de la Chlorophyceae.

Las biopelículas fueron lavadas con agua esterilizada para eliminar las partículas del desecho y, posteriormente, se cultivaron en cajas de Petri con medio Wood Hole esterilizado (Apéndice A3.3), usando discos de vidrio como sustrato artificial



(superficie:1.5 cm<sup>2</sup>). Un día antes del experimento, 105 discos de vidrio colonizados por biopelículas, fueron distribuidos en 21 cajas de Petri (3 réplicas por muestra y por tratamiento) con medio Wood Hole esterilizado sin Fe ni EDTA, ya que el EDTA tiene acción quelatante, formando complejos metálicos (Morris y Russell 1973) con fotoperíodos de 10/14 h con luz blanca de 15 watts y a T de 25±2°C.

Las biopelículas fueron expuestas durante cinco días a CuCl<sub>2</sub> (Tritrisol estándar de Cu) y ZnCl<sub>2</sub>, (Tritrisol estándar de Zn) y a una mezcla de Cu y Zn, de acuerdo a la relación Cu:Zn de las fracciones biodisponibles en el jal. Las concentraciones nominales finales fueron 0 (sin adición: controles), 10 y 100 μ M de Cu (0.635 y 6.35 mg·l<sup>-1</sup>, respectivamente), 100 y 1000 μM de Zn (6.537 y 65.37 mg·l<sup>-1</sup>, respectivamente), 10 y 100 μM de Cu y Zn (10 μM Zn: 0.6537 mg·l<sup>-1</sup>).

La intensidad de luz se mantuvo constante a 48 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (medida con un LICOR LI-185B) siguiendo fotoperíodos de 14/10 luz/oscuridad. La temperatura ambiente fue fijada a 25±5°C.

Las muestras fueron tomadas en los días 0 (inicial), el día 1 y el día 5 del experimento. El pH se midió en las fechas en que se tomaron las muestras, así como la concentración de fosfato en el medio, obtenida mediante la técnica de amonio-molibdato *sensu* Murphy y Riley (1962).

### **Concentración de metales**

Las concentraciones totales de Cu y Zn en el medio de cultivo previamente acidificado, en las biopelículas y en las fracciones extra e intracelulares de los polisacáridos fueron analizados (por triplicado) en la flama del EAA (Perkin Elmer 1100B) (Apéndice A3.3).

### **Fraciones orgánicas de las biopelículas**

Para cada metal probado, se tomaron tres discos de vidrio a fin de extraer las fracciones extra- e intracelular de polisacáridos (SPE), de acuerdo a Barranguet *et al.* (2003) (Apéndice A3.3). Una vez extraídos los carbohidratos, las muestras de las fracciones extracelular (SPE: suma de las fracciones "difusa" y "capsular") e intracelular, se mantuvieron a -20° C en la oscuridad, hasta la determinación de la concentración de carbohidratos mediante el método fenol-sulfúrico (Dubois 1959). Cada fracción de carbohidratos extraída se analizó por duplicado. La intensidad del color de los complejos de fenol, se midieron espectrofotométricamente (Espectro Shimadzu UV-1601) a 488 nm. Se usaron estándares de glucosa para la calibración.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se estimó la biomasa en forma de carbono orgánico total (COT) y clorofila total, empleando tres discos de vidrios colonizados por biopelículas. Para el COT se usó el analizador TIC/TOC (model 700 C, I.O. Analytical Corporation) y la clorofila total se extrajo con metanol al 100% (Apéndice A3.3). Se decidió usar el metanol como disolvente, pues la acetona no fue efectiva para la extracción de la clorofila de los cianoprocariontes.

### **Determinación de la fluorescencia in vivo**

La técnica de fluorescencia mediante el Pulso de Amplitud Modulada (PAM) fue empleada para medir la fluorescencia de la clorofila de las células vivas de la biopelícula. Dicha técnica PAM provee información cualitativa y cuantitativa relativa a los procesos fotosintéticos en el fotosistema II (PSII) (Genty *et al.* 1989). Así, los cambios en la fluorescencia algal permiten determinar si hay alteraciones en la eficiencia fotosintética de las algas; además, permiten estimar la biomasa y evaluar el estatus fisiológico de la biopelícula autofototrófica con relación a las condiciones y alteraciones de medio, tales como la presencia de metales tóxicos (Barranguet *et al.* 2000)<sup>7</sup>.

Los parámetros de fluorescencia usados en el presente estudio fueron:  $F_0$ , la señal de mínima fluorescencia en células adaptadas a la oscuridad, que fue empleada como un indicador indirecto de la biomasa;  $F_m$ , la señal de máxima fluorescencia en células adaptadas a la oscuridad, obtenida mediante un pulso de saturación. Bajo condiciones de luz actínica, los parámetros fueron:  $F_s$ , señal de fluorescencia cuando parte de los centros de reacción están cerrados (reducidos) y la ruta fotoquímica está completamente ocupada (reducida);  $F'_m$ , la intensidad de máxima fluorescencia, obtenida saturando los centros de reacción bajo condiciones estables. Estos parámetros permiten calcular la eficiencia del campo cuántico en la conversión de la energía fotosintética en el PSII  $\phi_{II}$ , y el campo cuántico máximo  $\phi_0$ , como:

$$\phi_{II} = (F'_m - F_s) / F'_m$$

$$\phi_0 = (F_m - F_0) / F_m$$

<sup>7</sup> La clorofila *a* es el pigmento más abundante en algas; juega un papel determinante en la transferencia de la energía lumínica, recibida en forma de fotones; el fotón excita un electrón, el cual es transfiriendo a través del pigmento antena hacia el centro de reacción, sitio donde es donado para que ingrese a la cadena de transporte de electrones. Esta ruta, denominada fotoquímica, es una de las posibles rutas por medio de las cuales el centro de reacción puede perder energía; otras rutas son la fluorescencia y la disipación por calor. La fluorescencia es la disipación de la energía del electrón en un nuevo fotón de menor energía al inicial. Este proceso parece ocurrir exclusivamente en el fotosistema II (PSII). La fluorescencia y la ruta fotoquímica son procesos que compiten entre sí. Los cambios en la fluorescencia se emplean para determinar cambios en la eficiencia fotoquímica y para evaluar el estado fisiológico del biopelícula (Ferrero 1998)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para las determinaciones, se colocó un disco de vidrio en la base de un vial de vidrio perfectamente limpio, con 3 mL de agua. Después de 20 min en la oscuridad, se obtuvieron el  $F_0$  y el  $\phi_0$ , empleando el fluorómetro PHYTO-PAM (Walz, Alemania), el cual permite discriminar la contribución de los tres principales grupos de organismos fotosintéticos (cianoprocariontes, clorofitas y diatomeas) a la biomasa total ( $F_0$ ). El PHYTO-PAM posee diodos emisores de luz (LED) que generan pulsos de luz a 470 nm (azul), 525 nm (verde), 640 nm (anaranjado) y 665 nm (rojo), por lo que se obtiene información simultánea de la fluorescencia del pigmento excitado con cuatro longitudes de onda diferentes, notificando sobre la contribución de varios tipos de organismos pigmentados a la señal total de fluorescencia (Schreiber *et al.* 2002).

Después de realizar las mediciones en la oscuridad, las biopelículas fueron expuestas a luz actínica durante 20 min para obtener  $\phi_{II}$ . Se utilizó un disco de vidrio perfectamente limpio para hacer la corrección del sonido de fondo. Ya que el tipo de PHYTO-PAM no permite realizar mediciones bajo condiciones de luz actínica, se usó el Fluorómetro WATER-PAM (Walz 222) para calcular la eficiencia fotosintética ( $\phi_{II}$ ) de células adaptadas a la luz. El WATER-PAM es más sensible que el PHYTO-PAM, pero no sirve para discriminar entre los grupos de organismos fotosintéticos. La iluminación actínica se hizo usando una fuente externa de iluminación; se aplicaron seis pulsos saturados de luz a intervalos de 20 s; sólo se promediaron los últimos tres pulsos para el cálculo de  $\phi_{II}$  (Kromkamp *et al.* 1998).

Ya que la fluorometría empleando el PAM es una técnica no destructiva, las muestras empleadas para el PHYTO-PAM y el WATER-PAM sirvieron para la determinación de clorofila total; para ello, después de realizar las mediciones, los discos fueron previamente congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Observaciones con el microscopio de láser de barrido (CLSM)**

Se realizó una reconstrucción tridimensional de las biopelículas empleando como colorante para visualizar las SPE, la lactina *Canavalia ensiformis* (Con-A. Molecular probe Inc.). Las observaciones al CLSM se hicieron en el día 5 de los bioensayos toxicológicos y sólo para las concentraciones más altas ensayadas (Cu  $100\ \mu\text{M}$ , Zn  $1000\ \mu\text{M}$  y Cu+Zn  $100\ \mu\text{M}$ ). Para cada caso, se emplearon 5 discos (0.2 mm grosor) colonizado con biopelículas. Después de retirar el exceso de agua en cada disco, se adicionaron varias gotas de solución de Con-A  $0.1\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Al cabo de 30 min de incubación a  $30^{\circ}\text{C}$ , los discos fueron lavados. Inmediatamente después, se examinaron los discos usando el CLSM

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

(Zeiss modelo LSM 510) equipado con dos fuentes de láser: helio-neón (emisión 543 nm y 633 nm) y argón (488 nm). Todas las observaciones se realizaron usando aceite Plan Neofluar 100x/1.3 NA.

Las biopelículas fueron barridas en 3 cortes consecutivos a intervalos de 5µm de profundidad, a longitudes de onda de excitación y con filtros de emisión óptimos para diferenciar entre los fotosintetizadores y las SPE. Los microorganismos fueron excitados a 633 nm y la señal emitida fue detectada empleando un filtro de 650 nm (long pass filter). La Con-A fue excitada a 543 nm y la señal emitida se detectó mediante un filtro de banda de 560-561. Parar cada imagen-z, la intensidad de señal relativa de los 3 grupos de cortes fue observada empleando el programa Zeiss LSM imagine browser v. 1.3.99. Los datos fueron corregidos para evitar señales de fondo.

El trabajo experimental correspondiente a este apartado (3.3.4), se realizó en el Departamento de Ecología Acuática y Ecotoxicología (AEE) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Ámsterdam, Países Bajos. El trabajo fue dirigido por la Dra. Christiane Barranguet. El manejo de CLSM y la obtención de las imágenes fue realizado por Bas van Beusekom, del AEE.

### 3.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### *Análisis estadístico*

Las diferencias significativas entre los tratamientos se probaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal y Wallis, a niveles de significancia  $p < 0.05$ . Los tratamientos pareados se evaluaron con la prueba de T'student con dos colas, también para  $p < 0.05$  (Sokal y Rohlf 1995).

Para conocer el nivel de asociación entre los elementos en las diferentes fracciones y la relación entre las fracciones para cada elemento, se calculó el índice de correlación de Pearson ( $r$ ), que refleja la relación lineal entre un par de datos (Sokal y Rohlf 1995).

Las pruebas estadísticas anteriores fueron hechas con el programa SPSS 10.0.5 para Windows (Microsoft 1999).

Para comprobar si existían o no diferencias en la toxicidad entre dos tratamientos de los ensayos toxicológicos (Cu y Zn, Cu y Cu+Zn, Zn y Cu+Zn), los datos de toxicidad fueron fijados a un modelo logístico no lineal (Haanstra *et al.* 1985) para de esta manera, comparar las curvas obtenidas, usando  $\phi_{II}$  como indicador. Las curvas se obtuvieron con el programa KaleidaGraph 3.0 para Windows (KaleidaGraph 1996).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.1. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LAS MUESTRAS DE JAL

##### *Componentes minoritarios, mayoritarios y mineralogía*

Los resultados de los análisis semicuantitativos para elementos minoritarios y cuantitativo de los elementos mayoritarios (<1% y >1% en peso seco, respectivamente), indican la presencia de más 30 elementos en concentraciones del orden de partes por millón (ppm ó  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) y por billón (ppb ó  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (Tabla 4.1), así como 7 elementos mayoritarios (Na, Mg, Al, Si, K, Ca y Fe) en forma de óxidos constituyentes de restos minerales (Tabla 4.2), algunos de los cuales se detectaron por difracción de rayos X (DRX) (Tabla 4.3. Ver Apéndice A1.1).

**Tabla 4.1.** Componentes minoritarios detectados en la muestra superficial del jal Valenciana

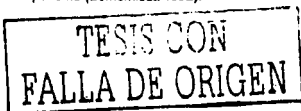
En $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Li, Be, B, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Sr, Mo, Cd, Ba, Hg, Sb, Tl, Pb y Th
En $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Sc, Ga, Ge, Br, Pd, Ag, Sn, Cs, Au y Bi

**Tabla 4.2.** Componentes mayoritarios (óxidos) de la muestra superficial del jal Valenciana reciente y del suelo control

Componente	Jal (% peso)	Suelo (%peso)
SiO <sub>2</sub>	77.45	70.7
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5.97	13.3
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.95	6.4
CaO	7.20	0.2
MgO	3.13	0.7
Na <sub>2</sub> O	0.38	0.4
K <sub>2</sub> O	3.35	2.3
Pérdida por calcinación (950°C)	5.09	5.3
total	104.5	99.3

El SiO<sub>2</sub> fue el componente presente en mayor proporción<sup>1</sup>. Los silicatos fueron la fase mineralógica mayoritaria en la muestra del jal, con el predominio de aluminosilicatos (cuarzo, ortoclasa y plagioclasa) y un considerable porcentaje de arcillas (caolinita y clorita), que juntos suman el 83.4%. El resto del jal lo conforman carbonatos (calcita y magnesita), sulfatos (yeso) y óxido de Fe o hematita (Tabla 4.3).

<sup>1</sup> Después del oxígeno el Si es el elemento más abundante en la litosfera y en prácticamente cualquier tipo de suelo y roca, pues se trata de un mineral extremadamente resistente al intemperismo (Bomemisza 1982).



**Tabla 4.3. Reconstrucción mineralógica de la muestra superficial del jal Valenciana reciente y suelo control**

JAL VALENCIANA		SUELO	
Cuarzo, SiO <sub>2</sub>	57.0%	Cuarzo	45.8%
Ortoclasa, KAISi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	16.0%	Caolinita	29.9 %
Calcita, CaCO <sub>3</sub>	8.3%	Ortoclasa	13.6 %
Caolinita, Al <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub>	5.6%	Hematita	6.4%
Yeso, CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.2%	Plagioclasa	3.4%
Magnesita, MgCO <sub>3</sub>	3.1%	Clorita	1.4%
Plagioclasa, NaAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	2.5%	Yeso	0.6%
Clorita, Mg <sub>3</sub> Al(Si <sub>3</sub> Al)O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub>	2.3%	Magnesita	0.2%
Hematita, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.9%		
Sulfatos en forma iónica	< 1%		

### **Características físicas y químicas del jal**

En la Tabla 4.4 se observa que el jal Valenciana reciente posee una coloración de gris claro a gris olivo claro, así como un bajo contenido de MO (0.8%) y un alto contenido de carbonatos alcalino-térreos (12.80%), resultados consistentes entre sí.

El pH registrado de 7.8, indica que el jal es un material ligeramente alcalino.

En la tabla 4.4. se indica un bajo contenido de fósforo (P) total, valor común en suelos pobres. También se indica que el jal posee una baja CIC (2.7 meq·100g<sup>-1</sup>). La deficiencia de P y la baja CIC son resultado estrechamente vinculado con el bajo contenido de MO y la baja proporción de arcillas<sup>2</sup>.

La textura franco-limosa del jal Valenciana es consecuente con el análisis mineralógico realizado, ya que corresponde a un sustrato con bajo contenido de arcillas como caolinita y clorita, y un elevado porcentaje de arenas y limos (cuarzo, plagioclasa, ortoclasa, calcita y magnesita).

Los valores de densidad real ( $\delta_r$ : 2.37 g·ml<sup>-1</sup>), densidad aparente ( $\delta_a$ : 1.34 g·ml<sup>-1</sup>) y de porosidad (47.68%) del jal (Tabla 4.4), son propios de sustratos con textura franco-limosa.

<sup>2</sup> Que, además, poseen bajos valores de CIC como caolinita y clorita (Tabla 4.3), minerales con baja a mediana CIC (6 a 10 y 10 a 20 meq 100 g<sup>-1</sup>, respectivamente)

**Tabla 4.4.** Algunas propiedades físicas y químicas de la muestra superficial del jal Valenciana reciente y suelo control.

Parametro	Jal	Suelo
Color	seco húmedo	gris claro gris olivo claro
Arcillas (%)	6	8
Limos (%)	52	44
Arenas (%)	42	48
Textura	franco-limosa	arcilla-arenosa
Densidad real (g·ml <sup>-1</sup> )	2.37	2.70
Densidad aparente (g·ml <sup>-1</sup> )	1.24	1.24
Porosidad (%)	47.7	54.07
pH	7.8±0.3	7.1
Conductividad eléctrica (mS·cm <sup>-1</sup> )	1.7	0.1
CIC (meq·100g <sup>-1</sup> )	2.7±0.06	17.8
Carbonatos alcalino-térreos (%)	12.80	ND
Materia orgánica (%)	0.77±0.38	5.6
Fósforo total (%)	0.08	ND

ND: no se detectó

### Extracción de metales

Los resultados de las extracciones secuenciales para el jal Valenciana reciente, indican que la mayoría de los metales determinados están adsorbidos a óxidos de Mn y Fe (Figura 4.1 y Tabla 4.5); excepto el Se, adsorbido principalmente a MO-sulfuros (50.05%), y el Mo en forma intercambiable (57.76%).

Ninguno de los elementos permanece asociado a minerales (fracción residual), excepto el Ti, presente en un 87.71% en forma residual.

La segunda fracción (carbonatos/específicamente adsorbida) representó la segunda fase en orden de abundancia de Cd (31.52%), Mn (18.87%) y Ni (16.79%), mientras que la cuarta fracción (MO-sulfuros) fue la segunda fase de Cu (39.05%), Co (27.47%), Cr (14.75%), Ni (16.2%) y Be (12.5%) (Fig. 4.1 y Tabla 4.5).

Resulta notable que la fracción intercambiable, figuró como la segunda fase en orden de abundancia de Zn (34.84%), As (27.01%), Se (15.82%) y Pb (11.93%). Así mismo, Mo, Cd, Sb y TI intercambiables también están en una elevada proporción: 57.67%, 16.83%, 18.68% y 30.14%, respectivamente (Fig. 4.1 y Tabla 4.5).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

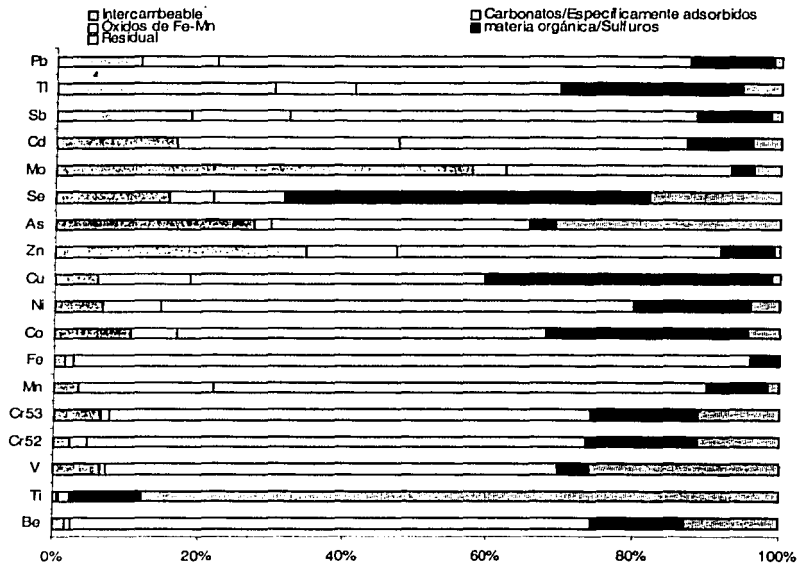


Figura 4.1. Abundancia relativa de metales extraídos secuencialmente de muestras superficiales del jal Valenciana. Porcentajes de cada fracción respecto a la concentración total. Datos: promedios

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**FALTA**

**PAGINA**

**48**

Tabla 4.5. Concentración de ciertos metales extraídos secuencialmente de la muestra superficial del jal Valenciana, antes de bioensayo. Concentración:  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Datos: promedio + dsv est (n=3)

	Be	Ti	V	<sup>52</sup> Cr	<sup>53</sup> Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Mo	Cd	Sb	Tl	Pb
I	0.012 ±0.004	0.03 ±0.01	0.28 ±0.10	0.26 ±0.11	0.38 ±0.02	18.4 ±1.56	5794 ±44.84	0.27 ±0.03	0.76 ±0.06	2.28 ±0.91	399 ±62	1.4 ±1.62	0.16 ±0.1	0.56 ±0.08	0.18 ±0.04	0.05 0	0.02 ±0.001	2.67 ±1.23
II	0.003 ±0.002	0.017 ±0.01	0.037 ±0.02	0.25 ±0.006	0.127 ±0.018	102 ±6.59	40.03 ±18.33	0.158 ±0.03	0.876 ±0.16	5.008 ±0.21	139 ±170	0.12 ±0.02	0.063 ±0.02	0.046 ±0.02	0.332 ±0.06	0.035 ±0.01	0.008 ±0.001	2.303 ±0.87
III	0.53 ±0.03	0.09 ±0.01	2.87 ±0.28	7.90 ±0.48	7.62 ±0.54	374.8 ±30	3473	1.27 ±0.14	7.26 ±0.56	15.88 ±0.99	513 ±178	1.82 ±0.02	0.10 ±0.03	0.30 ±0.02	0.44 ±0.03	0.14 ±0.01	0.021 ±0.003	14.6 ±1.04
IV	0.092 ±0.02	0.58 ±0.63	0.19 ±0.19	1.72 ±0.22	1.66 ±0.22	44.75 ±10.85	147.33 ±46.21	0.69 ±0.09	1.80 ±0.22	15.17 ±0.37	83.3 ±27.8	0.5 ±0.06	0.52 ±0.08	0.03 ±0.01	0.1 ±0.01	0.03 ±0.01	0.02 ±0.003	1.56 ±0.25
V	0.01 ±0.005	0.51 ±0.05	0.12 ±0.02	0.13 ±0.02	0.13 ±0.01	0.94 ±0.001	3.82 ±0.02	0.01 ±0	0.04 ±0	0.06 ±0.01	1.09 ±0.01	0.16 ±0.01	0.02 0	0.004 0	0.004 0	0.00 0	0.00	0.024 ±0.001
T	0.65	1.2	3.53	10.26	10.28	541	3722	2.4	10.74	38.38	1135	3.66	0.80	0.94	1.05	0.25	0.07	22.16

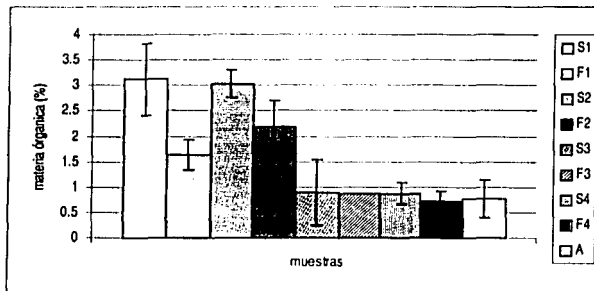
F: Fracciones: i: intercambiable, ii: unida a carbonatos/específicamente adsorbida, iii: unida a óxidos de Fe y Mn, iv: unida a materia orgánica y sulfatos, v: residual. Total: representa la suma de las cinco fracciones

TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN

## 4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE JAL DESPUÉS DE LOS BIOENSAYOS

### *Características físicas y químicas del jal*

Ciertas características del jal variaron con relación a su estado inicial. Después de 21 semanas de los BioE, sobresale un incremento muy significativo ( $p < 0.05$ ) del contenido de MO en la superficie de los tratamientos con presencia de biopelículas (tratamientos 1 y 2 ó T1 y T2, respectivamente), con relación a la muestra original, representando un incremento de hasta 4 veces más MO en los lotes con biopelículas (hasta  $3.12 \pm 0.7\%$ ) que en el control ( $0.77 \pm 0.38\%$ ), como se observa en la Figura 4.2. Solamente en T1, el contenido de MO superficial fue significativamente mayor que en el fondo del reactor.

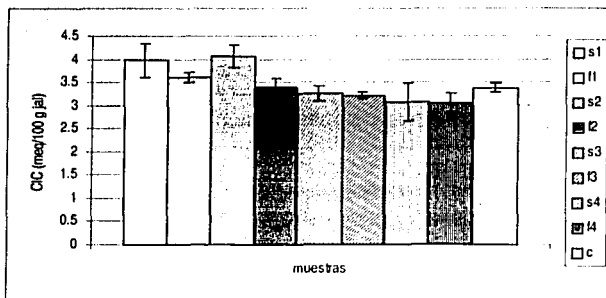


**Figura 4.2:** Contenido de materia orgánica en muestras superficiales (S) y profundas (F) del jal antes y después de los bioensayos. Tratamientos: 1 (barras punteadas), 2 (líneas horizontales), 3 (líneas inclinadas), 4 (líneas verticales) y antes de los bioensayos (A: barra blanca). Las barras representan promedios ( $n = 6$ ) y los ejes sobre las barras, la desviación estándar (dsv est)

Según Tavera (1985), contenidos de MO que fluctúan entre 1-1.9%, 2-2.9% y 3-5%, corresponden a suelos pobres, medios y ricos, respectivamente. Por lo anterior, el sustrato superficial en T1 y T2, son ligeramente ricos en MO.

La CIC también mostró incrementos significativos ( $p < 0.05$ ) en las muestras superficiales de los lotes con biopelículas, T1 y T2 (Fig. 4.3).





**Figura 4.3.** Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) de muestras superficiales (S) y profundas (F) del jal antes y después de los bioensayos, para los tratamientos 1 (barras con puntos), 2 (líneas horizontales), 3 (líneas inclinadas), 4 (líneas verticales) y del control (barra blanca). Las barras representan promedios (n= 6) y los ejes sobre las barras, la dsv est)

El pH en las muestras superficiales de T1 y T2 incrementó ligeramente ( $8.13 \pm 0.06$  y  $8.45 \pm 0.02$ , respectivamente), sin que se manifestaran diferencias significativas entre ellos, ni respecto a su valor original, antes de los BioE. No obstante, dada la sensibilidad de los microorganismos a las fluctuaciones del pH, así como el papel del pH en la dinámica de los elementos traza, esta ligera alcalinización no debe menospreciarse.

Otro cambio registrado en el jal fue su color. En los BioE con biopelículas (T1 y T2), la coloración del desecho en condiciones de humedad, pasó de gris olivo claro a gris fuerte, mientras que los demás tratamientos (3 y control) se mantuvieron gris claro. Por supuesto, la presencia de microorganismos, confirió tonalidades de verde, cian y pardo en la superficie.

La presencia de las biopelículas también repercutió en la tasa de difusión del agua. Al respecto, los resultados señalan que su desarrollo en la superficie del jal, se tradujo en menor volumen de agua drenada por unidad de tiempo que en la superficie sin biopelículas, como se aprecia en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.6.** Tasa de volumen de agua drenada ( $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) en muestras de jal Valenciana con y sin biopelículas (n=3 + dsv est)

Con biopelículas	Sin biopelículas
$1.3 \pm 0.2$ (13%)	$7.1 \pm 0.1$ (71%)

Tan notables fueron las alteraciones señaladas, como la constancia de otras características fisicoquímicas del jal, tales como el que no se registran cambios significativos

en el contenido de carbonatos alcalino-térreos en los tratamientos con relación al control y a la concentración inicial ( $p < 0.05$ ).

### ***Concentración de elementos traza del jal después de los bioensayos***

La determinación de los elementos traza por el proceso de extracción secuencial arroja resultados muy interesantes (Fig. 4.4 y Tabla 4.7). Lo primero que salta a la vista es que la proporción de las fases se mantuvo relativamente similar en ambos tiempos (antes y después de los BioE), así como un ligero descenso, no significativo, de las formas intercambiables. Los cambios más significativos se reportan a continuación.

La fase intercambiable del cobalto (Co) fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en los lotes con biopelículas al término de los BioE, respecto a su valor en el jal original (3.3% y 10.73%, respectivamente).

El Cu asociado a carbonatos se incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) al finalizar los BioE ( $15.07 \pm 2.21\%$ ) y, aunque se manifestó un descenso no significativo en la concentración de la fase intercambiable, las proporciones de las primeras dos fases, no difieren de lo hallado en el jal antes de los BioE. Adicionalmente, se registró un incremento significativo del Cu en la fase MO-sulfuros (48.44%), respecto al jal original (39%).

También las concentraciones de Cr y Ni asociados a la cuarta fracción (MO-sulfuros) fueron significativamente mayores al terminó de los BioE, respecto a la muestra original (Fig. 4.4).

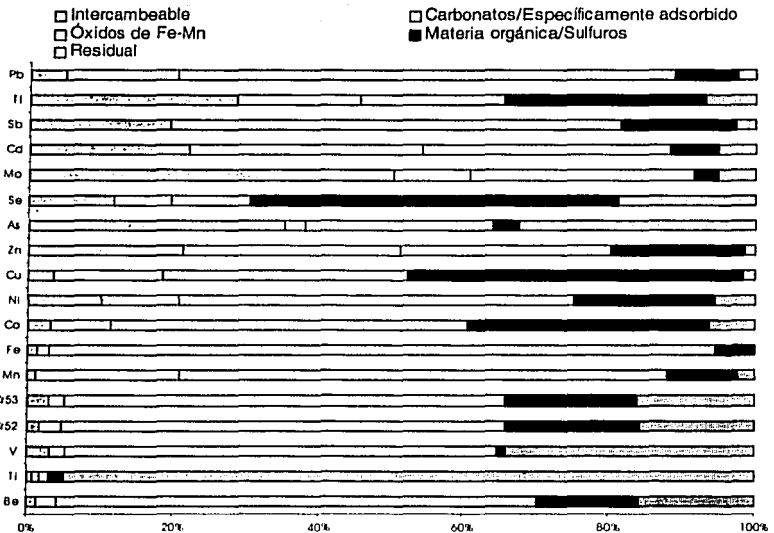
Se observó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) del Zn incorporado a carbonatos o específicamente adsorbido (Fig. 4.4).

El Ni asociado a carbonatos/específicamente adsorbido también se incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) después de los BioE (Fig. 4.4).

El As asociado a carbonatos incrementó significativamente (2.8%), mientras que el As intercambiable se mantuvo en una elevada proporción (32.69%) (Fig. 4.4).

El Pb intercambiable disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en los lotes de los BioE con relación a la muestra original del jal, 4.9% y 11.93%, respectivamente (Fig. 4.4).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 4.4.** Abundancia relativa de metales extraídos secuencialmente de muestras superficiales del jal Valenciana después de los BioE. Porcentajes de cada fracción respecto a la concentración total. Datos: promedios de los tratamientos con crecimientos de biopelículas (T1 y T2)

Como ya se dijo, las fracciones intercambiables, las más biodisponibles, no variaron significativamente en las muestras de los BioE con respecto a las originales. Las excepciones fueron Co y Pb (Figs. 4.1 y 4.4). Por lo tanto, la biodisponibilidad de algunos de los elementos extraídos secuencialmente se mantuvo sobre el 10%: Zn: 21.38%, As: 35.12%, Se: 11.79%, Mo: 50.37%, Cd: 22.03, Sb: 16% y Tl: 29.44%.

Los resultados de la Tabla 4.8 indican que los elementos traza en los lixiviados del control y de los tratamientos (T1 y T2) no presentan diferencias significativas entre sí ( $p < 0.05$ ), excepto Zn y Pb, ambos significativamente menores en los lixiviados de los tratamientos. Al comparar los tratamientos, sólo el Co en los lixiviados de T2 fue significativamente mayor que en T1 ( $p < 0.05$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 4.7.** Concentración (mg.kg<sup>-1</sup>) de metales extraídos secuencialmente de la muestra superficial del jal Valenciana antes y después de BioE. Datos: Promedios (dsv est) n=2.

	Be	Ti	V	<sup>52</sup> Cr	<sup>53</sup> Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Mo	Cd	Sb	Tl	Pb	
i	0.012 (0.004)	0.03 (0.012)	0.28 (0.10)	0.26 (0.11)	0.38 (0.02)	18.4 (1.56)	57.94 (44.84)	0.27 (0.03)	0.76 (0.06)	2.28 (0.91)	399 (62)	1.4 (1.62)	0.16 (0.1)	0.56 (0.08)	0.18 (0.04)	0.05 (0.003)	0.02 (0.001)	2.67 (1.23)	
ii	0.003 (0.002)	0.017 (0.01)	0.037 (0.02)	0.25 (0.006)	0.127 (0.018)	102 (6.59)	40.03 (18.33)	0.158 (0.03)	0.876 (0.16)	5.008 (2.21)	139 (170)	0.12 (0.02)	0.063 (0.02)	0.046 (0.02)	0.332 (0.06)	0.035 (0.01)	0.008 (0.001)	2.303 (0.87)	
iii	0.53 (0.03)	0.09 (0.01)	2.87 (0.28)	7.90 (0.48)	7.62 (0.54)	374.8 (30)	3473 (30)	1.27 (0.14)	7.26 (0.56)	15.88 (0.99)	513 (178)	1.82 (0.02)	0.10 (0.03)	0.30 (0.02)	0.44 (0.03)	0.14 (0.01)	0.021 (0.003)	14.6 (1.04)	
iv	0.092 (0.02)	0.58 (0.63)	0.19 (0.19)	1.72 (0.22)	1.66 (0.22)	44.75 (10.85)	147.33 (46.21)	0.69 (0.09)	1.80 (0.22)	15.17 (0.37)	83.3 (27.8)	0.5 (0.06)	0.52 (0.08)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.1 (0.01)	0.03 (0.01)	0.02 (0.003)	1.56 (0.25)
v	0.01 (0.005)	0.51 (0.05)	0.12 (0.02)	0.13 (0.02)	0.13 (0.01)	0.94 (0.001)	3.82 (0.02)	0.01 (0)	0.04 (0)	0.06 (0.01)	1.09 (0.01)	0.16 (0.01)	0.02 (0.002)	0.004 (0)	0.004 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.024 (0.001)	
T	0.65	1.2	3.53	10.26	10.28	541	3722	2.4	10.74	38.38	1135	3.66	0.80	0.94	1.05	0.25	0.07	22.16	
i	0.01 (0)	0.04 (0)	0.15 (0.03)	0.21 (0)	0.35 (0.06)	6.45 (0.18)	42.38 (13.9)	0.08*	1.10 (0.40)	1.47 (0.46)	275 (98.5)	2.43 (0.52)	0.13 (0.03)	0.51 (0.32)	0.25 (0.06)	0.04 (0.01)	0.03 (0.01)	0.95* (0.23)	
ii	0.02 (0.01)	0.05 (0.02)	0.10 (0.05)	0.36 (0.06)	0.24 (0.06)	104.2 (16.74)	58.95 (23.89)	0.19 (0.01)	1.25 (0.15)	6.13* (0.14)	323.7 (101.9)	0.19* (0.01)	0.09 (0.07)	0.09 (0.01)	0.36 (0)	0.06 (0)	0.02 (0.01)	2.96 (0.4)	
iii	0.50 (0.01)	0.08 (0.04)	2.92 (0.5)	7.39 (1.68)	7.20 (1.68)	361.12 (79.6)	3100 (79.6)	1.22 (0.35)	6.41 (2.32)	14.08 (4.52)	438.93 (3.26)	1.77 (0.11)	0.12 (0.05)	0.28 (0.06)	0.309 (0.12)	0.13 (0.04)	0.02 (0.01)	13.33 (3.88)	
iv	0.10 (0.01)	0.12 (0.05)	0.05 (0)	2.20 (0.26)	2.13 (0.25)	51.55 (6.8)	177 (41)	0.79 (0.04)	2.22 (0.22)	18.78* (1.73)	213.3 (105)	0.24 (0.11)	0.57 (0.02)	0.03 (0)	0.07 (0.01)	0.03 (0)	0.02 (0)	1.61 (0.17)	
v	0.01 (0)	0.56 (0)	0.17 (0.02)	0.19 (0.03)	0.19 (0.03)	1.28 (0.17)	5.46 (0.87)	0.02 (0)	0.07 (0.01)	0.07 (0.01)	1.75 (1)	0.22 (0.04)	0.02 (0)	0.0	0.01 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.05 (0.02)	
T	0.64	0.86	3.40	10.35	10.10	524.56	3383.4	2.31	11.05	40.52	1253	4.86	0.93	0.92	1.09	0.26	0.08	18.90	

Fracciones: i: intercambiable, ii: carbonatos, iii: óxidos de Fe y Mn, iv: materia orgánica y sulfatos, v: residual. Total: suma de las cinco fracciones (tratamientos: T). \*: diferencias significativas entre ambos tiempos.

**Tabla 4.8.** Concentración (mg.l<sup>-1</sup>) de metales extraídos con HNO<sub>3</sub> 1% en lixiviados de bioensayos irrigados Datos: promedios (dsv est) n=3

	Be	Ti	V	Cr <sup>52</sup>	Cr <sup>53</sup>	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Mo	Cd	Sb	Tl	Pb
T	<0.001 (0)	0.02 (0.013)	0.007 (0.004)	0.011 (0.006)	0.011 (0.006)	0.21 (0.114)	2.89 (0.19)	0.004 (0.002)	0.021 (0.013)	0.078 (0.05)	0.74 (0.142)	0.015 (0.009)	0.019 (0.02)	0.105 (0.116)	0.021 (0.026)	0.003 (0.002)	<0.001 (0)	0.02 (0.009)
Control	<0.001 (0)	0.05 (0.04)	0.02 (0.01)	0.03 (0.02)	0.03 (0.02)	0.55 (0.46)	0.76 (0.63)	0.01 (0)	0.02 (0.01)	0.09 (0.03)	1.46* (0.24)	0.02 (0.02)	0.01 (0)	0.04 (0)	0.01 (0)	<0.001 (0)	<0.001 (0)	0.04* (0.003)

\*: diferencias significativas entre tratamientos y control (p<0.05) (T: tratamientos 1 y 2. Control: tratamiento 4).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

### 4.3. MICROORGANISMOS DESARROLLADOS EN LOS BIOENSAYOS

#### *Colonización de crecimientos visibles*

*Since the Archae, in the primitive Earth,  
the surface is kept in a hospitable state for the microcosm  
Lynn Margulis*

El desarrollo de microorganismos fue observable en los BioE a los que se les adicionó agua y con muestra de jal sin esteriliza: T1 y T2, humedecidos periódicamente con agua corriente esterilizada y agua residual sintética, respectivamente.

