



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE INGENIERÍA

**“Alternativa de tratamiento
para remediar un terrero
lixiviado con bacterias
sulfato reductoras”**

TESIS

Que para obtener el título de

Ingeniero de Minas y Metalurgista

P R E S E N T A

Angel Hernández Pérez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Ricardo Alfaro Fuentes



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019



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.

Agradecimientos

El desarrollo de ésta tesis fue gracias al apoyo de grandes personas que se tomaron el tiempo de compartir su conocimiento, entre los cuales cabe destacar la aportación de Jessica J. Fernández Mendoza, quien me introdujo y guió a lo largo de este amplio tema, quien además de ser una excelente maestra la considero una gran amiga. A mis sinodales, Santos Jallath José Enrique, Miguel Márquez Martínez, Fabiola Vega García y Daniel Ramos Pérez, especialistas en diversos campos que hicieron posible un mejor entendimiento del tema y generar un documento más completo. En especial a mi asesor de tesis el Dr. Ricardo Alfaro Fuentes quien procuró el tema se fuera desarrollando de la mejor manera.

Agradecer al Apoyo de mis padres Marisela y Juan Gabriel, quienes me tuvieron la paciencia al desarrollar lo que a mí me gusta con su apoyo incondicional. A mis hermanos, Omar y Naydelin, que fungieron como mi motor, por el amor que me brindaron. A mi abuela Altagracia que sin ella no sería ni la mitad de lo que hoy soy. A mis abuelos Casimiro y Flora, quienes vieron por mí desde mis festivales de la primaria. A tíos, padrinos y primos que me motivaban día a día por ser mejor.

Quiero agradecer también a aquellos amigos que hicieron de cada día algo especial a lo largo de la universidad, Alondra, Misael, Iván, Eutiquio, Gabriel, Diana, Daniel, Jennyfer, Thamara y Enrique. A mis mejores amigos Monse y Carlos que además de su apoyo me inspiran a ser mejor cada día, como ellos.

Agradezco a esos maestros que te marcan a lo largo de toda la vida por su forma de ser y enseñar, a mi maestra de la primaria Gabriela Vargas, de la secundaria al profesor Santos, de la prepa a los profesores Miguel Carlos Esquivel y Juan Luis Díaz, así como de la universidad a maestros como Crail Corzas, Jacquelin Martínez Alavez y Santos Jallath.

En fin, no existen palabras para terminar de agradecer a todas esas personas que me han apoyado a lo largo de esta trayectoria académica y de la vida. Gracias.

Hernández Pérez Angel

Contenido

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	5
Fundamento teórico	6
Marco teórico	6
Microbiología del suelo	7
Bacterias.....	7
Monitoreo de la reproducción bacteriana.....	8
Análisis de comportamiento bacteriano al microscopio (Curva de crecimiento bacteriano)	12
Bacterias Sulfato Reductoras (BSR).....	14
Comportamiento de las bacterias sulfato reductoras.....	14
Características y crecimiento de las BSR.....	17
Reducción desasimilatoria de sulfato.....	17
Biopelículas.....	18
Medio de cultivo para el caso de BSR	20
Factores que afectan el proceso de sulfato-reducción	21
Efecto del pH	21
Efecto de la temperatura.....	21
Nutrientes.....	22
Agentes inhibidores.....	23
Metabolismo microbiano de las bacterias sulfato reductoras (BSR).....	24
Suelos y su contaminación por sustancias ácidas.....	28
Lixiviación	29
Lixiviación natural	30
Lixiviación natural a un jal.....	30
Lixiviación química en un terrero	30
Material lixiviado y Drenaje Ácido de Mina	33
Impacto del material lixiviado al suelo	33
Drenaje Ácido de Mina	34
Afectación de la desmineralización de suelos o terreros.	35
Biorremediación.....	37
Ejemplos de Biorremediación exitosa con bacterias en procesos mineros.....	40

Propuesta a desarrollar	44
Extracción de bacterias.....	45
Aislamiento y producción de bacterias sulfato reductoras	45
Producción industrial de bacterias	47
Planteamiento de neutralización	49
Uso de Bacterias Sulfato Reductoras para obtener la neutralización de un terrero lixiviado	50
Discusión de la propuesta de biorremediación.....	52
Conclusiones y recomendaciones.....	53
Contenido de figuras	54
Contenido de tablas	55
Bibliografía	56

Resumen

La minería es una de las industrias más importantes a nivel mundial, ya que aporta la materia prima para la obtención de materiales que se involucran en todas las actividades humanas, sin embargo, para la obtención de los valores minerales se requiere de diversas etapas, con las cuales se persigue generar productos de alta pureza y otras sustancias, los cuales pueden ser adversos para la naturaleza (contaminantes), puesto que llevan sustancias empleadas en el proceso de refinación. La tendencia frente a la adversidad que enfrentamos por la contaminación generada por el hombre, es buscar remediar o disminuir el efecto que tienen las actividades que desarrollamos día a día dentro de la minería, por lo que se plantean nuevas tecnologías que sean accesibles. El objetivo de este documento es dar a conocer una propuesta como tratamiento de un desecho arrojado por la minería (terreros lixiviados) para su remediación, mediante el uso de bacterias sulfato reductoras, las cuales tienen como principal función reducir los sulfatos a sulfuros, desencadenando una serie de reacciones las cuales propicien elevar el pH del terrero, evitando así, que los metales pesados (contaminantes) afecten al medio ambiente. Dejando así como premisa, que la actividad bacteriana con las condiciones adecuadas podría realizar una precipitación selectiva de metales de interés económico. El desarrollo del procedimiento de la biorremediación involucra parámetros esenciales (pH, temperatura, nutrientes, etc.) para el crecimiento, reproducción y desarrollo de los microorganismos. Los requerimientos mínimos se refieren a tener un pH de valor 4 en el terrero para facilitar la actividad de las bacterias, mediante la incorporación de fuentes de carbono como basura orgánica, carbonatos u otros compuestos que además permitan alcanzar el pH. La biotecnología como alternativa a la remediación de un terrero lixiviado presenta un gran potencial, debido a los bajos costos de operación y a las ventajas de reinsertar materiales no contaminantes al medio ambiente.

Fundamento teórico

Marco teórico

Existe la teoría de que la vida se originó en el mar hace miles de millones de años. Esto se pudo dar gracias a la interacción de la luz ultravioleta, descargas eléctricas y altas temperaturas junto con los compuestos inorgánicos de la atmosfera, resultando compuestos orgánicos que se formaron en el mar (Cardona, 2007). Dichos compuestos orgánicos formaron aminoácidos, polipéptidos y sustancias orgánicas complejas, que sirvieron como precursores para las primeras formas de vida (microorganismos).

Los microorganismos por lo tanto están presentes en todo lo que nos rodea ya que pueden ser trasladados por diversos medios y además cuentan con facilidad para adaptarse y depositarse en cualquier superficie. Predominan en ambientes ricos en nutrientes como vitaminas, minerales, oligoelementos y en condiciones óptimas para su reproducción y desarrollo tales como humedad, temperatura, pH y potencial.

Debido a su ubicuidad el estudio de los microorganismos se orienta a diferentes campos a saber:

-
- | | |
|---------------------------------|---|
| • Microbiología del agua | • Microbiología industrial |
| • Microbiología del aire | • Microbiología de los alimentos |
| • Microbiología médica | • Microbiología del suelo |
-

El medio ambiente edáfico¹ es único, ya que contiene una gran variedad de bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios; es uno de los sitios más dinámicos en interacciones biológicas en la naturaleza, en la cual se realizan la mayor parte de las reacciones bioquímicas involucradas en la descomposición de la materia orgánica, la intemperización de las rocas o la incorporación de nutrientes inorgánicos a las plantas. (Vergara, 2014)

¹ La **edafología** es una rama científica que se desprende de Geología. Concretamente se encarga de **evaluar, estudiar y comparar los suelos** y determinar si su composición afecta a la naturaleza y a los organismos que se desarrollan sobre y dentro de este.

Microbiología del suelo

La microbiología del suelo, como lo dice su nombre, corresponde a los organismos presentes en el suelo; estos organismos juegan un papel muy importante debido a que contribuyen a la fertilidad del suelo, por ejemplo algunos fijan el nitrógeno atmosférico en compuestos nitrogenados, utilizados por las plantas para sintetizar proteínas. Además convierten sustancias orgánicas complejas en compuestos más sencillos, para que las plantas puedan incorporarlas a sus procesos metabólicos. (Zapata, 2010)

El suelo contiene 5 grupos principales de microorganismos: bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios. El suelo como ecosistema, incluye a estos grupos microbianos así como los constituyentes orgánicos e inorgánicos de un determinado lugar, se llama comunidad a todos los microorganismos habitantes en una misma localidad. Un conjunto representativo de células o filamentos presentes en la comunidad se llega a considerar diferente uno del otro debido a que requieren de diferentes condiciones para subsistir (Zapata, 2010). Para este trabajo nos enfocaremos solamente en las bacterias.

Bacterias

Las bacterias se pueden dividir taxonómicamente o sistemáticamente por el sistema propuesto en el manual de Bergey, en el cual describe como identificar los distintos microorganismos de acuerdo a diferentes tinciones. Otras maneras de distinguir a las bacterias son por sus diferencias fisiológicas, para poder clasificarlos, se emplea una variedad de características nutricionales y metabólicas que incluyen la naturaleza de la fuente de energía, los carbohidratos que se utilizan para el crecimiento (azúcares en general), la capacidad de utilizar N_2 como fuente de nitrógeno, etc. (Valenzuela, 2010).

La capacidad de crecimiento en ausencia de O_2 es otra característica bioquímica importante que ha llevado a distinguir tres categorías distintas en las bacterias:

- Aerobias (requieren O_2)
- Anaerobias (crecen solamente en ausencia de O_2)
- Anaerobias facultativas (se desarrollan en ausencia y en presencia de O_2)

En el caso específico de las bacterias su función principal es aportar una serie de actividades fundamentales para la sustentabilidad de todos los ecosistemas; son el principal agente del ciclo de los nutrientes, regulan la retención del carbono y la emisión de gases de efecto invernadero, modifican la estructura material del suelo y los regímenes del agua, mejorando la cantidad y eficacia de la adquisición de nutrientes de la vegetación y la salud de las plantas. De ahí la importancia de las

bacterias pues no solo son decisivas para el funcionamiento de los ecosistemas naturales, sino que constituyen un importante recurso para la gestión sostenible de los sistemas agrícolas. (Ibañez, 2007)

De tal forma que es posible utilizar las características de las bacterias en otras actividades humanas, por ejemplo el uso de la biolixiviación, que nos refiere a un proceso en el cual las bacterias mediante reacciones bioquímicas permiten la liberación de elementos de interés, en vez de usar reactivos químicos (Gallego, 2002).

Monitoreo de la reproducción bacteriana

Como es el caso de cualquier organismo las bacterias tienen ciclos de crecimiento y por ello es importante evaluar la cantidad y tipo de microorganismos en una muestra (Gama, 2013). A continuación se describirán algunos procedimientos con los cuales se puede establecer el número de microorganismos existentes en una muestra ya sea por recuento total de microorganismos o recuento de microorganismos viables como se muestra en la ilustración 1.

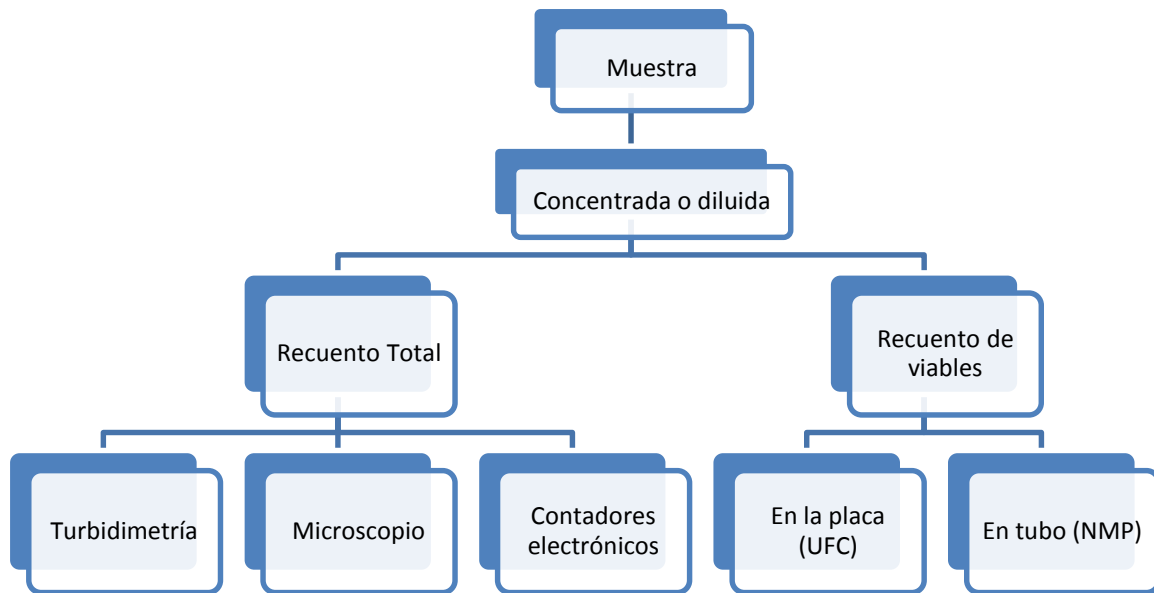
Al tener una muestra de la que se desea conocer cuántos microorganismos contiene y partiendo de un volumen o peso conocido, se estima un número de microorganismos presentes en la muestra, si dicho número es grande y se requiere minimizar para facilitar el conteo, se utiliza una dilución.

El monitoreo se puede llevar a cabo de manera directa (turbidimetría, microscopio o contadores electrónicos), arrojando un número de microorganismos presentes en la muestra sin tener conocimiento de cuántos siguen vivos y dependiendo que tipo de microorganismos se desea contar (Hongos, bacterias, cocos, etc.) o de manera indirecta a través de un recuento de viables (en placa UFC²) o en tubo NMP³) (Gama, 2013)

² UFC=Unidades formadoras de colonias

³ NMP= Número más probable

Ilustración 1. Diagrama de métodos de monitoreo para conteo de bacterias
(Gama, 2013)



Por practicidad en el laboratorio se suele implementar los métodos directos para realizar el conteo de bacterias. El método directo por contadores electrónicos consta de hacer pasar un volumen conocido de la muestra a través de un pequeño orificio de 5 a 10µm de diámetro, mediante manipulación con una micropipeta. La resistencia eléctrica a través del orificio está normalizada y se altera cada vez que un microorganismo pasa a través de él, la modificación de la resistencia se amplifica y registra electrónicamente. (Cardona, 2007).

El método de recuento microbiano conocido como turbidimetría consiste en que en una suspensión microbiana, la cantidad de microorganismos está directamente relacionada con la turbiedad o densidad óptica de la misma, e inversamente relacionada con la cantidad de luz que pasa por la misma. De este modo se puede precisar con bastante exactitud el número de microorganismos presentes en una suspensión mediante la determinación de la turbiedad, para ello se utilizan nefelómetros o espectrofotómetros.

Ilustración 2. Espectrofotómetro



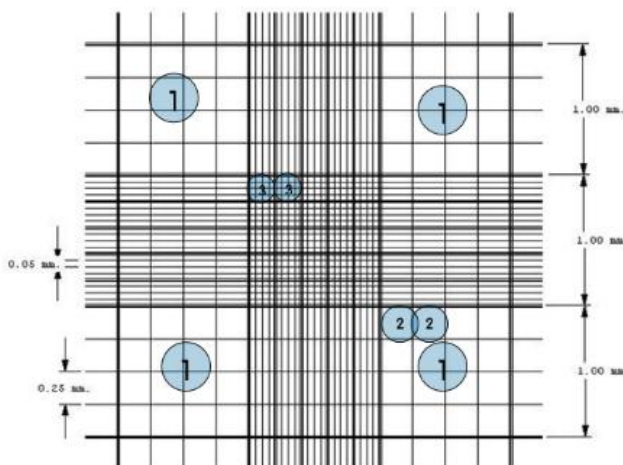
Ilustración 3. Nefelómetro



El último método para conteo de microorganismos directo es a microscopio, en el cual un volumen conocido de la muestra diluida se puede extender sobre la herramienta que lleva por nombre hematocitómetro o comercialmente denominada cámara de Neubauer la cual es una placa gruesa de cristal con forma de porta objetos de (30 x 70) mm y un grosor de 4 mm. Dicha placa contiene grabada una retícula en la parte central. Dicha herramienta facilita el recuento por unidad de superficie y de volumen.

La retícula tiene en total una sección de (3 x 3) mm por cada lado, la cual a su vez esta subdividida por 9 cuadros de 1mm por lado. El cuadro central de (1 x 1) mm es el destinado para el conteo celular y se encuentra dividido en 25 cuadros medianos de (0.2 x 0.2) mm y cada uno de estos cuadros se subdivide en 16 cuadros pequeños como se muestra en la siguiente imagen:

Ilustración 4. Detalle de la rejilla de una cámara de Neubauer.



Para el recuento de células existe una convención por la cual si las células tocan el límite superior o el límite izquierdo del cuadro, deben contabilizarse, pero no se contabilizan si tocan el límite inferior o el límite derecho. También se debe realizar una dilución a la muestra si cuenta con un número muy grande de bacterias (>80) y se recomienda llevar cierto orden en el conteo de las bacterias ya que se encuentran en movimiento. Realizando el conteo en 5 cuadros grandes y obteniendo un promedio del número de bacterias contabilizadas.

Ilustración 5. Recuento con alta concentración celular

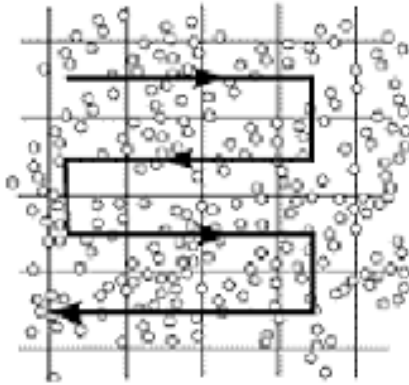
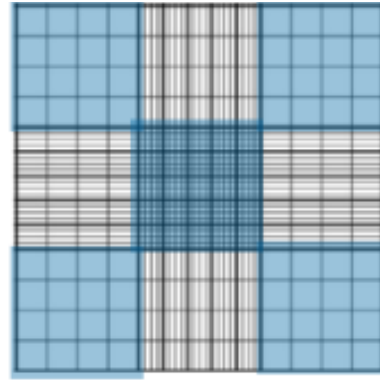


Ilustración 6. Recuento de 5 cuadros grandes de cámara Neubauer



Finalmente, con los datos obtenidos se puede obtener una concentración en cel/mm con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mm}} \right) = \# \text{ bacterias} * \text{dilución} * \text{factor de profundidad}$$

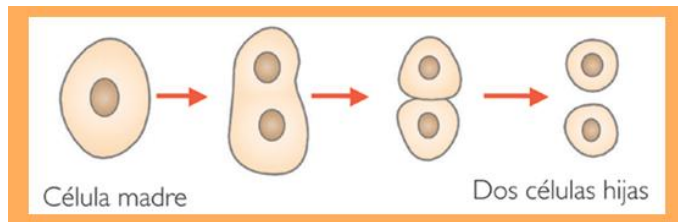
El factor de profundidad está dado por las dimensiones de la cámara de Neubauer en donde se contabiliza 160,000.

Análisis de comportamiento bacteriano al microscopio (Curva de crecimiento bacteriano)

La reproducción de las bacterias puede ser por esporas reproductivas, por crecimientos filamentosos, por gemación o por fisión binaria. Siendo este último, el mecanismo por el cual las bacterias sulfato reductoras (BSR) se reproducen, el cual es un proceso de la división de una célula en dos células, en donde

Ilustración 7. Fisión binaria

usualmente ambas células hijas tienen el mismo tamaño y forma. Este es el proceso más común y más importante en el ciclo de crecimiento de las poblaciones bacterianas. (Pacheco, 2008)



Se define crecimiento como un aumento en la cantidad de constituyentes y estructuras celulares, cuando hay crecimiento en ausencia de división celular hay aumento en el tamaño y peso de la célula. Mientras que cuando el crecimiento es seguido de división celular hay un aumento en el número de células.

En este caso la palabra crecimiento se refiere al aumento en el número de células y no al aumento en peso y volumen de una célula, lo cual es importante destacar. En las bacterias, el crecimiento se da de manera exponencial (ilustración 8) debido a lo que ya se explicó en lo correspondiente a fisión binaria (de una célula se obtienen dos). El comportamiento del crecimiento de una población bacteriana se puede representar de manera ideal bajo 4 fases de crecimiento las cuales se muestran en la tabla 1.

Ilustración 8. Fases de crecimiento de una población bacteriana

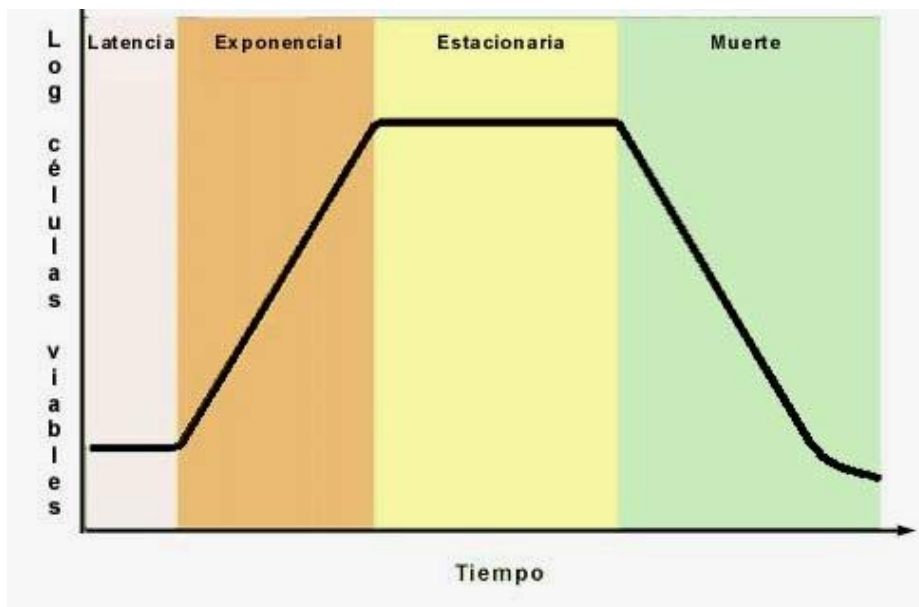


Tabla 1. Fases de crecimiento de una población bacteriana (Pacheco, 2008)

Latencia

- La fase de latencia representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición. En esta fase se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo medio ambiente.
- En esta fase no hay incremento en el número de células, pero hay gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, en el contenido proteico, ADN y peso seco de las células.

Exponencial

- Es el período de la curva de crecimiento en el cual el microorganismo crece exponencialmente, es decir que cada vez que pasa un tiempo de generación la población se duplica. Bajo condiciones apropiadas la velocidad de crecimiento es máxima. Las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo, etc.) afectan a la velocidad de crecimiento exponencial.

Estacionaria

- En cultivos en recipientes cerrados una población no puede crecer indefinidamente en forma exponencial. Las limitaciones del crecimiento ocurren ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, porque se alcance un número de células elevado para el espacio disponible o por una combinación de las causas anteriores. Este periodo durante el cual cesa el crecimiento se conoce como fase estacionaria.

Muerte

- Si la incubación continúa después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero va a comenzar una disminución progresiva en el número de células viables y cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte

Como ya se mencionó el conteo se hace a través de un homocitómetro, el cual alberga un volumen conocido de líquido. El recuento directo al microscopio resulta ser tedioso, pero una forma rápida de estimar el número de células microbianas aunque presenta las siguientes limitaciones:

- No se pueden distinguir las células vivas de las células muertas.
- Las células muy pequeñas son difíciles de contar.
- La precisión es difícil de lograr
- El método no es adecuado para suspensiones celulares de baja densidad, es decir las disoluciones deben contener aproximadamente 10⁷ células/ml o más.

Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)

Las bacterias sulfato-reductoras (BSR) constituyen un grupo diverso de procariotas, cuya principal acción radica en el ciclo del azufre al modificar sus estados de oxidación, además de cumplir con importantes tareas en diversos ámbitos como lo son la remediación de drenaje ácido de mina (DAM), la remediación de aguas residuales, la bioprecipitación de metales pesados, la eliminación de gases producto del efecto invernadero o hasta la eliminación de plásticos en los océanos (Virginia, 2010).

Comportamiento de las bacterias sulfato reductoras

Las BSR son microorganismos anaerobios obligados, metabólicamente versátiles provenientes de varias familias y diferentes géneros. Utilizan sulfato u otros compuestos de óxidos de azufre como aceptor final de electrones (agente oxidado) para la producción de H₂S. Pueden crecer de forma heterotrófica usando moléculas orgánicas de bajo peso molecular y de manera autotrófica usando hidrógeno y dióxido de carbono (Calderon, 2008).