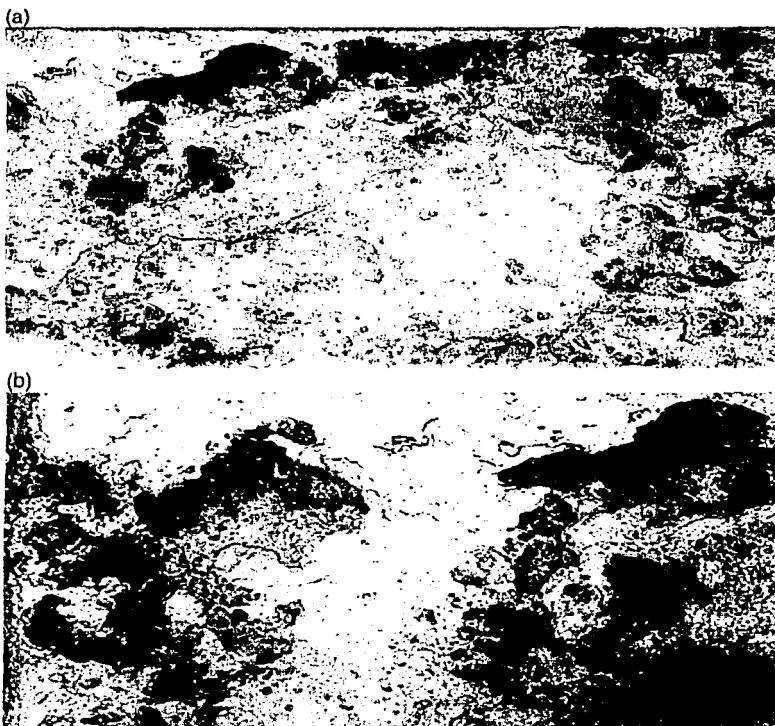


Fig. 4.5. Biopelículas autotróficas desarrolladas en superficie de jal, después de 5 semanas de iniciados los bioensayos en los tratamientos (a): T1 y (b): T2

Los crecimientos correspondieron a biopelículas fototróficas, denominadas así por ser microalgas y cianoprocariontes los microorganismos predominantes y responsables de la estructura de las biopelículas (Fig. 4.5).

También se identificaron bacterias no fotosintéticas, hongos y levaduras, que estaban asociados a las biopelículas o como constituyentes de las mismas.

Los biopelículas fotoautótrofas fueron perceptibles a simple vista 3 y 4 semanas después de dar inicio los BioE (T1 y T2, respectivamente); las levaduras fueron también evidentes, por formar crecimientos visibles, excepto *Candida* sp. El ritmo de colonización de las biopelículas sobre la superficie del desecho, fue más rápido bajo T1 que T2; pero hacia la semana 19, el área cubierta por las biopelículas fue similar en ambos tratamientos, por lo que, al finalizar los BioE (semana 21), las biopelículas cubrieron hasta el 76% de la superficie del jal en los lotes de ambos tratamientos (Fig. 4.6).

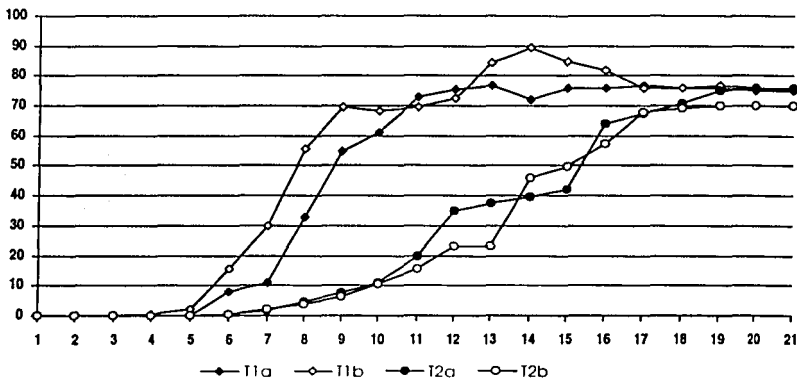


Figura 4.6. Área cubierta (%) por biotlimes sobre superficie del jal, en los lotes con crecimientos visibles y durante las 21 semanas de experimentación. T1: jal + agua corriente esterilizada. T2: jal + agua residual sintética. a y b: réplicas (n=2)

Aunque la presencia de C, N y P del agua residual sintética (T2) no fomentó un desarrollo inicial acelerado de las biopelículas fotoautótrofas, sí implicó un crecimiento

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

relativamente más temprano de las colonias de microorganismos heterótrofos, particularmente de levaduras.

**Microorganismos identificados: algas y cianoprocariontes**

*The sun lovers*

Los microorganismos fotoautótrofos que colonizaron los jales en los BioE, incluyeron 10 especies de Cyanoprokarionta, 4 especies de algas verdes o Chlorophyta y 2 de diatomeas o Bacillariophyceae (Tabla 4.9), especies presentes bajo ambos tratamientos, T1 y T2. La descripción de las especies se condensa en el Apéndice A2.2.

**Tabla 4.9.** Microorganismos fotoautótrofos desarrollos en tratamientos T1 y T2 de bioensayos sobre muestras del jal Valenciana

CYANOPROKARIOTA	CHLOROPHYTA	BACILLARIOPHYCEAE
<i>Aphanothece</i> sp.	<i>Chlorosarcinopsis</i> sp.	<i>Fragilaria construens</i>
<i>Synechococcus</i> sp.	<i>Chlorella vulgaris</i>	forma <i>construens</i>
<i>Cyanobium</i> sp.	<i>Chlamydomonsa</i> sp.	<i>Cocconeis placentula</i>
<i>Cyanothece</i> sp.	<i>Chlorococcum</i> sp.	
<i>Aphanocapsa</i> sp.		
<i>Pseudanabaena</i> sp.		
<i>Phormidium</i> sp.		
<i>Planktolyngbya</i> sp.		
<i>Anabaena</i> sp.		
<i>Borzia</i> sp.		

En orden cronológico, las primeras especie en manifestarse fueron los cianoprocariontes filamentosos de los géneros *Phormidium* y *Pseudanabaena*; en una fase posterior, sobrevino el predominio de las especies de clorofitas, destacando, por su abundancia, *Chlorococcum* sp. Finalmente, se advirtió la presencia de otros cianoprocariontes, particularmente la especie del *Anabaena*, importantes en términos ecológicos dado su papel en la fijación de nitrógeno. Cabe destacar que todos los géneros de fotoautótrofos reportados en el presente poseen representantes con formas de vida que incluyen la condición edáfica y epilítica (Anagnostidis y Komárek 1988; Bourrelly 1988; Ettl y Gärtner 1988; Novelo 1998).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Microorganismos identificados: bacterias

### Bacteria confederation

De los tratamientos T1 y T2 se aislaron y diferenciaron 16 especies de bacterias aerobias, tanto Gram positivas, Gram negativas, como Gram variables, y 2 de bacterias anaerobias Gram positivas (Tabla 4.10). Las bacterias aerobias se desarrollaron en las zonas previamente colonizadas por biopelículas autótrofas, excepto el bacilo *Actinomyces naesiundii*, que se aisló de una muestra no superficial.

Los resultados de las pruebas bioquímicas indican el requerimiento de carbohidratos simples (principalmente glucosa) como fuentes de carbono para el metabolismo aerobio. Por su parte, las bacterias anaerobias fueron negativas a las pruebas de carbohidratos simples (vr. gr.  $\alpha$  y  $\beta$ -glucosidasas); su metabolismo está relacionado con proteínas, pues fueron indol positivas, indicando la presencia de triptofanasa. Las especies de *Clostridium*, además, fueron ureasa positivas, es decir, utilizan compuestos derivados de aminoácidos con la concomitante generación de amoníaco, mientras que *Peptococcus* sp. reduce nitratos (Apéndices A2.1 y A3.2).

Tabla 4.10. Bacterias desarrolladas en los tratamientos 1 y 2 de los BioE con muestra del jal Valenciana

BACTERIAS		Tratamiento	Nexo-biopelícula	
AEROBIAS	Bacilos Gram +	<i>Actinomyces naesiundii</i>	1	-(1)
		<i>Bacillus brevis</i>	1	±
		<i>B. cereus</i>	1	±
		<i>B. pumillus</i>	1, 2	+ - ±
		<i>B. subtilis</i>	1, 2	+ ±
	Bacilos Gram -	<i>Acinetobacter</i> sp.	1	±
		<i>Klebsiella</i>	2	+
		<i>Pleisiomona shigelloides</i>	1	+
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1, 2	±
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1, 2	±
	Cocobacilos Gram +	<i>Corynebacterium</i> sp. 1	2	+ ± -
		<i>Corynebacterium</i> sp. 2	2	+
		<i>Corynebacterium aquaticum</i>	2	±
		<i>Rhodococcus</i> sp.	2	+,-
	Coccus Gram +	<i>Staphylococcus</i> sp.	1	+,-
		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	+
<i>Staphylococcus xilosus</i>		2	+,-	
ANAEROBIAS	Bacilos Gram +	<i>Clostridium</i> sp.	2	+,-
	Coccus Gram +	<i>Peptococcus</i> sp.	1, 2	+,-

+: tomada en zona de crecimiento conspicuo de la biopelícula; ±: crecimiento moderado; -: sin crecimiento

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### Microorganismos identificados: hongos y levaduras

Finalmente, se diferenciaron 5 especies de hongos y 3 especies de levaduras (Tabla 4.11). Una especie de levadura no fue identificada (morfotipo denominado "coralito"), que se caracterizó por desarrollarse en crecimientos visibles en los lotes experimentales, creciendo en colonias tipo coral (Fig. 4.7), así como por formar pseudohifas pero no esporas y por ser positivas a las pruebas de varios carbohidratos, como glucosa, arabinosa, xilosa, galactosa, lactosa, maltosa y sacarosa, entre otros. Sólo las levaduras *Candida albicans* y *Rhodotorula rubra* no mostraron estar asociadas a la biopelícula, desarrollándose en pequeñas colonias separadas, de tonos blancos y rojizos, respectivamente.

Tabla 4.11. Hongos y levaduras desarrollados en los tratamientos 1 y 2 de bioensayos con muestras superficiales del jal Valenciana

		LOTE	Nexo con biopelículas
HONGOS	<i>Aspergillus niger</i>	2	+
	<i>Aspergillus ruber</i>	2	+
	<i>Cephalosporium</i> sp.	2	+
	<i>Cladosporium</i> sp.	2	+
	<i>Fusarium</i> sp.	1, 2	+
	<i>Penicillium</i> sp.	1, 2	+
LEVADURAS	<i>Candida albicans</i>	2	-
	<i>Candida</i> sp.	1	-
	<i>Rhodotorula rubra</i>	2	+
	"coralito"	2	-

+: tomada en zona de crecimiento de biopelículas; -: zona sin biopelículas



Figura 4.7. Cultivo en Sabouraud-agar con la levadura aislada de los bioensayos (tratamientos T1 y T2). Especie no identificada: morfotipo denominado "coralito"

#### 4.4. ENSAYO TOXICOLÓGICO CON BIOPELÍCULAS AUTOTRÓFICAS DESARROLLADOS EN JAL

##### *Efectos de los metales en la producción de carbohidratos*

La concentración total de los carbohidratos extra e intracelulares de las biopelículas configuradas por cianoprocariontes y clorofitas, se incrementó proporcionalmente con el aumento en la concentración del metal adicionado al medio de cultivo (Fig. 4.8). El incremento fue más evidente en la fracción extracelular (SPE), que constituyeron la mayor proporción de carbohidratos de las biopelículas.

Después de 5 días de exposición, la concentración de SPE en controles fue de 2 a 5.6 veces menor ( $88.3 \pm 4.19 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) que en las biopelículas tratadas con metales, lo cual fue especialmente notorio para las concentraciones más altas ensayadas ( $350 \text{ a } 500 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) (Fig. 4.8). La producción intracelular, por su parte, no mostró un patrón claro, manteniéndose siempre en bajas concentraciones.

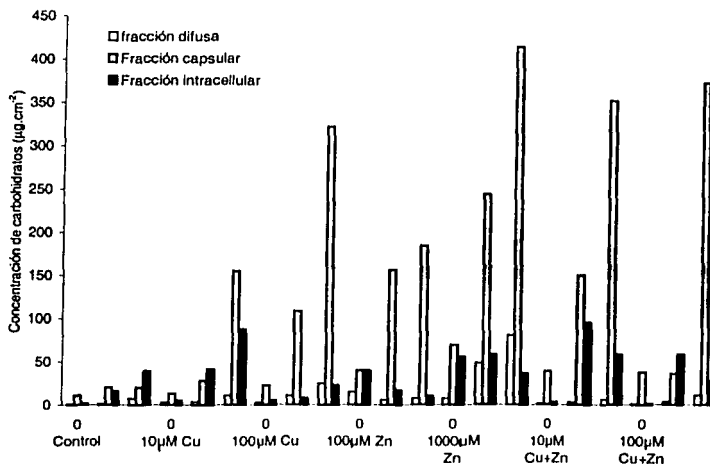


Figura 4.8. Concentración de carbohidratos ( $\mu\text{g carbohidratos}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) producidos en las fracciones "difusa" (barras blancas), capsular (barras grises) e intracelular (barras negras) en los tiempos 0 (inicio), y 1 y 5 días de exposición a los metales, para diferentes concentraciones de los metales adicionados. Control: sin metal adicionado. Datos: promedio ( $n=6$ )

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Acumulación de metales en biopelículas

Las biopelículas acumularon los metales adicionados al medio de cultivo, lo cual es consistente con el descenso en la concentración de Cu y Zn en el medio (Tabla 4.12).

La acumulación inició y fue prácticamente completa desde el primer día de exposición de las biopelículas al metal.

En la mayoría de los tratamientos se encontraron diferencias significativas entre la concentración del o los metales en el medio de cultivo del primero y del quinto día ( $p < 0.05$ ), excepto para el Cu en la mezcla Cu+Zn 100  $\mu\text{M}$ , y del Zn, en Cu+Zn 10  $\mu\text{M}$ .

En la Tabla 4.12 se aprecia también que la cantidad de metales adsorbidos por las SPE de las biopelículas, fue directamente proporcional a su concentración en el medio de cultivo.

**Tabla 4.12.** Concentración de Cu y Zn ( $\mu\text{M}$ ) en medio de cultivo después de 1 y 5 días de exposición a los metales, a las diferentes concentraciones probadas durante el ensayo de toxicidad. Datos: promedio  $\pm$  dsv est; n= 6

	Control	Cu 10	Cu 100	Zn 100	Zn 1000	Cu + Zn 10	Cu + Zn 100
<b>Cu</b>							
1 día	0	5.33 $\pm$ 1.54	27.6 $\pm$ 0.17	ND	ND	4.77 $\pm$ 0.38	33.5 $\pm$ 8.37
5 días	0	6.5 $\pm$ 0.28	22.5 $\pm$ 3.6	ND	ND	4.43 $\pm$ 0.25	18.3 $\pm$ 2.5
<b>Zn</b>							
1 día	0.03 $\pm$ 0.004	ND	ND	68.3 $\pm$ 1.27	734 $\pm$ 13.76	20.2 $\pm$ 3.22	94.6 $\pm$ 7.44
5 días	0.01 $\pm$ 0.009	ND	ND	61.4 $\pm$ 2.78	776 $\pm$ 73	13.1 $\pm$ 0.5	93.4 $\pm$ 6.85

Control: sin adición de metal al medio de cultivo. ND: no determinado

La Figura 4.9 muestra que los carbohidratos de las SPE fueron los principales responsables de la acumulación de metales en las biopelículas. Además, la Figura 4.9 permite afirmar que la adición de los metales por separado se tradujo en una mayor adsorción de Cu que de Zn, y que la adsorción fue mayor cuando los metales se adicionaron por separado que en las mezclas Cu+Zn.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

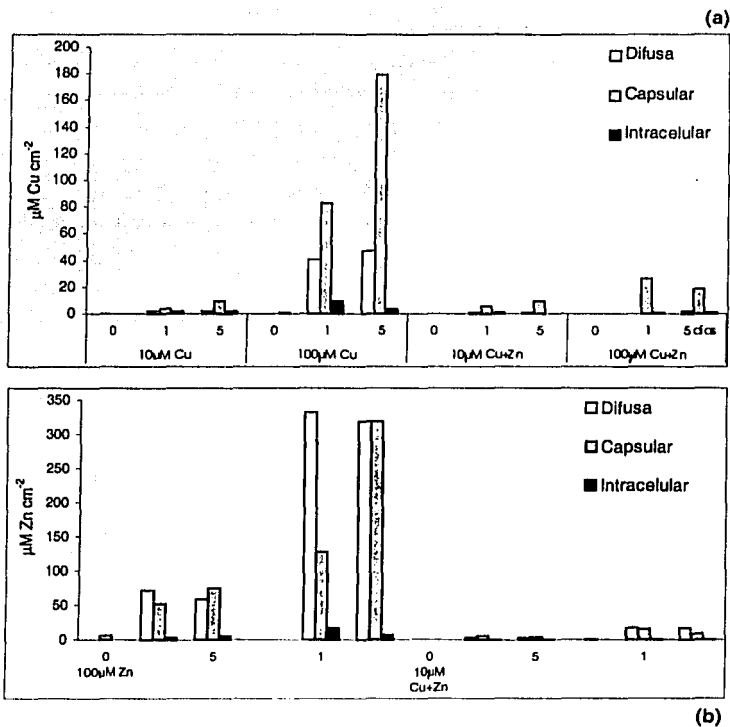


Figura 4.9. Concentración de (a) Cu y (b) Zn ( $\mu\text{g metal}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) sorbidos en las fracciones difusa (columnas blancas), capsular (grises) e intracelular (negras) de carbohidratos de biopelículas después de 1 y 5 días de exposición a las diferentes concentraciones de metales ensayadas. Control: sin adición de metal. Datos: promedios ( $n=6$ )

### Efectos de los metales en la biomasa

La biomasa se estimó como el COT y clorofila total; no obstante, esta última representó un parámetro más sensible a las condiciones experimentales que, en términos generales, tendió a disminuir cuando las biopelículas fueron expuestas a Cu (ambas concentraciones), Cu+Zn 100  $\mu\text{M}$  y Zn 1000  $\mu\text{M}$  (Fig. 4.10), sin que se manifestaran diferencias significativas entre estos resultados ( $p<0.05$ ).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

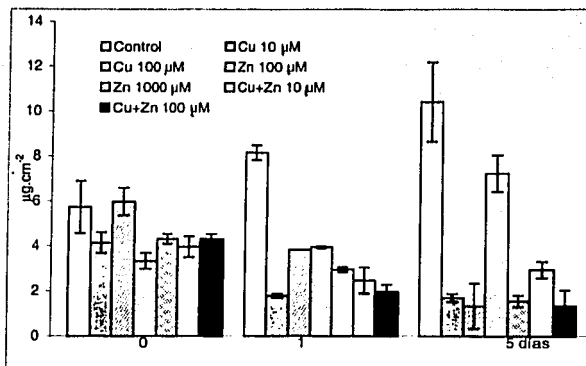


Figura 4.10. Clorofila total ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) al tiempo 0 (inicio o un día antes de la exposición al metal) y después de 1 y 5 días de exposición de las biopelículas para las diferentes concentraciones aplicadas ( $\mu\text{M}$  metal). Control: sin metal adicionado. Barras de error: dsv est ( $n=6$ )

El  $F_0$ , indicador de la contribución relativa de cada especie a la biomasa total de las biopelículas, reveló que los cianoprocariontes conforman el grupo dominante (hasta un 60%), manteniéndose más o menos estables en los ensayos con Zn y Cu+Zn. Por su parte, las biopelículas tratadas con Cu 100  $\mu\text{M}$  mostraron un cambio en la composición de especies: de una biopelícula compuesta mayoritariamente por cianoprocariontes (10.75% clorofitas en el día 0 o inicial), a una con las clorofitas como grupo dominante (99% clorofitas, en el día 5) (Fig. 4.11).

Este cambio se observó desde el primer día de exposición al Cu, haciéndose más evidente hacia el día 5. En contraste, la presencia de clorofitas se mantuvo baja en los tratamientos con Zn (hasta  $28.8 \pm 14.71\%$ ), especialmente con Zn 1000  $\mu\text{M}$  ( $6.96 \pm 0.8\%$ ), sin mostrar cambios significativos durante los cinco días de exposición (Fig. 4.11).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

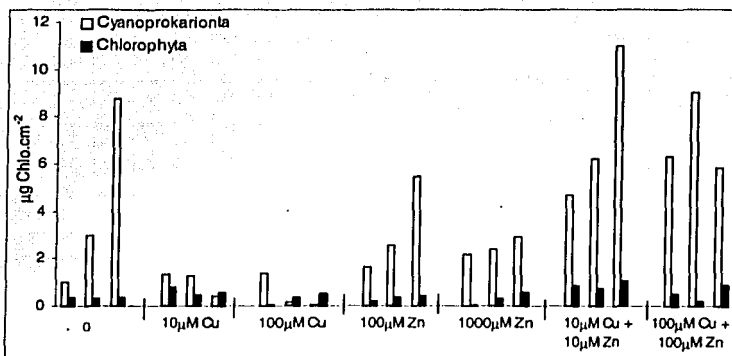


Figura 4.11. Clorofila total ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) de Cyanoprokariota (gris) y Chlorophyta (negro) biopelículas, para las diferentes concentraciones de metal ensayadas. Las columnas representan los valores iniciales (primera), del día 1 y del día 5 (segunda y tercera columna) para las diferentes concentraciones de metal. 0: control (sin adición del metal)

En las biopelículas tratadas con Cu+Zn, la composición de las especies se mantuvo sin cambios notables durante los cinco días de exposición a los metales. De hecho, la concentración de clorofila más elevada se registró en estos tratamientos, sin considerar al control (Fig. 4.11). Al parecer, la presencia de ambos metales amortiguó el efecto tóxico sobre la biomasa que cada metal tuvo al ser adicionado por separado.

#### Efectos de los metales en la actividad fotosintética

El campo cuántico máximo o capacidad fotosintética global ( $\phi_0$ ), parámetro indicador del estado metabólico de las especies, fue consistente con los resultados obtenidos para biomasa fotosintética. El  $\phi_0$  de clorofitas las ubica como más tolerantes al Cu que al Zn, mientras que los cianoprocariontes resultaron tolerantes al Zn pero sensibles al Cu, como lo indica su  $\phi_0$  (Fig. 4.12). Así, El  $\phi_0$  de las clorofitas se mantuvo más o menos constante en todos los tratamientos, pero ante Zn 1000  $\mu\text{M}$  su  $\phi_0$  bajó a valores cercanos a 0 ( $0.126 \pm 0.03$ ) (Fig 4.12a). Entre los demás tratamientos no se registraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), obteniéndose valores finales de  $\phi_0$  igual a  $0.54 \pm 0.04$  (Fig. 4.12b), que representan valores normales para algas bénticas sanas (Kromkamp *et al.* 1998). Por el contrario, el  $\phi_0$  de cianoprocariontes se incrementó con Zn, aún con 1000  $\mu\text{M}$  Zn. Sin embargo, en las biopelículas expuestas a Cu en ambas

concentraciones (10 y 100  $\mu\text{M}$ ) y a la mezcla Cu+Zn 100  $\mu\text{M}$ , se registró un fuerte descenso del  $\phi_0$  de cianoprocariontes, cercano o igual a 0, desde el primer día de exposición (Fig. 4.12b).

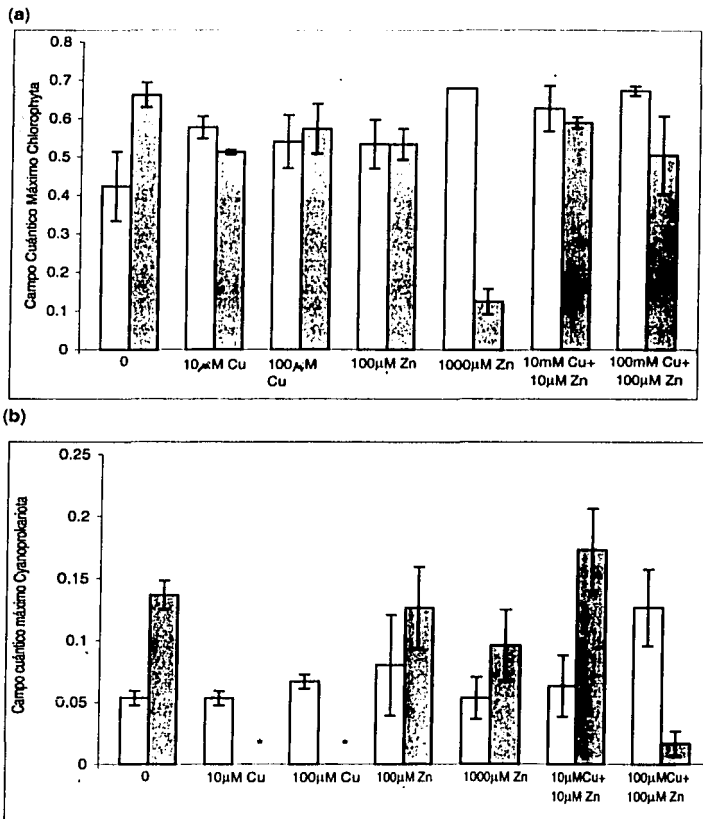


Figura 4.12. Campo cuántico máximo ( $\phi_0$ ) de Chlorophyta (a) y  $\phi_0$  de Cyanoprokarionta (b), antes de adicionar el(los) metal(es) (barras blancas) y después de cinco días (negras) de tratamiento para las diferentes concentraciones de metal ensayadas. 0: control (sin adición de metal). Barras de Error: dsv est (n=6). \*: valores de cero

Las observaciones del CLSM corroboraron la ausencia de la cianoprocarionta en los tratamientos de Cu 100  $\mu$ M, la ausencia de clorofitas ante Zn 1000  $\mu$ M y la baja fluorescencia de ambas especies ante Cu+Zn 100  $\mu$ M (Fig. 4.13).

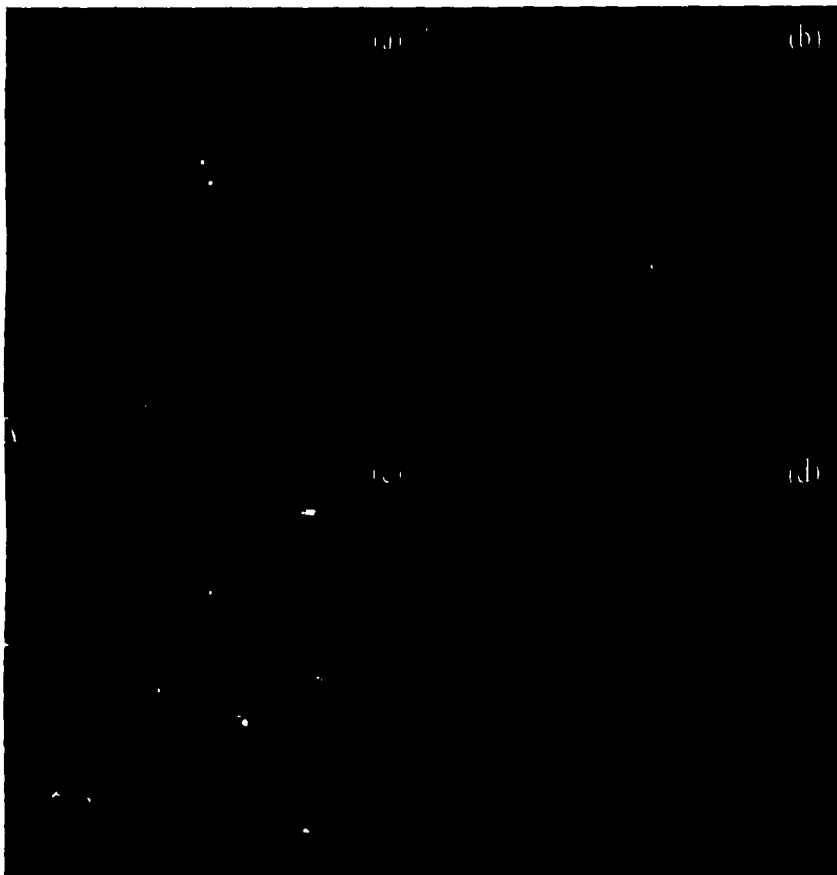
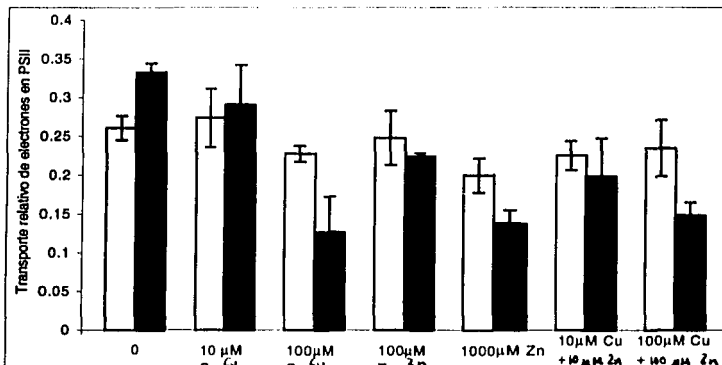


Figura 4.13. Fotografías obtenidas con el microscopio láser-confocal de barrido usando tinción Con-A, de (a) control y biopelículas tratadas con (b) Cu 100  $\mu$ M, (c) Zn 1000  $\mu$ M, y (d) Cu 100  $\mu$ M + Zn 100  $\mu$ M

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



El efecto de los metales sobre la actividad fotosintética,  $\Phi_{PSII}$ , de las biopelículas, fue menos pronunciado que el observado para la biomasa y sólo se manifestó una disminución de la  $\Phi_{PSII}$  ante las concentraciones más elevadas ensayadas (100  $\mu\text{M}$  Cu, 1000  $\mu\text{M}$  Zn y 100  $\mu\text{M}$  Cu+Zn). Cabe decir, que no se encontraron diferencias significativas entre las biopelículas tratadas ( $p < 0.05$ ), obteniéndose una  $\Phi_{PSII}$  final del 55 al 70% menor a la inicial (Fig. 4.14).



**Figura 4.14.** Transporte relativo de electrones, como medida de la eficiencia fotosintética del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) inicial (día 0; barras blancas) y final (día 5; barras negras) de biopelículas expuestas al metal en las concentraciones ensayadas. Control: sin metal adicionado. Barras de error: dsv est (n=6)

La presencia de ambos metales no se tradujo en una menor eficiencia fotosintética que en las biopelículas tratadas con un solo metal, por separado. Sin embargo, las curvas de dosis-respuesta (Fig. 4.15) sugieren que existen diferencias interesantes en el modo de acción de cada uno de los metales, por separado, y los metales adicionados conjuntamente: Ante el Cu 100  $\mu\text{M}$ , la disminución del  $\Phi_{PSII}$  delinea una curva con un descenso abrupto, típica de compuestos tóxicos muy específicos, mientras que la curva del Zn 1000  $\mu\text{M}$  indica un efecto tóxico más gradual. Por su parte, la curva de Cu+Zn 100  $\mu\text{M}$  presenta un patrón que puede calificarse de intermedio entre los casos anteriores, lo cual sugiere que el efecto tóxico de ambos metales se ve amortiguado cuando están presentes en la mezcla (Fig. 4.15). Las curvas difieren significativamente entre sí ( $p < 0.05$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

cuando están presentes en la mezcla (Fig. 4.15). Las curvas difieren significativamente entre sí ( $p < 0.05$ ).

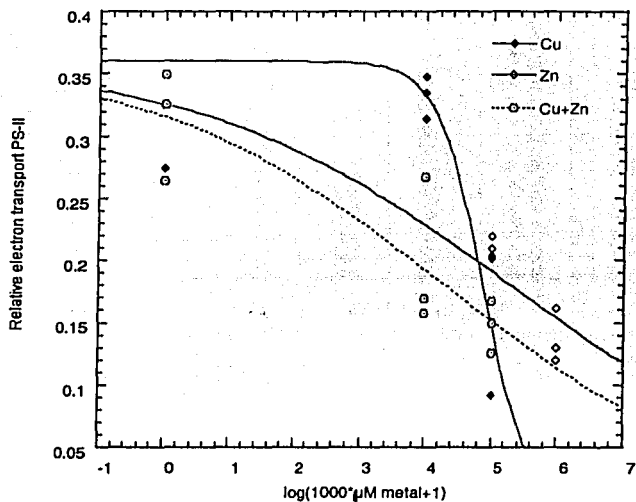


Figura 4.15. Curva de respuesta de las biopelículas a las dosis ensayadas de Cu 100µM (rombos negros), Zn 1000µM (rombos blancos) y Cu+Zn 100µM (círculos con punto central), calculadas mediante el uso de la eficiencia fotosintética  $\Phi_{PSII}$  ( $n=6$ )



**CAPÍTULO V**  
**DISCUSIONES**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Consisting of life, environment is continually regulated by life for life*  
Lynn Margulis

## 5.1. EL JAL VALENCIANA RECIENTE

### 5.1.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL JAL

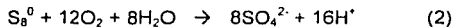
#### *Mineralogía y características físicas y químicas del Jal*

Las muestras analizadas del jal Valenciana reciente indican que se trata de un material muy heterogéneo, tipo franco limoso, constituido principalmente por cuarzo y silicatos, una elevada proporción de carbonatos, muy baja proporción de sulfuros minerales y más de 30 elementos, algunos de los cuales corresponden a metales tóxicos.

Aún cuando los desechos mineros suelen ser salinos (Nelson y Peterson 1972), la muestra del jal reveló una baja concentración de sales (Ce. 1.7 mS·cm<sup>-1</sup>, promedio), lo cual puede deberse a que se trata de un jal reciente (Ye *et al.* 2002). Estos valores de salinidad indican que las sales no dañarían a microorganismos sensibles (Richards 1974)<sup>1</sup>.

El jal es también un sustrato pobre, en el que no se propician actividades microbianas vitales para suelos, tales como la nitrificación y la amonificación (Flores-Delgadillo *com. pers*) debido al prácticamente nulo contenido de MO, propio de suelos infértiles (Tavera 1985), un exiguo contenido de P que limita el desarrollo vegetal (*in* Ye *et al.* 2002) y a una escasa capacidad hídrica de absorción y retención de cationes nutrientes, tal como lo indican los relativamente bajos valores de la CIC, posiblemente debido al bajo contenido de arcillas y coloides orgánicos (Tamhove *et al.* 1978; Donahue *et al.* 1981; Abollino *et al.* 2002). En realidad, los resultados de MO entran dentro de lo esperado, ya que una baja proporción de compuestos orgánicos es una característica intrínseca a los desechos mineros (Smith y Bradshaw 1979), al ser éstos material mineral altamente procesado.

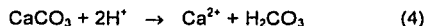
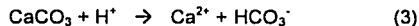
Los desechos mineros se asocian frecuentemente con sustratos generadores de drenajes ácidos, por la oxidación de sulfuros minerales (MS)<sup>2</sup> que libera al ambiente iones sulfato y protones (H<sup>+</sup>), según la ecuación general (Sand *et al.* 2001):



Sin embargo, el carácter ligeramente alcalino del jal Valenciana (pH 7.8±0.3) indica un elevado potencial de neutralización, que puede deberse a la elevada proporción de carbonatos alcalino-térreos, principalmente CaCO<sub>3</sub>, con una gran capacidad

<sup>1</sup> Richards (1974) señala que suelos con valores de Ce menores a 2.0 mS cm<sup>-1</sup>, las sales no afectan los cultivos; si, por el contrario, este valor fluctúa entre 2.0 y 4.0 mS cm<sup>-1</sup>, los cultivos sensibles son dañados por las sales

amortiguadora<sup>3</sup>, que permiten se mantengan las condiciones neutras (Lin 1997). La disolución de carbonatos minerales consume H<sup>+</sup>:



También los aluminosilicatos contribuyen a amortiguar el pH ácido.

Así, la elevada relación calcita:sulfuros del jal, 12:1, indica que cualquier acidez generada por la oxidación de sulfuros será amortiguada inmediatamente por la calcita. Por lo anterior, Bloomberg (1992) y Oelsner (2001) concluyen que la lixiviación ácida no representa un riesgo ambiental en el Distrito Minero de Guanajuato (*in Carrillo-Chávez et al.* 2003b). A conclusiones similares llegaron Chappell y Craw (2002) al explorar las características de desechos generados por el beneficio de minerales auríferos mediante cianuración, en Otago, Nueva Zelanda. Cabe agregar que el bajo contenido de sulfuros sugiere, además, que la extracción y el beneficio por flotación fueron muy eficientes (Cervantes *com. pers.*)<sup>4</sup>.

La reconstrucción mineralógica indica la presencia del material riolítico<sup>5</sup>, material de ganga y minerales alterados por la trituración. Se trata, principalmente, de minerales primarios (*sensu* Jambor y Owens 1993), como cuarzo, calcita, magnetita, hematita y sulfuros. Menos del 4% del material del residuo corresponde a minerales secundarios formados *in situ*, como yeso, caolinita y minerales arcillosos.

Los resultados de la mineralogía son consistentes con lo reportado para los yacimientos de la Veta Madre (*in Carrillo-Chávez et al.* 2003b). Los resultados de la caracterización fisicoquímica del jal Valenciana, son similares a aquellos reportados por Ramos (1991), Ramos-Arroyo y Siebe (1998) y García-Meza (1999), quienes caracterizaron jales del Distrito Minero de Guanajuato, y son similares a los reportados en otros países (Zhixun-Lin 1997; Simón *et al.* 1999; Ye *et al.* 2002).

<sup>2</sup> Sulfuros minerales como pirita (FeS<sub>2</sub>), pirrotita (Fe<sub>1-x</sub>S), arsenopirita (AsFeS) y esfarelita (ZnS), entre otros

<sup>3</sup> Se define como capacidad amortiguadora del suelo como el número de moles de H<sup>+</sup> o OH que se requieren para subir o bajar una unidad el pH de 1 g de suelo (*in Gee et al.* 2000)

<sup>4</sup> Según Chappell y Craw (2002), un eficiente proceso de beneficio por flotación (>90% de eficiencia) contribuye a generar desechos con bajo contenido de sulfuros. Esto es relativamente cierto, no debe olvidarse el tipo de yacimiento explotado

<sup>5</sup> Rocas ricas en minerales

### **Metales del jal Valenciana reciente**

Ya Basulto (1984) y Ramos (1991) habían reportado 15 de los metales detectados en este trabajo (B, Ti, Mn, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Mo, Ag, Au, Sb, Ba, Hg y Pb) en otros jales del Distrito Minero de Guanajuato. Por lo que los resultados obtenidos para Valenciana reciente, sólo confirman la presencia de tales elementos en los desechos de la región, añadiéndose 15 más al inventario. Diferentes autores reportan diferentes metales en desechos mineros. (Grimalt *et al.* 1999; Alastuey *et al.* 1999; Benvenuti *et al.* 1997; Wong *et al.* 1999), lo que refleja la variabilidad existente entre desechos de diferentes regiones, en relación de la geología y geoquímica de los yacimientos explotados. No obstante, Allan (1995) considera que Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Sn, Hg y al Pb son los componentes más comunes.

En Valenciana, destaca la elevada concentración de Zn y Se totales, los cuales rebasan los valores comunes en suelos y los límites aceptables para suelos agrícolas (*sensu* Bornemisza 1982; Allowey 1990; Kabata-Pendias y Pendias 1992; Fishbein 1995; Abollino *et al.* 2002). Las elevadas concentraciones del Zn y del Se es consecuencia de su abundancia relativa en las venas de Guanajuato (Carrillo-Chávez *et al.* 2003b)<sup>6</sup>.