Las BSR son notablemente adaptables y pueden ser encontradas en numerosos ambientes terrestres y acuáticos en los que se ha agotado el oxígeno debido a la descomposición aeróbica de la materia orgánica. Se encuentran principalmente en ambientes anóxicos ricos en sulfatos. Han sido descubiertas en suelos, lodos de estuarios; en aguas dulces, de alcantarillado, marinas, salobres, termales y/o áreas geotermales, depósitos de sulfuros, en pozos petroleros y de gas; y en el intestino de mamíferos e insectos (Postgate, 1984) (Calderon, 2008).

“Se ha comprobado que además estos microorganismos pueden cambiar su metabolismo para mejorar su rendimiento en diferentes condiciones es decir, ante la variación de los parámetros idóneos (pH, temperatura, nutrientes, etc.).” (Demergasso, 2010).

En la búsqueda de una clasificación de los microorganismos sulfato-reductores se han utilizado muchas de sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Entre estas propiedades se encuentran:

- Motilidad
 - Observando la facultad de movimiento como respuesta a ciertos estímulos por parte de las bacterias.
- Condiciones óptimas de crecimiento
 - Caracterizándolas de acuerdo a las temperaturas óptimas de crecimiento (lo mismo con pH, con luz o sin luz, etc.)
- Perfiles de utilización de fuentes de carbono
 - Conforme a la fuente de carbono que arroje mejores resultados en su utilización se clasifica a las bacterias.
- Tipos de enzimas reductoras de sulfitos
 - Conforme a como catalizan la reacción de reducción entre sustratos azufrados (Reductasa, ciclasa, cetoglutámico deshidrogenasa, quinureninasa, etc.)
- Composición de *nucleótidos*⁴ del ADN
 - A través de enzimas se hidroliza nucleótidos para extraerles el potencial energético almacenado.
 - ATP (un nucleótido de adenina con tres grupos de fosfato)
 - UTP (Uracilo más tres fosfatos)
 - GTP (guanina y tres fosfatos)

(McMahon, 2007).

Una forma tradicional muy sencilla y adecuada de clasificarlas está dada en base a su capacidad para degradar la materia orgánica en forma parcial o total; de acuerdo a esta propiedad pueden ser divididas en dos grupos principales:

⁴ Nucleótidos son moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un monosacárido (azúcares simples), de 5 carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.

Ilustración 9. Clasificación de bacterias en función de su capacidad para degradar materia orgánica (Calderon, 2008)

1) Compuestos oxidados parcialmente del sustrato.

- Generan acetato como producto final
- utilizan lactato, piruvato, etanol y ciertos ácidos grasos como fuente de carbono y energía para reducir el sulfato a sulfuro.
- Bajo condiciones ideales, tienen una velocidad de crecimiento mucho más rápida que los compuestos oxidados totalmente y pueden lograr tiempos de duplicación de 3 a 4 hrs si son alimentadas con los sustratos que las favorecen.
- El grupo esta constituido por géneros como:
 - Desulfovibrio
 - Desulfomonas
 - Desulfotomaculum
 - Desulfobulbus
 - Thermodesulfobacterium

2) Sustancias totalmente oxidadas

- Estos géneros utilizan ácidos grasos, especialmente acetato.
- Tienen un crecimiento lento, frecuentemente con tiempos de duplicación mayores a 20 horas.
- El grupo está compuesto por :
 - Desulfobacter
 - Desulfococcus
 - Desulfosarcina
 - Desulfonema
 - Desulfobacterium

Las BSR son de inmensa importancia desde el punto de vista industrial y ambiental (Tang, 2008); Que si bien, generan H₂S el cual puede producir graves problemas ambientales, éste se puede controlar al ser producido dentro de un biorreactor, de tal manera que las bacterias jueguen un papel importante en el tratamiento de drenaje ácido de mina.

Características y crecimiento de las BSR

Reducción desasimilatoria de sulfato

Bajo las condiciones adecuadas el sulfato puede reducirse biológicamente a sulfuro con problemas asociados de olor y riesgo severo de corrosión (Tang, 2008). La reducción de sulfato puede ocurrir de 2 maneras, por vía asimilatoria⁵ o desasimilatoria⁶. En el caso de la vía desasimilatoria se generan compuestos de azufre reducidos para la biosíntesis de aminoácidos y proteínas.

Las bacterias sulfato-reductoras llevan a cabo la reducción de sulfatos, usando el sulfato (SO₄)²⁻ como aceptor terminal de electrones durante la respiración anaeróbica. La sulfato reducción puede seguir un proceso desasimilatorio o *asimilatorio*. En la reducción desasimilatoria, el sulfuro de hidrógeno (H₂S) formado por la reducción del sulfato, es excretado o liberado al ambiente; mientras que en la reducción asimilatoria de sulfato, el H₂S formado se convierte inmediatamente en azufre orgánico que pasa a formar parte de aminoácidos como la cisteína o la metionina. (Virginia, 2010)

La fuente donadora de electrones para las bacterias sulfato reductoras puede ser en general diversa, es decir, no es limitada, puede ser hidrógeno, ácidos carboxílicos tales como ácido fórmico, acético, propiónico, butírico, láctico o pirúvico, o bien por ácidos dicarboxílicos como málico, fumárico, succínico, o alcoholes tales como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, y/o glicerol.

Los iones sulfato (principalmente), y otros compuestos de azufre también como: sulfito o tiosulfato son compuestos susceptibles a ser reducidos por las BSR. A continuación se muestra una tabla de los compuestos azufrados con su estado de oxidación y las especies donadoras de electrones:

⁵ Reducción de sulfato por vía asimilatoria: se reduce directamente el sulfato para utilizarlo en la biosíntesis de aminoácidos y proteínas

⁶ Reducción de sulfatos por vía desasimilatoria: en ésta, se utiliza el sulfato como aceptor final de electrones para formar sulfuros.

Tabla 2. Compuestos azufrados con sus respectivos estados de oxidación y compuestos donadores de electrones utilizados por las BSR (Virginia, 2010)

Estados de oxidación de los compuestos azufrados	
Compuesto	Estado de oxidación
S orgánico (R-SH)	-2
Sulfuro (H ₂ S)	-2
Azufre elemental	0
Ion tiosulfato (S ₂ O ₃) ²⁻	+2
Dióxido de azufre (SO ₂)	+4
Ion sulfito (SO ₃) ²⁻	+4
Trióxido de azufre (SO ₃)	+6
Ion sulfato (SO ₄) ²⁻	+6
Donadores de electrones	
H ₂	Acetato
Lactato	Propionato
Pirúvato	Butirato
Etanol y otros alcoholes	Ácidos grasos de cadena larga
Fumarato	Benzoato
Malato	Indol
Colina	Hexadecano

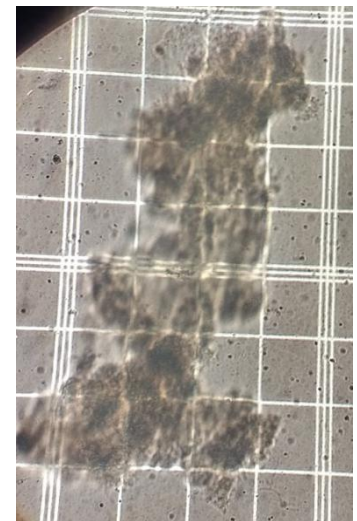
Biopelículas

Las bacterias existen en la naturaleza de dos formas o estados, ya sea en libre flotación o dentro de un biofilm (biopelícula), es decir en colonias de microorganismos *sésiles*⁷ (Nazar, 2007)

Una biopelícula o biofilm es una estructura colectiva de microorganismos adheridos a superficies vivas o inertes, revestidos por una capa protectora segregada por los propios microorganismos (GreenFacts, 2017), y en el caso de las BSR es una de las estructuras más comunes que genera.

Puede estar formado por una o varias especies de hongos o bacterias, con la condición de que los nutrientes disponibles sean suficientes para la población. Se cataloga como una especie de mecanismo de supervivencia que las bacterias generan para poder resistir biosidas y antibióticos de un modo más eficaz que a aquellos organismos que viven fuera de biopelículas.

Ilustración 10. Biopelícula al microscopio



⁷ El término *sésil* se utiliza para referirse a un organismo que crece adherido, agarrado o arraigado en un sustrato.

La generación de biopelículas se da mientras las bacterias se desarrollan y consta de cuatro pasos (Aristabal, 2014):

- Fijación y agregación
- Producción de matriz extracelular
- Comportamiento coordinado y comunicación
- Heterogeneidad

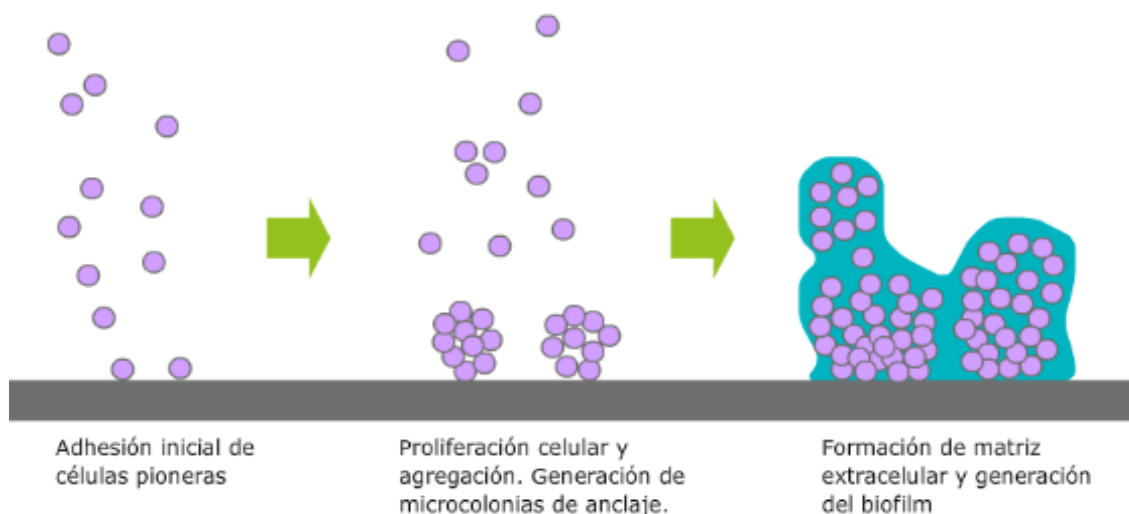
Conforme a la especie bacteriana que genere el biofilm, es su comportamiento. Sin embargo todas coinciden en producir resultados similares, es decir, al formar una “colonia” o “grupo” crearan una mayor resistencia a condiciones que puedan provocar su muerte.

“Se ha demostrado que la unión de células como biopelículas a la superficie de sulfuros metálicos mejoran la biolixiviación (Pogliani y Donati; 1999) (Gehrke *et al*; 1998) (Sand *et al*; 2001) (Rodríguez *et al*; 2003). “

“Estudios mundiales han demostrado que la mayoría de las comunicaciones microbianas pasan una gran parte de su ciclo de vida dentro de una biopelícula. Las biopelículas son sistemas de microorganismos altamente organizados”.

Integrados en una matriz producida, gelatinosa y altamente hidratada, compuesta de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), iones, gases, coloidales y compuestos particulados y canales de agua abiertos, en donde los EPS representan del 50 -90 % de la biopelícula. (Lara, 2009)

Ilustración 11. Formación de biopelículas



Las biopelículas se pueden analizar por microscopia de epifluorescencia (en materiales opacos), o con microscopio de escaneo laser confocal (CLSM) y con espectroscopia Raman para identificación precisa de azufre o polisulfuros. El análisis en Raman se lleva a cabo para determinar la presencia de azufre en las estructuras.

Medio de cultivo para el caso de BSR

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de microorganismos. La diversidad metabólica de los microorganismos es enorme; por ello, de igual forma existen una gran variedad de medios de cultivo (Díaz R. , 1995). Existen medios de cultivo específicos para BSR que se han ido modificando a través de la experimentación, desarrollados por el Dr. Aymer J. Postgate (Gutierrez, 2007), quien fue de los pioneros en la utilización de estas bacterias. Él, gracias a su experimentación a través de los años generó medios de cultivos específicos para BSR, a estos medios de cultivo los denomino “Postgate A”, “Postgate B” y “Postgate C”. En la siguiente tabla (Tabla 3) se puede apreciar el contenido de estos medios de cultivo:

Reactivos g/l	A	B	C
KH₂PO₄	0.5	0.5	0.5
CaSO₄	1.0		
Na₂SO₄		4.5	1
NH₄CL	1.0	1.0	1.0
MgSO₄*7H₂O	2.0	0.06	2.0
CaCl₂*6H₂O		0.06	1.0
Lactato de sodio	3.5	6.0	3.5
Citrato trisódico		0.3	
Extracto de levadura	1.0	1.0	1.0
FeSO₄*7H₂O	0.5	0.004	0.5
Ascórbato	0.1		0.1
Tioglicolato	0.1		0.1
Agar purificado			15.0
Agua común	1000 ml		1000 ml
Agua destilada		1000 ml	
pH	7.0 a 7.5	7.5	7.6
Notas	Contiene precipitado	Medio limpio	
Uso	Enriquecimiento y crecimiento de cultivos puros	Lote de cultivo de mayor capacidad	Enumeración

Conforme al paso del tiempo se ha visto que dichos medios de cultivo son una buena base para determinar que nutrientes aportar a las bacterias. Las modificaciones que se han generado a este medio han dado aún mejores resultados y por ello la implementación del Dr. Postgate, en variantes a los nutrientes y fuente de carbón para las bacterias, con el fin de propiciar las mejores condiciones para la reproducción de estas.