Además en las muestras del jal Valenciana analizadas, Cr, Zn, Se y Cd totales están por encima de los valores estipulados en las legislaciones ambientales de Estados Unidos de América (EUA) y la Comunidad Europea (CE) (Leonard 1995), mientras que Cu y Pb intercambiables sobrepasan los límites sugeridos por la Guía Suiza para Suelos (Gupta *et al.* 1996). Por último, la presencia del Hg en intervalos por encima de  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Tabla 4.1), indica que el Hg es potencialmente tóxico, ya que la concentración de Hg en suelos debe ser  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , como máximo (Kabata-Pendias y Pendias 1992).

Al comparar con datos de otros países, se constata que la muestra superficial del jal Valenciana reciente posee concentraciones muy bajas de la mayoría de los metales analizados. En efecto, en suelos afectados por remanentes mineros del Reino Unido (RU) se han detectado hasta  $540 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de Cr (Alloway 1990) y hasta  $2570 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de Pb. (Li y Thornton 2001), mientras que en suelos de EUA con la misma vocación, se reportan hasta  $750 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de Cr (Alloway 1990). Por su parte, He *et al.* (2002) informan de hasta  $136 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de As en zonas con residuos de minas de carbón; mientras que en suelos del RU severamente dañados por actividad minera, se cuantificaron hasta  $900 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de As (*in* Kabata-Pendias y Pendias 1992). Especialmente contrastante con los resultados del

<sup>6</sup> En general, los minerales de Se asociados al Au son muy comunes

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

presente, son los hallados por Simón *et al.* (2001) en suelos afectados por el derrame de desechos mineros en Aznalcóllar, España: hasta 2175 mg·kg<sup>-1</sup> Cu, 36.8 mg·kg<sup>-1</sup> Cd, 4293.4 mg·kg<sup>-1</sup> As y 65.6 mg·kg<sup>-1</sup> de Ti.

Lo anterior no debe ser motivo de relajamiento en torno a los estudios sobre los jales mineros de Guanajuato. Por un lado, se realizó la caracterización de la zona más superficial del desecho, zona parcialmente oxidada (Carrillo-Chávez *et al.* 2003b), donde, por lo general, las concentraciones de metales son más bajas. Por debajo de esta zona, los metales tienden a ser retenidos creándose una zona de enriquecimiento (Carlsson *et al.* 2002). Por otro lado, aún a bajas concentraciones los metales ejercen efectos sobre las propiedades de las comunidades bióticas (Dahlin *et al.* 1997). Además, aunque la concentración total de un metal indica el grado de contaminación potencial, no permite inferir su potencial tóxico, ya que este parámetro no ofrece información referente a su movilidad y biodisponibilidad (Li *et al.* 1995; Gupta *et al.* 1996). Para conocer el comportamiento de los metales en el medio, es necesario conocer las formas químicas en las que están presentes, como iones libres, óxidos, carbonatos, sulfuros o estructuras cristalinas (Salomons y Forstner 1980; Morgan y Stumm 1995; Li *et al.* 1995; Li y Thornton 2001). Así, la extracción secuencial informa acerca de la proporción de metales biodisponibles o móviles (fracciones intercambiable, adsorbida a carbonatos o específicamente adsorbida) y de la proporción de metales fuertemente unidos a los constituyentes del suelo (fracción residual) (Tessier *et al.* 1979; Li *et al.* 1995). Es importante acotar, sin embargo, que la distribución de un elemento en las fases químicas de cada paso de la extracción secuencial, no necesariamente refleja la acción adsorbente de cada fase del material o matriz; cada fracción se define en términos de los reactivos empleados, por lo que deben ser consideradas como especiaciones químicas relativas y no absolutas (Tessier *et al.* 1979; Li *et al.* 1995).

### **Formas químicas de los metales del jal Valenciana reciente**

Al inspeccionar los resultados de las extracciones secuenciales (Tabla 4.5), se verifica que ninguno de los metales está fuertemente unido a los minerales de la matriz (fracción residual), exactamente lo contrario a lo que sucede comúnmente en suelos, en los que las fases no residuales se asocian a material exógeno (Balasoiu *et al.* 2001; Abollino *et al.* 2002). El único metal relativamente inerte en el desecho de Valenciana, fue el Ti. Cabe recordar que ninguno de los metales detectados (Tabla 4.1) y analizados (Tabla 4.5) está

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



asociado con los minerales detectados por DRX (Tabla 4.3). Lo anterior se explica como consecuencia del nivel de procesamiento que impacta al material durante su beneficio.

Los resultados de las extracciones secuenciales indican que la mayoría de los metales está asociado a óxidos de Fe y Mn, principalmente (Tabla 4.5). La preponderancia de metales en forma de óxidos de Fe y Mn<sup>7</sup>, relativamente insolubles al pH registrado, se explica por que tales óxidos son adeptos a metales, particularmente a pH>7.0 (Tessier *et al.* 1979), lo que sugiere que el Fe y el Mn juegan un importante papel en la adsorción de los demás cationes en el jal, especialmente el Fe, elemento mayoritario, que constituye el 1.9% de los óxidos presentes (Tabla 4.2). De hecho, Carrillo-Chávez *et al.* (2003b) proponen que las superficies de hidróxidos de Fe son las que, probablemente, ejercen mayor control en la complejación de los cationes metálicos en los desechos de Guanajuato, sin despreciar el papel que juegan la calcita y, en menor grado, los minerales de arcilla.

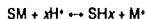
La tercera fracción (óxidos de Fe y Mn) y las dos últimas (MO-sulfuros y residual, respectivamente<sup>8</sup>) son, por lo general, las más estables, no biodisponibles para plantas (Li y Thornton 2001) siempre y cuando no se manifiesten cambios en el pH<sup>9</sup> y en el potencial rédox<sup>10</sup>. Cabe recordar que la cuarta fracción representó la primera y segunda fase en orden de abundancia del Se<sup>11</sup> y Cu, respectivamente.

La primera fase, la intercambiable<sup>12</sup>, indica que tan biodisponibles están los metales (Gupta *et al.* 1996). Así, una disponibilidad superior al 10% señala que el catión no está siendo retenido por los materiales del suelo (Kabata-Pendias y Pendias 1992). Aplicando lo anterior al desecho minero, es posible afirmar que Zn, As, Se, Mo, Cd, Sb, Ti y Pb son elementos eminentemente biodisponibles (Tessier *et al.* 1979; Li *et al.* 1995) y con un elevado potencial de lixiviarse (Gupta *et al.* 1996). Adicionalmente, se ha encontrado una fuerte correlación entre la suma de las fracciones intercambiable y unida a carbonatos con la asimilación de ciertos metales por plantas (Ma y Rao 1997; Li y Thornton 2001), de

<sup>7</sup> Recordando, la fracción de metales unidos a óxidos de Fe-Mn fueron extraídos con NH<sub>2</sub>-OH-HCl 0.04M en y ácido acético al 25% a 96°C por 6 h

<sup>8</sup> La fracción asociada a MO-sulfuros operacionalmente definida por su extracción con HNO<sub>3</sub> 0.02 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% a 65°C durante 2 h. La fracción residual, la última de la extracción secuencial se define por la extracción del residuo obtenido tras las cuatro extracciones previas con agua regia, HNO<sub>3</sub> (70%), HClO<sub>4</sub> (60%) y HF (40%)

<sup>9</sup> Bajo condiciones oxidantes, el descenso del pH propicia la solubilización de los complejos metálicos (SM), liberándose metales (M) al medio por la ecuación:



Donde x representa el número de moles o protones por ión de metal liberado.

<sup>10</sup> El potencial rédox puede cambiar directa o indirectamente el estado de oxidación de los metales; indirectamente, la forma química del ión metálico puede modificarse mediante cambios en el estado de oxidación de los ligantes -C, N, O, S (Schmitt y Sticher 1995)

<sup>11</sup> Las principales fuentes de Se en la naturaleza son los sulfuros (Fishbein 1995)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

manera que al sumar ambas fracciones, se obtienen las siguientes abundancias relativas: 18.74% del Cu, 46.98% Zn, 29.79% As, 21.9% Se, 49.06% Cd y 22.22% Pb. Estos elementos pueden ser un factor restrictivo para el desarrollo de la biota.

En resumen, si bien la mayoría de los elementos están primordialmente adsorbidos en óxidos de Fe y Mn, en primer término, y a carbonatos y compuestos orgánicos/sulfuros en segundo término, todos relativamente insolubles al pH registrado. Si el pH del desecho se mantiene circumneutro a ligeramente alcalino, los metales permanecerán en estas fracciones, inmovilizados (Morgan y Stumm 1995; Stark *et al.* 1996). Esta condición del pH es favorecida por la presencia de carbonatos.

Sin embargo, el jal Valenciana representa un riesgo ambiental dadas las bajas proporciones de metales en la fase residual, por la elevada proporción de metales en fases lábiles, no residuales, y por la presencia de, al menos, 10 elementos en forma intercambiable o movilizables ante posibles variaciones de pH y el potencial redox del sustrato (especialmente Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd y Pb). He *et al.* (2002), por ejemplo, observan que el exceso de As lábil en las minas de carbón de China está fuertemente correlacionado con concentraciones de As en aguas subterráneas.

Ciertamente, no todos los metales están en concentración superior a lo recomendable o común para suelos, pero su presencia simultánea, en adición a los metales que sí sobrepasan tales límites, puede maximizar su efecto tóxico (Fargasová 2001).

### 5.1.2. CIERTAS CARACTERÍSTICAS DEL JAL DESPUÉS DE LOS BIOENSAYOS

Pese a ser un sustrato equiparable a un suelo muy pobre en MO, rico en minerales, con una pobre estructura física, poco apta para el biodesarrollo, y con ciertos metales en concentraciones por encima de los niveles traza, el jal Valenciana fue colonizado por microorganismos durante los BioE.

Los resultados sugieren que los cambios significativos en las características químicas del jal, se produjeron como consecuencia del desarrollo de las biopelículas en los BioE, estimuladas por la adición periódica de agua. El por qué las biopelículas se desarrollaron sobre las muestras del desecho minero se explica posteriormente (sección 5.2). En la presente sección se analizarán las consecuencias de la colonización de biopelículas en ciertas características del jal.

---

<sup>12</sup> La fracción intercambiable se obtuvo mediante la extracción de metales de la muestra original con MgCl<sub>2</sub> 0.5 M a temperatura ambiente y durante 5 h

Los principales cambios en ciertas características del desecho minero, después de los BioE se resumen en la figura 5.1.

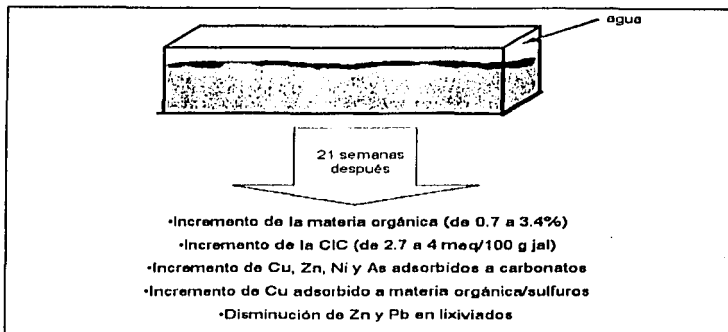


Figura 5.1. Principales cambios en ciertas características del jal Valenciana después de la colonización de microorganismos durante los bioensayos en lotes irrigados

#### **Implicaciones del incremento de la materia orgánica**

Indudablemente, la MO del jal incrementó como consecuencia de la presencia y la actividad de las biopelículas fotosintéticas en los BioE; el aumento fue de un orden de magnitud tal que la muestra de jal se tornó de pobre ( $0.77 \pm 0.38\%$ ) a ligeramente rica (hasta  $3.12 \pm 0.76\%$ ) en MO (Tavera 1985), lo que indica un proceso de fertilización natural después de 21 semanas de BioE, proceso que puede ser aplicado *in situ*. Cabe mencionar que Jahnke y Priefer (2002), al evaluar el desarrollo de las biopelículas fototróficas en zonas en proceso de remediación de minas de lignita, reportan incrementos del 4 al 12% del carbono total después de un mes y debido a la actividad fotosintética de microalgas, dada la ausencia de plantas.

Al incrementar la MO del sustrato y durante los BioE, asciende la proporción de metales en esta fracción (Abollino *et al.* 2002), lo que podría explicar por qué Cu y As adsorbidos a la MO fueron significativamente mayores respecto a la muestra original (Tabla 4.7). Balasoju *et al.* (2001) encontraron que el Cu retenido en suelos se incrementó paralelamente al contenido de MO. Lo anterior se debe a que los compuestos orgánicos presentan grupos funcionales en superficie (-OH,  $\equiv$ ROH, R-COOH), que actúan como

sitios de coordinación, formando complejos estables (Morgan y Stumm 1995), disminuyendo las formas biodisponibles de los metales (Arias *et al.* 2002; Shan *et al.* 2002) a un amplio intervalo de pH (Morgan y Stumm 1995). Entre todos los metales, el Cu posee una gran capacidad de interactuar químicamente con los compuestos orgánicos del suelo, debido a la elevada constante de formación de los complejos orgánicos de Cu (Morgan y Stumm 1995), los que tienden a acumularse en el horizonte superior (Kabata-Pendias y Pendias 1992). Algo similar podría estar sucediendo en los desechos colonizados por biopelículas. Cabe agregar que en suelos neutros y ricos en MO, se ha encontrado que el Cu tiende a estar asociado a MO y arcillas, mayoritariamente (>30%) (Schmitt y Sticher 1995).

La adición de coloides orgánicos, que deriva en una mayor superficie químicamente activa (superficie coloidal polianiónica), posibilita, a su vez, un ascenso en la CIC (Tamhove *et al.* 1978; *in* Arias *et al.* 2002), como se registró al finalizar los BioE en los lotes colonizados por las biopelículas. Respecto a la CIC, Babich y Stotzky (1985) indican que la proporción de metales intercambiables depende, en parte, de la CIC del medio y, éste, a su vez, de la cantidad de MO y minerales arcillosos. Por lo tanto, un metal en sedimentos con elevado CIC, estará menos biodisponible y será menos lixiviable<sup>13</sup>.

### ***Especies químicas de metales y desarrollo de biopelículas***

En suelos alcalinos calcáreos, los metales intercambiables suelen estar en menor proporción que en suelos ácidos (Chlopeka *et al.* 1996; Flores-Delgadillo *et al.* 1998), ya que se favorece la precipitación de metales en las fases minerales secundarias. Lo anterior redundaría en una fijación de metales en superficie de suelos (Gee *et al.* 2000), así como en la superficie de desechos mineros (Lin 1997; Newmam y Ross *in* Gee *et al.* 2000; Carrillo-Chávez *et al.* 2003a). Lo último fue especialmente evidente en el caso del Pb, ya que el Pb en lixiviados y en la segunda fracción (asociada a carbonatos) se correlacionan fuertemente. Así, el elevado contenido de carbonatos en el jal Valenciana (Tablas 4.3 y 4.4) puede estar jugando un importante rol en la fijación de ciertos metales, como el Pb.

Así, el desarrollo de las biopelículas no sólo se tradujo en una capitalización de la materia orgánica. Tan importante como ello, es el hecho de que biopelículas autotróficas

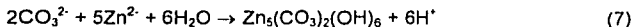
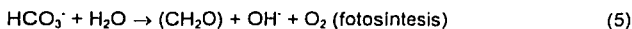
---

<sup>13</sup>Así, al incrementar la cantidad de coloides orgánicos, éstos se adsorben a las partículas minerales promoviendo la adsorción de compuestos inorgánicos hidrofóbicos y cationes metálicos. Los minerales unidos a coloides orgánicos modifican las superficies inorgánicas, cambiando el número y la carga de sitios de complejación y proveyendo, por lo tanto, de más sitios para la adsorción de metales (Arias *et al.* 2002)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

y, particularmente, la presencia de SPE, ayudan a configurar las condiciones propicias para la fijación de metales al favorecer el ascenso del pH: las SPE de las biopelículas crean un microambiente de características particulares, tales como su alcalinización durante la fotosíntesis (fijación de CO<sub>2</sub>), resultando un pH mayor en el interior y la vecindad de las biopelículas (Kuenen *et al.* 1986). Al elevarse el pH, se promueve la precipitación de metales, lo cual se traduce, en primera instancia, en una reducción de las formas solubles (Liehr *et al.* 1995), ya que un ascenso del pH favorece la adsorción de metales en la fase sólida (Parmar *et al.* 2000), así como la precipitación de cationes en formas estables, como oxihidróxidos y carbonatos (Lawrence *et al.* 1998; Rose *et al.* 1998; Parmar *et al.* 2000; Liehr *et al.* 1995). El incremento significativo (p<0.05) de Cu, As y Pb adsorbidos a carbonatos después de los BioE (Tabla 4.7) pudo ser consecuencia de esta alcalinización del sustrato superficial.

Según Lawrence *et al.* (1998) y Rose *et al.* (1998) los procesos de coprecipitación de minerales secundarios (carbonatos, oxihidróxidos) son favorecidos por la presencia de biopelículas fototróficas. Particularmente, ha sido documentado el papel de cianoprocariontes en la formación de precipitados de carbonatos metálicos (Thompson y Ferris 1990; Ferris *et al.* 1995; *in* Phoenix *et al.* 2000. Ver sección 2.5). Por ejemplo, las observaciones experimentales de Podda *et al.* (2000) sustentan la biomineralización epicelular de la hidrozincita [Zn<sub>5</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>6</sub>] inducida por la actividad fotosintética de fotótrofos presentes en las biopelículas -*Scytonema* sp. (cianoprocarionte) y *Chlorella* sp. (clorofita)- al darse una alcalinización del microambiente, dada la fijación del CO<sub>2</sub> a partir del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> disuelto y la liberación de OH<sup>-</sup>, de acuerdo a las siguientes ecuaciones:



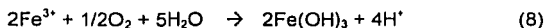
En este proceso, las SPE adsorben el Zn<sup>2+</sup> que, junto con el CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> generado, provocan una sobresaturación local respecto a la fase de carbonatos, favoreciendo la precipitación de la hidrozincita (Podda *et al.* 2000).

Además de favorecer el incremento de nutrientes (MO) y de pH, la presencia de biopelículas en la superficie del sustrato propicia la conformación de gradientes de gases como O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Liehr *et al.* 1995). Según Percival *et al.* (2000), al alcanzar un grosor de 10 a 25 μm, las condiciones en la superficie de la biopelícula se mantienen aerobias,

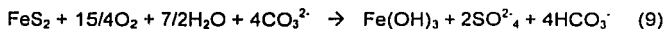
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

mientras que las de la base se tornan anaerobias. El estrato superior, fundamentalmente fotosintético y aerobio, representa una barrera que minimiza la difusión de O<sub>2</sub> hacia los estratos inferiores, así como la difusión de agua (Peppas *et al.* 2000) y, por lo tanto, la oxidación de sulfuros metálicos<sup>14</sup>. Así, por ejemplo, el Se del desecho Valenciana fue el único elemento mayoritariamente presente en la fracción MO-sulfuros (Tabla 4.7), la cual se correlacionó fuertemente con el Se total (r= 0.99). Además, no se manifestaron cambios significativos en el Se asociado a esta fracción después del BioE, respecto a la muestra de jal original, lo que parece indicar que la presencia de microorganismos oxigénicos en biopelículas, o la barrera que representa la biopelícula a la difusión del O<sub>2</sub>, no provocó la oxidación de los minerales de Se-sulfuro<sup>15</sup>.

Si bien las condiciones oxidantes en superficie favorecen la oxidación de minerales sulfurosos y la liberación de Fe<sup>3+</sup> (ecuaciones 1 y 2), hacia la base de las biopelículas (zona anóxica) y bajo condiciones de pH neutro a alcalino se favorece la adsorción de metales en la fase sólida (Parmar *et al.* 2000) y la precipitación de iones de, por ejemplo, Fe y Mn en forma de oxihidróxidos (α-FeOOH, Fe(OH)<sub>3</sub> y Mn(OH)<sub>3</sub>) o carbonatos (FeCO<sub>3</sub>, MnCO<sub>3</sub>), disminuyendo la presencia de las formas solubles (Lin 1997; Blowes *et al.* 1998):



La formación de los precipitados de Fe<sup>3+</sup> incrementa ante la presencia de carbonatos a pH circumneutro (ecuaciones 3 y 4) y la oxidación global puede ser presentada por la ecuación siguiente (Lin 1997):



La ecuación (9) indica que el ácido generado es consumido, el pH permanece circumneutro (Lin 1997) y el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> puede quedar disponible para la fijación fotosintética de CO<sub>2</sub> (ecuaciones 5-7).

Después de la precipitación de Fe<sup>3+</sup>, el As y el Zn pueden ser removidos de los lixiviados, dada su elevada capacidad para adsorberse en los hidróxidos de Fe<sup>3+</sup> (Lin 1997). Adicionalmente, sobre las superficies de los oxihidróxidos puede adsorberse Pb (Davranche *et al.* 2003). Como se indica en la figura 5.1, Zn, As y Pb lixiviados en los BioE fueron significativamente menores que en el control (ver más adelante).

<sup>14</sup> Cabe recordar que el agua y la cantidad de oxígeno en el sedimento influyen el estado rédox del mismo (Schmitt y Sticher 1995)

<sup>15</sup> Que son los minerales en los que comúnmente se encuentra el Se (Fishbein 1995)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **Lixiviación de metales en lotes de bioensayos y de control**

La lixiviación experimental del jal Valenciana no muestra cantidades considerables de los metales, representando menos del 7% de las formas totales, a excepción del Mo (>50%). Estos resultados coinciden con lo observado por Carrillo-Chávez *et al.* (2003a), quienes indican que la adsorción y complejación superficial son los factores que controlan la movilidad de los metales en jales del Distrito de Minero de Guanajuato, particularmente si se compara con lixiviados de otros tipos de depósitos, procedentes de yacimientos ricos en sulfuros (generadores de drenajes ácidos). Las bajas concentraciones de los metales a valores de pH circunneutro parecen ser característicos de depósitos de yacimientos de cuarzo-calcita (Plumlee 1999).

Sin embargo, la concentración de Zn y Pb lixiviados sobrepasan el límite máximo permisible en descargas de aguas residuales y lixiviados de suelo (5 mg Zn·l<sup>-1</sup> y 0.5 6 mg Pb·l<sup>-1</sup>) estipulados por la normatividad mexicana (NOM-001-ECOL-1996).

La presencia de biopelículas no implicó un incremento de metales lixiviados; por el contrario, favoreció la disminución de Zn y Pb, en concentraciones significativamente menores ( $p < 0.05$ ) que en los lixiviados de los lotes control (Tabla 4.8).

El Zn en lixiviados y el incremento de la MO (la presencia de biopelículas) en los BioE, se correlacionaron significativa y negativamente ( $r = -0.99$ ), indicando que la presencia de biopelículas redujo la difusión vertical de Zn, incrementándose o manteniéndose las formas adsorbidas a las distintas fracciones del desecho, particularmente en carbonatos (Zn-carbonatos, significativamente mayor en los BioE). Cabe decir que, a pesar de la significativa disminución del Zn lixiviado en los lotes con desarrollo de las biopelículas, su concentración al finalizar los BioE continuó por encima del límite máximo permitido en lixiviados de suelo.

Por su parte, la retención de Pb pudo ser consecuencia de su precipitación en carbonatos, como lo sugiere el que las cantidades de Pb en esta fracción y en lixiviados muestren una correlación significativa e inversa ( $r = -0.90$ ). Así, la presencia de biopelículas parece favorecer la precipitación e inmovilización del Pb, dada las diferencias significativas entre el control y los BioE para ambas fracciones del Pb.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El As determinado en lixiviados sobrepasó los límites de la norma mexicana ( $0.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) y se mostró muy por encima de lo recomendado para agua potable en la CE ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  As) (Battaglia-Burnet *et al.* 2002; Katsoyiannis *et al.* 2002). La presencia de biopelículas, sin embargo, disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) la proporción relativa de As lixiviado (Tabla 4.8), de 6.10% en el control al 2.18% en BioE, con el concomitante incremento de su forma biodisponible. Los resultados relacionados al As lixiviado coinciden con las observaciones vertidas por Carrillo-Chávez *et al.* (2003b), quienes alertan sobre un peligro potencial de lixiviación de As hacia agua subterráneas y cuerpos de agua superficiales de la región, con concentraciones de  $0.009$  a  $0.50 \text{ mg}\cdot\text{As}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Además del Zn, As y Pb, el Mn y Se lixiviados en control también sobrepasan los límites permitidos para agua potable de la CE (De Gregori *et al.* 2002; Katsoyiannis *et al.* 2002).

Por último, las biopelículas, pero especialmente sus SPE, favorecen también la reducción en la difusión del agua (Tabla 4.7), interfiriendo, a la larga, en la lixiviación de metales (Simms *et al.* 2000).

## 5.2. MICROORGANISMOS ASOCIADOS AL JAL VALENCIANA

### 5.2.1. COLONIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DURANTE LOS BIOENSAYOS

Con humedad suficiente, la superficie del suelo pronto es colonizada por comunidades de microalgas y cianoprocariontes en asociación con bacterias y hongos y, en los BioE con el desecho minero, los resultados obtenidos indican que la condición de riego fue necesaria y suficiente para inducir el desarrollo de microorganismos en la superficie de la muestra de jal Valenciana. Si bien el T4 también incluía riego, pero sobre una muestra de jal esterilizado, la ausencia de biopelículas en este lote confirma que los microorganismos desarrollados en los lotes no son producto de la contaminación, sino de la inoculación *ex-profeso*.

Los resultados también indican que el preestablecimiento de autótrofos favoreció el desarrollo de los microorganismos heterótrofos (bacterias y hongos)<sup>16</sup>, ya que la mayoría fueron aislados de muestras de jal previamente colonizadas por las biopelículas fotosintéticos. Se ha encontrado que ciertas bacterias dependen del carbón presente en

---

<sup>16</sup>Como se recordará, todas las bacterias aerobias determinadas respondieron positivamente a la prueba de glucosa. Los hongos, como los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, por ejemplo, requieren de MO, además de humedad (Herrera y Ulioa 1990)



las SPE de algas (Nalewajko 1977). De hecho, Jahnke y Priefer (2002) encontraron que el notable incremento en la materia orgánica como consecuencia de la actividad fotosintética, provoca el establecimiento de formas heterótrofas. Sólo las levaduras *Candida albicans* y *Rhodotorula rubra* se desarrollaron apartadas de las biopelículas y, únicamente, en lotes del T2. Lo anterior sugiere que los nutrientes adicionados en el agua fueron necesarios y suficientes para el desarrollo de ambas especies, logrando, por ello, independencia respecto a las biopelículas fotosintéticas. En el caso particular de las bacterias anaerobias de los BioE, especies ávidas por compuestos nitrogenados, su presencia se explica con relación a la de los otros microorganismos, dados sus requerimientos nutricionales. Así, la coexistencia de especies aerobias y anaerobias es viable, y lo es gracias a la estructura misma de las biopelículas, con zonas de menor difusión de oxígeno (Barranguet *et al.* 2000), por lo que la ocurrencia de ambientes microaerófilos y anaerobios es viable.

Existen pocos trabajos que den cuenta de los eventos de colonización microbiológica de sustratos afectados por contaminantes generados en la industria minera; tres de ellos, relatan la sucesión de microorganismos en zonas afectadas por desechos de minas de carbón (Lukesová y Komárek 1987; Frouz *et al.* 2001) y de lignita (Jahnke y Priefer 2002), en los que se comenta que los organismos fotosintéticos son los pioneros (ver antecedentes). El trabajo de Lukesová y Komárek (1987) se concentra en algas colonizadoras del desecho de las minas de carbón; los investigadores comparan las comunidades en relación con la vegetación presente (como parámetro temporal) y reportan que, en las etapas tempranas de la sucesión (3-6 meses, sin vegetación), las algas se desarrollan como células solitarias y esporádicas (*Chlamydomonas thomassonii* y *Chlorella vulgaris*); siendo las clorofitas las formas pioneras, mientras que el desarrollo de cianoprocariontes (tales como *Leptolyngbya edaphica* y *Nostoc* sp.) sobreviene después al cabo de año.

Así, los resultados de los BioE sólo representan una corroboración más de que los eventos de colonización en ambientes oligotróficos<sup>17</sup>, como el jal, son desatados fundamentalmente por microorganismos fotosintéticos (Booth 1941; Lukesová y Komárek 1987). Además, los resultados del presente dan cuenta de eventos de colonización más acelerados, por tratarse de un proceso *in vitro* bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad.

---

<sup>17</sup> Bajo a nulo contenido de nutrientes

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 5.2.2. LAS CARACTERÍSTICAS DEL SUSTRATO Y DE LOS MICROORGANISMOS

Cabe preguntarse por qué fue posible el desarrollo de microorganismos sobre muestras del jal, inhóspito y con metales tóxicos, en los BioE irrigados.

Si bien la biodiversidad reportada es baja, es claro que los microorganismos desarrollados en los BioE con jal son especies tolerantes a las condiciones del mismo, particularmente a ciertos metales como lo indican los resultados obtenidos de los ensayos toxicológicos. De hecho, entre los microorganismos identificados, sobresale la presencia de especies tipificadas por su relativa tolerancia a metales, tales como las bacterias *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* sp., los cianoprocariontes *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp., las algas *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum* sp., *Cocconeis placentula* y *Fragilaria construens*, y los hongos *Penicillium* sp. y *Aspergillus niger*. Algunas de estas especies ya habían sido descritas en jales de Guanajuato (Rodríguez-Vergil 1997; García-Meza 1999).

### **Tolerancia específica**

Tras ser crónicamente expuestas a altas concentraciones de Cu y Zn *in vitro*, cianoprocariontes y las clorofitas de la biopelícula del jal Valenciana, mostraron ser muy tolerantes a estos metales<sup>18</sup>. De hecho, ambos grupos de organismos han sido reportados en biopelículas de corrientes afectadas por desechos mineros (Anagnostidis y Roussomoustakaki 1988; Genter y Lehman 2000; Pawlik-Skowronska 2001) y en cultivos enriquecidos con metales comúnmente presentes en desechos mineros tales como Cu, Pb y Zn (Foster 1982; Takamura *et al.* 1990; Shehata *et al.* 1999)

Las especies de las biopelículas respondieron de manera particular ante los metales adicionados al medio de cultivo, lo cual influyó, finalmente, en su capacidad fotosintética y abundancia relativa, tal y como lo revelan los valores de  $\Phi_0$  y de  $F_0$  obtenidos con el PHYTO-PAM. En efecto, en las biopelículas expuestas al Cu, incrementó la proporción relativa de clorofitas, de magnitud tal que estas algas verdes resultaron ser el grupo dominante desde el primer día del tratamiento, mientras que el  $\Phi_0$  de cianoprocariontes

<sup>18</sup> La tolerancia de la biopelícula se toma más evidente al comparar la tolerancia a Cu y Zn de microalgas y cianoprocariontes provenientes de otros ambientes y con diferentes niveles de metales. A pesar de que el número de concentraciones ensayadas en el experimento no permiten obtener una estimación real del límite de concentración tolerable (EC<sub>50</sub>), los resultados revelan un descenso en la actividad fotosintética de tan sólo el 30 y 44% para Zn 1000  $\mu$ M y Cu 100  $\mu$ M, respectivamente, mientras que Paulsson *et al.* (2000) obtuvieron EC<sub>50</sub> de Zn 56  $\mu$ M (3.66 mg·kg<sup>-1</sup>) en penfiton expuesto a Zn en el río Göta Älv (Suecia), y Takamura *et al.* (1989)

mostró tan notable reducción que, hacia el quinto día, mostró valores de cero. De lo anterior, resultó un cambio en la estructura taxonómica original de la biopelícula, como se ha reportado en diversas comunidades de fitoplancton (*in* Babich y Stotzky 1985). Este cambio pudo deberse a que, en general, las clorofitas, especialmente las Chlorococcales, son más resistentes al Cu que los cianoprocariontes (Takamura *et al.* 1989; Takamura *et al.* 1990). De hecho, Guasch *et al.* (2002) notifican la omisión total del cianoprocarionte *Phormidium* (aislada de un río oligotrófico y calcáreo en la zona del Mediterráneo, España) en cultivos enriquecidos con Cu en concentraciones superiores a  $1 \mu\text{M}$  ( $0.064 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Por lo tanto, si un ambiente comienza a contaminarse con Cu, es de esperarse que se den cambios en la estructura taxonómica de las biopelículas residentes, de cianoprocariontes a clorofitas, como ya ha sido documentado por Soldo y Behra (2000).

Por el contrario, en los tratamientos con  $\text{Zn } 1000 \mu\text{M}$  y de la mezcla Cu+Zn, el  $\phi_0$  de clorofitas disminuyó y el de cianoprocariontes fue menos afectado, manteniéndose como el grupo dominante de la biopelícula, pues los cianoprocariontes son más tolerantes al Zn (Genter *et al.* 1987) y a la presencia de los dos metales (Genter y Lehman 2000; Shehata *et al.* 1999), aún en condiciones naturales (Guasch *et al.* 2002). En efecto, ante Cu+Zn, los resultados sugieren que el Zn atenúa el efecto tóxico del Cu para *Phormidium*, actuando como antagonista, propuesta que se refuerza en las curvas de la Figura 4.15, en las que se aprecia un descenso paulatino del  $\phi_{\text{PSII}}$  ante Cu+Zn al  $100 \mu\text{M}$ , mientras que el declive de la curva del Cu  $100 \mu\text{M}$  es abrupto.

Diversos autores han reportado la existencia de efectos antagonistas en metales (Les y Walker 1987). Particularmente, el Zn ha sido señalado como antagonista de varios metales, provocando una rápida disminución del efecto tóxico de éstos (Lee *et al.* 1994; Fargasová 2001), particularmente al Cu (Starodub *et al.* 1987). Adicionalmente, se ha demostrado que algunas respuestas contra metales tóxicos tales como la producción de fitoquelatinas en clorofitas filamentosas, es más pronunciada ante la presencia de un metal individual, que a una mezcla de metales (Pawlik-Skowronska 2001). El efecto antagonista de una mezcla de metales puede también explicar, parcialmente, la presencia de cianoprocariontes sensibles al Cu en las biopelículas del jal Valenciana con varios metales presentes<sup>19</sup>.

---

reportan una  $\text{EC}_{50}$  en la fotosíntesis de  $20 \mu\text{M}$  de Cu ( $1.27 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) y  $1000 \mu\text{M}$  de Zn ( $65.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), para fitobentos fluvial en regiones con desechos mineros

<sup>19</sup> Cabe agregar que Cu y Zn difieren en su tipo de acción, lo cual es claramente visible en las curvas de la Figura 4.13. La diferencia entre Cu y Zn se debe a la actuación tan específica del Cu, un potente inhibidor de la fotosíntesis, que inactiva el transporte de electrones en el PSII, provocando la disminución del campo cuántico (Shioi *et al.* 1978; Unbe y Stark 1982; Samson *et al.* 1988; Mohanthy *et al.* 1989). Por el contrario, el Zn opera de manera inespecífica sobre el aparato fotosintético y, por ende, sobre la actividad

### **Mecanismos de protección a metales en biopelículas**

Uno de los resultados más evidentes del ensayo toxicológico, fue el aumento en la producción de SPE, directa y proporcional a la concentración de los metales adicionados al medio de cultivo. El incremento en la producción de SPE ha sido hallado como una respuesta general de bacterias (*in* Teitzel y Párese, 2003) algas y cianoprocariontes (Les y Walker 1984; Pistocchi *et al.* 1997; Pistocchi *et al.* 2000; Jang *et al.* 2001) sometidos a estrés por metales tóxicos. La presencia de SPE eleva la posibilidad de que los cationes metálicos sean acumulados e inmovilizados extracelularmente, retardando así su ingreso a citoplasma y, por lo tanto, su efecto tóxico sobre procesos metabólicos vitales (Lombardi *et al.* 2002). Lo anterior se evidencia al comparar la concentración de Cu y Zn en la fracción celular de carbohidratos: 20 y 50 veces menos Cu y Zn, respectivamente, que en las SPE.

Entonces, se puede decir que, en efecto, las SPE son una protección efectiva contra metales en biopelículas. Esta efectividad también se indica en función de que su alta capacidad de sorber metales fue completa desde el primer día de exposición, debido a que los sitios de unión se saturan rápidamente, tal y como ha sido sugerido por Vymazal (1984) y confirmado por Harris y Ramelow (1990). Los últimos notaron que el 90% del Cu es adsorbido por las SPE dentro de los primeros 15 min de interacción y el metal remanente es adsorbido de manera más lenta.

Considerando el mecanismo general en la producción de SPE, se advirtieron diferencias importantes entre las biopelículas tratadas con los metales individuales y la mezcla de ambos, resultando en menos Cu y menos Zn sorbido por unidad de área en los últimos, que en las biopelículas tratadas con los metales agregados por separado. Lo anterior se puede explicar como efecto de la existencia de relaciones de competencia entre los iones metálicos (Crist *et al.* 1981; Arias *et al.* 2002), que resulta en una capacidad de unión diferencial a los sitios cargados, siendo mayor para el Cu que para el Zn (Kaplan *et al.* 1987; Crist *et al.* 1981; Harris y Ramelow 1990), debido a que el potencial iónico y la electronegatividad del Cu son mayores<sup>20</sup> (Arias *et al.* 2002).

---

fotosintética (Lehmann *et al.* 1999). La toxicidad del Zn se relaciona comúnmente con su interferencia en el metabolismo de fósforo, disminuyendo la disponibilidad de este nutriente, aún a bajas concentraciones de Zn (<0.05  $\mu\text{M}$  ó 3.18  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Pauisson *et al.* 2000; Pauisson *et al.* 2002). Lo último, permite aseverar que las especies del biopelícula no sufrieron estrés adicional por deficiencia de nutrientes durante los experimentos, como lo indican la concentración final de fosfatos en todos los ensayos (<0.03  $\mu\text{M}$ ) y el incremento del  $\Phi_c$  de ambas especies en los controles (Fig. 4.10) (Parkhill *et al.* 2001)

<sup>20</sup> Suponiendo que la adsorción a las SPE implica sólo interacciones electrostáticas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **Mecanismos de tolerancia en las biopelículas adaptadas a metales**

Existe una vasta literatura relativa a los mecanismos que confieren resistencia a metales a especies algales y cianoprocariontes (Capítulo II, apartado 2.3). Otra respuesta en biopelículas de hábitat contaminados con metales, es la que permite mantener una elevada eficiencia fotosintética en el PS-II (Ivorra *et al.* 2002), pese a que la biomasa se vea afectada. Es decir, es posible que el Cu, por ejemplo, induzca una reducción del contenido de clorofila, mientras que la  $\Phi_{PSII}$  no cesa del todo, como lo reportan Barranguet *et al.* (2002). Los resultados de los ensayos realizados confirman la observación anterior ya que, aún cuando parte de la biomasa de la biopelícula se perdió, los organismos que permanecieron continuaron efectuando la fotosíntesis, como lo indican los valores de  $\Phi_{PSII}$ .

Los resultados del ensayo toxicológico sustentan la hipótesis de Guasch *et al.* (2002), la cual plantea que los cambios estructurales (biomasa y abundancia relativa de los taxa) son más comunes que los daños funcionales (*v. gr.* eficiencia fotosintética) como resultado de la exposición de biopelículas a metales tóxicos<sup>21</sup>, ya que las especies que permanecen, continúan activas.

### **Comunidades tolerantes a metales**

Las observaciones anteriores se sintetizan en la hipótesis propuesta por Blanck *et al.* (1988) de que la *Contaminación Induce a Comunidades Tolerantes* (PITC, por sus siglas en inglés), y que ha sido considerada por otros investigadores, particularmente en biopelículas de ambientes acuáticos (*in* Babich y Stotzky 1985; Admiraal *et al.* 1999; Lehmann *et al.* 1999; Ivorra *et al.* 2000). Algunas investigaciones con comunidades edáficas apuntan hacia la misma dirección (Díaz-Raviña *et al.* 1994; Díaz-Raviña y Baath 1996; Baath *et al.* 1998; Giller *et al.* 1998). Cabe agregar que Díaz-Raviña *et al.* (1994) reportan tolerancia en comunidades microbianas de suelo, no sólo cuando éstas eran expuestas a un metal (como Ni, Cu, Zn o Cd), también como respuesta a la presencia de una mezcla de metales; así, observaron que el Cu inducía la tolerancia a Cu, pero también a Ni, Zn y Cd, aunque no a Pb. Algo similar podría suceder en las biopelículas del desecho minero.

<sup>21</sup>Ensayos toxicológicos con fitoplancton, por ejemplo, han demostrado que existe la sensibilidad a metales varía notablemente entre las diferentes especies y que al incrementar la concentración del metal en el medio, se verifican cambios en la composición (cambios estructurales), siempre que el metal esté en concentraciones que no afecten las funciones básicas, como la fotosíntesis (Gustavson *et al.* 1999)

El desarrollo de microorganismos en el desecho minero también puede ser explicado dada su capacidad de crecer asociados, creando un microambiente particular, tal como la biopelícula fototrófica. Los resultados indican de que las biopelículas que se desarrollaron *in vitro*, sobre la muestra del jal, gozan de una relativa biodiversidad microbiana, especialmente en cuanto a tipos metabólicos (autótrofos y heterótrofos, aerobios y anaerobios). Ello es relevante en términos ecológicos, ya que la agregación de microorganismos maximiza las capacidades metabólicas<sup>22</sup> debido a interacciones interespecíficas (Sutherland 1999). Justamente, se sabe que los productos extracelulares de cianoprocariontes y algas (ácidos orgánicos, carbohidratos, compuestos nitrogenados y vitaminas, principalmente) mantienen selectivamente el desarrollo de una gran variedad de bacterias (Nalewajko 1977)<sup>23</sup> <sup>24</sup>. Se sugiere entonces, que la estancia y el devenir de los microorganismos de los BioE, también resulta de su potencialidad de conformar unidades dinámicas o biopelículas, con propiedades emergentes particulares como son las interacciones descritas, de interdependencia, y que reflejan cierta madurez y estabilidad del sistema biológico. Adicionalmente, las biopelículas fototróficas actúan como reservas de nutrientes y energía<sup>25</sup>, por lo que son el sustrato ideal para el desarrollo de microorganismos de niveles tróficos más complejos.

En general, las relaciones interespecíficas modifican la reacción de las especies a la presencia de tóxicos en el ambiente (Bérard *et al.* 2002).

Por tanto, dado su hábitat original y considerando la permanencia de formas tolerantes, fotosintéticamente activas, se infiere que la elevada tolerancia a metales en las

<sup>22</sup> Se optimiza la utilización de los recursos mediante enzimas (rutas metabólicas) complementarias; los productos de desecho de un tipo de microorganismo pueden ser fuente de energía para otro (Margulis y Sagan 1986)

<sup>23</sup> Particularmente interesante, y un buen ejemplo de una relación simbiótica, es la liberación de vitamina B<sub>12</sub> y tiamina (por *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp.) que estimulan el crecimiento de ciertas diatomeas y clorofitas (Fogg 1962; Nalewajko 1977). *Rhodolorula* y *Candida*, los géneros de levaduras más comunes de la naturaleza, son también importantes productores de vitaminas del complejo B, que adicionan al ambiente (Herrera y Lilloa 1990). Claro está, algunas secreciones celulares inhiben el desarrollo de otros microorganismos; tal es el caso de antibióticos como la penicilina y la estreptomycinina, a los cuales los cianoprocariontes son muy sensibles (Skujins 1992)

<sup>24</sup> Respecto a las interacciones tróficas, las especies fotosintéticas aseguran el abastecimiento de carbohidratos, fuente de energía durante la respiración aerobia y el metabolismo anaerobio, pero que son eficientemente oxidados hasta CO<sub>2</sub> por especies aerobias, gracias a la producción de oxígeno. Entre tanto, las bacterias secretan polisacáridos en cantidades tales que pueden exceder su biomasa y son aprovechados por los otros grupos microbiológicos. Por su parte, *Pseudomonas* participan en la reducción de nitratos y algunas *Bacillus* fijan nitrógeno, mientras que las bacterias tipo cistostidio dotan de compuestos nitrogenados mediante el catabolismo de proteínas. Simultáneamente, los cianoprocariontes fijan nitrógeno atmosférico. Los hongos, por su parte, liberan alcoholes, ácido orgánicos, polisacáridos, enzimas, todos valiosos para la fermentación, la pultrificación y otros procesos de descomposición bacteriana. El que bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* figuran como parte del microcosmos asociado al jal, es muy alentador, dado el papel ecológico que juegan en suelos, como su capacidad de descomponer casi cualquier tipo de compuesto orgánico, como azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes y hasta compuestos cíclicos. Particularmente *Bacillus*, importantes pobladores del suelo, pueden descomponer recias sustancias de origen vegetal, incluyendo celulosa, pues se sabe que los metales inhiben la tasa de descomposición de ciertos compuestos orgánicos (*in Chew et al.* 2001)

<sup>25</sup> Función debida a las SPE, principalmente, que retienen y acumulan nutrientes; ver antecedentes 2.3

biopelículas del jal Valenciana es consecuencia de las presiones de selección que operan en el hábitat original, en concordancia con el concepto de PICT (Blanck *et al.* 1988), tanto como de su capacidad de desarrollarse en biopelículas, donde cohabitan especies tolerantes y sensibles a metales, sustentados por la actividad fotosintética. Los principales constituyentes de biopelículas, las SPE, representan un importante mecanismo de tolerancia contra metales tóxicos. Esta tolerancia hace de las biopelículas potenciales agentes para la remediación del desecho minero.

### 5.3. PROPUESTA PARA LA BIORREMEDIAÇÃO DEL JAL VALENCIANA

#### ***Características estructurales del jal Valenciana: implicaciones para su biorremediación***

Un sistema dinámico como el suelo, representa un proceso continuo de interacciones entre sus tres principales componentes: compuestos inorgánicos, orgánicos y comunidades microbianas. El jal, que no es un suelo, sólo posee el primero y pobremente estructurado; por lo que las oportunidades para el desarrollo exitoso de comunidades vegetales como una propuesta de remediación, son prácticamente nulas. Además, el jal Valenciana es un sustrato infértil y, bajo las condiciones originales, continuará presentando problemas de fertilidad, dado los valores registrados de la CIC, por lo que la adición de fertilizantes tampoco es de utilidad en el corto plazo.

Algunas propuestas sugieren fertilizar los desechos. Los resultados de esta investigación indican que ello es inoperante, ya que se dará una pérdida de los nutrientes por lixiviación. Propuestas más específicas consideran adicionar materia orgánica proveniente de aguas negras o residuales. Aunque los resultados no permitieron llegar a una conclusión al respecto, se considera que adicionar aguas residuales es particularmente riesgoso, no sólo porque contienen cantidades significativas de metales, provocando problemas de contaminación a veces irreversibles (Khan y Scullion 2002); además, se ha observado en suelos que la aplicación de aguas negras acelera la pérdida de C y la lixiviación de nitrógeno, eleva la concentración de las fracciones lábiles de metales, particularmente de las formas biodisponibles dada la conformación de complejos orgánicos muy inestables y solubles, así como la solubilización y lixiviación de metales, sobre todo en épocas de lluvia (Stacy *et al.* 2001; Wilden *et al.* 2001; Kaschl *et al.* 2002; Khan y Scullion 2002).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Adicionalmente, el jal Valenciana presenta, al menos, 18 metales, la mayoría de los cuales se encuentran en fracciones no residuales, por lo que existe un potencial tóxico inminente, mientras que las fracciones intercambiables de Zn, As, Se, Cd y Pb reflejan claramente que se trata de metales potencialmente biodisponibles. Por último, se constató la presencia de Hg en el intervalo de  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

En síntesis, la elevada disponibilidad de ciertos metales, el bajo contenido de materia orgánica y la pobre estructura física del desecho minero son los principales impedimentos para el establecimiento y desarrollo de plantas, como también lo advierten Bradshaw y Chadwick (1980) y Ye *et al.* (2002). Las plantas, además, acumulan metales en sus tejidos, particularmente en raíces y tallos, y también en semillas (Ernst 1988; Madejón *et al.* 2002; Rai *et al.* 2002)<sup>26</sup>. Finalmente, la acumulación de metales maximiza los efectos tóxicos de los mismos vía cadenas alimenticias.

La remediación del jal requiere, entonces, de seres vivos que gocen de una relativa independencia respecto al abasto de nutrientes, que desaten la generación de MO (fertilización natural), propicien la fijación de metales tóxicos y que reaccionen favorablemente a la presencia simultánea de las diferentes fracciones de tales elementos. Una vez consolidada esta cobertura orgánica, el desecho es susceptible a la colonización exitosa de especies vegetales.

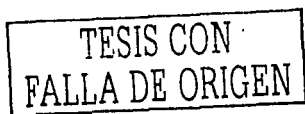
### **Uso de biopelículas para la remediación del jal Valenciana**

La elevada tolerancia de las biopelículas a las condiciones del jal, particularmente a la presencia de metales tóxicos, los hacen potenciales agentes para la remediación del desecho minero.

Las propiedades emergentes de la biopelícula, particularmente las ligadas a la secreción de las SPE, también hacen de éstas candidatas idóneas para subsanar la pobre estructura física del jal Valenciana, ya que las SPE unen las partículas del suelo en una capa única y consolidada (Zulpa de Caire *et al.* 1997), contribuyen a reducir la erosión de partículas así como a menguar la difusión vertical de agua, incrementan, a su vez, la

<sup>26</sup> Rai *et al.* (2002) dan cuenta de la acumulación de Cr, Cd, Pb y Cu en semillas de *Euryale ferox*, proceso correlacionado con la concentración de estos metales en el sedimento y en charcos

<sup>29</sup> Chinampas, del Náhuatl *Chinamil* (tejido de ramas y caña) y *pan* (encima de) terreno de corta extensión en los lagos de la Cuenca de México, donde se cultivan flores y legumbres





expansión hídrica de manera horizontal en el área que ocupe la biopelícula. Especialmente importante para el jal, un material pobre y susceptible de permanecer infértil, fue el incremento de MO y la CIC: la fertilización natural del jal, representando una consecuencia más de la presencia de estas unidades biológicas.

La producción de SPE puede favorecer el establecimiento de gradientes físicos y químicos que propicien la biomineralización y precipitación de minerales. De hecho, las SPE participan en la biomineralización, secuestrando metales (Phoenix *et al.* 2000, Podda *et al.* 2000; ver sección 2.4). Así, las SPE y las costras biominerales pueden estar actuando de manera recíproca, maximizando el importante papel que las SPE juegan en el devenir de la biopelícula, particularmente en su acción protectora en ambientes extremos (*v. gr.* elevada irradiación solar, períodos largos de sequía), y por su acción desintoxicante y de protección contra metales (Stauber y Florence 1987; Lawrence *et al.* 1998; Admiraal *et al.* 1999; Wilson *et al.* 2001).

Se juzga entonces, que el desarrollo de biopelículas es el primer paso de la remediación de jales, como detonador del establecimiento de redes tróficas más complicadas. Éstas, además, representan un mecanismo de remediación no agresivo para el ambiente y que impide cambios bruscos en el ecosistema, lo que lo hace aún más atractivo (Brierley *et al.* 1989; García-Meza 1999). Así una unidad dinámica, con propiedades emergentes que:

- Promueve el incremento de materia orgánica
- Genera gradientes químicos y condiciones físicas para la precipitación de metales
- Favorece la biomineralización de metales
- Limita la difusión de agua y de oxígeno
- Consume la producción de acidez
- Retiene metales en forma de complejos orgánicos o adsorbidos en SPE
- Es relativamente autosuficiente una vez desarrollada

Representa una excelente opción para remediar desechos mineros, configurando un sistema cuaternario de microorganismos-MO-metales-minerales, en una vasta orquestación de reacciones que controlan la movilidad de los metales, a valores de CIC, potencial rédox y pH dados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Surge, ciertamente, la pregunta de por qué las biopelículas no se desarrollan de manera espontánea y considerable sobre los desechos mineros. Se sugiere que los factores limitantes son la radiación solar directa, que provoca elevadas temperaturas en la superficie del sustrato, y la nula humedad durante el período de estiaje. En efecto, en los períodos de lluvia es posible constatar la presencia de incipientes biopelículas fotoautótrofas y se han observado biopelículas en jales antiguos y localizados en microclimas favorables para su desarrollo: cañadas con una mayor humedad ambiental relativa y presencia de plantas proveedoras de sombra (Sosa-Luna 1995; García-Meza 1999).

Una propuesta interesante para la remediación de jales, se ha denominado *chinampas-jal*<sup>29</sup> (Sosa *com pers.*), que no implica la producción de cultivos para su consumo, sino un sistema de manejo para fomentar el crecimiento de microorganismos en aquellas fracciones de los jaleros que han sido abandonados. Las *chinampas-jal* tendrán tres características fundamentales: (a) la superficie del jalero será parcelado en recuadros de dimensiones adecuadas para su fácil manejo; (b) un sistema de canaletas impermeabilizadas en torno a cada parcela que posibiliten el riego por goteo, muy somero, para mantener cierto grado de humedad, y (c) agentes que generen sombra y participen mitigando la pérdida de humedad por evaporación. Los fotoautótrofos se desarrollarán con el aporte periódico de agua en torno a las *chinampas-jal*. Los demás microorganismos lograrán su desarrollo gracias a la presencia de los pioneros. Cabe añadir que Stark *et al.* (1996) recomiendan emplear caliza como sustrato principal en labores de restauración de zonas afectadas por metales, para que el pH no disminuya, se mantenga bajo el potencial rédox y los metales libres formen carbonatos, reduciendo así su biodisponibilidad. Es justo recordar que el jal de Valenciana no requiere de carbonato adicional<sup>30</sup>, ofreciendo de manera natural los beneficios descritos.

---

<sup>30</sup> La zona aledaña al jal Valenciana posee características calcáreas; de hecho, hay vestigios de homos antiguos de cal (Cervantes *com. pers.*)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **CAPÍTULO VI CONCLUSIONES**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

*Para que comience la vida, se necesita una rica red de relaciones facilitadoras.*

*Se trata de cooperación, ayuda, enriquecimiento mutuo.*

*No es un mal modelo para principiantes!*

*Brian Goodwin*

## 6.1. CONCLUSIONES

Las muestras superficiales del jal Valenciana reciente es un material heterogéneo, altamente procesado, no consolidado y conformado principalmente por cuarzo y silicatos diversos. Su elevada proporción de carbonatos y bajo contenido de sulfuros indican un bajo potencial de generar drenajes ácidos (carbonatos:sulfuros, 12:1). Además, posee baja proporción de sales, bajo contenido de materia orgánica y baja capacidad de intercambio catiónico.

El material presenta 18 metales traza, algunos potencialmente tóxicos y presentes en concentraciones que sobrepasan los límites permitidos para suelos en las legislaciones de algunos países de la CE: Zn, Se, Cr y Cd totales y Cu y Pb intercambiables. En la legislación nacional no se estipulan los límites permitidos de la mayoría de los metales (formas totales) para suelos y no existe una legislación que defina los límites de las formas biodisponibles.

Los metales se presentan en formas no residuales, químicamente activas, principalmente asociados a la fracción de óxidos de Fe y Mn. Adicionalmente, Zn, As, Se, Mo, Cd, Sb, Tl y Pb intercambiables están en proporciones por encima del 10%, es decir, poseen un elevado potencial de ser asimilados por la biota.

Los resultados sugieren que la especiación de los elementos en el residuo minero Valenciana está gobernada por reacciones superficiales de complejación en compuestos inorgánicos como carbonatos, óxidos y sulfuros, dada la baja proporción de elementos lixiviados.

A pesar de ser un sustrato inhóspito y potencialmente tóxico, se desarrollaron biopelículas fotosintéticas en la superficie de las muestras del jal Valenciana. Éstas incluyeron 6 especies de algas y 10 de cianoprocariontes, entre las que se destacaron, por su abundancia y permanencia, los cianoprocariontes Oscillatoriales (*Phormidium* y *Pseudanabaena*) y las clorofitas *Chlorococcum* sp. y *Chlorella vulgaris*. También se constató la presencia de bacterias aerobias (16 especies), bacterias anaerobias (2 especies) hongos (5 especies) y levaduras (3 especies).

Las biopelículas colonizaron la superficie del jal en los bioensayos hasta cubrir el 76% del área durante 21 semanas, favorecidas por el aporte periódico de agua y las condiciones relativamente estables de los bioensayos (humedad, temperatura e incidencia de luz). La adición de nutrientes (C, N, P) en el agua de riego, no se tradujo en cambios significativos en la diversidad microbiana.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La presencia de biopelículas implicó alteraciones en ciertas características de un ambiente alterado *per se*, como un incremento en el contenido de materia orgánica del jal, superior al 200%. Lo anterior indica el activo papel de los microorganismos en la capitalización de nutrientes.

Se sugiere que las condiciones microambientales que controlan la especiación de la mayoría de los metales no son alteradas por la presencia de biopelículas, como lo indican los resultados de las extracciones secuenciales antes y después de los BioE. Los cambios más significativos después de los bioensayos implican a metales muy tóxicos:

- (i) incremento de Ni, Cu y As adsorbidos a carbonatos/específicamente adsorbidos,
- (ii) incremento de Cr, Ni y Cu adsorbido a MO-sulfuros,
- (iii) disminución de las formas intercambiables de Co y Pb,
- (iv) incremento de la forma biodisponible del As, y
- (v) disminución de las concentraciones absolutas de Zn y Pb y la proporción relativa de As en los lotes colonizados por biopelículas.

Pese a la disminución de Zn y As lixiviados en lotes colonizados por biopelículas respecto al control, sus concentraciones continuaron por encima de los límites permitidos por las normas mexicanas para lixiviados de suelo.

Los resultados anteriores sugieren que el desarrollo de biopelículas contribuye a disminuir el potencial tóxico del desecho minero. La movilidad de metales, sin embargo, requiere de un análisis más exhaustivo de las condiciones del medio y en diferentes estratos. Particularmente, se debe evaluar el efecto de la presencia de los microorganismos en el pH y las condiciones oxido-reductoras del desecho, pues éstas propician la absorción, adsorción, desorción y coprecipitación de metales en las diferentes fases mineralógicas, tales como los oxihidróxidos, sulfuros y carbonatos. Así mismo, se recomienda hacer análisis minuciosos de los productos de alteración microbiana (complejos metálicos formados durante el procesos de recolonización) mediante pruebas microscópicas (microscopio de barrido, microscopio de fuerza atómica o CLSM) y espectroscópicas para describir la dinámica de los metales a lo largo de los estratos (Monroy *com. pers.*).

Las biopelículas son una unidad ecológica integral, que representan un paradigma de la optimización de los recursos en condiciones extremas. Sus características intrínsecas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

posibilitan la residencia de microorganismos sobre la superficie del jal Valenciana, pese a las características del mismo en términos de nutrientes y presencia de elementos tóxicos. Los resultados de toxicidad sustentan la propuesta de esta investigación, de que la elevada tolerancia de los fotoautótrofos en biopelículas emana como propiedad emergente de una unidad dinámica, la *biopelícula* en sí, y no como la suma de las tolerancias individuales de los microorganismos integrantes, al crearse una estructura gelatinosa que protege contra los metales, vía la secreción de SPE, donde los metales son inmovilizados extracelularmente.

El activo papel en la fertilización natural del desecho, la reducción de la filtración de agua, la disminución de la lixiviación de Zn y Pb, así como su tolerancia a los metales, hace de las biopelículas potenciales agentes para desatar la remediación del desecho minero, como detonadores y catalizadores del incremento de la biodiversidad y el futuro establecimiento de redes tróficas más complejas. Además, las biopelículas, como una cobertura orgánica que propicia la agregación de partículas, contribuyen a mitigar la dispersión de partículas superficiales (erosión eólica). Esto tiene importantes implicaciones de salud pública, al atenuarse la propagación del jal sobre poblaciones aledañas.

## 6.2. PERSPECTIVAS

Aún existen grandes dudas acerca de la diversidad y el papel que juegan los distintos grupos de microorganismos presentes en sitios con residuos mineros expuestos a condiciones semiáridas y condiciones cercanas a la neutralidad, donde la alteración químico y/o biológica de los compuestos metálicos pudieran favorecer la movilidad/fijación de metales (Monroy 2001). Documentar tal diversidad y profundizar en el estudio del efecto que los microorganismos y sus productos metabólicos tienen sobre los metales y los minerales metálicos (oxihidróxidos, sulfuros, carbonatos) es, a mi parecer, la principal línea de investigación que debe seguirse para la formulación de propuestas de remediación de zonas afectadas por jales.

En el presente trabajo he hecho énfasis en que las biopelículas son unidades dinámicas, como lo es también el suelo y los ecosistemas. Ciertamente, el primero (biopelícula) y el tercero (ecosistema), representan dos niveles de organización biológica, se trata, en última instancia, de sistemas complejos y dinámicos. Por su parte, el suelo es

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En el presente trabajo he hecho énfasis en que las biopelículas son unidades dinámicas, como lo es también el suelo y los ecosistemas. Ciertamente, el primero (biopelícula) y el tercero (ecosistema), representan dos niveles de organización biológica, se trata, en última instancia, de sistemas complejos y dinámicos. Por su parte, el suelo es un tipo particular de ambiente que, entre otros atributos, sustenta la vida en el medio terrestre.

Si bien el jal minero no es un suelo, al ser colonizado por las biopelículas, adquiere nuevos rasgos, los derivados de las interacciones de microorganismos con los componentes inorgánicos del jal. Además, el suelo es la meta hacia la cual la remediación de un jal debiera estar siempre apuntando. En este contexto, propongo el desarrollo de las siguientes líneas de investigación:

- Analizar el efecto de la colonización de microorganismos en la especiación de metales a lo largo de gradientes fisicoquímicos, empleando columnas y comparando con lotes no colonizados
- Analizar el efecto de biopelículas en características del jal tales como las condiciones óxido-reductoras y el pH del desecho en los diferentes estratos
- Analizar los productos de alteración microbiana mediante pruebas microscópicas y espectroscópicas
- Evaluar el papel de las SPE en los procesos de biomineralización y precipitación (fijación) de metales
- Intensificar los estudios sobre el efecto de los metales en la actividad metabólica de las comunidades microbianas desarrolladas en desechos mineros
- Profundizar en la identificación de las especies, con el objetivo de elucidar el papel que juegan en el proceso (generación o descomposición de materia orgánica, oxidación o reducción de minerales, volatilización, biomineralización o solubilización de metales)
- Ensayar el pretratamiento de los jales, aprovechando la capacidad de las biopelículas de adsorber, precipitar e inmovilizar metales (solubilización, adsorción, absorción o precipitación y floculación) en sistemas biológicos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 6.3. CONSIDERACIONES FINALES

El ecosistema es un sistema abierto, dinámico y complejo, que responde a factores multivariados, siempre cambiantes, conformado por elementos que interactúan en complejas tramas de diversa naturaleza como ciclos biogeoquímicos, redes tróficas, dinámicas demográficas, entre otros. Dichos tejidos son enlaces que interconectan a las partes constituyentes y representan, a su vez, mecanismos estabilizadores del sistema, que posibilitan su devenir, en tanto su integridad se mantenga. Por consiguiente, el principal cometido de la remediación es el de lograr restablecer estos mecanismos, propiciando la sucesión, gracias a la presencia y permanencia de los elementos que lo posibiliten (Cairns 1991; Atkinson y Cairns 1994; Bradshaw 1997).

La remediación de desechos mineros sólo será completa si se analizan los factores físicos, químicos, geológicos y biológicos, más aún si se comprenden las interacciones entre ellos (Bradshaw y Hüttl, 2001; Ye *et al.* 2002), de tal manera que se evite una restauración cosmética en favor de una natural; es decir, la restauración del sistema, no de un atributo aislado. Tal propósito es consecuente con los ecosistemas, como un todo integrado y, como tal, suma las ventajas que en términos humanos conlleva, fundamentalmente, el reestablecimiento y la recuperación de recursos y subsidios naturales. Entonces, el éxito de la remediación involucra más que colocar un conjunto de especies de plantas, implica el desarrollo de un completo mecanismo de acumulación de nutrientes, por lo que, y como lo señalan Bradshaw y Hüttl (2001), la salud y actividad de los microorganismos son esenciales.

De lo anterior se desprende un corolario importante: las legislaciones ambientales concernientes a contaminantes de suelo por metales, deben considerar los efectos de los elementos tóxicos en la composición y los procesos microbiológicos (Dahlin *et al.* 1997; Giller *et al.* 1998), así como las formas totales y biodisponibles de los elementos<sup>1</sup>. Más sensato será limitar la descarga de metales mediante legislaciones más estrictas. En el caso específico de los jales, debe darse carácter de obligatoriedad al tratamiento de los desechos mineros antes de ser vertidos al ambiente. Lo anterior se fundamenta en los efectos irreversibles de los metales en suelos y aguas subterráneas (Dahlin *et al.* 1997; Gupta *et al.* 1996) y el complejo escenario, en términos de remediación, que desatan las prácticas existentes.

---

<sup>1</sup> Un importante antecedente es la legislación Suiza (Guía de Valores para Contaminantes del Suelo in Gupta *et al.* 1996), en la que se estipulan los límites permitidos las formas totales y móviles de los tóxicos



## REFERENCIAS

- Abollino O, Aceto M, Malandrino M, Mentasti E, Sarzanini C, Petrella F. 2002. Heavy metals in agricultural soil from Piedmont, Italy. Distribution, speciation and chemometric data treatment. *Chemos.* **49**:545-557
- Admiraal W, Blank H, Buckert-De-Jong M, Guasch H, Ivorra N, Lehmann V, Nyström BAH, Paulsson M, Sabater S. 1999. Short-term toxicity of zinc to microbial algae and bacteria in metal polluted stream. *Wat Res.* **33**(9):1989-1996
- Adriano DC. 1986. Trace elements in the terrestrial environment. Springer, New York
- Alastuey A, García-Sánchez A, López F, Querol X. 1999. Evolution of pyrite mud weathering and mobility of heavy metals in the Guadiamar valley after the Aznalcóllar spill, south-west Spain. *Sci Tot Environ.* **242**:41-55
- Allan RJ. 1995. Impact of mining activities on the terrestrial and aquatic environment. In: Salmons W, Förstner U, Mader P (Eds) *Heavy metals, problems and solutions*. Springer-Verlag. Berlin. Pp 120-140
- Alloway BJ. 1990. *Heavy metals in soils*. John Wiley and Sons Inc. New York
- American Public Health Association. APHA. 1992. *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Díaz de Santos S.A. Madrid
- Aminot A. Chaussepied M. 1983. Manual des analyses chimiques en milieu marine. CNEXU. Paris Pp. 395
- Anagnostidis K, Komárek J. 1988. Modern approach to the classification systems of Cyanophytes. 3-Oscillatoriales. *Arch Hydrobiol Suppl.* **80**, *Algal. Stud.* **50-53**:327-472
- Anagnostidis K, Roussomoustakaki M. 1988. Cyanophytes from metal burdened substrates. *Arch Hydrobiol Suppl.* **80**: 1-4, *Algal. Stud.* **50-53**:561-564
- Archer FC, Hodgson IH. 1987. Total and extractable trace elements of soils in England and Wales. *J Soil Sci.* **38**:421-431
- Arias A, Barral MT, Mejuto JC. 2002. Enhancement of copper and cadmium adsorption on kaolin by the presence of humic acids. *Chemos.* **48**(10):1081-1088
- Atkinson RB, Cairns J Jr. 1994. Possible use of wetlands in ecological restoration of surface mine land. *J Aquat Ecosys Health.* **3**(2):139-144
- Baath E, Díaz-Raviña M, Frostegard A. 1998. Effects of metal-rich sludge amendments on the soil on microbial community. *Appl Environ Microbiol.* **64**(1):238-245
- Babich H, Slotzky G. 1985. Heavy metal toxicity to microbe-mediated ecologic processes: a review and potential application to regulatory policies. *Environ. Res.* **36**:111-137
- Badell GW, Darnall DW. 1990. Immobilization of non-viable, biosorbent, algal biomass for the recovery of metal ions. In: Volesky E (Ed) *Biosorbents and biosorption for the recovery of heavy metal ions*. CRC Press. Boca Raton, Florida
- Bailey D, Mazurak AP, Rosowski R. 1973. Aggregation of soils particles by algae. *Ecol.* **9**:99-101
- Balasoiu CF, Zagury GJ, Deschenes L. 2001. Partitioning and speciation of chromium, copper, and arsenic in CCA-contaminated soils: influence of soil composition. *Sci Tot Environ.* **280**:239-255
- Barkay T, Liebert C. 1992. Distribution of metal resistant microorganisms in the environment: significance and methodology. In: Levin MA, Seidler RJ, Roguel M (Eds) *Microbial ecology: principles, methods and applications*. McGraw-Hill Inc. New York. Pp 663-682
- Barkay T, Schaeffer J. 2001. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Curr Opin Microbiol.* **4**:318-323

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Barranguet C, Chratoni E, Plans M, Admiraal W. 2000. Short-term response of monospecific and natural algal biofilms to copper exposure. *Eur J Phycol.* **35**:397-406
- Barranguet C, Plans M, van der Grinten E, Sinke JJ, Admiraal W. 2002. Development of photosynthetic biofilms affected by dissolved and sorbed copper in an eutrophic river. *Environ Toxicol Chem.* **21**(9):1955-1965
- Barranguet C, van Bausekom SAM, Vøuger B, Neu TR, Manders EMM, Sinke JJ, Admiraal W. 2003. Studying undisturbed autotrophic biofilms: still a technical challenge. (submitted).
- Basulto AMRP. 1984. *Estudio Analítico de los Jales del Distrito Minero de Guanajuato*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, Universidad de Guanajuato. Guanajuato
- Bates SS, Tessier A, Campbell PGC, Létourneau M. 1985. Zinc-phosphorus interactions and variation in zinc accumulation during growth of *Chlamydomonas variabilis* (chlorophyceae) in batch culture. *Can J Fish Aquat Sci.* **42**: 86-94
- Battaglia-Burnet FF, Dictor M-C, Garrido F, Crouzet C, Morin D, Dekeyser K, Clarens M, Baranger P. 2002. An arsenic (III)-oxidizing bacteria population: selection, characterization, and performance in reactors. *J Appl Microbiol.* **93**:656-667
- Bender J, Gould JP, Vatcharapijarn Y, Young JS, Phillips P. 1994. Removal of Zinc and manganese from contaminated water with cyanobacteria mats. *Water Environ Res.* **66**:679-683
- Benvenuti M, Mascaro I, Corsini F, Lattanzi P, Parrini P, Tanelli G. 1997. Mine waste dumps and heavy metal pollution in abandoned mining district of Boccheggiano (Suthern Tuscany, Italy). *Environ Geo.* **30**(3/4):238-243
- Besser JM, WG Brumbaugh, TW May, SE Church, BA Kimball. 2001. Bioavailability of metals in stream food webs and hazards to brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in the upper Animas River watershed, Colorado. *Arch Environ Contam Toxicol.* **40**:48-59
- Beveridge TJ. 1989. Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Ann Rev Microbiol.* **43**:147-171
- Beveridge TJ, Murray RGE. 1980. Sites of metal deposition in the cell walls of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **141**:876-887
- Beveridge TJ, Murray RGE. 1976. Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **127**:1502-1518
- Black CA. 1965. *Methods of soil analysis, part 1*. American Soc Agronomy inc. Madison Wisconsin
- Blanck H, Wängberg SA, Molander S. 1988. Pollution induced community tolerance- a new ecological tool. In Cairns JJr, Pratt JR (Eds) *Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals*. ASTM STP 988. American Society of Testing and Material. Philadelphia. Pp 219-230
- Blowes DW, Jambor JL, Hanton-Fong CJ. 1998. Geochemical, mineralogical and microbiological characterization of a sulphide-bearing carbonate-rich gold mine tailings impoundment, Joutel, Québec. *Appl Geochem.* **13**(6):687-705
- Booth WE. 1941. Algae as pioneers in plant succession and their importance in erosion control. *Ecology.* **22**(1):38-46
- Bornemisza, E. 1982. *Introducción a la química de suelos*. Secretaría General de la OEA, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington DC
- Bourrelly P. 1970. Les algues d'eau douce: les algues bleues et rouges. N. Boubee et Cie. Paris
- Bourrelly P. 1972. Les algues d'eau douce: les algues vertes. N. Boubee et Cie. Paris
- Bower CA. 1952. Exchangeable cation analysis of saline and alkali soils. *Soil Sci.* **73**:252-261
- Bradshaw AD. 1997. Restoration of mine land using natural processes. *Ecol Eng.* **9**:255-269

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- Bradshaw AD, Chadwick MJ. 1980. *The restoration of land*. University of California Press. Berkeley
- Bradshaw AD, Hüttl RF. 2001. Future mine site restoration involves a broader approach. *Ecol Eng.* **17**(2-3):87-90
- Brierley GE, Brierley JA, Davidson MS. 1989. Applied microbial processes for metal recovery and removal from wastewater. In: Beveridge TJ, Doyle RJ (Eds) *Metal, ions and bacteria*. J. Wiley and Sons. New York. Pp 359-382
- Cabrera F, Clemente L, Díaz-Barriento E, López R, Murillo JM. 1999. Heavy metals pollution of soils affected by the Guadimar toxic flood. *Sci Tot Environ.* **242**:117-129
- Cairns J Jr, McCormick PV, Niederlehner BR. 1992. Estimating ecotoxicological risk and impact using indigenous aquatic microbial communities. *Hydrobiologia.* **237**:131-145
- Cairns J Jr. 1991. The status of the theoretical and applied science of restoration ecology. *Environ Prof.* **13**:186-194
- Cameron RE, Blank GE. 1966. Desert algae: Soil crust and diaphanous substrata as algal habitats. Tech. Report No. 32-971. NASA. Pasadena
- Campbell R. 1977. *Microbial ecology*. Blackwell Scientific Publications. London
- Cardwell AJ, Hawker DW, Greenway M. 2002. Metal accumulation in aquatic macrophytes from southeast Queensland, Australia. *Chemos.* **48**(7):653-663
- Carlsson E, Thunberg J, Öhlander B, Holmström H. 2002. Sequential extraction of sulfide-rich tailings remediated by the application of till cover, Kristineberg mine, northern Sweden. *Sci Tot Environ.* **299**:207-226
- Carrillo-Chávez A, Morton-Bermea O, González-Partida E, Rivas-Solórzano H, Oelsner G, García-Meza JV. 2003a. Aspectos geoquímicos y ambientales de la minería: ejemplos de dos casos estudiados. *Reportes del IPICyT* (Instituto Potosino de Ciencia y Tecnología A.C.) **1**:39-46
- Carrillo-Chávez A, Morton-Bermea O, González-Partida E, Rivas-Solórzano H, Oelsner G, García-Meza JV. 2003b. Environmental geochemistry of the Guanajuato mining district, Mexico. *Ores Geol Rev.* (en prensa)
- Cervantes JJA, Aguilera AAF. 1992. Acercamiento de la investigación a la problemática regional, caso de los jales. *Acta Universitaria* **2**(2):74-79
- Cervantes J, Aguilera A, López P, Hernández L, Romero J, Uribe A, Luna FJ. 1993. Obtención de tetracloruro de silicio a partir de materia prima nacional. *Rev Soc Quim Mex.* **37**:72-
- Chapman HD, Pratt PF. 1961. *Methods of soil analysis. Part I*. Am. Soc. of Agronomy, Madison
- Chapman HD, Pratt PF. 1961. *Methods of analysis for soils, plants, and waters*. Univ. of California, Div. Agric. Sci. California
- Chappell DA, Craw D. 2002. Geochemical analogue for circumneutral pH mine tailings: implication for long-term storage, Macraes Mine, Otago, New Zealand. *Appl Geochem.* **17**:1105-1114
- Chen C-Y. 1994. Theoretical evaluation of the inhibition effects of mercury on algal growth at various orthophosphate levels. *Water Res.* **28**:293-937.
- Chew I, Obbard JP, Stanforth RR. 2001. Microbial cellulose decomposition in soils from a rifle range contaminated with heavy metals. *Environ Pollut.* **111**(3):367-375
- Chlopecka A, Bacon JR, Wilson MJ, Kay J. 1996. Heavy metals in the environment: Forms of cadmium, lead and zinc in contaminated soils from Southwest Poland. *J Environ Qual.* **25**:69-79
- Crist RH, Oberholser K, Shank N, Nguyen M. 1981. Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environ Sc Technol.* **15**: 1212-1217

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- Dahlin S, Witter E, Martensson A, Turner A, Baath E. 1997. Where's the limit? Changes in the natural microbiological properties of agricultural soils at low levels of metal contamination. *Soil Biol Biochem*, **29**(9):1405-1415
- Davranche M, Bollinger J-C. 2000. Heavy metals desorption from synthesized and natural Fe and Mn oxyhydroxides: effect of reductive conditions. *J Coll Interface Sci*, **227**:531-539
- Davranche M, Bollinger J-C, Bril H. 2003. Effect of reductive conditions on metal mobility from wasteland solids: an example from the Mortagne-du-Nord site (France). *Appl Geochem*, **18**:383-393
- Darnall DW, Greene B, Henzl MT, Hosea JM, McPerson RA, Sneddon J, Alexander MD. 1986. Selective recovery of gold and other metal ions from an algal biomass. *Environ Sci Technol*, **20**(2):206-208
- Davey MC. 1988. Ecology of terrestrial algae of fell field ecosystem of Signy Island, South Orkney Islands. *Br Antarct Surv Bull*, (81):69-74
- De Brouwer JFC. 2002. *Dynamics in extracellular carbohydrate production by marine benthic diatoms*. Ph D Thesis. Netherlands Institute of Ecology, Yerseke
- De Gregori I, Lobos MG, Pinochet H. 2002. Selenium and its redox speciation in rainwater from sites of Valparaiso region in Chile impacted by mining activities of copper ores. *Water Res*, **36**:115-122
- Desikachary TV. 1959. *Cyanophyta*. India Council of Agricultural Research (ICAR) Monographs on Algae. New Delhi
- Díaz-Raviña M, Acea MJ, Carballas T. 1993. Microbial biomass and its contribution to nutrient concentration in forest soil. *Soil Biol Biochem*, **25**(1):25-31
- Díaz-Raviña M, Baath E, Frostegard A. 1994. Multiple heavy metal tolerance of soil bacteria communities and its measurement by thymidine incorporation. *Appl Environ Microbiol*, **60**:2238-2247
- Díaz-Raviña M, Baath E. 1996. The development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl Environ Microbiol*, **62**:2970-2977
- Dick RP, Thomas DR, Harvarson JJ. 1996. Standard methods, sampling and sample pretreatment. In: Duran JW, Jones AJ (Eds) *Methods for assessing soil quality*. Soil Science Society of America. Madison. Pp 107-122
- DOF (Diario Oficial de la Federación) 1993a. Reglamento de la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA) en Materia de Residuos Peligrosos. <http://www.ine.gob.mx/dgra/reglamentos>
- DOF. 1993b. Norma Oficial Mexicana NOM-053-ECO-1993. [www.ine.gob.mx/dgra/reglamentos](http://www.ine.gob.mx/dgra/reglamentos)
- DOF. 2000. Reglamento de la LGEEPA en Materia de Evaluación del Impacto Ambiental. [www.ine.gob.mx/dgra/reglamentos/iamb/reglamentoia.html](http://www.ine.gob.mx/dgra/reglamentos/iamb/reglamentoia.html). Mayo 30 del 2000
- Donahue RL, Miller RW, Shickluna JC. 1981. *Introducción a los suelos*. Prentice Hall Internacional. Madrid
- Dubouis M. 1959. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, **28**:350-356
- Durán C. 1994. Tratamiento de aguas residuales de la industria de proceso. Publicaciones PIQAYQA (5<sup>a</sup> ed.) Facultad de Química, UNAM, México DF
- Durrell LW, Shields L. 1961. Characteristics of soil algae relating to crust formation. *Trans Am Micro Soc*, **80**:73-79
- Dvorak DH, Hedin RS, Edenborn HM, McIntire PE. 1992. Treatment of metal-contaminated water using bacterial sulfate-reduction. Results from pilot-scale reactors. *Biotechnol Bioeng*, **40**:609-616