Factores que afectan el proceso de sulfato-reducción

Efecto del pH

Es importante que el medio en donde se encuentre la bacteria tenga un intervalo de pH para que su reproducción y crecimiento sea el óptimo, de tal manera que cumpla de manera adecuada con su actividad. Las bacterias sulfato reductoras tienden a tener una mejor reproducción en un intervalo de pH neutro a básico (6.0 a 9.0) en donde se llega a observar un mejor comportamiento en el rango de 7.0-7.5 dependiendo la especie.

El estudio de las bacterias sulfato reductoras se ha limitado a aquellas condiciones óptimas para su reproducción, es decir, en los rangos ya mencionados (6.0-9.0). Esto debido a que la mayoría de las especies sulfato reductoras son inhibidas fuera de ese rango. Sin embargo, se ha detectado actividad bacteriana sulfato reductora en pH del rango 3.0 – 4.0, aunque cabe mencionar que su reproducción es más lenta al igual que su producción de ácido sulfhídrico y dióxido de carbono. (Valenzuela, 2010)

Efecto de la temperatura

Como en todos los procesos metabólicos de un organismo, la temperatura es un factor importante para su buen funcionamiento, en el caso de las BSR no es la excepción. Existen estudios que indican que las bacterias sulfato reductoras se pueden mantener en condiciones extremas dependiendo su especie, es decir, se pueden mantener en casi cualquier condición de temperatura según lo siguiente (Gutierrez, 2007):

- Condición psicrófila (0 - 25 °C)
- Condición mesófila (25 - 35 °C)
- Condición termófila (35 – 70 °C)

Lo cual es una ventaja para las BSR ya que las bacterias metanogénicas son más sensibles a los cambios de temperatura, sobre todo a los incrementos de la misma.

Varios autores coinciden (Hao et al., 1996), en que las condiciones óptimas de temperatura para las BSR se encuentran en el rango de los 28 – 35 °C, sin embargo esto difiere con respecto a cada especie (Valenzuela, 2010).

Además de ayudar a las especies bacterianas a su reproducción, la temperatura es un factor importante debido a que al utilizar un biorreactor para cultivo de las BSR, el incremento o decremento de temperatura se verá reflejado en los costos, en los distintos procesos metabólicos y la actividad de los microorganismos.

Nutrientes

Para que una célula viva, crezca y se reproduzca, debe ser capaz de incorporar y transformar (metabolizar) los compuestos químicos que necesita para obtener energía, así como las moléculas que pasarán a formar parte de su material celular (Gama, 2013).

En la naturaleza los constituyentes principales de la célula (C, H, O, N, P y S) se encuentran como elementos simples o enlazados covalentemente a otros elementos, formando compuestos de complejidad química viable. Prácticamente cualquier sustancia presente en la naturaleza puede servir como nutrimento a uno u otro microorganismo pero ninguno puede utilizar todos los nutrimentos y algunas sustancias son empleadas solo por un grupo reducido de ellos. Las diferencias que presentan los microorganismos en cuanto a su requerimiento nutricional, y la capacidad para transformarlos, están determinadas por su constitución genética y consecuentemente por las enzimas que poseen, y además por factores ambientales. Algunos microorganismos producen una batería reducida de sistemas enzimáticos, en tanto que otros son capaces de sintetizar una variedad amplia. De este modo, cuanto mayor sea la diversidad de enzimas que posee un microorganismo, mayor es el espectro de materias primas que éste puede utilizar (Gama, 2013).

Los requerimientos nutricionales de los seres vivos están determinados por la composición química de la célula, por su constitución genética y por factores del medio ambiente. Considerando lo anterior, desde un punto de vista meramente químico, cualquier sustrato o medio de cultivo que contenga los elementos constitutivos celulares, proporcionará los nutrimentos para el desarrollo de los microorganismos; no obstante, estos varían ampliamente en sus características genéticas y consecuentemente en sus propiedades fisiológicas y su capacidad para utilizar y transformar a los diferentes compuestos químicos (sulfatos a sulfuros en el caso de las BSR) (Gama, 2013).

La elección de los nutrientes adecuados determina el desarrollo y actividad de los microorganismos debido a que están directamente relacionados. Dicho medio de cultivo por tanto, debe contener fuentes de carbono, energía, nitrógeno y fósforo, como principales factores para un óptimo desarrollo (Zapata, 2010).

En busca de un proceso de remediación rentable, se utilizan los compuestos que den buenos resultados buscando alternativas más baratas pero funcionales. Tal es el caso de las diversas fuentes de carbono que se han analizado para el proceso de Biorremediación con bacterias encontrando cada vez una de menor costo como lo han sido el aserrín, heno, alfalfa, virutas de madera, estiércol, lodo de aguas residuales y abono (Tang, 2008).

La elección de los nutrientes, por ejemplo “Postgate A”, se debe realizar conforme a tres puntos específicos:

- Costo del nutriente
- Disponibilidad local
- Eficiencia probada del nutriente

Algunos microorganismos derivan su energía de compuestos inorgánicos y utilizan carbonatos como fuente de carbono, lo que indica que tienen requerimientos nutricionales muy simples en tanto que otros requieren de compuestos orgánicos con diferentes grados de complejidad. En general sus requerimientos nutricionales reflejan el ambiente natural en que viven; por lo que este conocimiento y el uso de medios de cultivo con composición química definida son de primordial importancia en el estudio de la nutrición microbiana (Gama, 2013).

Algunos nutrientes constituyen los bloques estructurales a partir de los cuales la célula elabora macromoléculas estructurales o funcionales, mientras que otros sirven como donadores de electrones (fuente de energía) y otros como aceptores finales de electrones sin ser incorporados directamente al material celular. A veces un mismo nutriente puede desempeñar todas las funciones, lo que dependerá del tipo de microorganismo y de las condiciones ambientales (Gama, 2013).

La forma química bajo la cual los microorganismos adquieren el carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y oxígeno, así como su energía es muy variable, lo que determina los microorganismos presenten múltiples tipos nutricionales. Es así como dentro del medio de cultivo tienen que ir compuestos con dichos elementos que satisfagan los requerimientos nutricionales de los microorganismos (Gama, 2013).

Agentes inhibidores

Existen agentes inhibidores de la actividad bacteriana para los microorganismos sulfato reductores, tales como los mismos metales encontrados en el material a remediar o componentes del medio de cultivo. La inhibición de la actividad bacteriana dependerá de las concentraciones presentes de los ya mencionados y de la composición. Ejemplo de ello, es que el rango metabólico de una población de BSR es afectado en gran extensión en presencia de Zn y en mediana extensión en presencia de Cu (dependiendo las concentraciones). Esto repercute

consecuentemente, en que en la generación de sulfuro y en la precipitación de sulfuros metálicos puede ser más alta en la presencia de cobre que en presencia de Zinc (Vivek, 2003).

El inmovilizar a las bacterias en gránulos, haría más tolerantes (resistentes) a los microorganismos de las concentraciones de metales pesados, protegiendo la precipitación de sulfuros metálicos sobre la superficie de los mismos gránulos de bacterias sulfato reductoras (Zhang, 2016).

En cuanto a la parte de inhibición por agentes presentes en el medio de cultivo, se llegaría a pensar que con el fin de proporcionar los nutrientes necesarios se añadan porciones mayores de los componentes del medio, sin embargo, puede resultar contraproducente inhibiendo la actividad bacteriana. Tal es el caso del acetato de sodio presente en el medio de cultivo Postgate C, el cual puede llegar a ser inhibidor de actividad bacteriana en grandes concentraciones (Vivek, 2003).

Así mismo, en general, los ácidos orgánicos que son utilizados como donadores de electrones y fuentes de carbón para las BSR han mostrado que pueden inhibir la actividad de los microorganismos. Acetato, citrato y lactato son inhibidores en pH 3.8, mientras que son estimulantes de la actividad bacteriana en pH 6.2 (Jong, 2006).

Los cultivos de bacterias sulfato reductoras tienen su propio mecanismo de defensa, protegiéndose así de los efectos adversos de los metales pesados por la producción de sulfuro generado por su actividad metabólica (Vivek, 2003).

Metabolismo microbiano de las bacterias sulfato reductoras (BSR)

Los microorganismos en general juegan un papel de suma importancia en el ciclo global de varios elementos tales como azufre, nitrógeno, carbono, hierro, etc. En el caso de las BSR, se observa una reducción del estado de oxidación del azufre con la degradación de la materia orgánica, en donde el sulfato actúa como aceptor de electrones en las rutas metabólicas por este tipo de bacterias para transformar el azufre en sulfuro o H_2S . En dicho proceso se genera como subproducto CO_2 .

El mecanismo de las bacterias sulfato reductoras para producir H_2S y CO_2 , es mediante una respiración anaerobia. Dicho proceso es el utilizado para el tratamiento de fuentes contaminadas como drenaje ácido de mina, terreros lixiviados o hasta aguas residuales (Valenzuela, 2010). En la respiración anaerobia se llevan a cabo 3 principales competencias en las cuales actúan las bacterias sulfato reductoras. La primera es la competencia versus las bacterias acidogénicas por los productos que se generan en la hidrólisis. En segunda instancia, se encuentra la competencia contra las acetogénicas por los sustratos intermedios como los ácidos grasos volátiles (AGV) y por los alcoholes. Por último se encuentra la competencia de las BSR versus las metanogénicas por sustratos menos complejos como son hidrógeno y acetato.

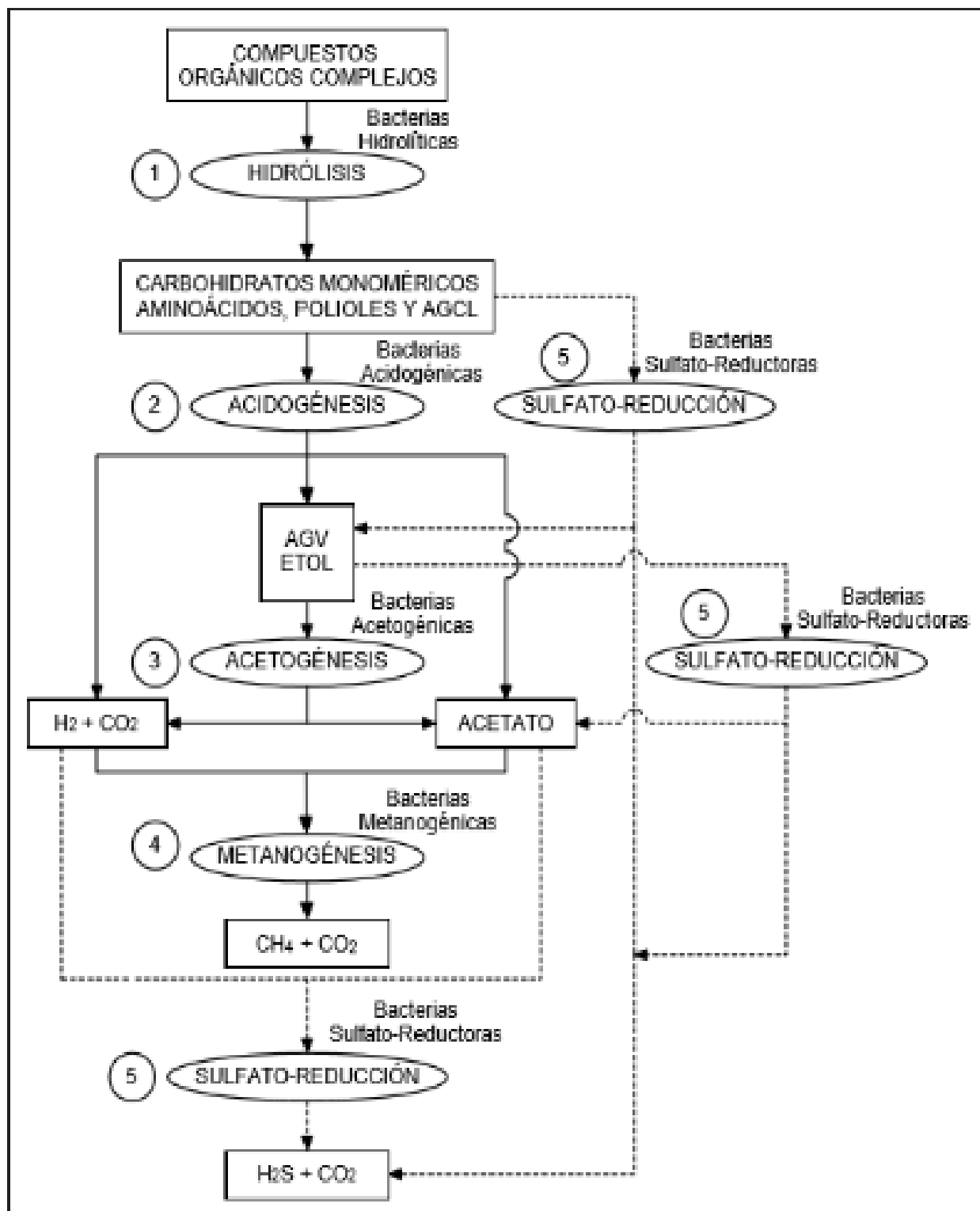
En el proceso de la bioremediación a través de sulfato reducción ésta última competencia (versus las bacterias metanogénicas) es de vital importancia, puesto que determina el rendimiento de los productos finales de la mineralización, ya sea sulfuros por parte de las bacterias sulfato reductoras o bien metano, si las bacterias metanogénicas vencen en la competencia por hidrógeno y acetato. (Lens et al., 2000)

Dicha competencia estará bajo la influencia de varios factores que más adelante se describirán en este texto de los cuales algunos por mencionar son: pH, temperatura, demanda química de oxígeno (DQO), sustrato a emplearse, duración de monitoreo, inóculo o la inhibición ocasionada por sulfuros si es que se tiene presente en la muestra.