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Ernst WHO. 1988. Response of plants and vegetation to mine tailings and dredged materials. *In: Salmons W, Försiner U (Eds) Chemistry and biology of solid wastes dredged material and mine tailings*. Springer-Verlag. New York. Pp 54-69
- Ettl H, Gärtner G. 1988. Chlorophyta II: Tetrasporales, Chlorococcales, Gloeodendrales. *In: Ettl H, Gerloff J, Heynig H, Mollenhauer D (Eds) Die Süßwasservegetation von Mitteleuropa*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Fargasová A. 2001. Interactive effect of manganese, molybdenum, nickel, copper I and II, and vanadium of the fresh alga *Scenedesmus quadricauda*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 67: 688-695
- Ferguson KD, Erickson PM. 1988. Pre-mine prediction of acid mine drainage. *In: Salmons W, Försiner U (Eds) Environmental impact of management of mine tailings and dredged materials*. Springer-Verlag. Berlin. Pp 24-43
- Ferrero MP. 1998. *Acute and chronic effects of copper on periphytic communities from the River Meuse*. M. Sc. Final Report. Amsterdam Research Institute for Substances in Ecosystem (ARISE), Section of Aquatic Ecology and Ecotoxicology, Universiteit van Amsterdam, Amsterdam
- Ferris FG, C. Fratton M, Gerits JP, Schultze-Lam S, Sherwood-Lollar B. 1995. Microbial precipitation of a strontium calcite phase at a groundwater discharge zone near Rock Creek, British Columbia. *Can Geomicrobiol J*. 13:57-67
- Fishbein L. 1995. Selenium. *In: Merian E. (Ed) Metals and their compounds in the environment*. VCH. Weinheim. Pp 1153-1175
- Fitzpatrick EA. 1980. *Soils: Their formation, classification and distribution*. Longman Group. London
- Fleming CA, Trevors JT. 1988. Copper retention and toxicity in freshwater sediment. *Water Air Soil Pollut.* (40):433-441
- Fleming HC, Wingender J. 2000a. Relevance of microbial extracellular polymeric substance (EPSs). Part I: Structural and ecological aspects. *In: Fleming HC, Leis A (Eds) Extracellular polymeric substances: The construction materials of biofilms*. Selected Proc I -IWA Int. Conf. on Microbial Extracellular Polymeric Substances. Pp 1-8
- Fleming HC, Wingender J. 2000b. Relevance of microbial extracellular polymeric substance (EPSs)- Part II: Technical aspects. *In: Fleming HC, Leis A (Eds) Extracellular polymeric substances: The construction materials of biofilms*. Selected Proc I -IWA Int. Conf. on Microbial Extracellular Polymeric Substances. Pp 9-16
- Flores-Delgado L, Blas G, Hernández G, Alcalá R. 1998. Distribution and sequential extraction of some heavy metals from soils irrigated with wastewater from Mexico City. *Water Air and Soil Pollut*. 98:105-117
- Fogg GE. 1962. Extracellular products. *In: Lewin RA (Ed) Physiology and biochemistry of Algae*. Academic Press. New York. Pp 475-489
- Foster PL. 1982. Metal resistant Chlorophyta from rivers polluted by heavy metals. *Freshwat Biol*. 12:41-61
- Francis AJ, Dodge CJ. 1990. Anaerobic microbial remobilization of toxic metals coprecipitated with iron oxide. *Environ Sci Technol*. 24:373-378
- Frouz J, Keplín, Pizl V, Tajovský K, Starý J, Lukesová A, Nováková A, Balík V, Háněl L, Materna J. 2001. Soil biota and upper soil layer development in two contrasting post-mining chronosequences. *Ecol Eng*. 17(2-3):275-284
- García-Meza JV. 1997. *Diatomeas de una zona de jales mineros de Guanajuato*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México DF
- García-Meza JV. 1999. *Algas de jales mineros*. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Vegetal). Facultad de Ciencias, UNAM. México DF


  
 TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- García-Meza JV, Sosa L, Ramos-Arroyo YR, Novelo E. 1997. Algae and zooplankton of mine tailings from Guanajuato, Mexico. Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Conference on Aquatic Ecosystem Health. Ajijic, Jalisco, México, October 26-29th, 1997. Pp 80-81
- García-Meza JV, Sosa L, Cano C, Ponce P, Ramos-Arroyo YR. 1995. Biotecnología ecológica para el tratamiento de residuos mineros. *Actas INAGEQ*. 1(1):175-180
- Gao S, Burau RG. 1997. Environmental factors affecting rates of arsine evolution from and mineralisation of arsenicals in soils. *J Environ Qual*. 26:753-763
- Gao L, Miao Z, Bai Z, Zhou X, Zhao J, Zhu Y. 1998. A case study of ecological restoration at the bauxite mine, Shanxi Province, China. *Ecol Eng*. 11:221-229
- Gee C, Ramsey MH, Thornton I. 2000. Buffering from secondary minerals as a migration limiting factor in lead polluted soils at historical smelting sites. *Appl Geochem*. 16:1993-1199
- Geel C. 1971. *Photosystem II electron flow as a measure for phytoplankton gross primary production*. Ph. D. Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands
- Gekeler W, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch Microbiol*. 150:197-202
- Genter RB, Cherry DS, Smith EP, Cairns Jr. 1987. Algal-periphyton population and community changes from zinc stress in stream mesocosms. *Hydrobiologia* 153:261-275
- Genter RB, Lehman RM. 2000. Metal toxicity inferred from algal population density, heterotrophic substrata use and fatty acid profile in a small stream. *Environ Toxicol Chem*. 19(4):869-878
- Genty B, Briantais J, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*. 990:87-92
- Giller KE, Witter E, McGrath SP. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem*. 30(10-11):1389-1414
- Goodwin B. 1988. *Las manchas del leopardo: la evolución de la complejidad*. Tusquets, Barcelona. 307 pp
- Griffin GJ, Smith EP, Robinson TJ. 2001. Population patterns of *Aspergillus flavus* and *A. niger* group in field soils. *Soil Biol Biochem*. 33(2):253-257
- Grimalt JO, Ferrer M, Macperson E. 1999. The mine tailing accident in Aznalcóllar. *Sci Tot Environ*. 242:3-11
- Guasch H, Paulsson M, Sabater S. 2002. Effect of copper on algal communities from oligotrophic calcareous streams *J Phycol*. 38:241-243
- Guiza R. 1949. *Estudio geológico del distrito minero de Guanajuato*. Boletín del Instituto Nacional para la Investigación de Recursos Minerales. (22)
- Gupta SK, Vollmer MK, Krebs R. 1996. The importance of mobile, mobilisable and pseudo total heavy metal fraction in soil for three level risk assessment and risk management. *Sci Tot Environ*. 178:11-20
- Haanstra L, Doelman P, Oude Voshaar JH. 1985. The use of sigmoidal dose response curves in soil ecotoxicological research. *Plant Soil* 84:293-297
- Harris PO, Ramelow GJ. 1990. Binding of metal ions by particulate biomass derived from *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. *Environ Sci Technol*. 24:220-228
- Hart BA, Bertram PE. 1980. Cadmium-binding protein in a cadmium tolerant strain of *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ Exp Bot*. 20:203-210
- Hasnain S, Nasim A. 1992. Effects of temperature and pH on conjugal transfer of Zn-resistant plasmids residing in Gram-negative bacteria isolated from industrial effluents. *Environ Pollut*. 76:245-249

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- Heaney SI. 1978. Some observation on the use of the *in vivo* fluorescence technique to determine chlorophyll *a* in a natural population and cultures of freshwater phytoplankton. *Freshwat Biol.* **8**:115-126
- He B, Liang L, Jiang G. 2002. Distribution of As and Se in selected Chinese coal mines. *Sci Tot Environ.* **296**:19-26
- Herrera T, Ulloa M. 1990. *El reino de los hongos*. Fondo de Cultura Económica - UNAM. México DF
- Huang PM. 1993. Impacto de las interacciones entre microbios, minerales y componentes orgánicos del suelo sobre los agroecosistemas. In: Ferrera R, Quintero R (Eds) *Agroecología, sustentabilidad y educación*. Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados, Chapingo. Pp 79-97
- Hughes MN, Poole RK. 1989. *Metals and microorganisms*. Chapman and Hall. New York
- INEGI. 1993. *Cuaderno estadístico municipal*. Gobierno del estado de Guanajuato, Guanajuato, México
- INEGI. 1998. [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)
- INEGI. 2000. [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)
- Ivorra N. 2000. Metal induced succession in benthic diatom consortia. PhD Thesis. Department of Aquatic Ecology and Ecotoxicology, Faculty of Science, University of Amsterdam, The Netherlands
- Ivorra N, Barranguel C, Jonker M, Kraak MHS, Admiraal W. 2002. Metal induced tolerance in the freshwater microbenthic diatom *Gomphonema parvulum*. *Environ Pollut.* **116**:147-157
- Iwahori K, Takeguchi F, Kamimura K, Sugio T. 2000. Ferrus iron-dependent volatilization of mercury by the plasma membrane of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol.* **66**(9):3823-3827
- Jahnke J, Priefer UB. 2002. Phototropic biofilms of reforested fields in the rhenish lignite mining area: development of soil algal, bacterial, and fungal biomasses. *Soil Biol Biochem.* **34**:1157-1165
- Jambor JL, Owens DR. 1993. *Mineralogy of the tailings impoundment at the former edge of Sudbury structure, Ontario*. CANAMET Div. Rep. MSL93-4 (CF). Department of Energy and Mine Research. Ontario
- Jang A, Kim SM, Kim SY, Lee SG, Kim IS. 2001. Effect of heavy metals (Cu, Pb and Ni) on the composition of EPS in biofilms. *Water Sci Technol.* **43**(6):41-48
- Jarvie HP, Neal C, Warwick A, White J, Neal M, Wickham HD, Hill LK, Andrews MC. 2002. Phosphorus uptake into algal biofilms in a lowland chalk river. *Sci Tot Environ.* **282-283**:353-373
- Johansen JR, Rushforth S, Orbendorfer R, Fungladda N, Grimes JA. 1983. The algal flora of selected wet walls in Zion National Park, Utah, U.S.A. *Nova Hedwigia* **38**:765-808
- John J. 1993. The use of diatoms in monitoring the development of created wetlands at a sand mining site in West Australia. *Hidrobiologia.* **269/270**:427-436
- Joint Committee on Powder Diffraction Standards. 1976. *Powder Diffraction Data*. National Bureau of standards. Pennsylvania
- Juneau P, El Berday A, Popovic R. 2002. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum* and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Environ Contam Toxicol.* **42**:155-164
- Kabata-Pendias A, Pendias H. 1992. *Trace elements in soils and plants*. 2nd edition. CRC Press. Boca Raton
- KaleidaGraph. 1996. Data analysis and graphic presentation for business, science and engineering. Synergi Software

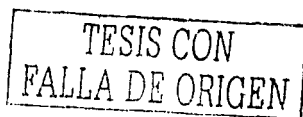
TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- Kaplan D, Christiaen D, Arad S. 1987. Binding of heavy metals by algal carbohydrates. In: Staedler T, Mollion J, Verdus MC, Karamanos Y, Moran H, Christiaen D (Eds) *Algal Biotechnology*. Elsevier Applied Sciences, London. Pp 179-187
- Kaplan D, Heimer YM, Availovich A, Goldsbrough PB. 1995. Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella sp.* *Plant Sci.* **109**:129-137
- Kaschl A, Römheld V, Chen Y. 2002. The influence of soluble organic matter from municipal solid waste compost on trace metal leaching in calcareous soils. *Sci Tot Environ.* **291**:45-57
- Katsoyiannis I, Zouboulis A, Althoff H, Bartel H. 2002. As(III) removal from groundwaters using fixed-bed upflow bioreactors. *Chemos.* **47**:325-332
- Keeney WK, Beck WG, Vanloon GW, Page JA. 1976. The determination of trace metals in *Cladophora glomerata* as a potential biological monitor. *Water Res.* **10**:81-84
- Kelly EG, Spottiswood DJ. 1990. *Introducción al procesamiento de minerales*. Limusa. México DF
- Khan M, Scullion J. 2002. Effects of metal (Cd, Cu, Ni, Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil microorganisms and their activities. *Appl Soil Ecol.* **20**:145-155
- King TV. 1995. Environmental considerations of active and abandoned mine lands: lessons from Summitville, Colorado. USGS Bulletin 2220. Pp. 38
- Kirke PWW. 1987. Pollution control legislation. In: Lester JN (Ed) *Heavy metals in wastewaters and sludge treatment*. CRC Press. Boca Raton. Pp 65-103
- Komárek J, Anagnostidis K. 1989. Cyanoprokaryota. 1: Teil: Chlorococcales. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Komárek J, Fott B. 1983. *Das Phytoplankton des Süßwassers, Systematik und Biologie*. Huber-Pestalozzi, G. Die Binnengewässer, Chlorophyceae (Grünalgen). Ordnung: Chlorococcales. Vol. 7 Teil 1. Band XVI. Verlagsbuchhandlung. Stuttgart
- Kosman DJ. 1994. Transition metal ion uptake in yeasts and filamentous fungi. In: Wilkenmann, G. Winge DR (Eds) *Metal ions in fungi*. Marcel Dekker Inc. New York. Pp 1-38
- Kotrba P, Dolecková L, de Lorenzo V, Rumi T. 1999. Enhanced bioaccumulation of heavy metals ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. *Appl Environ Microbiol.* **65**(3):1092-1098
- Krammer K, Lange-Bertalot H. 1991a. Bacillariophyceae. Teil 3: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. Band 2/3. In: Ettl H, Gerloff J, Heynig H, Mollenhauer D (Eds) *Die Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Krammer K, Lange-Bertalot H. 1991b. Bacillariophyceae. Teil 4: Achnantaceae, Kritische Ergänzungen zu *Navicula* (Lineolatae) und *Gomphonema*. Gesamtliteraturverzeichnis Teil 1-4. Band 2/4. In: Ettl H, Gerloff J, Heynig H, Mollenhauer D (Eds) *Die Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Krantz L. 1978. *Minería y marginalidad: Ensayo socioeconómico de la minería en Guanajuato*. Escuela de Ingeniería, Minas y Metalurgia. México DF
- Krompkamp J, Barranguet C, Penne J. 1998. Determination of microphytobentos PSII quantum efficiency and photosynthetic activity by means of variable chlorophyll fluorescence. *Mar Ecol Prog Ser.* **162**:45-55
- Kuonen JG, Jorgensen BB, Revsbech. 1986. Oxygen microprofiles of trickling filter biofilms. *Wat Res.* **20**:1589-1598
- Lan CY, Shu WS, Wong MH. 1998. Reclamation of Pb/Zn mine tailings at Shaoguan, Guangdong Province, People's Republic of China: The role of river sediments and domestic refuse. *Bioresource Technol.* **65**:117-124

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



- Lawrence JR, Swerhone GDW, Kwong YTJ. 1998. Natural attenuation of aqueous metal contamination by an algal mat. *Can J Microbiol.* **44**:825-832
- Lee LH, Lustigman B, Dandford D. 1994. Effect of manganese and zinc on the growth of *Anacystis nidulans*. *Bull Environ Contam Toxicol.* **53**:158-165
- Ledger ME, Hildrew AG. 2001. Growth of an acid-tolerant stonely on epilithic biofilms from streams of contrasting pH. *Fresh Biol.* **46**:1457-1470
- Lehmann V, Tubbing GMJ, Admiraal W. 1999. Induced metal tolerance in microbenthic communities from three lowland rivers with different metal loads. *Arch Environ Contam Toxicol.* **36**:384-391
- Leonard A. 1995. Arsenic. In: Merian E (Ed) *Metals and their compounds in the environment*. VCH. Weinheim. Pp 751-767
- Les A, Walker RW. 1984. Toxicity and binding of Cu, Zn and Cd by the blue-green algae *Chroococcus parvus*. *Water, Air and Soil Pollut.* **23**:129-139
- Lewin JC. 1962. Calcification. In: Lewin RA (Ed) *Physiology and biochemistry of the algae*. Academic Press. New York. Pp 457-465
- Li X, Coles BJ, Ramsey MH, Thornton I. 1995. Sequential extraction of soils for multielement analysis by ICP-AES. *Chem Geol.* **124**:109-123
- Li X, Thornton I. 2001. Chemical partitioning of trace and major elements in soils contaminated by mining and smelting activities. *Appl Geochem.* **16**:1693-1706
- Liehr SK, Chen H-J, Lin S-H. 1995. Metal removal by algal biofilms. *Wat Sci Tech.* **30**(11):59-68
- Liu Y, Lam MC, Fang HHP. 2001. Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge. *Wat Sci Tech.* **43**(6): 59-66
- Logan TJ, Traina SJ. 1993. Trace metals and agriculture soils. In: Allen HE, Perdue EM, Brown DS (Eds) *Metals in ground water*. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida
- Lombardi AT, Vieira AAH, Sartoni LA. 2002. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales) *J Phycol.* **38**:332-337
- Lukesová A, Komárek J. 1987. Succession of soil algae on dumps from strip coal-mining in the Most Region (Czechoslovakia). *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica.* **22**:355-365
- Lund JWG. 1962. Soil algae. In: Lewin RA (Ed) *Physiology and biochemistry of algae*. Academic press. New York. Pp 759-770
- Lund W. 1990. Speciation analysis: Why and How? *J. Anal Chem.* **337**:557-564
- Ma LQ, Rao GN. 1997. Chemical fraction of cadmium, copper, nickel, and zinc in contaminated soils. *J Environ Qual.* **26**:259-264
- MacFaddin JF. 1990. *Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias*. Panamericana. México DF
- Madejón P, Murillo JM, Marañón T, Cabrera F, López R. 2002. Bioaccumulation of As, Cd, Cu, Fe, and Pb in wild grasses affected by the Aznalcóllar mine spill (SW Spain). *Sci Tot Environ.* **290**:105-120
- Maeda S, Mizoguchi M, Ohki A, Takeshita T. 1990a. Bioaccumulation of Zn and Cd in freshwater alga, *Chlorella vulgaris*. Part I: Toxicity and accumulation. *Chemosph.* **21**(8):953-963
- Maeda S, Mizoguchi M, Ohki A, Inanaga J, Takeshita T. 1990b. Bioaccumulation of Zn and Cd in freshwater alga, *Chlorella vulgaris*. Part II: Association mode of the metals and cells tissue. *Chemosph.* **21**(8):965-973
- Margulis L, Schwartz KW. 1985. *Cinco Reinos*. Labor. Barcelona


  
 TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- Margulis L, Sagan D. 1986. *Microcosmos: four billion years of evolution from our microbial ancestors*. Summit Books. New York
- Mazor G, Kidron GJ, Vonshak A, Abeliovich A. 1996. The role of cyanobacterial exopolysaccharides in structuring desert microbial crusts. *FEMS Microbiol Ecol.* **21**:121-130
- Mohanty N, Vass I, Demeter S. 1989. Copper toxicity affects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor, Q<sub>B</sub><sup>-1</sup>. *Plant Physiol.* **90**:175-179
- Monroy FMG. 2001. Estudio de la movilización/fijación de As, Cu, Pb y Zn asociada a la alteración química y microbiana de sulfuros en suelos calcáreos de climas semiáridos. Trabajo interno del Instituto de Metalurgia, Universidad Autónoma de San Luis Potosí
- Morgan JJ, Stumm W. 1995. Chemical processes in the environment, relevance of chemical speciation. In: Merian E (Ed) *Metals and their compounds in the environment*. VCH. Weinheim. Pp 68-101
- Morris OP, Russell G. 1973. Effect of chelation on the toxicity of copper. *Mar Pollut Bull.* **4**:43-48
- Morton O, Carrillo-Chávez A, Hernández E (2000) Geochemical characterization of historical mine tailings and groundwater in the Guanajuato Mining District, central Mexico: Environmental considerations. *GSA Abstracts with Programs.* **32**(7):488
- Motohiro F, Sunao Y, Shozo T. 1983. Distribution of copper in the cells of the heavy metals tolerant fungus *Penicillium ochro-chloron*, cultured in concentrated copper medium. *Agr Biol Chem.* **47**:1367-1369
- Mullen MD, Wolf DC, Beveridge TJ, Bailey GW. 1992. Sorption of heavy metals by the soil fungi *Aspergillus niger* y *Mucor rouxii*. *Soil Biol Biochem.* **24**:129-135
- Müller B, Axelsson MD, Öhlander B. 2002. Adsorption of trace elements on pyrite surfaces in sulfidic mine tailings from Kristineber (Sweden) a few years after remediation. *Sci Tot Environ.* **298**:1-6
- Mummey DL, Stahl PD, Buyer JS. 2002. Microbial biomarkers as indicator of ecosystem recovery following surface mine reclamation. *Appl Soil Ecol.* **21**:251-259
- Munsell Color Soil Charts. 1975. Munsell Color Company Inc. Baltimore
- Murphy J, Riley JP. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta.* **27**:31-36
- Muttana A, Crespi R, Liberio G. 1997. *Guía de minerales y rocas*. Grijalbo. Barcelona
- Nalewajko C. 1977. Extracellular release in freshwater algae and bacteria: Extracellular products of algae as a source of carbon for heterotrophs. In: Cairns Jr. (Ed) *Aquatic microbial communities*. Gerland Publishing Inc. New York. Pp 589-624
- Naqvi SM, Rizvi SA. 2000. Accumulation of chromium and copper in three different soils and bioaccumulation in aquatic plant *Alternanthera Philoxeroides*. *Bull Environ Contam Toxicol.* **65**:55-61
- Newman DK, Beveridge TJ, Morel FM. 1997. Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Appl Environ Microbiol.* **63**:2022-2028
- Nelson RA, Peterson HB. 1972. *Treatment of mine tailings to promote vegetative stabilization*. Agricultural Experiment Station, Logan, Utha, Bulletin 485
- Nord G, Wixon B. 1979. Removal of heavy metals from industrial effluents by algae. *Dev Ind Microbiol.* **20**:259-273
- Novelo E. 1978. *Diseño y ensayo de una metodología para estudios de la flora ficológica del suelo en zonas áridas realizado en Tehuacán, Puebla*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México DF

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- Novelo E. 1985. *Ficollora dinámica de suelos del Valle de Tehuacán, Puebla*. Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM. México DF
- Novelo E. 1998. *Flora ficológica del Valle de Tehuacán, Puebla*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM, México DF
- Novick RP, Roth C. 1968. Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* **95**:1335-1349
- Olsen Y, Vadstein O, Andersen T, Jensen A. 1989. Competition between *Staurastrum luetkemuellarii* (Chlorophyceae) and *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) under varying modes of phosphate supply. *J Phycol.* **25**:499-508
- Olson BH, Panigrahi AK 1995. Bacteria, fungi and blue-green algae. In: Merian E (Ed). *Metals and their compounds in the environment*. VCH. Weinheim. Pp 419-445
- Ortiz-Monasterio P, Cortinas C, Maffey ML. 1987. *Manejo de desechos industriales en México*. Universo Siglo XXI. México DF
- Page AL, RH Miller, DF Keeney. 1982. *Methods of Soils Analysis, Part 2: Chemical and biological properties*. Agronomy 9. Am. Soc. Agronomy, Inc. Madison
- Parkhill JP, Maillet G, Cullen JJ. 2001. Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. *J Phycol.* **37**:517-529
- Parmar N, Warren LA, Roden EE, Ferris FG. 2000. Solid phase capture of strontium by the iron reducing bacteria *Shewanella alga* strain BrY. *Chem Geol.* **169**:281-288
- Paulsson M, Nyström B, Blanck H. 2000. Long-term toxicity of zinc to bacteria and algae in periphyton communities from the river Göta Älv, based on a microcosm study. *Aquatic Toxicol.* **47**:243-257
- Paulsson M, Mansson V, Blanck H. 2002. Effect of zinc on the phosphorus availability to the periphyton communities from the river Göta Älv. *Aquatic Toxicol.* **56**:103-113
- Pawlik-Skowronska B. 2001. Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. *Aquatic Toxicol.* **52**(3-4):241-249
- Peppas A, Komnitsas K, Halikia I. 2000. Use of organic covers for acid mine drainage control. *Minerals Engineering.* **13**(5):563-574
- Percival SL, Walker JT, Hunter PR. 2000. *Microbiological aspects of biofilms and drinking water*. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Phoenix VR, Adams DG, Konhauser KO. 2000. Cyanobacterial viability during hydrothermal biomineralisation. *Chem Geol.* **169**:329-338
- Pistocchi R, Guerrini F, Balboni V, Boni L. 1997. Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Goymnodinium* sp. *Eur J Phycol.* **32**:125-132
- Pistocchi R, Mormile, AM, Guerrini F, Issani G, Boni L. 2000. Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *J Appl Phycol.* **12**:69-477
- Plumlee GS. 1999. The environmental geology of mineral deposits. In Plumlee and Logsdon (Eds.) *The environmental Geochemistry of Mineral Deposits.* *Rev Economic Geol.* **6**:71-113
- Podda F, Zuddas P, Minacci A, Pepi M, Baldi F. 2000. Heavy metal coprecipitation with hydrozincita  $[Zn_5(CO_3)_2(OH)_4]$  from mine waters cause by photosynthetic microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* **66**(11):5092-5098
- Pyrzynska K. 2002. Determination of selenium species in environmental samples. *Microchim Acta.* **14Q**:55-62


  
 TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- Rai UN, Tripathi RD, Vajpayee P, Jha V, Ali MB. 2002. Bioaccumulation of toxic metals (Cr, Cd, Pb and Cu) by seed of *Euryale ferox* Salisb. (Makhana). *Chemos*. 46:267-272
- Ramos RE. 1991. *Reconstrucción mineralógica de los jales de Guanajuato*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México
- Ramos-Arroyo YR. 1993. *Algas resistentes a metales pesados con potencial en el tratamiento de desechos mineros*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México
- Ramos-Arroyo YR. 1995. Estudios de la movilización de metales pesados en el Municipio Minero de Guanajuato. *Actas INAGEQ*. (1):41-43
- Ramos-Arroyo YR, Siebe C. 1998. Variabilidad espacial de condiciones geoquímicas en presas de jales. *Actas INAGEQ* 4:51-63
- Richards LA. 1974. *Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos*. Limusa, México DF
- Rodríguez GS, Vergil PM. 1989. *Optimización de parámetros de la planta concentradora minera. Minas*. Universidad de Guanajuato. Guanajuato
- Rodríguez ME, Cano C, Sosa L, Vega E, Obregón A, Amézquita F, Mendoza E. 1997. *Silver resistance in fungi isolated from mine residues at Guanajuato, Mexico*. 5<sup>th</sup> International Conference on Aquatic Ecosystem Health (abstracts). P:103
- Rose PD, Boshoff GA, van Hille RP, Wallace LCM, Dunn KM, Duncan JR. 1998. An integrated algal sulfate reducing high rate ponding process for the treatment of acid mine drainage wastewaters. *Biodegradation* 9(3-4):247-257
- Saint-Clair LL, Webb BL, Johansen JR, Nebeker GT. 1964. Cryptogamic soil crusts: Enhancement in disturbed and undisturbed areas. *Reclamation and Revegetation Res.* 3:129-136
- Sabater S, Guasch H, Romani A, Muñoz I. 2000. Stromatolitic communities in Mediterranean streams: adaptation of a changing environment. *Biodiv Conser.* 9:379-392
- Salomons W, Forstner U. 1980. Trace metal analysis on polluted sediments. Part 2: Evaluation of environmental impact. *Environ Technol Lett.* 1:506-517
- Samson G, Morissette JC, Popovic R. 1988. Copper quenching on the variable fluorescence in *Dunaliella tertiolecta*. New evidence for a copper inhibition effect on PSII photochemistry. *Photochem Photobiol* 48(3):329-332
- Sand W, Gehrke T, Jozsa P-G, Schippers A. 2001. (Bio)chemistry of bacterial leaching – direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometal* 59:159-175
- Santamaría FJ. 2000. Diccionario de mejicanismos. Ed Porrúa, 6ta. Edición. México D.F.
- Schmitt HW, Sitcher E. 1995. Heavy metal compounds in the soil. In: Merian, E. (Ed) *Metals and their compounds in the environment*. VCH. Pp 311-331
- Schreiber U, Gademann R, Bird P, Ralph PJ, Larkum AWD, Kühn M. 2002. Apparent light requirement for activation of photosynthesis upon rehydration of desiccated beach rock microbial mats. *J Phycol.* 38:125-134
- SEDESOL-INE (Secretaría de Desarrollo Social e Instituto Nacional de Ecología). 1994. Informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente 1993-1994. México DF
- SEMARNAP; (Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca). 2000. [www.semarnap.gob.mx](http://www.semarnap.gob.mx)
- Shan X, Liab J, Wen B. 2002. Effect of organic acids on absorption and desorption of rare earth elements. *Chemos*. 47(7):701-710

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- Shehata SA, Lasheen MR, Kobia IA, Ali GH. 1999. Toxic effect of certain metals mixture on some physicochemical and morphological characteristics of freshwater algae. *Water Air Soil Pollut.* **110**:119-135
- Shiol Y, Tamai H, Sasa T. 1978. Inhibition of Photosystem II in the green alga *Ankistrodesmus falcatus* by copper. *Physiol Plant.* **44**:434-438
- Shu J, Bradshaw D. 1995. The containment of toxic wastes: I. Long term metal movement in solid over covered metalliferous waste heap at Parc lead-Zinc Mine, North Wales. *Environ Pollut.* **90**(3):371-377
- Silver S, Budd K, Leahy KM, Shaw WV, Hammond D, Novick RP, Willsky GR, Malamy MH, Rosenberg H. 1981. Inducible plasmid determined resistance to arsenate, arsenite, and antimony III in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* **146**:983-996
- Simms PH, Yanful EK, St-Arnaud L, Aubé B. 2002. A laboratory evaluation of metal release and transport in flooded pre-oxidized mine tailings. *Appl Geochem.* **15**:1245-1263
- Simón M, Ortiz I, Fernández E, Fernández J, Dorronsoro C, Aguilar J. 1999. Pollution of soils by the toxic spills of a pyrite mine (Aznalcóllar, Spain). *Sci Tot Environ.* **242**:105-115
- Simón M, Martín F, Ortiz I, García I, Fernández E, Dorronsoro C, Aguilar J. 2001. Soil pollution by oxidation of tailings from toxic spill of pyrite mine. *Sci Tot Environ.* **279**:63-74
- Skujins J. 1992. Environmental control of Cyanobacteria. In: Levin MA, Seldler RJ, Rogel M (Eds) *Microbial ecology, principles, methods and applications*. Mc Graw-Hill Inc-Environmental Biotechnology Series. New York. Pp 877-883
- Smith RAH, Bradshaw AD. 1979. The use of metal tolerant plant populations for the reclamation of metalliferous wastes. *J Appl Ecol.* **16**:595-612
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biology research*. 3 ed. Freeman and Co. New York
- Soldo D, Behra R. 2000. Long-term effects of Cu on structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquat Toxicol.* **47**:181-189
- Spijkerman E, Coesel PFM. 1996. Competition for phosphorus among planktonic Desmid species in continuous-flow culture. *J Phycol.* **32**:939-948
- Stacey S, Merrington G, McLaughlin MJ. 2001. The effect of aging biosolids on the availability of cadmium and zinc in soils. *Eu J Soil Sci.* **52**:131-321
- Stanier RY, Adelberg EA, Ingraham JL, Wheelis ML. 1979. *Introduction to the microbial world*. Prentice-Hall, Inc. Englewood
- Stark LR, Williams FM, Wenerick WR, Wuest PJ, Urban C. 1996. The effects of substrate type, surface water depth and flow rate on manganese retention in mesocosmos wetlands. *J Environ Qual.* **25**:97-106
- Starodub ME, Wong PTS, Mayfield IC, Chaud YK. 1987. Influence of complexation and pH on individuals and combined heavy metal toxicity to freshwater green algae. *Can J Fish Aquat Sci.* **44**:1173-1180
- Stauber JL, Florence TM. 1987. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biol.* **94**:511-519
- Stein JR (Ed). 1973. *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp 7-24
- Stoeppler M. 1995. Cadmium. In: Merian, E. (Ed) *Metals and their compounds in the environment*. VCH. Pp 803-838
- Stokes PM. 1983. Response of freshwater algae to metals. In: Round FE, Chapman DJ (Eds) *Progress in phycological Research*. Vol. 2. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. Pp 87-111

- Summers A, Silver S. 1978. Microbial transformation of metals. *Ann. Rev. Microbiol.* **32**:637-672
- Sutherland IW. 1984. Microbial exopolysaccharides: Their role in microbial adhesion in aqueous systems. *CRC Crit. Rev Microbiol.* **10**:173-201
- Sutherland IW. 1999. Biofilms exopolysaccharides. In: Wingerder J, Neu TR, Fleming HC (Eds) *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer, Berlin. Pp 73-92
- Suzuki T, Miyata N, Horitso H, Kawai K, Takamizawa K, Tai Y, Okazaki M. 1992. NADPH-dependent chromium (VI) reductase of *Pseudomona ambigua* G1: a Cr (V) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III). *J Bacteriol.* **174**:5340-5345
- Taghavi S, Delanghe H, Lodewyckx C, Mergèay M, van der Lelie D. 2001. Nickel-resistance based minitransposons: new tools for genetic manipulation of environmental bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **67**(2):1015-1019
- Takamura N, Kasai F, Watanabe MM. 1989. Effect of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *J Appl Phycol.* **1**:39-52
- Takamura N, Kasai F, Watanabe MM. 1990. Unique response of cyanobacteria to Cu. *J Phycol.* **2**:293-296
- Tam NFY, Wong JPK, Wong YS. 2001. Repeated use of two *Chlorella* species, *C. vulgaris* and *C. WW1*, for cyclic nickel biosorption. *Environ Pollut.* **114**(1):85-92
- Tamhaye RV, Motiramani DP, Boli YP. 1978. *Suelos: química y fertilidad en zonas tropicales*. Diana. México DF
- Tavera SG. 1985. Criterios para la interpretación y aprovechamiento de los reportes de laboratorio de las áreas de asistencia técnica. Publicación 3: Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, La laguna, Matamoros
- Thompson JB, Ferris FG. 1990. Cyanobacterial precipitation of gypsum, calcite, and magnesite from natural alkaline lake water. *Geology.* **18**:995-998
- Teitzel GM, Parsek MR. 2003. Heavy metal resistance of biofilms and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* **69**(4):2313-2320
- Tessier A, Campbell PGC, Bisson. M. 1979. Sequential extraction procedure for speciation of particulate trace metals. *Anal Chem.* **5**(7):844-851
- Tom-Petersen A, Hosbond C, Nybroe O. 2001. Identification of copper-induced genes in *Pseudomonas fluorescens* and use of a reporter strain to monitor bioavailable copper in soil. *FEMS Microb Ecol.* **38**:59-67
- Trevors JT. 1989. The role of microbial metal resistance and detoxification mechanisms in environmental bioassay research. *Hidrobiol.* **188/189**:143-147
- Trueb M. 1888. Notice sur la nouvelle flora de Krakatoa. *Ann J Bot.* **7**:221-223
- Tubbing MJD, Admiraal W, Cleven RFMJ, Iqbal M, van de Meent D, Verweij W. 1993. The contribution of complexes of copper to the metabolic inhibition of algae and bacteria in synthetic media and river water. *Water Res.* **28**:37-44
- Turpeinen R, Pantsar-Kallio M, Häggblom M, Kairesalo T. 1999. Influence of microbes on the mobilization, toxicity and biomethylation of arsenic in soils. *Sci Tot Environ.* **236**:173-180
- Turpeinen R, Pantsar-Kallio M, Häggblom M, Kairesalo T. 2002. Role of the microbes in controlling the speciation and production of arsines in contaminated soils. *Sci Tot Environ.* **285**:133-154
- Underwood GCJ. 1997. Microalgal colonization in salt marsh restoration scheme. *Est Coast Shelf Sci.* **44**: 471-481
- Uribe EG, Stark B. 1982. Inhibition of photosynthetic energy conversion by cupric ion. *Plant Physiol.* **69**:1040-1045

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- Vangronsveld J, Colpaert JV, Van Tichelen KK. 1996. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: Physico-chemical and biological evaluation of the soil treatment and revegetation. *Environ Pollut.* **94**:131-140
- Vauger B. 2001. *Development of natural photosynthetic biofilm and production of extracellular carbohydrates.* Department of Aquatic Ecology and Ecotoxicology, University of Amsterdam, Amsterdam
- Verrechia E, Yair A, Kidron GJ, Verrechia A. 1995. Physical properties of the psammophile cryptogamic crust and their consequences to the water regime of sand soils, North-western Negrev Desert, Israel. *J Arid Environ.* **29**:427-437
- Vieira MJ, Oliveira R, Melo L, Pinheiro M, van der Mei H. 1992. The adhesion of *Pseudomonas fluorescens* to metallic surface. *J Dispersive Sci Technol.* **13**(4):437
- Vizcaino MF. 1975. *La contaminación en México.* FCE. México DF
- Von Burg R, Greenwood MR. 1995. Mercury. In: Merian E. (Ed) *Metals and their compounds in the environment.* VCH. Weinheim. Pp 1044-1068
- Vymazal J. 1984. Short-term uptake of heavy metals by periphyton algae. *Hydrobiol.* **199**:171-179
- Vymazal J. 1990. Uptake of lead, chromium, cadmium, and cobalt by *Cladophora glomerata*. *Bull Environ Contam Toxicol.* **44**:797-806
- Walkley A. 1947. A critical examination on a rapid method for determining organic carbon in soil. *Soil Sci.* **63**:451-464
- Wang W-X, Dei RCH. 2001. Effects of major nutrients on metal uptake in phytoplankton. *Environ Pollut.* **111**:233-240
- Wightman PG, Fein JB. 2001. Ternary interactions in a humic acid-Cd-bacteria system. *Chem Geol.* **180**:55-65
- Wilden R, Schaaf W, Hüttl RF. 2001. Element budgets of two afforested mine sites after application of fertilizer and organic residues. *Ecol Eng.* **17**(2-3):253-273
- Wilkin RT, Ford RG. 2002. Use of hydrochloric acid for determining solid-phase arsenic partitioning in sulfidic sediments. *Env Sci Technol.* **36**:4921-4927
- Williams S, Sims H. 1993. *Las minas de plata en el Distrito Minero de Guanajuato: Una perspectiva histórica.* Centro de Investigaciones Humanísticas, Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Guanajuato
- Wilson AR, Lion LE, Nelson YM, Schuler ML, Ghiorse WC. 2001. The effects of pH and surface composition on Pb adsorption to natural freshwater biofilms. *Env Sci Technol.* **35**(15):3182-3189
- Wingender J, Neu TR, Fleming HC. 1999. What are bacterial EPS? In: Wingender J, Neu TR, Fleming HC (Eds) *Microbial extracellular polymeric substances.* Springer, Berlin. Pp 1-9
- Wolfaardt GM, Lawrence JR, Korber D. 1999. Function of extracellular polymeric substances. In: Wingender J, Neu TR, Fleming HC (Eds) *Microbial extracellular polymeric substances.* Springer, Berlin. Pp 171-200
- Wong HKT, Gauthier A, Nriagu JO. 1999. Dispersion and toxicity of metals from abandoned gold mine tailings at Goldenville, Nova Scotia, Canada. *Sci Tot Environ.* **228**:35-47
- Wuertz S, Sphaeth R, Hinderberg A, Griebel T, Fleming HC, Wilderer PA. 2001. A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals. *Water Sci Tech.* **43**(6):25-31
- Xue H, Sigg L. 1990. Binding of Cu to algal in metal buffer. *Wat Res.* **24**(9):1129-1136
- Ye ZE, Shu WS, Zhang ZQ, Lan CY, Wong MH. 2002. Evaluation of major constraints to revegetation of lead/zinc mine tailings using bioassay techniques. *Chemos.* **47**(10):1103-1111

- Zhixun-Lin.1997 Mobilization and retention of heavy metals in mill-tailings from Garpenberg sulfide mines, Sweden. *Sci Tot Environ.* **198**:13-31
- Zulpa de Caire G, Storni de Cano M, Zaccaro de Mulé MC, Palma RM, Colombo K.1997. Exopolysaccharide of *Nostoc muscorum* (Cyanobacteria) in the aggregation of soil particles. *J Appl Phycol.* **9**:249-253

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**APÉNDICES**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## APÉNDICE A1.1

# CÁLCULOS PARA LA RECONSTRUCCIÓN MINERALÓGICA (Difracción de Rayos X y Análisis de óxidos mayoritarios por Espectrofotometría de Absorción Atómica)

Las sustancias cristalinas producen un patrón de difracción característico (una especie de huella digital), por el cual la sustancia puede ser identificada, ya sea pura o en una mezcla. **Difracción de rayos X (DRX)**: Cuando un haz de rayos X monocromático incide sobre la superficie de un cristal, se refleja siempre y cuando el ángulo de incidencia tome ciertos valores, mismos que dependen de la longitud de onda y las dimensiones del cristal. El rayo incidente se refleja parcialmente en diferentes planos y los rayos reflejados se colectan simultáneamente en un detector; sin embargo, sólo hay difracción si se cumple la **Ley de Bragg**, principio en el cual se basa el análisis por difracción de rayos X:

$$2d\text{sen}\theta = n\lambda$$

d: distancia interplanar	n: orden de la difracción (generalmente = 1)
$\theta$ : ángulo de incidencia (se lee de la gráfica)	$\lambda$ : longitud de onda de los rayos X (1.5418 Å)

Cada vez que se cumpla la Ley de Bragg, el fenómeno de difracción ha ocurrido en el cristal; el rayo difractado se detecta como una señal en una gráfica que se llama "difractograma" o "patrón de difracción". El difractograma se obtiene al graficar  $\theta$  contra la intensidad. Una ventaja de la DRX es que informa el estado real de combinación química de una sustancia y no en términos de sus elementos constituyentes. La identificación de la sustancia se realiza comparando las líneas del difractograma obtenido, en cuanto a sus posiciones e intensidad, con respecto a patrones conocidos.

La muestra se muele en mortero de ágata y se homogeniza perfectamente. Posteriormente se coloca en un portamuestras y se somete al análisis de DRX (en el presente trabajo se empleó el Difractómetro SIEMENS D-500, Cu-K $\alpha$   $\lambda = 1.5405 \text{ \AA}$  a potencia de 3 kV y corriente de 20 mA). Después de obtenido el

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

difractograma, los picos obtenidos (en 2  $\theta$ ) se comparan con el archivo PDF (Powder Diffraction File). Una vez identificados los minerales más abundantes por DRX y cuantificados sus principales elementos por Absorción Atómica (y en algunos casos por termoanálisis), se realiza la reconstrucción mineralógica.

De esta manera:

1. A partir de los datos siguientes

Óxidos de elementos mayoritarios		Minerales detectados por DRX
SiO <sub>2</sub>	77.45%	Cuarzo (SiO <sub>2</sub> )
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5.97%	Minerales arcillosos tipo esmectita (probablemente montmorillonita o saponita)
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.95%	Caolinita (Al <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub> )
CaO	7.20%	Yeso (CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)
MgO	3.13%	Ortoclasa (KAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub> )
Na <sub>2</sub> O	0.38%	Plagioclasa (NaAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub> )
K <sub>2</sub> O	3.35%	Hematita (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
		Calcita (CaCO <sub>3</sub> )
		Magnesita (MgCO <sub>3</sub> )

2. Se realizó la reconstrucción mineralógica de la muestra superficial del jal Valenciana, efectuando los siguientes cálculos:

% Plagioclasa (todo el Na<sub>2</sub>O)



$$(0.38\%)(8.47\%) = 3.22\%$$

$$-\text{SiO}_2: (3.22\%)(0.657\%) = 2.21\% \text{ (-74.45\% SiO}_2\text{: 75.24\%)}$$

$$-\text{Al}_2\text{O}_3: (3.22\%)(0.195\%) = 0.628\% \text{ (-5.97\% Al}_2\text{O}_3\text{: 5.342\%)}$$

% Ortoclasa (todo el K<sub>2</sub>O)

$$(04.35\%)(5.92\%) = 19.38\%$$

$$-\text{SiO}_2: (19.38\%)(0.648\%) = 12.85\% \text{ (-75.24\%: 62.39\%)}$$

$$-\text{Al}_2\text{O}_3: (19.83\%)(0.195\%) = 3.86\% \text{ (-5.345\%: 1.482\%)}$$

\* Consideración: se emite mineral arcilloso, el Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> restante corresponde a la caolinita

% Caolinita

$$(1.482\%)(2.53\%) = 3.75\%$$

$$-\text{SiO}_2: (3.75\%)(0.465\%) = 1.749\% \text{ (-62.39\%: 60.65\%)}$$

$$-\text{H}_2\text{O}: (3.75\%)(0.14\%) = 0.525\% \text{ (-5.05\% ppc: 4.525\%)}$$

% Calcita: 5.09%

$$-\text{CaO}: (5.09\%)(0.56\%) = 2.85\% \text{ (-7.2\% CaO: 4.34\%, yeso)}$$

$$-\text{CO}_2: (5.09\%)(0.44\%) = 2.44\% \text{ (-4.525\% H}_2\text{O: 2.285\% yeso+ MgCO}_3\text{)}$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

% Magnesita: 3.12%

- MgO: (3.12%)(0.48%) = 1.49% (-3.13% CaO: 1.6%, MgSiO<sub>3</sub>)

- CO<sub>2</sub>: (3.12%)(0.52%) = 1.62% (-2.285% H<sub>2</sub>O: 0.665%, yeso)

---

% Cuarzo

- MgSiO<sub>3</sub>: (1.64%)(4.1%) = 4.1%

- SiO<sub>2</sub>: (4.1%)(0.6%) = 2.46% (-60.65%: 58.19%, cuarzo)

---

% Yeso:

(4.76%)(0.665%) = 3.14%

(3.14%)(0.21%) = 0.66% (-0.665%: 0, sin materia orgánica)

---

3. Concluyendo,

Cuarzo, SiO <sub>2</sub>	57.0%
Ortoclasa, KAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	16.0%
Calcita, CaCO <sub>3</sub>	8.3%
Caolinita, Al <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub>	5.6%
Yeso, CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.2%
Magnesita, MgCO <sub>3</sub>	3.1%
Plagioclasa, NaAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	2.5%
Clorita, Mg <sub>5</sub> Al(Si <sub>3</sub> Al)O <sub>10</sub> (OH) <sub>8</sub>	2.3%
Hematita, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.9%
Sulfatos en forma iónica	< 1%

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**\*NOTAS:**

**Datos generales para interpretar el termo-análisis de la muestra de jal Valenciana reciente**

Almóflera: N <sub>2</sub>	Porla-muestras: platino	T alcanzada: 1300 °C (Val. 10°C·min <sup>-1</sup> )
Peso inicial muestra: 12.7228 mg	Peso inicial final: 11.72 mg	Pérdida de peso total: 7.87%

Temperatura °C	Reacción	Pérdida de peso (%)	Valor máximo DTA*	Interpretación
30-454	endotérmica	0.8	-	Materia orgánica; agua de deshidratación
455-559	*	0.9	548.6	Deshidroxidación de caolín
560-758	*	3.86	685.9	Descomposición de magnesita
759-1229	*	1.85	1104	Descomposición de sulfatos
1230-1300	*	0.17	1257	Feldespatos

## APÉNDICE A1.2

Índices de correlación entre las fracciones metales, materia orgánica (MO), capacidad de intercambio catiónico (CIC) y concentración de elementos en lixiviados (lix)

Be	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	-0.14711	-0.44282	0.461374	-0.99928	-0.63606	-0.4394	-0.5515	-0.6459
ii		-0.06168	0.258242	0.131095	0.177873	0.79671	0.7003	0.5765
iii			0.484341	0.41419	0.951294	0.55142	0.6532	0.7455
iv				-0.49454	0.366329	0.46056	0.4061	0.3469
v					0.607978	0.40979	0.5221	0.6175
total						0.73298	0.827	0.9034
MO							0.9863	0.9435
CIC								0.9852

Tj	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	0.870063	0.31484	0.062129	0.965748	0.636666	0.77284	0.8068	-0.062
ii		0.184944	-0.34093	0.720608	0.211381	0.90591	0.8634	-0.4444
iii			-0.39065	0.433075	0.014005	0.55142	0.6532	-0.2651
iv				0.199919	0.795292	-0.5828	-0.5049	0.9838
v					0.752881	0.67013	0.7448	0.1688
total						0.02171	0.1217	0.767

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

MO						0.9863	-0.6186	
CIC							-0.5202	

V	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	-0.8241	-0.58077	0.948535	-0.47608	-0.27798	-0.7548	-0.7077	0.921
ii		0.938788	-0.62429	0.78782	0.748745	0.72378	0.7748	-0.5424
iii			-0.33304	0.815825	0.891897	0.55142	0.6532	-0.2283
iv				-0.17638	0.034497	-0.5702	-0.4832	0.9913
v					0.82211	0.9046		-0.1312
total						0.55432	0.6834	0.1162
MO							0.9863	-0.5798
CIC								-0.4758

Cr	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	-0.3408	-0.24803	-0.01662	-0.57718	-0.28424	-0.4416	-0.526	-0.4403
ii		0.109167	0.521392	0.55575	0.311959	0.88819	0.8108	-0.831
iii			0.828023	0.852166	0.977301	0.55142	0.6532	-0.2422
iv				0.82249	0.915587	0.80149	0.8133	-0.733
v					0.917644	0.86859	0.9366	-0.3089
total						0.70875	0.7853	-0.3981
MO							0.9863	-0.6056
CIC								-0.5041

Cr	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	0.007557	-0.9591	-0.84431	-0.82553	-0.8973	-0.428	-0.5613	-0.1755
ii		0.152845	0.585499	0.557211	0.369357	0.9004	0.8201	-0.4695
iii			0.825982	0.874646	0.97477	0.55142	0.6532	-0.1087
iv				0.849168	0.912513	0.80134	0.8125	-0.5843
v					0.945379	0.86298	0.9302	-0.0915
total						0.72015	0.7967	-0.2187
MO							0.9863	-0.3339
CIC								-0.2237

Mn	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	0.178416	-0.42385	0.178099	-0.6492	-0.22354	-0.7182	-0.7823	-0.1313
ii		-0.68684	-0.10641	-0.29915	-0.50859	0.14621	-0.0127	-0.4962
iii			0.653727	0.876986	0.951169	0.55142	0.6532	-0.2175
iv				0.628775	0.855289	0.45379	0.4361	-0.8004
v					0.860972	0.88444	0.9333	-0.4647
total						0.56983	0.6317	-0.4792
MO							0.9863	-0.5925
CIC								-0.4877

Fe	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	0.111134	-0.4111	0.843964	-0.40174	-0.26297	-0.3057	-0.4302	-0.5644
ii		0.855873	0.178222	0.789943	0.929604	0.51071	0.5424	-0.6678
iii			-0.23864	0.893369	0.983233	0.55142	0.6532	-0.2691
iv				0.106459	-0.06834	0.45088	0.3007	-0.85
v					0.915588	0.86739	0.9198	-0.4881
total						0.60854	0.6856	-0.4385
MO							0.9863	-0.5952
CIC								-0.4977

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Co	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	-0.83123	-0.46388	-0.786	-0.80668	-0.40961	-0.9836	-0.9424	0.521
ii		0.316352	0.923491	0.613407	0.383647	0.72948	0.8384	-0.7522
iii			0.639354	0.89574	0.977657	0.55142	0.6532	0.3839
iv				0.805393	0.70708	0.72904	0.6941	-0.447
v					0.849012	0.86207	0.9109	0.0049
total						0.46898	0.5562	0.3162
MO							0.9863	-0.367
CIC								-0.209

Ni	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	0.260244	-0.24137	0.15936	0.21138	0.02546	0.67118	0.577	-0.464
ii		0.775689	0.994124	0.925108	0.914619	0.65102	0.85	0.078
iii			0.804035	0.895512	0.95745	0.55142	0.6532	0.6636
iv				0.910086	0.920504	0.78995	0.7945	0.1002
v					0.981172	0.86492	0.9176	0.4135
total						0.75808	0.824	0.474
MO							0.9863	0.0418
CIC								0.2067

Cu	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	-0.43728	-0.0702	0.137185	-0.63695	0.090278	-0.6329	-0.6503	0.1214
ii		0.662121	0.830579	0.700201	0.796171	0.97158	0.9599	-0.2755
iii			0.668769	0.808269	0.900018	0.55142	0.6532	0.499
iv				0.362969	0.923995	0.67943	0.652	-0.2511
v					0.598269	0.73449	0.8354	0.3956
total						0.64281	0.6798	0.1257
MO							0.9863	-0.316
CIC								-0.156

Zn	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	-0.20201	0.373975	0.072958	0.410727	0.403816	-0.5371	-0.3988	0.5932
ii		0.700832	0.859242	0.690539	0.749162	0.66966	0.6498	-0.7501
iii			0.943046	0.998979	0.98834	0.55142	0.6532	-0.5212
iv				0.937642	0.939023	0.74781	0.8055	-0.7464
v					0.991902	0.51392	0.6184	-0.485
total						0.48125	0.5751	-0.4721
MO							0.9863	-0.9869
CIC								-0.9537

As	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	0.695039	0.512082	-0.2848	0.418468	0.934516	0.50977	0.6205	0.5323
ii		0.623873	0.329986	0.806278	0.869595	0.97222	0.9936	-0.2288
iii			-0.34903	0.911256	0.733182	0.55142	0.6532	0.0814
iv				0.067876	-0.15331	0.50973	0.3626	-0.8577
v					0.711978	0.81041	0.854	-0.2911
total						0.73243	0.8296	0.2705
MO							0.9863	-0.4501
CIC								-0.3121

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Se	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	0.079334	-0.47559	0.673206	0.006375	0.719387	-0.2639	-0.4001	-0.2265
ii		-0.54157	0.205106	-0.54252	0.245646	0.38238	0.279	-0.6796
iii			0.123903	0.876049	0.043472	0.55142	0.6532	0.9564
iv				0.528214	0.696724	0.51747	0.4017	0.2624
v					0.462023	0.51216	0.5503	0.9579
total						0.47188	0.3471	0.188
MO							0.9863	0.4154
CIC								0.4981

Mo	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	0.145483	0.686133	-0.31432	0.561067	0.994315	-0.1902	-0.0889	0.7255
ii		0.698657	-0.54313	0.885263	0.383631	0.490417	0.8879	0.6795
iii			-0.195	0.142114	0.850051	0.55142	0.6532	0.9884
iv				-0.45643	-0.34789	-0.1907	-0.1046	-0.2216
v					0.756458	0.7025	0.7541	0.9373
total						0.07542	0.1779	0.8786
MO							0.9863	0.511
CIC								0.8133

Cd	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	0.646953	0.893654	-0.38843	-0.01595	0.991844	0.64788	0.6824	0.8501
ii		0.23607	-0.74353	0.177457	0.544486	0.48052	0.3818	0.1549
iii			-0.06494	-0.11381	0.943536	0.55142	0.6532	0.991
iv				-0.79001	-0.30251	-0.8017	-0.6924	0.0668
v					-0.04791	0.74353	0.6741	-0.233
total						0.63179	0.6883	0.9092
MO							0.9863	0.4372
CIC								0.5518

Sb	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	-0.32649	0.5244	-0.31679	0.613635	0.420278	-0.4017	-0.2593	0.5519
ii		0.609894	0.883714	0.533726	0.717711	0.90809	0.873	0.5915
iii			0.420268	0.992817	0.982733	0.55142	0.6532	0.9293
iv				0.380195	0.579678	0.61727	0.5433	0.5784
v					0.970685	0.44937	0.558	0.9486
total						0.6039	0.6808	0.9581
MO							0.9863	0.3809
CIC								0.4553

Tl	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	0.835904	0.960784	0.663682	0.90978	0.92822	0.31441	0.4439	0.5637
ii		0.955285	0.959722	0.974906	0.980096	0.75239	0.815	0.0634
iii			0.841403	0.983292	0.994934	0.55142	0.6532	0.3333
iv				0.87471	0.890865	0.82687	0.8438	-0.1294
v					0.386404	0.68008	0.774	0.1719
total						0.62274	0.7119	0.2479
MO							0.9863	-0.8027
CIC								-0.4899

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Pb	ii	iii	iv	v	Total	MO	CIC	lix
i	0.015081	-0.37933	0.398198	-0.60224	0.048161	-0.8115	-0.8476	0.0613
ii		0.605114	0.899013	0.691765	0.793822	0.5533	0.5177	-0.9
iii			0.539981	0.921811	0.888153	0.55142	0.6532	-0.2813
iv				0.466159	0.854623	0.1513	0.1388	-0.6806
v					0.758929	0.82912	0.8865	-0.5149
total						0.32049	0.3866	-0.4482
MO							0.9863	-0.6376
CIC								-0.5413

Fraciones, i: intercambiable, ii: unida a carbonatos/específicamente adsorbida, iii: absorbida en óxidos de Fe y Mn, iv: absorbida en materia orgánica y sulfatos, v: residual. Total: representa la suma de las cinco fracciones. Rojo:  $r \geq 0.95$ ; Lila:  $0.95 > r > 0.90$

## APÉNDICE A2.1

### RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS BACTERIAS Y LEVADURAS

#### BACTERIAS AEROBIAS

##### COCOBACILOS GRAM POSITIVOS

	G3m	3C4	2C4a	2C1	G3s	3C8	2C5	3C2b	2D1	D2
CS	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Kliger	-	-	-	-	-	-	-	-?	-	-
HS	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
GN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Rojo Mebio	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ALD	-	-	-	-	-	-	-	-?	-	-
Agar Almídon	-	-	-	-	-	-	-	+?	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilosa	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Catalasa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CN	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Género	<i>Corynebacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>
Especie	sp B1	sp	sp	sp	sp B3	sp B1	sp B1	<i>aquaticum</i>	sp	sp B3

CLAVES: CS: citrato de Simmons; GN: gelatina nutritiva; VP: prueba de Vogel y Proksauer; ALD: agar-leche descremada; CN: caldo nutritivo con NaCl al 6%

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## BACTERIAS AEROBIAS (Cont.)

### COCOS GRAM POSITIVOS y GRAM VARIABLES

	2C4b	3C1	3C3	2C3	2B	3A1	4
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa	-	-	-	-	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	-	-	-
Maltosa	-	-	-	-	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	+	+	+
Trealosa	-	-	-	-	-	+	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-
Meliblosa	+	+	+	+	-	+	-
Nitratos	-	-	-	-	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-
Xilosa	+	+	+	+	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	+	+	+
Mdg	-	-	-	-	+	+	-
Nag	-	-	-	-	+	+	-
Arginina	-	-	-	-	+	-	+
Ureasa	-	-	-	-	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-
DNAasa	-	-	-	-	-	-	-
Coagulasa	-	-	-	-	-	-	-
Omitina	-	-	-	-	-	+	ND
MH	-	-	-	-	-	-	-
RM-VP	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	ND
Fructosa2	-	-	-	-	-	-	+
Trealosa2	-	-	-	-	-	-	-
Manitol2	-	-	-	-	-	-	-
Xilosa2	+	+	+	+	-	-	-
Género	<i>Staphylococcus</i>						
Especie	<i>S. xilosus</i>			<i>S. sp</i>	<i>S. sp</i>	<i>S. saprophyticus</i>	

Pruebas de fermentación de los azúcares señalados. CLAVES: NAG: N-Acetil-glucosaminidasa; ADH: arginina dihidrolasa; MH: pigmentación en agar de Müller-Hinton a 37 y 42°C; VP: prueba de Vogel y Proksauer; RM: rojo de metilo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## BACTERIAS AEROBIAS (Cont.)

### BACILOS GRAM POSITIVOS

	5B2	2C2	3C2g	L2B1 b	2D3	L2B1 c	L2B1 a	5B1 c	5B1 g
CS	-	-	-	+	-	-	-	+	+
Kligler	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GN	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	+	+
RM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALD	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AA	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	+	+	-	+	-	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacárosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitratos	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CN	+	+	-	+	+	+	+	+	+
42°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Género	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>pumilus</i>	<i>pumilus</i>	<i>brevis</i>	<i>subtilis</i>	<i>pumilus</i>	<i>subtilis</i>	<i>subtilis</i>	<i>subtilis</i>	<i>subtilis</i>

CLAVES: CS: citrato de Simmons; GN: gelatina nutritiva; VP: prueba de Vogel y Proksauer; RM: rojo de metilo; ALD: agar-leche descremada; AA: agar-almidón; CN: caldo nutritivo con NaCl al 6%

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## BACTERIAS AEROBIAS (Cont.)

### BACILOS GRAM POSITIVOS (Cont.)

	L2A	4B2	4A(1)	4B5 n	C2 a	C2 b
CS	+	-	-	-	-	-
Kliger	-	-	-	-	-	-
HS	+	+	+	+	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-
Movilidad	-	+	+	-	-	-
Esculina	+	+	+	+	+	+
GN	+	+	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	+	+
Rojo Matilo	-	-	-	-	-	-
ALD	+	+	-	+	+	+
Agar Almidón	+	+	-	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Xilosa	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	-	-	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	-	-	-
Salicina	+	-	+	+	+	+
Catalasa	+	+	-	+	+	+
Nitratos	+	+	+	-	-	-
Oxidasa	+	-	+	+	+	+
CN	+	+	+	-	-	-
42°C	+	-	-	+	+	+
Género	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>subtilis</i>	<i>cereus</i>	<i>naesiundii</i>	<i>pumilus</i>	<i>pumilus</i>	<i>pumilus</i>

(1): mayor desarrolló en Gelosa-chocolate que en BHI: CLAVES: CS: citrato de Simmons; GN: gelatina nutritiva; VP: prueba de Vogel y Proksauer; ALD: agar-leche descremada; CN: caldo nutritivo y NaCl 6%

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## BACTERIAS AEROBIAS (Cont.)

### BACILOS GRAM NEGATIVOS

	C6 b	4B5 b	4B3	3O5	L1B3 be	B2	2B1
Oxidasa	-	+	+	+	-	+	+
Ox glucosa	+	+	+	+	+	+	+
F gluc	+	-	-	-	-	+	+
42°C	+	+	+	+	+	+	+
MH	-	-	-	-	-	-	ND
CS	+	+	+	+	-	+	+
Klieger	-	-	-	-	+	-	-
Manosa	-	-	-	-	+	ND	ND
Sacarosa	-	-	-	-	+	ND	ND
VP	+	+	+	+	+	-	-
Rojo Metilo	-	-	-	-	-	-	-
HS	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	-	+	+	+	-	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-
McConkey	-	-	-	-	-	ND	ND
Sacarosa	-	-	-	-	-	ND	ND
TCBS	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
DNAsa	-	ND	ND	ND	ND	-	-
GN	-	ND	ND	ND	-	-	-
Nitratos	ND	ND	ND	ND	ND	+	+
Esculina	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
MIO	-,-,-	ND	ND	ND	ND	+, -, +	+, -, +
Malonato	+	ND	ND	ND	-	ND	ND
Género	<i>Klebsiella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Plesiomona</i>	<i>Plesiomona</i>
Especie	<i>K. sp</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>A. sp</i>	<i>shigelloides</i>	<i>shigelloides</i>

CLAVES: Ox gluc: oxidación de glucosa; F gluc: fermentación de glucosa; MH: pigmentación en agar de Müller-Hinton a 37 y 42°C; CS: citrato de Simmons; VP: prueba de Vogel y Proksauer; TCBS: agar tiosulfato citrato y sales biliares; GN: gelatina nutritiva; MIO: movilidad, indol y ornitina; ND: no determinado

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## BACTERIAS AEROBIAS (Cont.)

### BACILOS GRAM NEGATIVOS NE (+Apl 20 NE)

	4B4	C5a	C5b
Nitrato	+	+	+
Trp	-	-	-
Fermentación de glucosa	-	-	-
ADH	+	+	+
Ureasa	-	-	-
Esculina	+	+	-
Gelatina	-	-	+
PNPG	-	-	-
Glu-a	+	+	+
Ara	-	+	+
Manosa	-	+	-
Manitol	+	+	+
NAG	-	+	+
Maltosa	+	+	+
Gnt	+	+	+
Caprato	+	+	+
Adipato	-	+	-
Malato	+	+	+
Citrato	+	+	+
Pac	-	-	-
Ox	+	+	+
42°C	+	+	+
HS	ND	ND	ND
Indol	ND	ND	ND
Movilidad	ND	ND	ND
OF-Oxidación	-	-	-
OF-Fermentación	-	-	-
Fructosa			
Mac	+	+	ND
Cetrim	ND	ND	ND
Género	<i>Pseudomona</i>		
Especie	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i>

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## BACTERIAS ANAEROBIAS GRAM POSITIVAS (Cont.)

	COCOS		BACILOS	
	A101b	C110	2C100	C108
Ureasa	-	+	+	+
ADH	-	-	+	-
$\alpha$ Galactosidasa	-	-	-	-
$\beta$ Galactosidasa	-	-	-	-
$\beta$ GP	-	-	-	-
$\alpha$ Glucosidasa	-	-	-	-
$\beta$ Glucosidasa	-	-	-	-
$\alpha$ ARA	-	-	-	-
$\beta$ GUR	-	-	-	-
$\beta$ NAG	-	-	-	-
Manosa	+	-	-	-
Ralinoso	-	-	-	-
GDC	-	+	-	-
$\alpha$ Fucosidasa	-	-	-	-
Nitratos	+	-	-	-
Indol	+	+	+	+
PAL	-	+	+	-
Arginina A	-	-	-	-
Prolina A	-	+	+	+
LG A	-	-	-	-
fenilalanina A	-	-	-	-
Leucina A	-	+	+	-
Pirina A	-	-	+	-
Tirosina A	-	-	-	-
Alanina A	-	-	+	-
Glicina A	-	-	-	-
Histidina A	+	-	-	-
Glutamina A	-	-	-	-
Serina A	-	-	-	-
Catalasa	-	-	-	-
Esporas	-	+	+	+
Género	<i>Peptococcus</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i>

ADH: arginina dihidrolasa; GP: galactosidasa-6-fosfato; ARA: arabinosidasa; GUR: glucuronidasa; NAG: N-Acetil-glucosaminidasa; GDC: ácido glutámico decarboxilasa; PAL: fosfatasa alcalina; A: anilamidasa; LG: leucil glicina

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## LEVADURAS

	L1A4	L2A	"coralito" (L2Ac)
Pseudomicelio	-	-	+
Ascosporas	-	-	-
Glucosa	+	-	+
Glicerol	+	+	+
2-ceto-D-gluconato	+	-	+
Arabinosa	-	-	+
D-Xilosa	-	-	+
Adonitol	+	+	-
Xilitol	-	-	-
Galactosa	+	-	+
Inositol	-	-	+
Sorbitol	+	-	+
$\alpha$ -metil-D-glucosa	-	-	+
N-acetil-glucosa	-	-	-
Celobiosa	+	-	+
Lactosa	-	-	+
Maltosa	+	+	+
Sacarosa	+	+	+
Trealosa	+	-	-
Melezitosa	+	+	+
Ralinoso	-	+	+
Sacarosa (a/f)	nd	nd	-/-
Glucosa (a/f)	nd	nd	+/-
Maltosa (a/f)	nd	nd	-/-
Lactosa (a/f)	nd	nd	-/-
Morfotipo	<i>Candida</i>	<i>Rhodotorula</i>	nd
Especie		<i>R. rubra</i>	nd

NOTA: (a/f): asimilación/fermentación

## APÉNDICE A2.2

### DESCRIPCIONES DE CIANOPROCARIONTAS, CLOROFITAS Y DIATOMEAS

CYANOPROKARYOTA Komárek 1989

CYANOPHYCEAE Sachs 1874

CHROCOCCALES Wettstein 1924

SYNECHOCOCCACEAE Komárek et Anagnostidis 1992

APHANOTHECOIDEAE Komárek et Anagnostidis 1992

*Aphanothece* Nägeli 1849

Cfr. *A. saxicola*. In Desikachary 1959, Pag. 138, lámina 22 fig. 11

Cenobio amorfo con mucllago incoloro, difuso; células verde-azules, elipsoidales o ligeramente bacilares, distribuidas irregularmente en el mucllago, solitarias o en pares, más o menos separadas entre sí. División celular en dos planos. Contenido celular homogéneo, no se observó granulaciones, nanocitos ni aerotopos. Dimensión de las células: diámetro

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

(D) y largo (L)= 1.9-2.4µm, ancho (a)= 0.9 µm. Especies de este género han sido caracterizadas como edáfica y epilítica (Novelo 1998). En suelos pantanosos, en desagües o en cultivos de muestras de suelo.

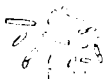


#### SYNECHOCOCCOIDEAE Komárek et Anagnostidis 1992

##### *Synechococcus* Nägeli 1849

Cfr. *S. elongatus* (Nägeli) Nägeli 1849. In Komárek y Anagnostidis, 1999, pag. 123, fig. 137

Células bacilares (cilíndricas), rectas, con ápices redondeados; solitarias o en grupos de 2-4, sin mucilago común; contenido celular homogéneo sin granulaciones, verde cian pálido; división celular transversal por fisión binaria; después de la división, las células tienden a mantenerse unidas, formando pseudofilamentos de hasta 4 células. L: 3-4 µm; a: 1-2 µm. Especies de este género poseen formas de vida edáfica y epilítica: suelo de zonas áridas, suelos húmedos, lodos, rocas húmedas (Novelo, 1998). *S. elongatus* ha sido reportada en rocas sumergidas de un lago en India (Desikachary 1959). Subaerofítica en suelos húmedos, zonas pedregosas y paredes húmedas; reportadas para zonas tropicales (Komárek y Anagnostidis 1999)



#### MERISMOPEDIACEAE Elenkin 1934

##### *Aphanocapsa* Nägeli 1849

Cfr. *A. grevillei* (Berkeley) Rabenhorst 1865. In Desikachary (1959) pag. 134, lámina 21 fig. 9; In Komárek y Anagnostidis (1999) pag. 159, fig. 194

Cenobio más o menos esférico con mucilago homogéneo común, incoloro. Células esféricas a subesféricas, localizadas de manera irregular dentro de la colonia (hasta 40 células por colonia); contenido celular homogéneo azul-verde, sin granulaciones; división celular en dos direcciones o planos; células hijas en una vaina común. D < 3 µm. Especies de este género pueden ser edáficas y epilítica (suelos de zonas áridas, suelos húmedos, lodos, rocas húmedas) (Novelo 1998). *A. grevillei* ha sido reportada en suelos húmedos de India (Desikachary 1959); ocasionalmente en sustratos pedregosos húmedos o en suelos pantanosos (Komárek y Anagnostidis 1999)



#### OSCILLATORIALES Elenkin 1934

##### PHORMIDIACEAE Anagnostidis et Komárek 1988

##### PHORMIDIUOIDEAE Anagnostidis et Komárek 1988

##### *Phormidium* Kützing ex Gomont 1892

*Phormidium* Cfr. *mucosum* Gardner In Desikachary (1959) Pag. 265, lámina 43 fig. 6

Filamentos largos, formando una mata intrincada; vaina lisa e incolora; filamento que tiende a trenzarse, no forma pseudoramificaciones; sin constricciones en septos; células más largas que anchas, algunas ligeramente más largas que otras; citoplasma homogéneo sin vacuolas ni granulaciones; célula apical similar a las intercalares, ligeramente más larga, con ápice redondeado y sin caliptra. División del tricoma por muerte de célula intercalar. Forman homociontos. L célula: 2-3 µm (3.6 apical); a: 1.7-2.4 µm

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

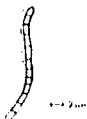


**PSEUDOANABAENACEAE** Anagnostidis *et* Komárek 1988

**PLANKTOLYNGBYA** Anagnostidis *et* Komárek 1988

*Planktolyngbya* Cfr. *subtilis* (Lemmerman 1898) Anagnostidis *et* Komárek (1988); Desikachary (1959) pag. 294, fig. 50: 11 (= *Lyngbya limnetica* Lemmerman 1898). Anagnostidis y Komárek (1988)

Colonias postradas, costrosas. Filamentos con vaina individual formando un agrupamiento con tricomas enredados, sin falsas ramificaciones; constricciones en septos. Células ligeramente más largas que anchas, con citoplasma homogéneo aunque más denso hacia la periferia, algunas con 1-2 aerotopos hacia la región apical de la célula que la presenta, aerotopos más comunes en hormogonios; célula apical hemiesférica, redondeada y sin caliptra; división celular transversal, sin zonas meristemáticas y no forman necridios. Hormogonios móviles, por deslizamiento. L= 1.7-2.1  $\mu$ m, a= 1.7-2.3  $\mu$ m



**BORZIACEAE** Borzi 1914

**BORZIA** Cohn *et* Grom 1892

Cfr. *Borzia penkei* Anagnostidis (1983). In Anagnostidis y Komárek (1988), pag 370, fig.16:6

Trícoma corto, de 2-8 células, sin ramificaciones, vaina ni movimiento, con constricciones muy evidentes. Células en forma de barril con citoplasma homogéneo, tilacoides periféricos; no se observan necridios, división celular transversal. Células ligeramente más largas que anchas, L= 3.2-4.7, a= 2.8-4.2  $\mu$ m



**NOSTOCALES** (Borzi 1914) Geitler 1925

**NOSTOCACEAE** Dumont 1829

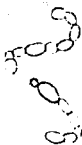
**ANABAENOIDEAE** (Bornet *et* Flahault 1886) Kirchner 1900

*Anabaena* Bory de St. Vincent 1822 ex. Bornet *et* Flahault 1886

In Bourrelly (1970); Novelo (1998)

Tricomas en agrupaciones, mucilago común, difluente; filamentos isopolares, sin ramificaciones. Células en forma de barriles, más largas que anchas, con granulaciones citoplasmáticas; célula apical muy ligeramente mayor y esférica. Acinetos elipsoidales, que se desarrollan adyacentes a heterocitos o terminales; acinetos sin ornamentaciones, separados entre sí por 20-30 células; heterocitos intercalares, esféricos. División celular por fragmentación del filamento (hormogonios), por constricción de una célula. Dimensiones de células L= 3.8  $\mu$ m, a= 3.6  $\mu$ m; heterocito: D= 4.18-4.85  $\mu$ m; acineto: L= 5.04  $\mu$ m, a= 4.28  $\mu$ m. Especies de este género han sido tipificadas como edáficas (suelos húmedos o secos, arcillosos o arenosos) (Novelo 1998)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## CHLOROPHYTA

CHLOROPHYCEAE Kützing 1843 (*sensu* Silva 1982)

CHLOROSARCINALES Groover *et* Bold 1969

CHLOROSARCINACEAE Groover *et* Bold 1969

CHLOROSARCINOPSIS Herdon 1958

*Chlorosarcinopsis* sp.

Colonias verde pardo y, con el tiempo, tonos zanahoria oscuro, costroso. Sarcinas densas; talos formando paquetes de células con desmoesquisis, más o menos cúbicos con vaina común de 2, 4 u 8 (16) células. Células con pared celular gruesa, discontinua (ondulaciones), un núcleo, granulaciones citoplasmáticas refringentes de color naranja-zanahoria que toman una coloración negra con lugol, en células adultas, periféricas. Cloroplasto parietal, esponjoso; pirenoide basal con 5-6 cojinetes; se observaron células con 2-5 pirenoides. Células jóvenes solitarias con cloroplasto parietal, de urna con abertura en tres direcciones; presentan vacuolas. División celular con formación del septo de manera unilateral, las células hijas aprovechan la pared materna; pared rígida. Durante la división celular desaparece el pirenoide. Aplanosporas ovoides. Zoosporas billageladas.