El proceso de digestión anaerobia es un proceso complejo llevado a cabo por las diferentes poblaciones microbianas interactuando en *sintrofia*⁸, como se muestra en la ilustración 12. Consta de 5 procesos generales como lo son hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis, metanogénesis y la sulfato reducción.

⁸ *Sintrofia* se refiere a una forma de metabolismo microbiano en el que interactúan los microorganismos colaborando para realizar una reacción química, que de otra forma, sería desfavorable energéticamente.

Ilustración 12. Degradación anaerobia en presencia de sulfato
(Calderon, 2008)



El proceso inicial parte de compuestos complejos orgánicos que al interactuar con las bacterias hidrolíticas se desintegran. En esta etapa los carbohidratos, proteínas y lípidos son hidrolizados a azúcares monoméricos, aminoácidos, polioles y ácidos grasos de cadena larga (AGCL).

Dichos carbohidratos monoméricos, aminoácidos, polioles y AGCL pueden tomar dos caminos dentro del proceso de digestión anaerobia, entrando en un sulfato reducción directa o pasando al segundo proceso dentro de la respiración que es conocido como acidogénesis. En la acidogénesis se lleva a cabo la fermentación de compuestos solubles como los productos generados por la hidrólisis (azúcares, aminoácidos y polioles), dando por resultado a ácidos grasos volátiles (AGV), hidrógeno, dióxido de carbono y pequeñas cantidades de etanol y ácido láctico.

El producto de la reacción de acidogénesis puede formar parte del proceso de sulfato reducción o seguir el camino dentro de la respiración anaerobia, llegando a si a formar parte de la acetogénesis. La acetogénesis consiste en la conversión de los ácidos grasos volátiles a acetato e hidrógeno, los cuales de igual manera pueden intervenir en la sulfato reducción o dar paso a la metanogénesis.

La metanogénesis, representa, la formación de metano por la descarboxilación de acetato, gracias a los microorganismos conocidos como bacterias metanogénicas acetotróficas. Mientras que las bacterias, metanogénicas hidrógeno tróficas se encargan de formar metano a partir de la hidrogenación de dióxido de carbono.

El quinto proceso dentro de la respiración anaerobia es la sulfato reducción. Dicho proceso se lleva a cabo en presencia de sulfato. En esta etapa ocurren las reacciones de oxidación de ácidos grasos volátiles con más de dos átomos de carbono, así como la oxidación de acetato por bacterias sulfato reductoras acetotróficas y de hidrógeno por bacterias sulfato reductoras hidrógenotróficas. Como producto de la sulfato reducción se obtiene H_2S y CO_2 . De tal manera que todas las etapas dentro de la respiración anaerobia de las bacterias interactúan en la reducción del azufre para la formación de sulfuros.

Para que el desempeño celular de este tipo de microorganismos ocurra de manera eficiente, es necesaria tener una fuente de carbono. Debido a lo anterior, se han realizado diversas investigaciones en busca de la mejor fuente de carbono, monitoreando el crecimiento y reproducción de las bacterias sin dejar de lado el costo que tendría adquirir dicha fuente. En la Tabla 4 se muestran compuestos utilizados como fuente de carbono.

Tabla 4. Compuestos utilizados como fuente de carbono para bacterias
(Pacheco, 2008)

Tipo de compuesto	Compuesto utilizado (ejemplos)
Inorgánicos	Hidrógeno (H ₂), monóxido de carbono (CO)
Hidrocarburos	Alcanos
Ácidos monocarboxílicos (alifáticos)	Formato, acetato, propionato, butirato, ácidos grasos de cadena larga, 2-metilbutirato, 3-metilbutirato, piruvato, lactato.
Ácidos dicarboxílicos	Fumarato, malato, oxalato
Alcoholes	Metanol, etanol, n-propanol, n-butanol, n-pentanol, isobutanol, isopropanol, 2-butanol.
Aminoácidos	Glicina, alanina, serina, cisteína, tirosina.
Azúcares	Fructosa, glucosa, maltosa, lactosa.
Compuestos aromáticos	Benzoato, fenol,

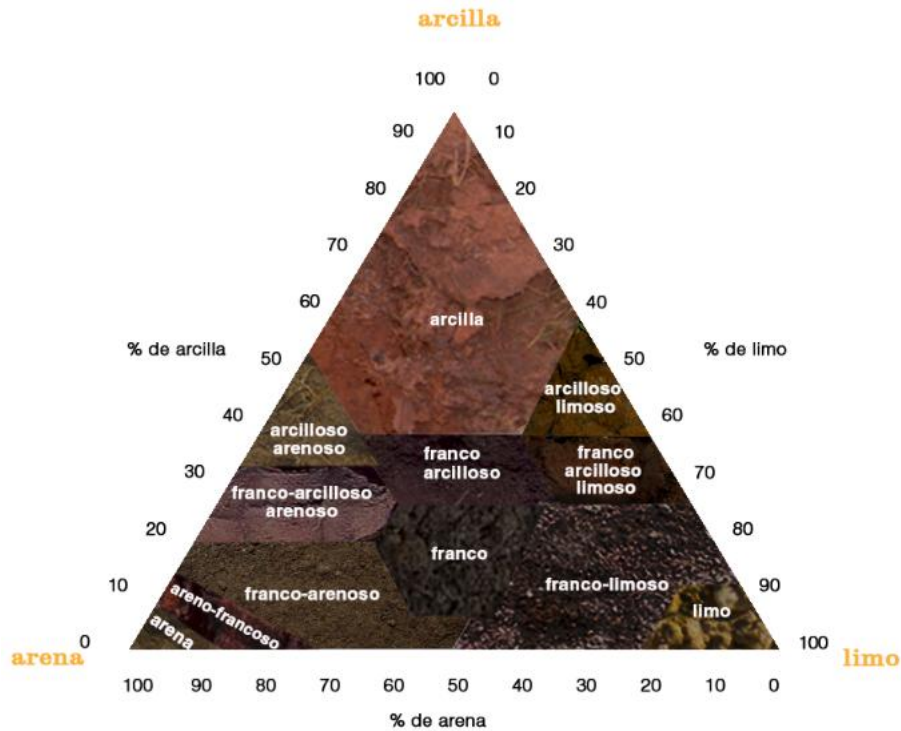
Suelos y su contaminación por sustancias ácidas

El suelo está formado por 4 componentes principales (Garzón, 2015):

- Materia mineral
- Agua
- Aire
- Materia orgánica

Se sabe existe una gran variedad de suelos los cuales se pueden distinguir de acuerdo a su composición física del contenido de arcillas, arenas o limos como se muestra en la ilustración 13. Estas diferencias se pueden apreciar de mejor manera en el diagrama ternario en donde se puede apreciar las diferencias porcentuales de las arcillas, arenas y limo, y determinar la textura del suelo que se esté evaluando.

Ilustración 13. Texturas de un suelo



El suelo antes de ser intervenido por la alteración del hombre se encuentra en un equilibrio con sus componentes (materia orgánica, materia mineral, agua y aire). Al introducir un agente externo al terreno se verá alterado dicho equilibrio, lo cual presentará diversas consecuencias como alteración del pH, muerte de especies, alteración en la salinidad, etc. En este sentido la afectación tiene una relación directa con la cantidad y especie contaminante.

Lixiviación

En general, se denomina lixiviación, al lavado de una sustancia pulverizada para extraer las partes solubles (Díaz R. , 2018). El proceso genera el desplazamiento de sustancias solubles o dispérsables. Existen así dos tipos de lixiviación: lixiviación natural y lixiviación química. La lixiviación natural se da en climas húmedos, es decir, donde el material a lixiviar se encuentre en contacto con agua de manera natural y de ahí su nombre. Mientras que la lixiviación química parte de extraer uno o varios solutos de un sólido mediante la utilización de un disolvente líquido (reactivo), normalmente ácido.

En minería podemos tener tres casos de lixiviación, dos naturales y una química. En el caso de la lixiviación natural en minería las dos partes que se mencionan son: la lixiviación natural en un suelo (por lluvia o contacto con agua, además de factores como tiempo y temperatura) y la lixiviación en presa de jales (por lluvia o

contacto con agua del mismo proceso y de igual manera aunado a el factor tiempo y el factor temperatura). Mientras que la lixiviación química en minería se refiere a la metalurgia extractiva de metales para su beneficio. A continuación se describen dichos tipos de lixiviación:

Lixiviación natural

Al contar con diferentes zonas en la mina, existen lugares dentro de la misma que no tienen un uso específico y que están expuestas a condiciones de intemperismo. Es así, que al entrar en contacto con agua, ya sea por lluvia o riego, el liquido arrastrará consigo las partes solubles de el suelo o bien las partes dispersarles generando una lixiviación natural. Este tipo de lixiviación es una lixiviación moderada, es decir no se tiene un ataque considerable sobre el material a diferencia de con sustancias químicas.

Lixiviación natural a un jal

La lixiviación de un jal dependerá de la naturaleza de las especies mineralógicas que lo componen, así como al intemperismo que puedan sufrir en presencia de agua y aire. Conforme al manejo que se le dé a dicho jal y a la mineralogía que lo conforma, podría causar problemáticas ambientales, en donde el caso más común y que se busca contrarrestar, es el drenaje ácido de mina (DAM).

Lixiviación química en un terrero

La lixiviación química de un terrero es un proceso utilizado para extraer un metal contenido en la roca usando un medio líquido. Normalmente la lixiviación se utiliza para minerales de cobre u oro según sea el caso. En donde es necesaria una preparación del mineral (trituración), para un mejor contacto entre el reactivo químico y el mineral, solubilizando los metales para su posterior captación en el fondo del terrero.

Las actividades industriales y la oxidación natural de los sulfuros metálicos producen aguas ricas en iones sulfatos con bajo pH y alto contenido de metales, generalmente denominados en la industria minera como DAM. Esto es de gran preocupación ambiental ya que los metales pesados pueden ser altamente tóxicos si no se manejan adecuadamente (Sánchez L. R., 2013).

Las operaciones mineras exponen minerales de sulfuro a la acción combinada con agua y oxígeno, que facilitan el desarrollo de drenaje ácido de mina, uno de los principales problemas ambientales generado por la minería.

En la NOM-159-SEMARNAT-2011 también se determina que un residuo minero producto de la lixiviación puede ser peligroso por dos puntos:

- Movilidad de constituyentes tóxicos
- Potencial para generar ácido

Los cuales van de la mano ya que si un terreno es ácido y entra en contacto con agua propicia la movilidad de los constituyentes solubles los cuales pueden contener metales y constituirse como lixiviados tóxicos. Por su parte, la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) pide entre sus criterios de cierre se remedie el lugar afectado, en donde dicha remediación en el caso de la lixiviación consiste en contrarrestar el pH ácido que se tiene, para que los metales pesados no puedan precipitar, dejando como resultado un suelo neutro-básico en donde la NOM-159-SEMARNAT-2011 tan solo establece que para alcanzar una estabilidad química, los efluentes de la pila debe tener un nivel de pH entre 5 y 10. En cuyo caso, para evitar problemáticas, y aunque no es un criterio de remediación indicado en la norma se puede basar en la NOM-021-SEMARNAT-2000 donde se establecen las especificaciones de salinidad, fertilidad y clasificación de suelos (tabla 5), siendo así más específicos.

Tabla 5. Clasificación de un suelo en función de su pH

Clasificación	pH
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 -6.5
Neutro	6.6 – 7.3
Medianamente alcalino	7.4 – 8.5
Fuertemente alcalino	8.5

Dentro de los tratamientos para contrarrestar dichos valores de pH, la opción de utilización de bacterias sulfato reductoras es atractiva, al ser la opción de remediación más barata hasta hoy en día y con posibilidad de recuperación de valores lo cual haría redituable el llevarlo a cabo.

Material lixiviado y Drenaje Ácido de Mina

Impacto del material lixiviado al suelo

En minería se denomina material lixiviado a la roca con material de interés (sulfuros metálicos) que ha sido atacada con algún ácido para extraer dicho metal de la roca. En la actualidad un ejemplo es la lixiviación que se utiliza principalmente para menas de cobre que contienen bajos contenidos de metales. Este caso lo usaremos para demostrar el efecto de la lixiviación en los terreros.

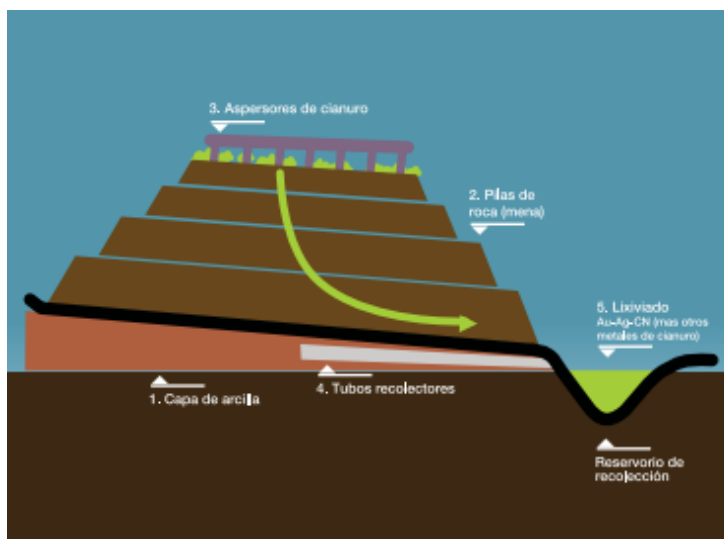
El método es implementado en la industria del cobre cuando la mena proviene de óxidos y contiene bajos contenidos de Cu. Lo más utilizado para la lixiviación de cobre es una solución de ácido sulfúrico (Biswas, 1993) puesto que tiene como principales ventajas su bajo costo, su acción rápida sobre los minerales de cobre que contiene oxígeno y el hecho de que es regenerado cuando son lixiviados minerales de sulfato o sulfuro.

Existen diferentes métodos de lixiviación que dependerán principalmente de con cuanto se cuente para los costos de capital, costos de operación y ley del mineral. Teniendo como métodos de lixiviación los siguientes:

- Lixiviación in situ
- Lixiviación en terreros y pilas
- Lixiviación en tanque
- Lixiviación por agitación

Los métodos más utilizados son lixiviación in situ y lixiviación en terreros y pilas ya que son los que presentan bajos costos al tratar materiales de baja ley. Sin embargo, la lixiviación en tanque y por agitación son métodos con alto nivel de producción por lo que generalmente se emplea a menas de alta ley.

Ilustración 15. Sistema de lixiviación en terreros

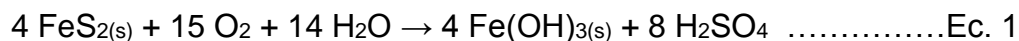


Al reaccionar el ácido con los minerales básicos presentes en el terrero, propicia un decremento en el pH del material, dicho material contiene diferente mineralogía en la cual se puede encontrar pirita como mineral asociado, que al oxidarse en contacto con el agua y aire puede producir drenaje ácido de mina que estimula la disminución del pH. Dejando así, un terreno con condiciones ácidas que facilitan la depositación de contaminantes (metales pesados), por lo que es necesario una neutralización.

Un ejemplo de lo que se comentó en el párrafo anterior es el proceso de lixiviación de cobre que esta descrito en la NOM-159-SEMARNAT-2011, en donde nos indica que la lixiviación de cobre puede generar un residuo peligroso por dos factores: movilidad de constituyentes tóxicos y por su potencial generador de acidez. Debido al método (aplicando ácido), el terreno ya cuenta con un valor de acidez y esto a su vez, propicia la movilidad de constituyentes tóxicos, por lo cual se dice que la lixiviación de cobre con ácido sulfúrico puede generar residuos peligrosos y se debe de evitar.

Drenaje Ácido de Mina

El drenaje ácido de mina son escurrimientos de soluciones ácidas sulfatadas, con un contenido significativo de metales disueltos, resultado de la oxidación química y biológica de minerales sulfurados y la lixiviación de metales pesados asociados (Sánchez N. A., 2016). La oxidación de material de pirita durante y después del minado produce ácido sulfúrico y iones metálicos, que reaccionan con la roca encajonante, la superficie y agua subterránea generando agua con pH en rangos de 2 a 8 y elevadas concentraciones de iones como se muestra en la ecuación uno (Ec. 1). Dichas aguas son denominadas drenaje ácido de mina (DAM) (Skousen, 2016)



Las principales características del drenaje ácido de mina son pH bajo (entre 1.5 y 5), alta concentración de metales pesados disueltos (tales como As, Fe, Zn, Pb, Cd, Cu, Al) y su alta conductividad producida por la oxidación, mediante exposición al oxígeno, al agua y a la acción de algunas bacterias, de minerales ricos en sulfuros liberando sulfatos (Sánchez N. A., 2016).

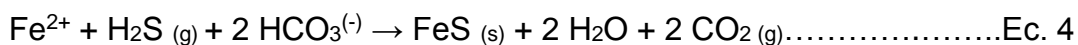
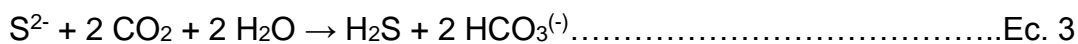
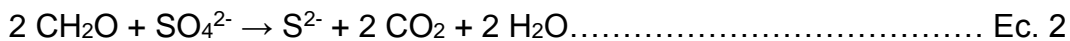
Los drenajes ácidos de mina (DAM) se generan a través de una combinación de procesos químicos y biológicos por medio de los cuales, los sulfuros metálicos provenientes de las actividades mineras, tales como la pirita o marcasita (FeS_2), la arsenopirita (FeAsS), la calcopirita (CuFeS_2) y la esfalerita (ZnS) son oxidados y generan lixiviados con altas concentraciones de metales pesados disueltos, ciertos elementos tóxicos, iones sulfatos y acidez (Virginia, 2010).

En general para lograr contrarrestar los efectos causados por la lixiviación es necesario buscar incrementar el pH con materiales accesibles y de bajo costo que a la par permita la incorporación de sales para la recuperación de los suelos e inclusive la reincorporación de organismos vivos como plantas, para conocer los criterios mínimos necesarios se puede tomar como referencia la NOM-021-SEMARNAT-2011, que establece las especificaciones de salinidad, fertilidad y clasificación de suelos.

En minería el método más utilizado para contrarrestar el pH generado en el terrero lixiviado es agregando un material básico (generalmente caliza), que puede estar presente dentro de la misma mina, dependiendo de la mineralogía que presente. Aunque este método es de los más utilizados, produce cantidades voluminosas de hidróxidos que todavía contienen metales (Andrea, 2013).

Un caso estudiado es la implementación de filitas en lugar de carbonatos, teniendo el mismo efecto de neutralizar el pH ácido con el que cuenta la solución y a su vez ayudando a la remoción de metales como Fe y Al. (Jallath, 2018).

En la actualidad se han desarrollado nuevos métodos, demostrando la efectividad por ejemplo, de la sulfato reducción para remediar DAM, reduciendo sulfatos contenidos en la solución a sulfuros (Ec. 2 y 3), dichos sulfuros producidos precipitan con metales disueltos (Ec. 4), además las bacterias producen bicarbonato (Ec. 2) el cual incrementa el pH de la solución de drenaje ácido (Elliott, 1998).



En donde CH₂O representa un carbohidrato.

Afectación de la desmineralización de suelos o terreros.

La desmineralización de un suelo es el proceso de pérdida de una cantidad anormal de sales minerales que contiene el suelo de manera natural o antropogénica. La mineralización de un suelo y su equilibrio se mantienen gracias a la interacción de microorganismos presentes en el mismo, pues están conformados de tejidos duros los cuales tienen una composición de calcio insoluble, sales o carbonatos, silicatos y iones fosfatos. Por lo tanto la desmineralización de un terreno se da principalmente por la pérdida de la fase

mineral de los tejidos duros de los organismos presentes y sus medios para subsistir (Spanish Oxford Living Dictionaries, 2018).

El principal factor en contra de un suelo causado por la desmineralización, es la acidez, por lo tanto conviene procurar mantener el valor de pH inicial. El encontrar carbonatos presentes en el lugar, ayudará a mantener dicho valor de pH en el terreno. Los minerales de carbonato de calcio que pueden encontrarse en la naturaleza para ayudar a mantener sano el terreno son 3 diferentes polimorfismos en el orden de la disminución de la solubilidad; vaterita, aragonita y calcita. Esto permite indicar las diferencias de interacción y resistencia para la actividad de los organismos como función del polimorfismo de los carbonatos (Ehrlich, 2008).

De tal manera que la desmineralización se puede presentar de manera natural y de manera antropogénica en donde el fenómeno de desmineralización biológica, incluyendo la descalcificación biológica son extensamente variadas en la naturaleza. Un ejemplo de ello es, el pastoreo en la superficie por los animales y el crecimiento de los microbios *chasmolitic* y *criptoendolítico*, que pueden resultar en una erosión significativa ya sea física o química de los minerales (Ehrlich, 2008).

Además líquenes y hongos en suelos producen ácidos orgánicos tales como láctico, succínico, oxálico, cítrico, acético y α -ceto ácido, estos ácidos disueltos u otros exudados orgánicos que pueden afectar el pH en soluciones a la intemperie y de este modo promover o inhibir *agua fuerte*⁹. Otro ejemplo de desmineralización biológica es el de los tejidos duros de mamíferos. (Ehrlich, 2008).

Mientras que la desmineralización por causas antropogénicas se debe a la acidificación del terreno ya sea por la introducción de reactivos con características ácidas como los aditivos en la agricultura o en el caso de la minería por el proceso de lixiviación, en donde se vierte un ácido sobre el material para captar los valores minerales y dejando el suelo ácido.

La alternativa más utilizada para contrarrestar la desmineralización por causas antropogénicas es mediante materiales básicos en la precipitación suministrada al suelo por otros medios, reduciendo la acidificación del suelo por precipitación ácida (Wiklander, 1975).

La consecuencia de la precipitación ácida (causa antropogénica de desmineralización), se traduce en la pérdida de los suelos, es decir, quedan inservibles. La textura del suelo y el contenido de calcita son factores muy importantes, ya que el material fino y la calcita aumentan la amortiguación (Wiklander, 1975).

⁹ Se denomina agua fuerte a la disolución de un ácido en una pequeña cantidad de agua que propicia la desmineralización.

Biorremediación

La biorremediación puede ser definida como el uso de microorganismos, tales como las bacterias, que mediante sus funciones metabólicas tengan la capacidad de remediar un terreno, ya sea por *humificación*¹⁰ de materia orgánica, residuos, (agentes contaminantes) o por la estabilización de los metales presentes en el suelo. La biorremediación es un fenómeno común en la naturaleza ya que el ambiente siempre tiende al equilibrio mediante sinergia entre sus componentes.

El tratamiento biológico se basa en mejorar la actividad de ciertos grupos microbianos que generan alcalinidad (Tang, 2008), de tal forma que al producir dicha alcalinidad los metales pesados presentes precipiten en sulfuros evitando la contaminación de los suelos o cuerpos de agua. Es necesario contar con oxígeno, donadores de electrones y fuentes de carbono para poder llevar a cabo dicho proceso y mejorar la actividad de los grupos microbianos de los cuales se apoye para remediar un terreno. En el caso de la problemática del drenaje ácido de mina, se busca el aumento de las bajas concentraciones de carbono (nutriente de las BSR); para mejorar los procesos metabólicos de las bacterias y con ello poder contrarrestar la acidez generada.

El comportamiento de los organismos utilizados para remediar requiere de condiciones específicas para realizar sus procesos metabólicos y su reproducción, que son temperatura, pH, nutrientes, etc. Además las bacterias, así como otros organismos han evolucionado, al desarrollar sus capacidades de adaptación a nuevas condiciones de vida. Sin embargo, llega a ser complicado determinar todos los factores que imperan para la reproducción de los microorganismos y saber cuál de ellos beneficia o perjudica al proceso es aún más complejo.