CHLORELLALES Bold *et* Wynne 1978

CHLORELLACEAE (Wille) Brunthaler 1915

CHLORELLA Beijerinck 1890

*Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890

*In* Komárek y Fott (1983), pag. 594, fig. 168

Células solitarias, elipsoidales (jóvenes) a esféricas (adultas); cloroplasto en forma de copa, parietal; un pirenoide con 2 a 5 gránulos de almidón, lateral a la abertura del cloroplasto. Multiplicación mediante 2, 4 u 8 autoesporas elipsoidales, todas del mismo tamaño; la pared celular materna se rompe en 2 ó 4 gajos más o menos triangulares que persisten unidos después de la liberación de las esporas. Vacuolas grandes de lípidos en células viejas. D: 5-8.5  $\mu$ m



## BACILLARIOPHYCEAE Fritsch 1953

PENNALES Kirchner 1878

ARAPHIDINEAE Hustedi 1930 *sensu* Simonsen 1979

FRAGILARIACEAE Greville 1883

FRAGILARIA Lyngbye 1819

*Fragilaria construens* fo. *construens* (Ehrenberg) Hustedi 1957

*In* Krammer y Lange-Bertalot (1991a), pag. 153, fig. 129:21-27, 132:1-34

Frústulo con simetría bipolar; márgenes muy convexos en el centro, de manera que tiene apariencia de cruz (*estauros*); ápices redondos; área central ausente; área axial lineal-lanceolada; estrías paralelas. L: de 14.31 a 20  $\mu$ m; A: de 6.57 a 9.87  $\mu$ m; estrías: de 10 a 11 en 10  $\mu$ m



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

RAPHIDINEAE Hustedt 1930 *sensu* Simonsen 1979

ACHNANTHACEAE Kützing 1844

COCCONEIS Ehrenberg 1838

*Cocconeis placentula* Ehrenberg 1838

In Krammer y Langa-Beralot, 1991ab, pag. 86, fig. 5:1-5

Células elípticas ampliamente redondeadas, valva con rafe: área axial estrecha y lineal, área central más o menos circular y pequeña; rafe filiforme, recto, central, terminaciones proximales cercanas, terminaciones distales rectas e internas al área marginal; estrías finamente punteadas, curvas, con interrupción hialina. Valva sin rafe: pseudorrafe lineal, mas o menos recto; sin área central; estrías radiadas, curvas, punteadas, ondulantes. L: 20µm; A: hasta 15 µm; estrías: 12-18 (valva con rafe) y 13-20 (valva sin rafe) en 10 µm



## APÉNDICE A3

### TÉCNICAS ANALÍTICAS

#### A3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE JAL

##### MANEJO DE MUESTRAS (Richards 1974)

Colectar la muestra con pala de plástico; guardar en bolsa de plástico. Secar la muestra el tiempo necesario

Cernir en tamiz con malla de 2 milímetros (mm) de abertura, pasarla a una bolsa de plástico nueva

##### ANÁLISIS CUALITATIVO MINERALÓGICO POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X (Ramos 1991)

1. Se coloca una porción de muestra finamente molida y seca en el porta-muestras, barriendo la muestra con un portaobjetos para que quede perfectamente plana
2. Se coloca el porta-muestras en el difractómetro SIEMENS D500 y se indican las condiciones de operación
3. Una vez obtenido el difractograma se miden los ángulos y la longitud de cada curva y se comparan estos datos con los compilados en el archivo de datos "Powder Diffraction Data" (Joint Committee on Powder Diffraction Standards 1976), a fin de establecer los minerales detectados

##### CONCENTRACIÓN DE ELEMENTOS MAYORES POR FUSIÓN (Ramos 1991)

1. Secar la muestra a 110°C durante 2 h
2. En un crisol de platino, pesar 1 g de carbonato de litio (LiCO<sub>3</sub>); posteriormente, 0,3 g de muestra seca y, por último, 1 g de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>). Mezclar hasta homogeneizar, evitar pérdida del material
3. Calcinar la mezcla anterior a 950°C durante 30 min
4. Colocar el crisol en un vaso de precipitados, añadir 50 ml de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) al 10%, tapar con un vidrio de reloj y agitar magnéticamente hasta la disolución total de los cristales
5. Transferir la muestra disuelta a un matraz de 250 ml y aforar con agua destilada (AD), lavando del crisol y el vaso

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Preparar las disoluciones necesarias (1:10, 1:20, 1:50 ó 1:100, según se requiera), en matraces de 100 ml, aforar con AD y por duplicado, a un duplicado añadir el estándar antes de aforar (muestra con adición de estándar). Para la determinación de Ca y Mg, añadir 1 ml de óxido de lantano al 10%, para eliminar interferencias del Al
- Determinar la absorbancia de Si, Al, Fe, Mg, Na y K por espectrofotometría de absorción atómica, preparar las soluciones estándar necesarias. Realizar la determinación de Si el día de la preparación de la muestra, ya que en la práctica se observan alteraciones en los resultados de un día para otro
- Calcular el porcentaje del óxido metálico correspondiente de la siguiente manera:

Concentración elementos

$Cd = (Am)(Cs)/As$	$Cm = (Cd)(Vd) (fd)/w$
Cd: concentración muestra en disolución	Cm: concentración muestra (mg·kg <sup>-1</sup> )
Cs: concentración estándar (ppm)	Vd: volumen de muestra en disolución (V de aforo)
Am: absorbancia muestra	w: peso muestra (g)
As: absorbancia estándar	fd: factor de dilución
	fd= Vol muestra diluida (ml)/ Vol alícuota dilución (ml)

- b) Porcentaje del óxido metálico correspondiente

$$\% R_xO_y = (Cm)(Vt)(Vd)(100/w) / (R_xO_y / R_z)(10^{-6})$$

Vt: dilución total

R<sub>x</sub>O<sub>y</sub>/ R<sub>z</sub>: relación de pesos moleculares

El balance de materia incluye la determinación de la pérdida de peso por calcinación a 950°C de 1 g de muestra seca

#### DETERMINACIÓN DE COLOR (Richards 1974)

- Colocar 0.5 g de muestra (aproximadamente) en una placa de porcelana
- Comparar el color con la Tabla de Colores Munsell (Munsell Color Soil Charts 1975) hasta encontrar el color adecuado; anotar la clave del mismo y buscar el color correspondiente en la lista de nombres de colores
- Humedecer la muestra y determinar el color nuevamente

#### TEXTURA (Bouyoucos in Black 1965)

- Destrucción de materia orgánica: Pesar 55-60 g de muestra y colocar en un vaso de precipitados de 500 ml; humedecer el suelo con AD; agregar 20 ml de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 8%; calentar en la parrilla hasta que deje de hacer efervescencia y se evapore la mayor parte del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; añadir 20 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y permitir que evapore hasta que seque completamente. Este paso puede omitirse si la muestra posee menos del 1% de materia orgánica
- Secar la muestra en horno durante 24 h a 105 °C. Pesar 50 g de la muestra seca
- Colocar la muestra en el vaso de la batidora; agregar 10 ml de solución dispersante (solución 1:1 de metasilicato de sodio, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, y oxalato de sodio) y la cantidad de AD necesaria hasta la segunda marca del vaso. Agitar durante 3-5 min
- Vaciar en una probeta de 1000 ml, aforar a 1000 ml con AD y agitar 1 min, para volver a suspender las partículas
- Tomar lectura con el hidrómetro a los 40 seg
- Tomar una segunda lectura a las 2 h
- Calcular el porcentaje de limos, arcillas y arenas empleando las siguientes fórmulas:

% de limos y arcillas	(lectura hidrómetro a los 40" / peso suelo seco) • 100
% de arcillas	(lectura hidrómetro a las 2 h / peso suelo seco) • 100
% de arenas	100 - % de limos y arcillas
% de limos	% de limos y arcillas - % de arcillas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### **DENSIDAD REAL (Richards 1974)**

1. Pesar 10 g de muestra (dato w) y vaciar en un matraz de 100 ml
2. Llenar una probeta analítica con 100 ml de agua
3. Aforar a 100 ml el matraz con la muestra
4. Medir el volumen de agua que quedó en la probeta (dato V)
5. Obtener la densidad real ( $\delta_r$ ) con la siguiente fórmula:

$$\delta_r = w/V$$

#### **DENSIDAD APARENTE (Richards 1974)**

1. Pesar una probeta de 10 ml completamente seca (dato P)
2. Agregar muestra hasta que se compacte lo más posible (golpeando); medir el volumen que ocupa la muestra en la probeta (dato V)
3. Pesar la probeta con la muestra (dato Pm)
4. Calcular la densidad aparente ( $\delta_a$ ) con la siguiente fórmula:

$$\delta_a = Pm \cdot P/V$$

#### **POROSIDAD (Richards 1974)**

1. Calcular a partir de los datos de las densidades real y aparente, mediante la fórmula:

$$\text{Porosidad} = \delta_r - \delta_a / \delta_r$$

#### **pH y CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (CE) (Richards 1974)**

1. Pesar 10 g de muestra y verter en un vaso de precipitados de 100 ml
2. Añadir 10 ml de AD (pH 7); sellar vaso. Agitar durante 30 min
3. Hacer lecturas. Para la CE, calibrar con una solución de KCl de concentración conocida

#### **CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO (Bower 1952)**

Las soluciones se preparan con agua desionizada; el material se lava con agua desionizada

1. Pesar 5 g de muestra
2. Añadir 25 ml de una solución 1:1 de BaCl<sub>2</sub> 1M y Trietanolamina al 9% pH 8.1
3. Agitar fuertemente durante 10 min a temperatura (T) ambiente. Centrifugar 5 a 10 min a 2000 revoluciones por minuto (rpm), decantar sobrenadante. Repetir 3 veces
4. Añadir 25 ml de agua desionizada, agitar durante 5-10 min a T ambiente. Centrifugar 5 min a 2000 rpm, decantar sobrenadante. Repetir lavado con agua desionizada 3 a 4 veces
5. Añadir 25 ml de MgSO<sub>4</sub> 0.01N y agitar durante 5-10 min a T ambiente. Centrifugar 10 min a 2000 rpm
6. Decantar sobrenadante en un matraz
7. Hacer las diluciones necesarias por duplicado, a uno de los duplicados, añadir 1 ml del estándar (0.1 ppm de Mg) antes de aforar (muestra con adición de estándar)
8. Leer en espectrofotómetro de absorción atómica la absorbancia de Mg en la solución de MgSO<sub>4</sub> 0.01N y en las diluciones, para calcular la CIC

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **PORCENTAJE DE MATERIA ORGÁNICA POR PÉRDIDA DE PESO POR CALCINACIÓN**

1. Secar la muestra a 110°C durante 2h. Pesar 1 g de muestra en un crisol de platino
2. Hornear hasta 350°C durante 30 min
3. Dejar enfriar y pesar el crisol con muestra y determinar pérdida de peso de muestra por calcinación
4. Calcular el porcentaje de peso perdido

### **PORCENTAJE DE MATERIA ORGÁNICA POR TITULACIÓN (Walkley 1947)**

1. Secar la muestra a 110°C durante 2h. Pesar 0.5 g de muestra y pasarla a un matraz Erlenmeyer de 250 ml
2. Agregar 5 ml de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) 1 N. Añadir 10 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado; agitar 1 min. Dejar reaccionar por 30 min
3. Añadir a la muestra 100 ml de AD, 5 ml de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) concentrado y 6 gotas de indicador (bariosulfonato de difenilalanina)
4. Titular muestra con sulfato ferroso ( $FeSO_4$ ) 0.5 N hasta que vire de un color rojizo a olivo-azulosos y, finalmente, verde esmeralda bandera. De manera previa, deben prepararse y titularse los blancos
5. Calcular el porcentaje de materia orgánica (%MO) de la siguiente manera:

$$\%MO = (5 \text{ ml de } K_2Cr_2O_7 \text{ N}) - (\text{ml de gastado} \times 0.5N \times FC) / 0.5 \text{ g de muestra}$$

FC: relación entre los 10 l de que se gastarán, teóricamente y los ml gastados realmente en el blanco

### **ANÁLISIS ELEMENTAL (por ciento de C, H, O, N y S TOTALES)**

1. Iniciar el ascenso de temperatura en el horno del Analizador Elemental (Carlo Erba, modelo EA 1100 para CHNS-O) hasta 1020°C. Abrir llaves de gases ( $O_2$  y He), ajustar presión a 150 kP y flujo a 120 ml/min
2. Pesar 1-3 mg de muestra seca, perfectamente homogeneizada en un crisol de aluminio. Colocar el crisol en el automuestreador del Analizador Elemental e iniciar la calcinación de la muestra cuando se alcancen los 1020°C. Registrar los porcentajes de C, H y N (dados automáticamente por el Analizador Elemental)
3. Pesar 5-10 mg de muestra seca en el crisol; pesar 10-20 mg de pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ); mezclar perfectamente bien. Colocar el crisol en el automuestreador del Analizador Elemental e iniciar la calcinación a 1020°C. Registrar el porcentaje de C, H, N y S totales
4. Calcular el porcentaje de óxido total presente, a partir de los datos obtenidos

### **FÓSFORO TOTAL (Chapman y Pratt 1961)**

1. Preparar las siguientes soluciones:
  - a) Molibdato de amonio,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ : Disolver 1.5 g del molibdato de amonio en 30 ml de AD hasta 50°C, para que se disuelva; dejar enfriar y filtrar si es necesario; añadir 35 ml de HCl 10 N; dejar enfriar y aforar a 100 ml
  - b) Cloruro de estaño,  $SnCl_2$ , concentrado: disolver 10 g de  $SnCl_2$  en 25 ml de HCl concentrado; pasar a un frasco ámbar (almacenar por no más de 2 meses)
  - c)  $SnCl_2$  diluido: A 1 ml de la solución anterior, añadir 332 ml de AD. Agitar bien antes de usarse (preparar cada 8 h)
  - d) Estándares de fósforo: Secar 1 g de  $KH_2PO_4$  y pesar 0.2195 g; verter en un matraz volumétrico de 1 l; aforar con AD. Esta solución posee 50 ppm de P. Tomar alícuotas para preparar las soluciones para la curva de titulación

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



2. Pesar 2 g de muestra seca y molida; pasar a un vaso de precipitado de 50 ml y añadir ml de HClO<sub>4</sub> al 72%; cubrir con un vidrio de reloj y calentar hasta que el residuo tome un aspecto de sal blanca; agitar de vez en cuando y evitar que la muestra salpique y llegue a la sequedad
3. Dejar enfriar y añadir AD para disolver a 30 ml, aproximadamente
4. Filtrar a un matraz volumétrico de 100 ml, lavando los residuos y aforar con AD
5. Tomar 20 ml de alícuota y pasar a un matraz volumétrico de 50 ml; medir pH. Añadir 1 gota de indicador; si éste conserva la tonalidad roja, agregar NaOH 0.2N hasta que el indicador cambie de color
6. Añadir 10 ml de AD, 10 ml de la solución de molibdato y 5 ml de la solución diluida de SnCl<sub>2</sub>; aforar con AD
7. Leer en espectrofotómetro la transmitancia a 660-680 m $\mu$  de longitud de onda después de 10 min de preparada la muestra, pero no antes de 20 min
8. Calcular la concentración de P total, a partir de la curva de calibración

#### **CARBONATOS ALCALINO-TÉRREOS POR EFERVESCENCIA (Richards 1974)**

1. Poner 1 a 2 g de suelo en un vidrio de reloj; añadir suficiente agua para saturar el suelo y eliminar así el aire
2. Agregar unas cuantas gotas de HCl concentrado y observar el grado de efervescencia
3. El suelo puede considerarse como ligera, moderada o altamente calcáreo de acuerdo al grado de efervescencia

#### **CARBONATOS ALCALINO-TÉRREOS POR TITULACIÓN (Richards 1974)**

1. Pesar 5 g de muestra seca y colocar en un vaso de precipitado de 150 ml
2. Añadir 50 ml de HCl 0.5N estándar; cubrir con un vidrio de reloj y hervir por 5 min, agitando un poco. Dejar enfriar
3. Filtrar en matraz volumétrico de 50 ml con papel filtro Whatman No. 42, lavar y aforar con AD
4. Titular con NaOH 0.25 N estandarizado y dos gotas de solución de fenoftaleína al 1% en etanol al 6%, hasta que vire a rosa fuerte o lila
5. Calcular el equivalente en porcentaje de carbonatos con la fórmula siguiente:

$$\text{Eq\%CO}_2 = \frac{(50 \text{ l HCl} \times N_{\text{HCl}}) - (\text{ml NaOH} \times N_{\text{NaOH}})}{g \text{ de muestra}}$$

#### **METALES ASOCIADOS A ÓXIDOS EXTRAÍDOS CON HNO<sub>3</sub> y HCl**

1. Secar la muestra a 110 °C durante 2 h
2. Pesar 2 g de muestra seca y pasar a un vaso de precipitados de 100 ml y añadir 10 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado y 3 ml de HCl concentrado, poner en agitación (16 h) y en calentamiento (2 h)
3. Dejar enfriar. Filtrar con papel Whatman No. 42, lavar los residuos y aforar a 100 ml con agua desionizada (ADI)
4. Determinar la absorbancia de los metales, preparando las soluciones estándar necesarias
5. Calcular la concentración de los elementos en mg·kg<sup>-1</sup> ó ppm de la siguiente manera:

$Cd = (Am)/(Cs)/As$	$Cm = (Cd)(Vd) (fd)/w$
Cd: concentración muestra en disolución	Cm: concentración muestra (mg·kg <sup>-1</sup> )
Cs: concentración estándar (mg·kg <sup>-1</sup> )	Vd: volumen de muestra en disolución (V de aforo)
Am: absorbancia muestra	w: peso muestra (g)
As: absorbancia estándar	fd: factor de dilución
	fd= Vol muestra diluida (ml)/ Vol alícuota dilución (ml)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### **METALES EXTRAÍDOS CON HNO<sub>3</sub> AL 50% (Page et al. 1982)**

1. Secar la muestra a 110 °C durante 2 h
2. Pesar 5 g de muestra seca y pasar a un vaso de precipitados de 100 ml; añadir 50 ml de HNO<sub>3</sub> al 50%. Poner en agitación durante 1 h
3. Dejar enfriar. Filtrar con papel Whatman No. 42, lavar los residuos y aforar a 100 ml con ADI
4. Determinar la absorbancia de los metales, preparando las soluciones estándar necesarias
5. Calcular la concentración de los elementos como en el paso 5 de la técnica anterior

#### **METALES BIODISPONIBLES, EXTRAÍDOS CON EDTA (Archer y Hodgson 1987)**

1. Preparar una solución de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0.05M y pH 7.0
2. Pesar 10 g de muestra seca y pasar a un vaso de precipitados de 100 ml y añadir 50 ml de EDTA 0.05M. Agitar durante 2 h a temperatura ambiente
3. Dejar enfriar. Filtrar con papel Whatman No. 42, lavar los residuos y aforar a 100 ml con ADI
4. Determinar la absorbancia de los metales, preparando las soluciones estándar necesarias
5. Calcular la concentración de los elementos como en el paso 5 de la técnica anterior

#### **METALES EXTRAÍDOS CON ÁCIDO ACÉTICO (NOM-CRP-001)**

1. Preparar una solución de ácido acético(Hac) M y pH 7.0
2. Pesar 50 g de muestra seca y pasar a un vaso de precipitados de 100ml. Añadir 50 ml de la solución de ácido acético. Agitar durante 72 h a temperatura ambiente
3. Filtrar la solución con papel Whatman No. 42; lavar residuos y aforar a 100 ml con ADI
4. Determinar la absorbancia de metales, preparar las soluciones estándar necesarias
5. Calcular la concentración de los elementos en como en el paso 5 de la técnica anterior

#### **METALES SOLUBLES EN AGUA**

Lavar el material con EXTRAN, dejar 24 h en HNO<sub>3</sub> 10% y enjuagar con ADI

1. Secar (a 110 °C por 2 h) muestra previamente tamizada. Pesar 10 g peso seco de muestra. Añadir 50 ml de ADI
2. Agitar durante 1 h a T ambiente. Centrifugar 20 min a 2000 rpm
3. Recuperar sobrenadante, filtrar (Whatman # 42); lavar residuos y aforar a 50 ml con ADI
4. Determinar la absorbancia de metales, preparar las soluciones estándar necesarias
5. Calcular la concentración de los elementos en como en el paso 5 de la técnica anterior

#### **EXTRACCIÓN SECUENCIAL DE METALES (Li et al. 1995)**

Todo el material empleado deberá estar lavado con HNO<sub>3</sub> al 10%; usar ADI para soluciones

1. Secar (a 110 °C por 2 h) muestra previamente molida en mortero de ágata y tamizada. Pesar 1-2 g peso seco de muestra y pasar a tubo de ensaye con tapa de rosca
2. **Fracción intercambiable:** añadir 8 ml de MgCl<sub>2</sub> 0.5 M, pH 7. Agitar (50 oscilaciones por minuto) durante 30 min, a T ambiente. Centrifugar a 2000 rpm por 20 min; recuperar sobrenadante por filtración al vacío; añadir 8 ml de ADI, agitar 5 min, centrifugar 20 min; desechar sobrenadante

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

3. **Fracción unida a carbonatos:** añadir al residuo 8 ml de acetato de sodio 1M, pH 5, agitar 5 h; centrifugar 20 min; recuperar sobrenadante por filtración al vacío; añadir 8 ml de ADI, agitar 5 min, centrifugar 20 min; desechar sobrenadante
4. **Fracción unida a óxidos de Fe y Mn:** añadir al residuo 20 ml de  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  0.04 M; agitar ocasionalmente durante 6 h a 96°C; agregar 20 ml de ADI y agitar por 10 min a 96°C; centrifugar 20 min; recuperar sobrenadante por filtración al vacío; añadir 8 ml de ADI, agitar 5 min, centrifugar 20 min; desechar sobrenadante
5. **Fracción unida a materia orgánica y sulfatos:** añadir al residuo 3 ml de  $\text{HNO}_3$  0.02 M y 5 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%; calentar progresivamente hasta 85°C; una vez alcanzada la T anterior, mantener por 2 h en agitación; dejar enfriar. Agregar 3 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% y volver a llevar a 85°C; mantener a esta T durante 3 h con agitación intermitente. Dejar enfriar. Añadir 5 ml de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  3.2 M en  $\text{HNO}_3$  al 20%. Diluir hasta 20 ml con ADI y agitar por 30 min; centrifugar 20 min; recuperar sobrenadante por filtración al vacío
6. **Fracción residual:** recuperar el residuo del paso anterior. Digerir la muestra con 4 ml de  $\text{HNO}_3$  concentrado (70%), 2 ml de  $\text{HClO}_4$  (60%) y 15 ml de HF (40%), hasta la sequedad usando el siguiente régimen de calentamiento: 90°C por 6h, 120°C por 10 h, 190°C por 6 h. El material remanente se mantiene en 5 ml de HCl 4 M a 70°C por 1h, y se diluye a 25 ml con HCl 0.3 M

### DISPONIBILIDAD

Para el manejo de la cantidad de metales disponibles en porcentaje, hacer

$$\% \text{ de disponibilidad} = (\text{metal disponible o intercambiable} / \text{metal total}) \times 100$$

## A3.2. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

### MEDIOS DE CULTIVO

#### Medio Basal Bold (MBB) para algas pH 6.6 (Nicholson y Bold 1965 *in* Stein 1973)

Se preparan seis soluciones base (*stock*) de macronutrientes, tres soluciones *stock* de componentes minoritarios y una solución única de micronutrientes. Se emplea para algas (Chlorophyceae, Bacillariophyceae y Rhodophyceae) y Cianoprocariontes.

#### a. Macronutrientes. Usar 10 ml de cada uno para 940 ml de medio

$\text{NaNO}_3$	10 g/400 ml
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 g/400 ml
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3 g/400 ml
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	3 g/400 ml
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7 g/400 ml
$\text{NaCl}$	1 g/400 ml

#### b. EDTA. Usar 1 ml·l<sup>-1</sup>

EDTA	50 g·l <sup>-1</sup>
KOH	31 g·l <sup>-1</sup>

#### c. Hierro. Usar 1 ml·l<sup>-1</sup>

$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.98 g·l <sup>-1</sup>
$\text{H}_2\text{SO}_4$	1.0 ml·l <sup>-1</sup>

#### d. Boro. Usar 1 ml·l<sup>-1</sup>

$\text{H}_3\text{BO}_3$	11.42 g·l <sup>-1</sup>
-------------------------	-------------------------

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

e. **Micronutrientes. Usar 1 ml-l<sup>-1</sup>**

ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.82 g·l <sup>-1</sup>
NaCl·4H <sub>2</sub> O	1.44 g·l <sup>-1</sup>
MoO <sub>3</sub>	0.71 g·l <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1.57 g·l <sup>-1</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.49 g·l <sup>-1</sup>

Esterilizar a 110°C por 30 min

**Medio Woods Hole (WC) para algas y cianoprocariontes dulceacuicolas pH 7.0 (Nichols 1973 in Stein 1973)**

Se preparan seis soluciones *stock* para macro-nutrientes, tres soluciones *stock* de componentes minoritarios y una solución única para micro-nutrientes.

a. Macro-nutrientes. Usar 1 ml de cada uno para 1 l de medio

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	36.76 g·l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	36.97 g·l <sup>-1</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	12.60 g·l <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.71 g·l <sup>-1</sup>
NaNO <sub>3</sub>	85.01 g·l <sup>-1</sup>

b. Micro-nutrientes. Prepara solución *stock* con las siguientes concentraciones, usar 1 ml de solución *stock* para 1 l

MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.18 g·l <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.022 g·l <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.0046 g·l <sup>-1</sup>
CCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.012 g·l <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.01 g·l <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.06 g·l <sup>-1</sup>

Adicionar 500 mg·l<sup>-1</sup> del amortiguador HEPES; ajustar pH 7 con HCl ó NaOH. Esterilizar a 120 °C por 20 min

c. Añadir al medio (ya frío) 1 ml de la siguiente solución, mediante filtración, bajo condiciones de esterilidad. Disolver el Na<sub>2</sub>EDTA en AD y añadir el FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O

Na <sub>2</sub> EDTA	4.36 g·l <sup>-1</sup>
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3.15 g·l <sup>-1</sup>

d. Preparar un *pre-stock* de biotina (0.1 mg·ml<sup>-1</sup>) Cianocobalamina o vitamina B12 (1.0 mg·ml<sup>-1</sup>), acidificando ligeramente con 2 gotas de HCl. Agregar 100 mg de Tiamina-HCl y dejar disolviendo durante una noche. Aforar a 500 ml con AD y filtrar por esterilización. Adicionar al medio de cultivo, mediante filtración bajo condiciones de esterilidad, 0.5 ml de la solución de vitaminas

e. Adicionar al medio de cultivo, mediante filtración bajo condiciones de esterilidad, 2.0 ml de la solución de silicatos

NaSiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	14.21 g·l <sup>-1</sup>
---------------------------------------	-------------------------

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### Medio enriquecido para bacterias cerebro-corazón (BHI)

Usar 52 g·l<sup>-1</sup> del medio BHI (*Merck*) y ajustar pH a  $7.4 \pm 0.2$ ; esterilizar a 121°C (15 lb/in<sup>2</sup>) por 15 min. Preparar y esterilizar el agar por separado y reunir con medio antes de vaciar en cajas Petri estériles. El medio debe tener un tono amarillo paja.

#### Medio enriquecido para bacterias fenil etanol agar (FEA)

1. Preparar:

Base agar Müller-Hinton	38.0 g
Fenil-etanol ( <i>Merck</i> )	2.5 ml
Sangre de camero desfibrinada	50.0 ml
Agua destilada	1000 ml
Medio Eagle al 1% ( <i>Life Techno</i> )	

2. Disolver la base agar en el AD, hervir agitando constantemente; adicionar el fenil etanol
3. Esterilizar a 121°C por 15 min. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente (25°C)
4. Adicionar la sangre de camero, agitando suavemente la solución para su homogenización
5. Añadir medio Eagle previamente esterilizado por filtración
6. Distribuir en cajas Petri. Hacer prueba de esterilidad incubando por 24 horas a 35°C

#### Medio enriquecido para bacterias Casoy-agar

1. Disolver 40 g de Casoy agar (*Merck*) en 1 l de AD; dejar remojando 15 min
2. Calentar hasta hervir para su completa disolución
3. Esterilizar durante 15 min a 121°C
4. Hacer prueba de esterilidad incubando durante 24 horas a 35°C

#### Medio enriquecido para bacterias caldo Casoy (CC)

1. Pesar 30 g de CC (*Merck*) y disolver en 1000 ml de AD
2. Calentar en baño María para su completa disolución
3. Distribuir el caldo en tubos de ensayo, tapar y esterilizar durante 15 min a 121°C. Hacer prueba de esterilidad por 24 h a 35°C

#### Medio enriquecido para bacterias gelosa-chocolate (Gel-Ch)

1. Pesar 2 g de secado de hemoglobina y añadir gradualmente a 100 ml de AD, hasta obtener una suspensión uniforme; esterilizar por medio de filtración
2. Suspender 7.2 g de base agar Gel-Ch (*Bioxón*) en 100 ml de AD, mezclar bien y dejar reposar 5 min. Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir por 1 min
3. Preparar solución de poli-enriquecimiento (*Bioxón*) en AD
4. Esterilizar por separado la base agar Gel-Ch y la solución el poli-enriquecimiento a 121°C por 15 min
5. Dejar enfriar las soluciones anteriores hasta 50°C, juntarlas y añadir la solución de hemoglobina
6. Ajustar pH a  $7.2 \pm 0.2$  y vaciar en cajas Petri
7. Hacer prueba de esterilidad incubando durante 24 h a 35°C

#### Medio enriquecido para bacterias gelosa-sangre (Gel-S)

1. Suspender 40 g de base agar Gel-S (*Bioxón*) en 1 l de AD; mezclar perfectamente, calentando con agitación frecuente y dejar hervir 1 min
2. Esterilizar a 121°C por 15 min. Dejar enfriar hasta 45°C
3. Adicionar 5% de sangre estéril desfibrinada. Hacer prueba de esterilidad incubando por 24 h a 35°C

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Medio mineral para bacterias (MM)

1. Preparar la siguiente solución:

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5.0 g
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
MgSO <sub>4</sub>	2.0 g
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml

2. Ajustar pH a 7.0. Verter en tubos de ensaye y esterilizar a 121°C por 15 min. 3. Hacer prueba de esterilidad incubando durante 24 h a 35°C

### Medio tergitol-7 para bacterias tipo bacilos Gram negativos (T7)

1. Disolver 30 g de T7 (*Merck*) y disolver en 1000 ml de AD
2. Calentar hasta que el medio adquiera un tono amarillo paja
3. Esterilizar durante 15 min a 121°C. Hacer prueba de esterilidad incubando durante 24 h a 35°C

### Medio tioglicolato semisólido para bacterias (T)

1. Disolver 30 g de tioglicolato semisólido (*Merck*) en 1 l de AD
2. Calentar hasta que el medio adquiera una coloración amarillo paja
3. Esterilizar durante 15 min a 121°C. Hacer prueba de esterilidad incubando durante 24 h a 35°C

### Medio Sabouraud líquido para hongos y levaduras (S)

1. Suspender 30 g de caldo Sabouraud (*Merck*) en 1 l de AD; ajustar pH a 5.6 ± 0.2
2. Distribuir en tubos de ensaye, tapar y esterilizar durante 15 min a 121°C. Hacer prueba de esterilidad por 24 h

### Medio Sabouraud agar para hongos y levaduras (SA)

1. Disolver 65 g de SA (*Difco*) en 1 l de AD; calentar hasta que se disuelva completamente
2. Esterilizar durante 15 min a 121°C
3. Hacer prueba de esterilidad incubando durante 24 horas a 35°C

### Medio Czapek-Dox agar para micro-cultivo de hongos

1. Disolver 50 g de medio Czapek-Dox (*Bioxón*) en 1 l de AD; dejar 10-15 min en remojo; calentar agitando frecuentemente y dejar hervir por 1 min
2. Esterilizar durante 15 min a 121°C
3. Hacer prueba de esterilidad incubando durante 24 horas a 35°C
4. Distribuir en cajas Petri y dejar enfriar
5. Cortar cuadritos del tamaño de un cubreobjetos y colocar, cada cuadrito entre dos portaobjetos
6. Con un asa esterilizada, tomar una porción de la colonia de hongos y colocar en el medio
7. Incubar a 28°C durante 3-5 días

### TÉCNICA PARA CULTIVO DE BACTERIAS ANAEROBIAS

1. Poner las cajas Petri los tubos de ensaye en la jarra de anaerobiosis
2. Colocar el catalizador (alumina recubiertas de paladio). Puede usarse un tubo de ensaye, previamente deshidratado
3. Colocar dentro de la jarra el generador de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (mezcla en partes iguales de bromohidruro de sodio, bicarbonato de sodio y ácido nítrico o un sobre GAS-PAK, marca BBL)
4. Añadir 10 ml de AD al generador y cerrar inmediatamente la jarra
5. Incubar a 35°C durante 48-72 h

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA BACTERIAS AEROBIAS

### Tinción Gram (Gram 1884 in MacFaddin 1990)

1. Poner 1 gota de AD sobre portaobjetos limpio y etiquetado. Calentar asa de cultivo al rojo vivo, tomar una muestra de la colonia bacteriana y disolver en la gota de agua con movimiento circular; dejar secar la gota de agua y, cuando esté seca, pasa 2 ó 3 veces sobre la flama, para fijar
2. Añadir 1 gota de cristal de violeta sobre la mancha de agua y dejar actuar durante 1 min; lavar con agua de la llave
3. Añadir 1 gota de lugol (mordente); esperar 1 min y lavar con agua de la llave
4. Agregar 1 gota de solución alcohol-acetona (al 80-95%) y lavar al cabo de unos segundos con agua de la llave
5. Finalmente, añadir 1 gota de safranina, dejar actuar de 30 s a 1 min y lavar con agua corriente
6. Dejar secar la preparación; observar al microscopio a 1000X

Las bacterias Gram positivas se tiñen con el cristal violeta y las Gram negativas toman el color de la safranina (rosado)

### Prueba de catalasa (In MacFaddin 1990)

Para comprobar la presencia de la enzima catalasa, la cual cataliza la transformación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y  $O_2$ . El  $H_2O_2$  se forma como un producto terminal oxidativo de la descomposición anaerobia de los azúcares, por oxidación indirecta y, ya que se trata de un producto tóxico, la catalasa descompone el  $H_2O_2$ . Esta enzima se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas (que contienen citocromos)

1. Calentar asa de cultivo al rojo vivo, tomar una muestra de la colonia bacteriana pura de 18 a 24 h de incubación y poner sobre portaobjetos limpio y etiquetado
  2. Agregar una gota de  $H_2O_2$  al 30%
  3. Observar la inmediata formación de burbujas (liberación de  $O_2$ ) y registrar el resultado
- La prueba será positiva si hay efervescencia inmediata y muy visible. Puede haber interferencia por la presencia de la enzima peroxidasa

### Prueba de Oxidasa (In MacFaddin 1990)

Para determinar la presencia de las enzimas oxidasas (forman parte del sistema citocromo-oxidasa) activando la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno ( $O_2$ ), quien a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa final de la transferencia de electrones. Se emplean colorantes que son aceptores de electrones artificiales. La prueba de oxidasa puede ser positiva también para bacterias anaerobias facultativas.

1. Sobre un portaobjetos limpio, colocar trozos de papel filtro
  2. Tomar una muestra de la colonia con un palillo estéril, colocar sobre el papel filtro y añadir 1 gota del reactivo de Kovacs (diclorohidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%, solución acuosa) y extender la colonia sobre el papel impregnado
  3. Observar la reacción al cabo de 5-10 s
  4. Repetir lo anterior con una cepa control (*Pseudomonas aeruginosa*)
- La prueba será positiva si la colonia toma un color púrpura oscuro (casi negro) al cabo de 10 s. Si no tal cambio de color o la coloración púrpura se logra al minuto, la prueba es negativa.

### Prueba de reducción del nitrato (In MacFaddin 1990)

Los microorganismos facultativos, durante la etapa anaerobia, utilizan nitratos para obtener oxígeno, reduciéndolos a nitritos, óxidos de N ó N molecular. Esta prueba evalúa la capacidad de un microorganismo para reducir el nitrato.

1. Preparar el caldo para prueba de nitratos de la siguiente manera, pesar

Extracto de carne	3 g
Peptona de caseína	5 g
Nitrato de Potasio	1 g
Agua destilada	1 l

Calentar suavemente hasta disolver. Esterilizar a 105°C, 30 min; verter 3.5 ml en tubos de ensayo estériles; enfría con los tubos inclinados (pico de flauta) hasta que solidifique el medio. Si se requiere, refrigerar a 4°C

2. Preparar los reactivos para la prueba:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Reactivo Griess A

Reactivo Griess B

$\alpha$ -naftilamina al 0.5% en ácido acético 5N

Ácido sulfanílico 0.8% en ácido acético 5N

Conservar en refrigeración a 4°C

3. En un tubo de ensaye con el caldo para prueba de nitratos, se añade una porción de la colonia tomada con el asa esterilizada. Incubar a 35°C durante 24 a 48 h
  4. Añadir en cada tubo 2 gotas del reactivo A y 2 del reactivo B; esperar unos segundos
- La coloración rosada a rojo intenso indica que los nitratos fueron reducidos a nitritos (la prueba es positiva)

#### Prueba SIM (In MacFaddin 1990)

Para diferenciar enterobacterias. Esta prueba indica movilidad (M), indol (I) y presencia de ácido sulfhídrico, H<sub>2</sub>S (S). Las bacterias se mueven mediante undulipodios (uno o más), principalmente los bacilos y algunas formas de cocos. La prueba del indol permite determinar la capacidad de un organismo para desdoblar el indol de la molécula de triptofano, aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos: Indol, metilindol y ácido indolacético; en este proceso intervienen diversas enzimas intracelulares denominadas, conjuntamente, triptofanasas; el indol generado puede ser detectado por un reactivo que posea una combinación química que produzca un color definido. La prueba también permite determinar si se ha liberado H<sub>2</sub>S gaseoso por acción enzimática de la cisteinasa sobre las proteínas o, más específicamente, los aminoácidos con S; lo anterior sucede en algunas bacterias heterotróficas.

1. Preparar reactivo para indol de Ehrlich de la siguiente manera

$\rho$ -dimetilamino-benzaldehído	2 g
Etanol absoluto	190 ml
HCl concentrado	40 ml

El reactivo tiene un tono amarillo

2. Usar 30 g de medio SIM (*Bioxón*) para 1 l de AD. Calentar, agitando hasta que hierva; dejar hervir 1 min
  3. Distribuir en tubos estériles (12X75 mm), esterilizar a 121°C por 15 min. Enfriar con los tubos en posición vertical
  4. Inocular una porción de la colonia pura de 24-48 h, tomada con el asa esterilizada por el método de piqueta y estriado (punción central hasta una profundidad de 1.2 cm). Incubar a 35°C durante 24-48 h. Si la prueba es negativa, incubar a 21-25°C durante 5 días
  5. Observar si hubo movimiento de la colonia. Los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio, provocando turbiedad; pueden mostrar un crecimiento en estrías vellosas. El caso anterior indica que la prueba es positiva; la prueba es negativa si el medio se mantiene claro y hubo crecimiento sólo a lo largo de la línea
  6. Añadir 2 g de reactivo de Ehrlich para la prueba de indol; observar después de unos segundos; la prueba será positiva si se observa un anillo rojo en la superficie del medio (en la capa alcoholica); por el contrario, la prueba será negativa si la superficie toma el color del reactivo de Ehrlich (amarillo)
- La presencia de H<sub>2</sub>S se indica si se observan residuos negros.

#### Prueba de Oxidación-Fermentación, OF (In MacFaddin 1990)

Algunas bacterias son capaces de metabolizar hidratos de carbono (producción de ácido) sólo en condiciones aerobias (oxidativas), mientras que otras son facultativas. La fermentación se da en bacterias facultativas, generalmente.

1. Usar 9.8 g de medio basal OF (*Bioxón*) para 1 l de AD; añadir 0.15 g de una fuente de carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa o dextrosa). Calentar, agitando hasta que hierva. El medio adquiere una tonalidad verde a pH neutro dada la presencia de azul de bromotimol
2. Distribuir en tubos estériles, esterilizar a 118°C por 10 min. Enfriar colocando los tubos inclinados (pico de flauta)
3. Inocular una porción de la colonia pura de 18-24 h, picando hasta 0.6 mm del fondo, aproximadamente. Agregar a la mitad del total de tubos aceite mineral (para crear condición anaerobia). Incubar a 35°C por 24 h
4. Observar cambio en el color del medio; la producción de ácidos se indica por el cambio en el medio a un tono amarillo. Las especies pueden ser oxidativas y/o fermentativas

#### Ureasa (In MacFaddin 1990)

La presencia de ureasa provocará la formación de 2 moléculas de amoníaco, que alcalinizan el medio.