La biorremediación entra dentro de la tecnología de sistemas pasivos para el tratamiento generalmente de DAM. Los tratamientos pasivos se basan en procesos naturales de neutralización de ácido, oxidación y reducción y precipitación de metales, a su vez pueden ser separados en biológicos y geoquímicos, en donde los biológicos principalmente confían en la actividad bacteriana con ayuda de material orgánico para estimular la sulfato reducción y absorber los contaminantes. Mientras que en el caso de los tratamientos pasivos geoquímicos se encuentran los casos de humedales o biorreactores, los cuales dan lugar a la generación de alcalinidad tal como pasa con la caliza en contacto con el DAM. (Skousen, 2016)

¹⁰ La palabra humificación forma parte del argot de la edafología (ciencia que estudia los suelos). Compuesta del latín "*humus*" (tierra), "*facere*" (hacer) y el sufijo "*ción*" (acción y efecto). Se refiere al proceso de formación de materia orgánica en el suelo.

La mayoría de los tratamientos pasivos emplean múltiples métodos, a menudo en serie, para lograr su cometido de neutralizar ácidos, reducir especies u oxidarlas y precipitar metales. Antes de seleccionar alguna tecnología como tratamiento apropiado se debe caracterizar las condiciones y química del material a remediar, que fungen como parámetros críticos tal como lo es acidez o alcalinidad, metales contenidos, concentraciones de oxígeno disuelto. Mientras el diseño del sistema de tratamiento sea apropiado y mantenido, puede proveer eficiencia y efectividad a largo plazo. Sin embargo si requiere de inspección periódica y un mantenimiento eventual de re incubación. (Skousen, 2016)

En la actualidad, la tendencia es la remediación de terrenos o de aguas residuales por medio de bacterias, en cuanto a las alternativas “BIO”, se puede emplear de utilizar hongos y/o plantas para remediar, sin embargo, no son tan eficientes debido a sus propias características como:

- Al remediar con plantas (fitorremediación), se obtienen buenos resultados de remediación, sin embargo, debido a que los contaminantes se incorporan a la planta, ésta, no es una solución total, dado que la fauna local puede llegar a consumir dicha flora que ha absorbido el contaminante y sufrir daños en su salud o incluso morir (Villar, 2017).
- Mientras que el uso de hongos para remediar un terreno puede descontrolarse debido a que tienen la característica de ser “oportunistas”, puesto que aprovechan las mínimas condiciones para reproducirse y eso puede ser contraproducente al alterar el equilibrio que el terreno tenía antes de ser afectado produciendo una mayor alteración de los suelos, por ejemplo con el incremento del pH desde valores ácidos o hasta valores alcalinos (Villar, 2017).

Es por ello que el uso de bacterias entre otros elementos para la remediación de un terreno o efluente ofrece mejores ventajas con respecto a los otros organismos (Díaz R. A., 2010); las ventajas antes indicadas son:

- Menor costo a comparación de las tecnologías convencionales.
- Los contaminantes son usualmente convertidos a productos inocuos
- Permite el uso continuo del sitio al regenerarlo y permitir que se integre rápidamente a los ecosistemas.
- Toma menos tiempo a comparación de la remediación con hongos o plantas.
- Relativamente fácil de implementar.
- Ofrece flexibilidad de los sistemas y aplicaciones.
- Puede ser integrado con otras tecnologías

- Elimina costos de transporte y la responsabilidad asociada.
- Aplicable en zonas inaccesibles por otros métodos de tratamiento.
- Rentable.
- Cuenta con la aceptación pública positiva.

La remediación mediante bacterias se puede realizar de dos formas:

- Agregando al terreno a remediar, los nutrientes necesarios para propiciar la reproducción de los microorganismos y su actividad.
- Agregando microorganismos con nutrientes que se han estado cultivando de manera independiente y esperando que los microorganismos se adapten a las nuevas condiciones

Hasta el momento se habla de que existen 3 generaciones o etapas en la biorremediación, en las cuales han ido avanzando conforme a la tecnología. El proceso comenzó por los años 70's al utilizar bacterias para limpiar contaminantes de origen humano (heces en aguas residuales), pasando a la segunda etapa en los años 80's-90's en los que se comenzó a modificar las bacterias genéticamente para hacerlas más resistentes y mejorar su capacidad de degradación. En la tercera etapa, en donde se busca utilizar nuevos microorganismos también modificados genéticamente para generar biorremediaciones más eficientes aplicado aguas residuales, terrenos contaminados o incluso gases de efecto invernadero (Gallego, 2002), los campos de acción en donde se aplicarían estas nuevas bacterias son:

- Biorremediación de hidrocarburos
 - Utilización de bacterias capaces de utilizar los hidrocarburos para su degradación debido a que las bacterias se alimentarían de los contaminantes del medio en que se encuentran generando productos inocuos (Degado, 2013).
- Bioprecipitación de metales pesados
 - El uso de este nuevo tipo de microorganismos permite que para metales que son muy solubles o que tienen una elevada movilidad las bacterias a través de sus procesos concentrar e inmovilizar a las sustancias tóxicas permitiendo minimizar la generación de desechos industriales y rehabilitar áreas afectadas por diversos contaminantes (Vicente, 2006).

- Biorremediación de compuestos xenobióticos¹¹
 - Al aumentar con el tiempo la concentración de los compuestos xenobióticos, se llega a la alternativa de utilizar microorganismos para la degradación de dichos compuestos. Las rutas metabólicas de estos microorganismos transforman los contaminantes por medio de sistemas específicos disminuyendo los efectos tóxicos y contaminantes en el ambiente (García, 2016).

- Biorremediación de productos mineros para disminuir la toxicidad
 - Con ayuda de la biotecnología se busca implementar la alternativa de contrarrestar la toxicidad de los productos mineros, ya sea por la introducción de la biolixiviación o el tratamiento del drenaje ácido de mina, la acidez en terreros lixiviados o los desechos generados en el proceso de beneficio (Virginia, 2010)

La normatividad en torno a la contaminación ha ido aumentando cada vez más, puesto que las consecuencias de esta actividad se han ido reflejando en nuestro día a día, es por ello que se busca nuevas técnicas para la remediación de dicha contaminación y la tendencia gira en torno a las técnicas biotecnológicas que han generado buenos resultados y su campo de aplicación es vasto (Coto, 2013).

Ejemplos de Biorremediación exitosa con bacterias en procesos mineros

Existen un sin número de investigaciones con buenos resultados aplicando bacterias sulfato reductoras para remediar, contrarrestando el potencial de acidez presente en un terreno, de tal manera que no se permita precipitar a los metales pesados evitando la contaminación del terreno.

A continuación se presentan una serie de casos en los cuales se ha aplicado la biorremediación con bacterias de manera exitosa:

- **Evaluación del potencial de generación de sulfuro por la acción de las bacterias sulfato reductoras y sus posibles aplicaciones en el tratamiento de los drenajes ácidos de mina. – Virginia Andrade – 2010 – Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.**

¹¹ El termino xenobiótico se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el ser humano en el laboratorio.

Este escrito presenta a la minería como una de las actividades económicas más importantes, sin embargo, es de igual importancia el remediar lo afectado por la industria (DAM). Implementan la biotecnología como alternativa a la remediación del terreno afectado por la minería en su país (Ecuador), al presentar altos rendimientos y bajos costos de operación.

Se determinó que las bacterias sulfato reductoras desempeñan adecuadamente sus actividades metabólicas con pH mayores a 4 y hasta ligeramente básicos con concentraciones adecuadas de materia orgánica (nutrientes), siendo así que con dichas condiciones el sulfuro de hidrógeno producido, reaccione con los metales disueltos para formar sulfuros metálicos insolubles que precipitan.

Al comparar diferentes nutrientes (acetato, etanol, lactato y peptona) se sigue obteniendo la producción de sulfuro que se requiere para remediar dando pauta a que cualquiera de las fuentes de carbono podría funcionar, sin embargo debido a que el acetato mostró un ligero incremento de actividad a comparación de los demás y a que los costos de operación son menores, se eligió como la mejor opción de nutriente.

Cabe mencionar que es importante determinar que tipo de BSR se están utilizando pues de ello depende su actividad al interactuar con diversos sustratos. En este trabajo las BSR empleadas corresponden a un cultivo mixto de bacterias sulfato reductoras aislados de los sedimentos de una laguna artificial.

La producción final de sulfuro para este trabajo fue de 455.3312 mg/s²L usando al acetato como sustrato, siendo este el mejor resultado de biorremediación Dejando claro que la actividad de las bacterias sulfato reductoras son capaces de mejorar los medios afectados por la minería (tierra y agua).

- **Aislamiento y cultivo de bacterias sulfato reductoras acidófilas para la producción de sulfuro biogénico para la precipitación de metales pesados - Álvaro Víctor Gutiérrez Rojas – 2007 - Universidad mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.**

El proyecto desarrolla la experimentación con bacterias sulfato reductoras oxidando la materia orgánica para la producción de sulfuro de hidrógeno y bicarbonato de sodio. Dicha Biorremediación consiste en la precipitación

insoluble del sulfuro con los metales pesados y la alcalinización del medio por el bicarbonato.

Utilizaron lodos de la zona altiplánica de Bolivia en columnas Winogradsky comparando dos cepas de bacterias que eran potencialmente útiles para remediar en condiciones ácidas lo cual permitiría tratar de manera directa el drenaje ácido de mina.

El hecho de determinar la producción de sulfuro de hidrógeno representaría que las bacterias sulfato reductoras están trabajando adecuadamente para el fin que es biorremediar; es por ello que en esta investigación se determinó por dos vías (con acetato de plomo y por turbidimetría).

Los resultados fueron que la producción de ácido sulfhídrico para este trabajo, fueron las esperadas, variando en ella los medios de cultivo y arrojando los mejores resultados en la utilización de etanol como fuente de carbono. Se pretende obtener concentraciones más adecuadas y optimizar el crecimiento bacteriano, estableciendo biorreactores en un solo paso que permita la precipitación eficiente de metales pesados, alcalinizar el pH del efluente y disminuir la concentración de sulfatos con la generación de los sulfuros.

- **Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage – Irene Sánchez Andrea – 2013 – Departamento de biología molecular, Universidad Autónoma de Madrid, España.**

La preocupación por los desechos que se generan en la industria minera está aumentando considerablemente y es por ello que en esta investigación plantean el tratamiento de drenaje ácido de mina con bacterias sulfato reductoras para poder recuperar metales de los drenajes. En este trabajo se menciona que el mismo proceso de sulfato reducción produce alcalinidad neutralizando el DAM simultáneamente.

El proyecto muestra especial cuidado en factores vitales para la implementación de la biotecnología de las BSR, adecuando el valor del pH del proceso, los sustratos empleados y hasta el diseño de los reactores, con el fin de implementar adecuadamente el proceso y obtener los mejores resultados.

Hay especial énfasis en que cuando hay riesgo de generación de DAM, la primera opción sería evitar la formación de los sulfatos, teniendo como premisa que *“es mejor prevenir que curar”*. La formación de DAM

incrementa en presencia de microorganismos acidófilos, lo cual se puede evitar si no entra en el proceso el agua o el oxígeno lo cual en la industria es complicado de cumplir.

Propuesta a desarrollar

Como parte de las actividades de formación de un ingeniero en minas y metalurgia se deben de realizar estancias profesionales, para poder ampliar los conocimientos adquiridos en el ámbito de la ingeniería (desarrollo teórico-práctico). Al llevar a cabo una estancia profesional en el norte del país, se desarrollaron actividades en un proyecto de biorremediación, en el cual se pretendía reducir sulfatos a sulfuros en terreros lixiviados empleando bacterias nativas de la zona.

Como parte de este proyecto de tesis y tomando como punto de partida una estancia de investigación en una mina ubicada en el norte del país. Se realizaron pruebas y se siguieron procedimientos para la obtención de extractos biológicos de zonas aledañas al sitio afectado. Los microorganismos aislados se aplicaron en muestras de suelo lixiviado con ácido sulfúrico; mostrando que las bacterias presentes en el inóculo lograban reducir los sulfatos a sulfuros e incrementando el pH. Es entonces que el presente trabajo pretende plantear un procedimiento general para el tratamiento de terreros lixiviados para su estabilidad química, y de ser posible que mediante la interacción con materia orgánica (suelo), se lleve a cabo la biorremediación del lugar por transformación química empleando bacterias sulfato reductoras.

El problema a resolver tiene como escenario un terrero que mediante microorganismos llegue a su estabilización química en donde las condiciones son las menos adecuadas para el desarrollo o actividad de las bacterias sulfato reductoras, debido a que el material lixiviado presenta baja concentración de minerales. La premisa con la que se cuenta es que las bacterias logren estabilizar los terreros que se encuentran bajo condiciones ácidas y desmineralizados debido a la lixiviación, siendo éstas, las condiciones extremas de afectación, por lo que en casos de lixiviación natural o lixiviación de jales, podrían ser de igual manera remediados por las bacterias sulfato reductoras.

El procedimiento propuesto se compone de los siguientes puntos:

- Aislamiento de bacterias
- Material lixiviado
- Planteamiento de neutralización
- Funcionalidad

El seguimiento de los puntos anteriores permitirá que se identifiquen las bacterias, al conocer cuáles son las condiciones propicias para la producción y reproducción de los microorganismos, donde los nutrientes que se agreguen serán fundamentales para cumplir con una producción industrial de los microorganismos para ser utilizados sobre los terrenos a recuperar.

Extracción de bacterias

Tal y como se indica en el marco teórico en la naturaleza existen diferentes bacterias que pueden ser empleadas en procesos que clásicamente han sido llevados por procesos mecánicos y/o químicos. En términos generales para el caso de las bacterias sulfato reductoras, estas se encuentran en la gran mayoría de los suelos y más aun en suelos asociados con minerales. Para aislar este tipo de bacterias se debe de tomar muestras de suelo cercanas a la mina de preferencia húmedas, con un pH ligeramente más alto a la neutralidad, que las muestras de suelo presenten minerales con un alto contenido de sulfuros y el contenido de minerales básicos sea bajo mientras que los suelos estén intemperizados. Todo esto para potenciar la posibilidad de encontrar a las bacterias sulfato reductoras en las muestras seleccionadas.

Aislamiento y producción de bacterias sulfato reductoras

Para el aislamiento de las bacterias se pueden trabajar con las muestras por separado o se puede trabajar con una muestra compuesta. El primer paso a desarrollar para el aislamiento es homogeneizar la muestra, y para ello se pasa por una malla -10 retirando ramas o rocas presentes en la muestra de suelo. Es importante indicar que para asegurar el crecimiento bacteriano se debe de contar con un área aséptica en un espacio cerrado que no presente corrientes de aire para evitar la entrada de polvo y contar con líneas de electricidad y gas, en el caso de que no sea posible contar con ello, se puede suplir esto con lámparas de alcohol, además de contar con agua destilada. El material empleado debe de estar limpio y esterilizado por lo que es importante contar con una autoclave de vapor¹².

Partiendo de conocer los nutrientes necesarios para el desarrollo de las bacterias sulfato reductoras, es recomendable usar el medio Postgate C de cultivo específico, el cual propicia que las bacterias sulfato reductoras se reproduzcan principalmente, sobre los demás microorganismos presentes en el inóculo, de manera que el medio es “selectivo”.

Con el fin de asegurar la permanencia y conteo de las bacterias en el medio, se realiza mediante microscopio y una cámara Neubauer, un conteo diario de bacterias presentes, analizando el comportamiento de los microorganismos conforme al ciclo de vida reproductiva de las bacterias. Llegando al máximo de su etapa reproductiva (antes del estancamiento¹³) y por ello es importante monitorear el crecimiento de bacterias en el inóculo¹⁴, para ser insertado dentro de un medio

¹² Una autoclave es un instrumento utilizado para esterilizar mediante vapor, de paredes resistentes y con cierre hermético, en cuyo interior contiene un líquido, generalmente agua que se somete a presiones y temperaturas elevadas.

¹³ El estancamiento de una bacteria en su vida reproductiva se da por no tener las condiciones adecuadas (nutrientes, temperatura, pH, etc.), es decir, el crecimiento bacteriano es nulo.

¹⁴ Un inóculo es una porción de suspensión de microorganismos que se transfiere a un ser vivo o a un medio de cultivo (inoculación).

de cultivo nuevo, esto tiene como finalidad dar los nutrientes necesarios (C, N, S, P, O) que podrían haberse terminado en el primer medio para que las bacterias se puedan seguir reproduciendo y seguir siendo selectivos en los microorganismos que se quiere tener presente en el inóculo. De esa manera es como se aísla a las bacterias de los demás componentes del suelo, ya que los nutrimentos y condiciones de reacción no son aptas para el crecimiento de hongos o levaduras, ya que estas condiciones solo permiten producir las bacterias que serán usadas en el tratamiento de suelos lixiviados.

Para la preparación de un medio de cultivo apto solo para el crecimiento de bacterias sulfato reductoras es recomendable preparar el Postgate C lo más reciente posible para evitar degradaciones de los nutrimentos.

Tabla 6. Componentes de un medio de cultivo Postgate para BSR

<i>Sulfato de sodio</i>	<i>Na₂SO₄</i>
<i>Cloruro de calcio hexahidratado</i>	CaCl ₂ *6H ₂ O
<i>Sulfato de Magnesio heptahidratado</i>	MgSO ₄ *7H ₂ O
<i>Lactato de sodio</i>	C ₃ H ₅ NaO ₃
<i>Citrato de sodio</i>	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇
<i>Agua destilada</i>	H ₂ O
<i>Fuente de carbono</i>	Alcoholes o Azúcares
<i>Sulfato de fierro heptahidratado</i>	FeSO ₄ *7H ₂ O
<i>Fosfato dipotasico</i>	KH ₂ PO ₄

Es necesario recordar que dicho medio de cultivo se prepara bajo condiciones asépticas para no contaminar la muestra y después de verter todos los ingredientes se introduce en una autoclave para esterilizarlo dejando entreabierto el frasco para evitar accidentes provocados por presión en el recipiente.

Ilustración 16. Componentes de un medio de cultivo Postgate C



Ilustración 17. Preparación de medio de cultivo Postgate C



Producción industrial de bacterias

Las cantidades de material a remediar (terceros) en la industria minera son grandes, por lo cual será necesaria la producción a escala industrial de los microorganismos que ayudan a la biorremediación (BSR). Para desarrollar o producir bacterias sulfato reductoras a gran escala se debe tomar en cuenta como crucial el punto de vista económico, Para ello se debe encontrar los nutrientes adecuados para los microorganismos, teniendo en cuenta lo que la bacteria necesita se pueden implementar sustitutos de nutrientes, mientras cumplan con la misma funcionalidad y buscando sean más económicos que el principal.

A nivel mundial en la investigación del desarrollo de BSR el campo se dirige a encontrar un sustituto de fuente de carbono y de fuente de energía, en donde las principales coincidencias han sido que los alcoholes son los mejores para desempeñar dicho papel como fuente de energía y de carbono. La problemática es el costo que tendría desarrollar un medio de cultivo con alcohol como fuente de carbono y energía a diferencia de implementar desechos orgánicos, aserrín y/o papel como se ha implementado en las investigaciones internacionales sobre el tema de sulfato reducción con bacterias (Virginia, 2010).

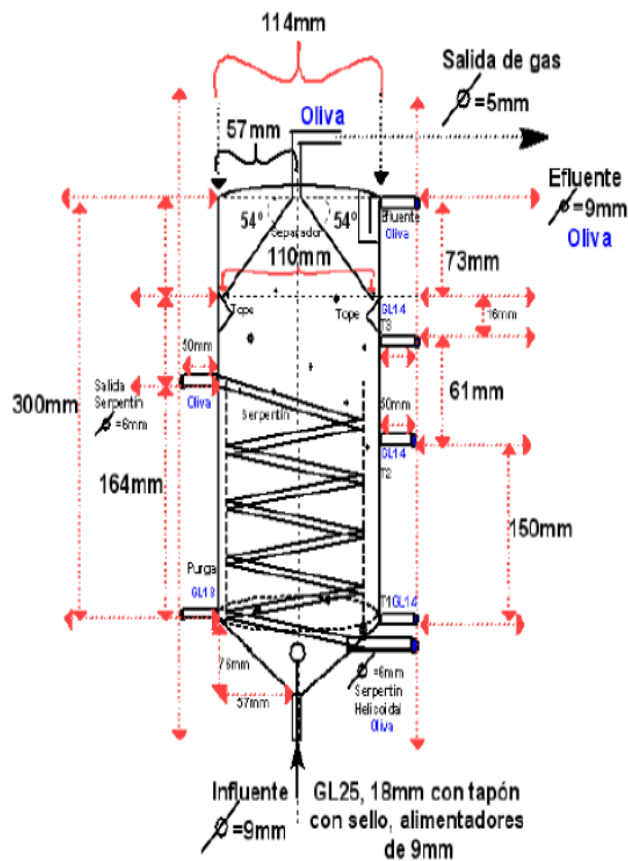
Para producir las bacterias a gran escala es necesaria la utilización de un biorreactor el cual cumpla con mantener las condiciones adecuadas para la bacteria controlando así, la temperatura, agitación (en caso de ser necesario), entrada de nutrientes y salida de materia. Se debe estar monitoreando constantemente para controlar la reproducción de los microorganismos.

En los años recientes, se han construido birreactores para el tratamiento de DAM, que utilizan a las BSR para reducir sulfatos a sulfuros. Los sulfuros generados pueden subsecuentemente precipitar como sulfuros metálicos y estos a su vez deben ser separados en laboratorio usando $H_2S_{(g)}$ y clarificadores.

En este caso se puede utilizar un reactor denominado RALLFA (reactor anaerobio de lechos de lodo de flujo ascendente), que es un reactor en el que se lleva a cabo un proceso anaerobio mediante un lecho de lodos biológicos y con una alimentación de agua residual en la parte inferior provocando un flujo ascendente. Es utilizado por ser un diseño muy simple y barato (Zamora, 2013). El uso de un biorreactor ayudaría en mantener condiciones sulfidogénicas para mantener exceso de sulfato sobre acetato asegurando la dominación de especies sulfato reductoras sobre especies metanogénicas (Vivek, 2003).

El agua a tratar en el caso de DAM, entra por la parte inferior y el flujo lleva a los sustratos hacia arriba, a través de la cama de lodos, compuesta por microorganismos que llevan a cabo las reacciones de interés (Zamora, 2013). Donde las propiedades hidráulicas del biorreactor son claramente importantes para el buen funcionamiento del tratamiento. (Tsukamoto, 2003)

Ilustración 18. Reactor de lecho de lodos de flujo ascendente, RALLFA, a escala de laboratorio (Zamora,2013)



Planteamiento de neutralización

Es necesario como humanidad el plantear remediar o disminuir los efectos que causamos en la naturaleza. En la industria minera por ejemplo dados los problemas de lixiviación que se muestran en este trabajo, se debe neutralizar el terrero afectado por los procesos que lleva el mineral. En donde dicha neutralización se plantea sea mediante bacterias sulfato reductoras, las cuales tienen la capacidad de cómo lo dice su nombre, reducir sulfatos, produciendo sulfuros y bicarbonato el cual puede incrementar el pH.

La SEMARNAT como autoridad, plantea a la industria minera que mediante un plan de cierre presente la forma de remediar el terreno afectado. En el caso de la lixiviación de manera general, requiere que el terrero no cuente con acidez para así evitar la promoción o movilidad de constituyentes tóxicos. Para ello en este documento se plantea la utilización de bacterias reductoras de sulfato para contrarrestar dicha acidez, sin embargo, como ya se menciona en la parte de marco teórico, al vértelas en las condiciones que presenta el terrero lixiviado generaría la muerte de muchas de las bacterias requiriendo una mayor cantidad de microorganismos para estabilizar el terrero.

Por lo tanto, lo ideal sería mejorar las condiciones en el terrero para que las bacterias puedan realizar su actividad de reducir sulfatos sin complicaciones y así llevar a cabo la estabilización química del terrero. En donde el factor principal a considerar dentro de un terrero lixiviado es el pH con el que se encuentra (pH=3), el cual tiene que ser llevado mínimo a 4 para el buen funcionamiento de las BSR y por ello, se puede utilizar reactivos, carbonatos o materia orgánica, de acuerdo a lo que se plantea.

En el caso de agregar un material para ayudar a las bacterias a cumplir su cometido, sería realizar lo que ya se ha implementado en la industria (emplear carbonatos o cal para elevar el pH) pero en menor escala ya que son de alto costo, reduciendo así los costos en el material utilizado, ya que el introducir reactivos al terrero con el fin de contrarrestar el pH sería una inversión mayor; Mientras que la utilización de carbonatos o cal, siendo la más utilizada por economía, podría presentar una menor inversión con los mismos resultados.

En este caso, se puede utilizar como propuesta inicial una mezcla en partes iguales de carbonatos y las bacterias sulfato reductoras para remediar el terreno lo que lo haría una opción aun más viable teniendo así una opción amigable con el ambiente. La primera propuesta involucraría agregar una cantidad equivalente en un intervalo del 5 al 10% del material a recuperar, con la expectativa de que el mismo proceso genere sus propios mecanismos para una regeneración total del terrero.

Otra opción para el planteamiento de neutralización de un