1. Usar 3.87 g de caldo de urea (*Bioxón*) en 1 l de AD. El medio se verá amarillo paja (no disolver al calor)
2. Distribuir en tubos estériles y esterilizar a 108°C durante 10 min. Dejar enfriar, colocando los tubos horizontalmente

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



3. Inocular una porción de la colonia pura de 18-24 h; incubar a 35°C
4. Observar cada 8, 12, 24 y 48 horas.

La hidrólisis de la urea se observa si el medio viró a rojo rosado-rojo intenso; en tal caso, la prueba es positiva.

#### Prueba de Fe de Kligler (*In MacFaddin 1990*)

Permite determinar la capacidad del microorganismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de la posible producción de H<sub>2</sub>S y FeS. El medio contiene lactosa (1%) y glucosa (0.1%); algunos organismos pueden fermentar uno o ambos carbohidratos, aeróbicamente (parte superior o pico de flauta) y/o anaeróbicamente (en la capa inferior del cultivo). Esta prueba ayuda a diferenciar bacilos como las Enterobacterias.

1. Usar 452 g de agar de Fe de Kligler (*Bioxón*) para 1 l de AD. Mezclar y calentar agitando frecuentemente hasta que hierva; dejar hervir 1 min. El medio adquiere una tonalidad roja
2. Distribuir en tubos estériles y esterilizar a 121°C durante 15 min. Dejar enfriar en posición inclinada para obtener extremos prolongados (pico de flauta)
3. Inocular una porción de la colonia pura de 24 horas, con el asa esterilizada, por estricción sobre el pico de flauta y con picadura profunda hacia el fondo del tubo. Incubar a 35°C durante 24 h
4. Observar

La fermentación de los carbohidratos, con la subsecuente generación de ácidos, se indica con el cambio de color del medio a un tono amarillo; si este cambio se observa sólo en el pico del cultivo, sólo sucedió la fermentación de la lactosa; si el cambio se observa en el fondo, sólo fermentó la glucosa. La presencia de H<sub>2</sub>S se indica por la generación de burbujas del gas, y la de FeS se observa por la presencia de residuos negros en la capa profunda.

#### Prueba de citratos de Simmons (1926 *In MacFaddin 1990*)

Se usa para determinar si el organismo es capaz de utilizar citrato (a través del ciclo del ácido tricarbóxico o de fermentación del citrato) como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando la alcalinización del medio.

1. Usar 24.2 g de agar de citrato de Simmons (*Bioxón*) para 1 l de AD. Dejar remojando 5 a 10 min. Mezclar y calentar suavemente, agitando despacio, hasta que la solución comience a hervir; dejar hervir 1 min. El medio adquiere una tonalidad verde a pH circunneutro ante la presencia de azul de bromotímol
2. Distribuir en tubos estériles y esterilizar a 121°C durante 15 min
3. Dejar enfriar, colocando los tubos de manera inclinada (pico de flauta con poca profundidad)
4. Inocular una porción de la colonia pura de 18-24 h, estriando sobre el pico de flauta. Incubar a 35°C durante 24-48 h
5. Observar si hubo cambio de color

El viró del color (azul de bromotímol) indica la utilización de los citratos como única fuente de C, de la sal de amonio como fuente de N y la formación de subproductos alcalinos (como NH<sub>3</sub>). El crecimiento de los organismos y el cambio a un color azul intenso sobre el pico de flauta indican que la prueba es positiva.

#### Prueba de Vogel y Proksauer/Rojo de Mello o PV/RM (1926 *In MacFaddin 1990*)

La prueba de VP determina la capacidad de algunas bacterias de originar un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol o acetoina, por la fermentación de glucosa. Adicionalmente, la prueba de RM permite comprobar si el organismo produce y mantiene estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa y vencer la capacidad amortiguadora del medio; es una prueba cualitativa de la producción de ácido (determinación del pH). Útil para bacterias que producen grandes cantidades de ácidos (láctico, acético, fórmico), a partir de glucosa y por fermentación ácida mixta. Detecta la fermentación fórmica de enterobacterias. Preparar el siguiente medio:

Peptona de caseína	7.0 g
Glucosa	5.0 g
Agua destilada	1.0 l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.0 g

1. Mezclar y calentar suavemente, agitando despacio, hasta que la solución comience a hervir; dejar hervir 1 min
2. Distribuir en tubos estériles y esterilizar a 121°C durante 15 min. Dejar enfriar
3. Inocular una porción de la colonia tomada con asa esterilizada. Incubar a 35°C durante 24-48 h
4. Separar las colonias en dos tubos; a un tubo se le agrega 1 gota de KOH o NaOH al 40% y 1 gota de α-naftol (intensificador del color) al segundo tubo, agregar 1 gota de fenol. Agitar suavemente los tubos
5. Dejar reaccionar 10-15 min; observar

La fermentación del carbohidrato conlleva a un cambio de pH, que se detecta por el rojo de fenol. La prueba de PV es positiva al observa un color rojo-rosado en la superficie del medio (presencia de acetoina). Si el cultivo es lo suficientemente ácido como para permitir que el RM se mantenga rojo en la superficie del medio, la prueba RM será positiva. Si por el contrario, el medio tiende a mantenerse o virar a amarillo, la prueba es negativa.

## PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LEVADURAS

### Observación de ascosporas

El primer carácter que se toma en cuenta en la taxonomía de las levaduras es la presencia de ascosporas (esporas haploides, formadas en el interior de las ascas, después de una división meiótica), mediante el siguiente medio:

#### 1. Mezclar:

Extracto de levadura ( <i>Bioxón</i> )	10 g
Agar bacteriológico ( <i>Bioxón</i> )	20 g
Agua destilada	500 ml
Jugo de verduras (V8)	500 ml

- Ajustar pH a 6.8 con KOH al 40%
- Repartir en tubos de ensaye, tapar y esterilizar a 121°C durante 15 min
- Dejar enfriar los tubos inclinados (pico de llauta). Meter a incubadora para prueba de esterilidad (35°C por 24 horas)
- Tomar una muestra de la colonia de levadura con el asa bacteriológica y sembrar mediante estricción
- Incubar a 28°C durante tres días; revisar al microscopio, previa tinción con cristal violeta

### Tinción de ascosporas (Küfnerath, *sensu* Silva *com. pers.*)

- Poner 1 gota de AD sobre portaobjetos. Calentar asa de cultivo al rojo vivo, tomar una muestra de la colonia de levaduras desarrollada en agua peptonada y zanahoria o en medio V8; disolver la gota con movimiento circular; dejar secar la gota de agua y, cuando esté seca, pasa 2 ó 3 veces sobre la flama, para fijar
- Colocar un trozo de papel filtro sobre el portaobjetos. Impregnar el papel filtro con fucsina básica mientras se flamea la parte inferior el portaobjetos hasta la emisión de vapores; adicionar cuantas fucsina sea necesaria para evitar que el papel filtro se seque con el calor. Hacer lo anterior durante 7 min; lavar con agua de la llave
- Decolorar con gotas de alcohol acidulado (HCl concentrado: 1 ml, etanol: 99 ml); lavar con agua de la llave
- Tañir de 15-30 segundos con azul de metileno; lavar con agua de la llave
- Poner unas gotas de tinta china, extenderla sobre toda la superficie del portaobjetos; secar al aire

### TÉCNICAS DE PRESERVACIÓN PARA BACTERIAS AEROBIAS

- Preparar glicerol para una solución en caldo BHI al 15%. Calentar lentamente hasta disolver
- Repartir 4 ml en tubos de cepario y esterilizar a 121°C durante 15 min. Dejar enfriar
- Cosechar crecimiento masivo (de 24 h) y pasar a tubo con caldo BHI y glicerol, homogeneizar perfectamente
- Vaciar 3 µl en tubos de plástico con rosca y congelar a -72 °C
- Hacer prueba de viabilidad después de 15 días

### TÉCNICAS DE PRESERVACIÓN PARA BACTERIAS ANAEROBIAS

- Cocer 250 g de carne fresca, sin grasa y molida, más 12.5 ml de NaOH 1N, en 500 ml de AD, agitando suavemente
  - Filtrar el caldo y recuperar la carne en una gasa
  - Lavar la carne para eliminar posibles residuos del NaOH y secar
  - Pasar la carne a frascos con tapa de rosca de 16 X 150 ml, una cantidad equivalente 1/3 parte del tubo
  - Tomar 500 ml del caldo, añadir la cantidad correspondiente a 500 ml de medio tioglicolato semisólido. Ajustar el pH entre 6.8 y 7
  - Adicionar a cada tubo con la carne 7 ml del caldo con tioglicolato y cerrar
  - Esterilizar a 121 °C por 15 min. Meter en incubadora a 35°C para prueba de esterilizar
  - Cosechar crecimiento masivo (48 h) y pasar a tubo con caldo de carne y tioglicolato, homogeneizar perfectamente
- Las bacterias pueden mantenerse a temperatura ambiente

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **A3.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA ENSAYO DE TOXICIDAD EN BIOFILME AUTOTRÓFICO**

#### **EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS EXTRA- E INTRACELULARES (Barranguet et al. 2003)**

1. Tomar una cantidad conocida (preferentemente) del biofilme y colocar en tubo de ensayo con tapa de rosca; añadir 3-5 ml de agua bidestilada (BiD) y licuar  $\pm 5$  s; centrifugar 5 min a 3500 rpm
  2. Tomar 2 ml del sobre-nadante y vaciar en un tubo Eppendorf de 2 ml. Esta fracción será considerada la cantidad "difusa" de los exopolisacáridos del biofilme, por lo que será llamada "fracción difusa"
  3. Disolver el botón añadiendo 3-5 ml de  $H_2SO_4$  0.1 M, agitar licuar por 1-2 seg. y tapar los tubos de ensayo (para evitar evaporación). Colocar los tubos en calentamiento a 95 °C, agitando cada 5-10 min. Dejar calentando 30 min. Centrifugar a 3500 rpm durante 5 min
  4. Tomar 2 ml del sobrenadante y verter en tubo Eppendorf de 2 ml. Esta fracción representa la cantidad de exopolisacáridos unidos o de cápsula celular, por lo que se le llamará "fracción unida" o "fracción capsular"
  5. Re-suspender el botón en agua BiD, licuar 1-2 s y vaciar en tubos Eppendorf de 2 ml. Esta fracción final representa los polisacáridos intracelulares, por lo que se denominará "fracción intracelular"
- Las fracciones pueden ser almacenadas a  $-20$  °C y en oscuridad

#### **OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE EXOPOLISACÁRIDOS (Barranguet et al. 2003)**

Permite verificar la eficiencia de la extracción de exopolisacáridos, mediante la tinción en de las fracciones obtenidas con Azul Alcian (AB, por sus siglas en inglés) al 0.1% (w/v) en ácido acético. La inspección al microscopio revelará la presencia de los carbohidratos extracelulares de las fracciones correspondientes.

#### **DETERMINACIÓN DE POLISACÁRIDOS (Dubois 1959)**

1. Tomar 200  $\mu$ l de la muestra y adicionar 200  $\mu$ l de fenol al 5% (v/v) y 1 M de  $H_2SO_4$  18 M. El material presente en las muestras será hidrolizado por el ácido; los carbohidratos C5 y C6 se transformarán en compuestos capaces de reaccionar con el fenol, creando un complejo de color naranja-amarillo
2. Medir la intensidad de color con el espectrofotómetro a 488 nm, hacer la curva de calibración con soluciones de glucosa en concentraciones entre 5 y 200  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>, preparadas el mismo día

#### **CONCENTRACIÓN DE METALES EN POLISACÁRIDOS**

1. 1 ml de cada una de las fracciones obtenidas en la extracción de polisacáridos, se mantiene en refrigeración las muestras a  $-20$ °C, hasta su lectura posterior en la flama del EAA, haciendo las diluciones necesarias. Previo a la lectura, se añaden 2  $\mu$ l de  $HNO_3$  Ultra-puro a las muestras de la fracción "difusa"

#### **CONCENTRACIÓN DE METALES EN BIOFILME**

1. Mantener las muestras a  $-80$ °C
2. Liofilizar durante una noche; pesar para obtener peso seco
3. La digestión puede hacerse en horno de micro-hondas, añadiendo 2.5  $\mu$ l de  $HNO_3$  ultra-puro (J.T. Baker, Ultrex II)
4. Leer en la flama del EAA, haciendo las diluciones necesarias

#### **CONCENTRACIÓN DE METALES EN MEDIO LÍQUIDO**

1. Tomar 2 ml del medio y añadir 2  $\mu$ l de  $HNO_3$  ultra-puro (J.T. Baker Ultrex II)
2. Leer en la flama del EAA, haciendo las diluciones necesarias

#### **DETERMINACIÓN DE CLOROFILA POR ESPECTROFOTOMETRÍA CON ACETONA (sensu Barranguet 2001)**

Las muestras deberán estar congeladas en la oscuridad inmediatamente antes de su liofilización.

1. Liofilizar las muestras, dejándolas durante la noche en la liofilizadora
2. Colocar en un tubo o vial la muestra del biofilme adherida al disco de cristal y adicionar una cantidad conocida de acetona al 90% (p.e. 6 ml)

3. Poner los tubos en el sonificador durante 30 min, en la oscuridad y en un baño de agua y hielo. Guardar los tubos en el refrigerador (4°C) durante una noche y no más de 30 h, ya que la clorofila comenzará a degradarse
4. Tomar una muestra del líquido y centrifugar durante 5 min a 3000 rpm
5. Llenar la celda de cuarzo del espectrofotómetro con hasta 4 ml del sobrenadante (sin partículas en suspensión)
6. Leer la absorbancia a 665 y 430 nm
7. Adicionar 30 µl de HCl 0.4 N. Agitar y volver a leer a 665 nm
8. La concentración de clorofila por unidad de área se calcula de acuerdo a Lorenzen (1967):

$$\text{Chlo } a (\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}) = 26.73 \times (\text{DO } 665 - \text{DO } 665a) \times V/SX1$$

Dónde:

- **26.73:** factor de corrección, conformado por el coeficiente de absorción específica de la clorofila *a* en acetona al 90% (103/91 l·g<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>) y K, el factor para adecuar la reducción de la absorbancia inicial de la clorofila
- **DO 665a:** densidad óptica (absorbancia) después de acidificar
- **V:** volumen de acetona usada para extraer (ml)
- **S:** área superficial del disco (cm<sup>2</sup>)
- **l:** trayecto óptico (cm)

Además, la relación **430/665** son el Índice Margaleff (1961) para la diversidad de pigmentos, representando la cantidad relativa de carotenoides presentes en la muestra.

#### **DETERMINACIÓN DE CLOROFILA POR ESPECTROFOTOMETRÍA CON METANOL (sensu Barranguet 2001)**

Las muestras deben preservarse a -80°C; el desarrollo de la técnica debe realizarse manteniendo las muestras en frío y protegidas de la luz

1. Liofilizar las muestras durante una noche
2. Colocar la muestra liofilizada en un vial con 3-4 ml de metanol al 100%; sonificar durante 1 h
3. Centrifugar la muestra a 3000 rpm, durante cinco minutos. Recuperar sobrenadante
4. Medir absorbancia a 665 nm en celda de cuarzo. La concentración de clorofila se calcula:  

$$\text{Chlo (mg}\cdot\text{l}^{-1}) = \text{Abs } 665 \text{ nm} \times 1000/74.5 \times d - \text{donde } d: \text{ distancia óptica}$$

#### **CARBONO ORGÁNICO TOTAL (COT)**

El COT se determina midiendo la concentración de CO<sub>2</sub> generado por la oxidación química del carbón orgánico presente en la muestra, a 100 °C, adicionando persulfato de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), un oxidante muy fuerte. Cuando la oxidación es completa, el CO<sub>2</sub> se purga de la solución, se concentra por atrapamiento, se desorbe siendo acarreado al analizador infrarrojo (no dispersivo), previamente calibrado. La masa de CO<sub>2</sub> es equivalente al COT originalmente presente en la muestra (TIC/TOC Analyzer, model 700, O.I. Corporation)

1. Preservación de las muestras: las muestras deben mantenerse en refrigeración hasta su uso posterior. En el caso del biofilme, previamente: se liofilizan las muestras, se obtiene su peso seco y se disuelven en agua.
2. Solución estándar para COT: Disolver en 1 l de agua BiD, 2.13 g (peso seco, dos horas a 120°C) de C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub> 4 ml de esta solución, disueltos en 100 ml de agua BiD, da un estándar de 40 ppm COT.

#### **DETERMINACIÓN DE FOSFATO (Aminot y Chausseped 1983)**

1. Conservación de las muestras: Tomar 2 ml de la muestra y congelar, inmediatamente, a -20 °C. También se pueden conservar añadiendo 0.5 ml de cloroformo por cada 100 ml de muestra
2. Reactivos:
  - a) Solución de molibdato de amonio: Disolver 15 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O en 500 ml de agua BiD. Guardar en frasco de plástico y mantener en oscuridad
  - b) Ácido sulfúrico: A 140 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> añadir 900 ml de agua BiD. Conservar en refrigeración
  - c) Ácido ascórbico: Disolver 54 g de C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> en 500 ml de agua BiD, pasar a frasco de plástico y mantener en refrigeración, protegido de la luz (en refrigeración dura semanas; en el congelador dura más tiempo)
  - d) Tartato de amonio y potasio: Disolver 0.34 g de K(SbO)<sub>3</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> en 250 ml de agua BiD, calentando si es necesario. Conservar en refrigeración
3. Mezcla de Reactivos

Mezclar los reactivos en las proporciones siguientes:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	100 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250 ml

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>  
K(SbO)C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>

100 ml  
50 ml

4. Solución pre-stock para curva de calibración: Secar a 100 °C en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Pesar 0.6805 g, par a 1 l de solución. Añadir 1 ml de cloroformo. Un ml de esta solución equivale a 5 μMol del ión fosfato. Refrigerar
5. Solución stock para curva de calibración: tomar 100 ml de la solución pre-stock, aforar a 1 l con agua BiD; añadir 1 ml de cloroformo. Un ml de esta solución equivale a 0.05 μM de PO<sub>4</sub>. Refrigerar. Caducidad de 10 días
6. Curva de calibración: tomar 1, 2, 5, 10, 20 ml de solución stock y llevar a un volumen final con agua BiD, para una curva de calibración de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, etc. μM de PO<sub>4</sub>. Usar agua BiD como blanco. Hacer blanco de reactivos (absorbancia esperada: 0.02)
7. Lectura de muestras: Añadir la mezcla de reactivos a la muestra, lograr una relación 10:1 (mezcla de reactivos: muestra). Leer la absorbancia a 885 nm en celdas de cuarzo

#### A3.4. PREPARACIÓN DE AGUA RESIDUAL SINTÉTICA

Las aguas residuales domésticas no tratadas, suelen presentar hasta 290 mg·l<sup>-1</sup> de C orgánico (APHA, 1992); por ello, y para mantener una relación C:N:P de 15:1:0.1 (Durán 1994.), el agua residual sintética se preparó:

1. Usar:

CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	0.991 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.110 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.008 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml

2. Mezclar las sales; aforar con agua corriente esterilizada, libre de cloro. Ajustar pH a 7.0

## APÉNDICE A4

### ALGUNOS DATOS SOBRE METALES

#### Vanadio

Metal presente principalmente en rocas ultramáficas, por lo tanto, los suelos con mayor concentración de V son los derivados de este tipo de rocas (150 a 460 ppm o mg·kg<sup>-1</sup>); en otro tipo de suelos se estima que la cantidad de V fluctúa entre 18 y 150 mg·kg<sup>-1</sup>. El V es muy común en derivados del petróleo y la principal fuente de contaminación de suelos por V es la combustión del petróleo crudo; otra fuente son las termales eléctricas (Kabata-Pendias y Pendias 1992). Una característica particular de este elemento es su tendencia a asociarse con la materia orgánica (Kabata-Pendias y Pendias 1992)

#### Cromo

El cromo es un elemento esencial e, incluso, algunos suelos para cultivos son enriquecidos con este micronutriente. El Cr ocupa el 7° lugar en abundancia, con 100 mg·kg<sup>-1</sup> en corteza terrestre (Alloway 1990) y 54 mg·kg<sup>-1</sup> en suelos, en promedio. En rocas de Si, la concentración del Cr varía desde 1 mg·kg<sup>-1</sup> hasta constituir el 10% (in Logan y Traina 1993); el intervalo aceptable para suelos agrícolas es de 50-120 mg·kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias y Pendias 1992). Alloway (1990), indica concentraciones de 540 y 750 mg·kg<sup>-1</sup> de Cr en suelos mineros del Reino Unido y EE.UU.A, respectivamente, y Kabata-Pendias y Pendias (1992) citan hasta 1780 mg·kg<sup>-1</sup> en desechos de industrias procesadoras de metales. El Cr está muy asociado a la explotación y manufactura de Ag, por lo que sorprende su baja concentración y más aún por su tendencia a permanecer en capas superiores del sustrato. En Suiza y Alemania el máximo permitido es 75 y 100 mg·kg<sup>-1</sup>, respectivamente, en suelos (Kirke 1987). La normatividad nacional considera hasta 0.5 mg·l<sup>-1</sup> de Cr como el límite máximo tolerable para lixiviados de suelo y hasta 1 mg·l<sup>-1</sup> en cuerpos de agua.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Manganeso

El Mn es un elemento esencial para plantas, animales y diversos microorganismos (*v. gr.* forma parte estructural de algunas vitaminas) e interviene en el comportamiento de muchos otros micronutrientes (Kabata-Pendias y Pendias 1992). La corteza terrestre presenta Mn en concentraciones superiores a las de los otros metales (aparte del Fe), mientras que en rocas y suelos esta concentración varía notablemente, entre 200-2000 y 50-4500 mg·kg<sup>-1</sup>, respectivamente. En suelos puede representar el 7%, dependiendo del mineral parental (Bornemisza 1982; Alloway 1990; Kabata-Pendias y Pendias 1992). La Comisión Europea estipula hasta 0.05 mg·t<sup>-1</sup> Mn en agua potable (*in* Katsoyiannis *et al.* 2002)

## Cobalto

La concentración de Co en rocas varía entre 0.1 (rocas sedimentarias) y 200 ppm (rocas ultramáficas), mientras que en suelos la concentración fluctúa de 0.1 a 100 mg·kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias y Pendias 1992; Pyrzynska 2002), formando compuestos inorgánicos ó como Se elemental, pero también es posible encontrar algunos compuestos orgánicos del Se (Pyrzynska 2002). Se trata de un elemento esencial en el metabolismo de bacterias y microalgas, como coenzima o parte estructural de ciertas moléculas, como en el metabolismo de la fijación del N<sub>2</sub>. No obstante, también puede tener efectos antimicrobianos (Kabata-Pendias y Pendias 1992)

## Níquel

El intervalo del contenido de Ni en suelo es muy amplio, varía entre 0.2 y 450 mg·kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias y Pendias, 1992), lo cual se relaciona con las rocas parentales (desde 5 en granitos hasta 2000 mg·kg<sup>-1</sup> en ultramáficas). El relativamente alto porcentaje de Ni extraído con EDTA de suelos (10% de disponibilidad) sugiere que el metal no es retenido por los componentes del suelo (Kabata-Pendias y Pendias 1992)

## Cobre

La concentración promedio de Cu en corteza terrestre fluctúa entre 24 y 55 mg·kg<sup>-1</sup>, en rocas tiene un intervalo de 2 a 200 mg·kg<sup>-1</sup>, mientras que en suelos, de 13 a 24 mg·kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias y Pendias 1992) ó 20 a 30 mg·kg<sup>-1</sup> (Alloway 1990), con una concentración máxima aceptable de 100 mg·kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias y Pendias 1992). En suelos, el Cu se presenta como sulfuros y, debido a su carácter de metal noble, también se encuentra en forma elemental (Bornemisza 1982). Existe una correlación entre pH y contenido de Cu en suelo; particularmente, se espera una mayor cantidad de Cu disponible en suelos con pH superior a 7, contrario a lo que ocurre con otros oligoelementos; lo cual se debe a la reducida movilidad del Cu (Bornemisza 1982). Por otra parte, el Cu posee una gran capacidad de interactuar químicamente con los minerales y compuestos orgánicos del suelo y tiende a hacinarse en el horizonte superior (Kabata-Pendias y Pendias 1992). En México no se ha estipulado el valor máximo permitido para Cu en lixiviados de suelo; algunos países europeos sitúan entre 0.1 y 0.28 mg·l<sup>-1</sup> los límites máximos aceptados (Kirkó 1987). Cabe recordar que éste es un metal fitotóxico (Alloway 1990) y que se emplea como alguicida (Flemming y Trevors 1988; Skujins 1992)

## Zinc

Se considera un metal esencial para los seres vivos y, al igual que el Cr, algunos fertilizantes incluyen cantidades traza de este elemento. En la litosfera su concentración promedio es de 80 mg·kg<sup>-1</sup> y en suelos se estima entre 10 y 300 mg·kg<sup>-1</sup>, con un máximo aceptable de 200 a 300 mg·kg<sup>-1</sup> (Bornemisza 1982; Alloway 1990; Kabata-Pendias y Pendias 1992). El Zn se presenta en suelos principalmente como sulfuro; las arcillas y las fracciones de materia orgánica pueden absorber e inmovilizar una proporción aceptable de Zn, formando minerales diversos y compuestos organometálicos, quedando indisponible para plantas, hasta que la materia orgánica se mineralice (Bornemisza 1982)

## Arsénico

La legislación en materia ambiental de la antigua República Federal Alemana permitía hasta 300lt, arsenato y en compuestos organoarsénicos) tienden a formar complejos insolubles en suelo (Leonard 1995) y es común en aguas superficiales y subterráneas en sus formas inorgánicas en hasta 60 µg·kg<sup>-1</sup> (Katsoyiannis *et al.* 2002). Se trata de un elemento muy móvil, ampliamente conocido por su elevada toxicidad a humanos (antiguamente, las sales de As eran empleadas como venenos). Además de las actividades agrícolas, una de las principales causantes de la contaminación por As es la minería (Bataglia-Brunet *et al.* 2002; He *et al.*, 2002; Katsoyiannis *et al.* 2002). Así, en suelos del Reino Unido severamente dañados por la actividad minera, se han detectado hasta 900 mg·kg<sup>-1</sup> de As (Colbourn *et al.* 1975 *in* Kabata-Pendias y Pendias 1992) y en lagos contaminados por desechos mineros se ha reportado hasta 3000 mg·l<sup>-1</sup> de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

este metal (Leonard 1995). La Comunidad Europea limita a 20 mg·kg<sup>-1</sup> de As en suelos (Leonard 1995) y, recientemente, disminuyó el límite permisible de As en agua potable de 50 a 10 µg·l<sup>-1</sup>, dada su naturaleza carcinogénica (Balaglia-Brunet *et al.* 2002; Katsoyiannis *et al.* 2002)

### Selenio

En la corteza terrestre hay 0.05-0.09 mg·kg<sup>-1</sup> Se; en suelos su concentración varía fuertemente, de 0.1 µg·kg<sup>-1</sup> a 1 mg·kg<sup>-1</sup>, siendo aceptable hasta 0.5 mg·kg<sup>-1</sup>, en suelos agrícolas (Kabata-Pendias y Pendias 1992; Fishbein 1995). Rocas y suelos volcánicos, depósitos de uranio y rocas carbonosas presentan concentraciones ligeramente mayores (He *et al.* 2002) y existen alrededor de 40 minerales en los que el Se predomina, por lo que la minería, en especial las minas de carbón y uranio, representa la principal vía de contaminación por Se. Este metal, además, se volatiliza (Fishbein 1995). En agua, niveles tan bajos como 0.01 mg·l<sup>-1</sup> pueden ser letales para seres humanos (De Gregori *et al.* 2002)

### Molibdeno

En corteza terrestre, la concentración de Mo varía entre 1 y 6 mg·kg<sup>-1</sup> y es uno de los oligoelementos más escasos en suelos, con un contenido promedio entre 0.01 y 13 mg·kg<sup>-1</sup>, aunque en suelos volcánicos puede alcanzar hasta 30 mg·kg<sup>-1</sup>, concentraciones superiores son indicativas de contaminación (Bornemisza 1982; Kabata-Pendias y Pendias 1992). La disponibilidad del Mo incrementa con el pH y es fácilmente adsorbido por óxidos e hidróxidos de Fe y Al, halloysita y caolinita (Bornemisza 1982)

### Cadmio

El Cd es un metal relativamente volátil y raro en la naturaleza (ocupa el 67avo lugar en orden de abundancia). Se presenta en corteza terrestre en una concentración promedio de 0.1 mg·kg<sup>-1</sup> y en suelos ésta varía según la roca parental<sup>1</sup>. En general, se esperan concentraciones de Cd en suelos por debajo de 0.1 mg·kg<sup>-1</sup> (Alloway 1990) y en suelos agrícolas, hasta 0.5 mg·kg<sup>-1</sup> (Stoeppeler 1995). Según Kabata-Pendias y Pendias (1992), la cantidad promedio de Cd oscila entre 0.06 y 6 mg·kg<sup>-1</sup> y sólo valores por encima de éstos son indicativos de contaminación. Es un metal tóxico, no esencial. Algunos países europeos estipulan límites aceptables de Cd en suelos de 3.5-5 mg·kg<sup>-1</sup> (Kirke 1987). En México el límite máximo permitido en lixiviados de suelo es 1 mg·l<sup>-1</sup>, valores superiores indican daños al ambiente.

### Plomo

El Pb es un elemento tóxico del cual no se tienen evidencias respecto a participación en el metabolismo de los seres vivos. Suele encontrarse en cantidades traza en suelos y rocas, en estas últimas, hasta entre 1 y 30 mg·kg<sup>-1</sup>. De sus principales fuentes contaminantes (minería, gases vehiculares) y por ser el metal menos móvil, el Pb tiende a acumularse en el horizonte superior del suelo<sup>2</sup>, donde alcanza hasta 100 mg·kg<sup>-1</sup>; concentraciones por encima de este valor se deben exclusivamente a la contaminación (Alloway 1990; Kabata-Pendias y Pendias 1992). La normatividad mexicana establece hasta 5 mg·l<sup>-1</sup> de Pb en lixiviados de suelo.

### Mercurio

Normalmente, los suelos poseen no más de 300 µg·kg<sup>-1</sup> de Hg, concentraciones por encima de este valor son resultados de la contaminación (Kabata-Pendias y Pendias 1992); aunque para von Burg y Greenwood (1995) en suelos agrícolas se esperan 0.06 a 0.2 ppm. La minería es una de las principales industrias generadoras de Hg. Kabata-Pendias y Pendias (1992) documentan las concentraciones de Hg en depósitos mineros, mismas que fluctúan entre 0.1 y 40 mg·kg<sup>-1</sup>. La interacción Se + Hg incrementa la toxicidad de ambos. El Hg emplea como agente antiséptico por su acción antimicrobiana (antibacteriana y fungicida, principalmente); en forma de complejos organometálicos tales como alcali- y arilmercurio, mucho más potentes que las sales inorgánicas (von Burg y Greenwood 1995). Una vez asimilado por microorganismos, su eliminación sucede lentamente, por lo que tiende a bioacumularse vía cadena trófica.

<sup>1</sup>Así: 0.11 a 0.60 mg·kg<sup>-1</sup> en suelos ígneos, 0.007-0.87 en suelos metamórficos y hasta 11 mg·kg<sup>-1</sup> en suelos sedimentarios  
<sup>2</sup>y en capas superiores de sedimentos lacustres

## APÉNDICE A5

### PRODUCTOS GENERADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN

#### A5.1. PRESENTACIONES EN CONGRESOS

##### Nacionales

- Carrillo-Chávez A, Ramos-Arroyo YR, García-Meza JV, Mendoza-Amezquita E. 1999. *Geoquímica ambiental del Distrito Minero de Guanajuato: Informe preliminar*. IX Congreso Nacional de Geoquímica (INAGEQ). Septiembre 20-25, Linares, Nuevo León. Abstracts Actas INAGEQ 5(1):12 (sesión oral)
- García-Meza JV, Durán C. 2000. *Uso de microalgas para la restauración de desechos mineros (jales)*. V Congreso Nacional de Ciencias Ambientales. Junio 7-9, Acapulco, Guerrero. Abstracts y Programa, p. 43 (sesión oral)
- Pompa N, Hernández L, García-Meza JV, Durán C. 2001. *Identificación de bacterias aisladas de bioensayos con desechos mineros de Guanajuato*. Gto. XXXII Congreso Nacional de Microbiología. Abril 3-5, Guanajuato, Gto. (póster)
- García-Meza JV, Barranguet C, Durán C. 2002. *Short-term experiment using autotrophic biofilms isolated from a jal of Guanajuato: adaptative response*. XXXIII Congreso Nacional de Microbiología. Abril 7 a 10, Monterrey, Nuevo León (póster)

##### Internacionales

- Carrillo-Chávez A, Ramos-Arroyo YR, García-Meza JV, Mendoza-Amezquita E. 2000. *Environmental geochemistry of the Guanajuato Mining District, Mexico: Preliminary report*. Geological Society of American (GSA) Annual Meeting. Octubre 25 a 28, Denver, Colorado, EE.UU. Resumen con programas, 31(7):333 (presentación oral)
- García-Meza JV, Durán C. 2000. *Some physical, chemical and biological characteristics of La Valenciana jal (mine tailing) of Guanajuato, Mexico*. Proceedings of the 25th Annual Meeting and Conferences of the Canadian Land Reclamation Association (CLRA). Septiembre 17 a 20, Edmonton, Alberta, Canadá. Resumen con programas, formato CD (presentación oral)
- García-Meza JV, Novelo E, Hernández-Gómez L, Durán C. 2001. *Uses of microbial communities in the stabilization of bioavailable metals in mine tailings residues: the future of an environmentally friendly mining in Mexico*. IV International Symposium on Industrial Microbiology and Biotechnology. Marzo 1 a 3, Mérida, Yucatán, México. Abstracts, p.15 (presentación oral)
- García-Meza JV, Durán C. 2001. *Microorganisms development as an important step in mine tailings remediation*. Proceedings of the 26th Annual Meeting and Conferences of the Canadian Land Reclamation Association (CLRA). Agosto 25 a 29, Halifax, Nueva Escocia, Canadá (presentación oral)
- Carrillo-Chávez A, Morito-Bermea O, González-Partida E, Rivas-Solórzano H, Oesler G, García-Meza JV. 2001. *Evaluación geoquímica ambiental del Distrito Minero de Guanajuato*. XXIV Convención Internacional de la Asociación de Ingenieros de Minas Metalurgistas y Geólogos, A.C. Octubre 15 a 20 Acapulco, Guerrero, México
- García-Meza JV, Barranguet C, Durán C, Admiraal W. 2002. *Effects of metals on photosynthesis, EPS production and composition of metal tolerant biofilms from Guanajuato, Mexico*. Summer Meeting of the American Society of Limnology and Oceanography (ASLO). Junio 10 a 14, Victoria, Columbia Británica, Canadá. Abstracts p.48 (presentación oral)
- García-Meza JV, Carrillo-Chávez A, Durán C. 2003. *Chemical change of the Valenciana mine-tailing samples after microorganisms development*. Fourth International Seminar of Experts on the Treatment of Industrial Effluents and Residues. Abril 9-11, Ciudad de México, México (póster)



## A5.2. PUBLICACIONES

### Nacionales

- Carrillo-Chávez A, Morton-Bermea O, González-Partida E, Rivas-Solórzano H, Gretchen O, García-Meza JV. 2002. Aspectos geológicos ambientales de la minería: ejemplos de dos casos estudiados. *IPICYT* (Instituto Potosino de Investigación Ciencia y Tecnología A.C.) 1(1): 39-46
- García-Meza JV, Hernández-Gómez L, Silva A, Durán-de-Bazúa C. Desarrollo de biofilmes autotróficos en superficie de muestras del desecho minero aurífero-argentífero "Valenciana" (Guanajuato, México): Implicaciones de la colonización del desecho. *Revista IMIQ* (en preparación)

### Internacionales

- Carrillo-Chávez A, Morton-Bermea O, González-Partida E, Rivas-Solórzano H, Oelsner G, García-Meza JV. 2003. Environmental geochemistry of the Guanajuato mining district, Mexico. *Ores Geol Rev.* (En prensa)
- García-Meza JV, Ramos E, Carrillo-Chávez A, Durán C. 2003. Elemental and mineralogical composition of historical mine tailings from La Valenciana mine, Guanajuato. *Bull Environ Contam Toxicol.* (En prensa)
- García-Meza JV, Barranguet C, Admiraal W. Mechanisms underlying the survival of metal-tolerant biofilms. (sometido)
- García-Meza JV, Duran C, Carrillo-Chávez A. Sequential extractions on mine tailings samples after and before of bioassays: Implications on the liberation of toxic metals during microbial re-colonization. (sometido)

### Memorias in extenso

- Carrillo-Chávez A, Morton-Bermea O, González-Partida E, Rivas-Solórzano H, Oesler G, García-Meza JV. 2001. *Evaluación geoquímica ambiental del Distrito Minero de Guanajuato*. XXIV Convención Internacional de la Asociación de Ingenieros de Minas Metalurgistas y Geólogos, A.C. p.43-46
- García-Meza JV, Carrillo-Chávez A, Durán C. 2003. *Chemical change of the Valenciana mine-tailing samples after microorganisms development*. Fourth International Seminar of Experts on the Treatment of Industrial Effluents and Residues. p.159-164

## A5.3. Ponencias y seminarios

- En el Postgrado Institucional en Química, Universidad de Guanajuato, con el seminario impartido: *Sistemas Biológicos para la restauración de zonas con desechos mineros*. Guanajuato, Guanajuato, México. Marzo 30 de 2000
- En la XL Convención Nacional del Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos, A.C. con la sesión técnica: *Propuestas para el tratamiento de residuos tóxicos mediante sistemas biotecnológicos*. Ciudad de México, D.F. México. Octubre 7 de 2000
- Exposición del seminario: *Bioensayo para la remediación de zonas afectadas por jales mineros*, organizado por el Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental (PIQAYQA), Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, D.F. México. Marzo 9 de 2001
- Exposición del seminario: *Effect of metals on photosynthesis, species composition and EPS production of metal tolerant biofilms from mine-tailings (Guanajuato, Mexico)*. Seminario interno del Departamento de Ecología Acuática y Ecotoxicología, Facultad de Ciencias, Universidad de Ámsterdam, Países Bajos. Mayo 2 de 2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Del PIQAYQA, Facultad de Química, UNAM, a Landy, Lorena, Marisela, Irene, Rolando y Pavel.  
Del Departamento de Ecología y Ecotoxicología Acuática, Universiteit van Amsterdam, Nederland,  
a Helen, Bas, Harm, Gerdit, Esther, Miriam, Bart y Saskia  
A mis compañeros Miguel, Francisco y Nora  
Del personal administrativo del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM, a  
Josefina Tenopala, Patricia Vargas, Bety López, Susana, Leticia, Elsa, Ma. Elena  
A la UNAM

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN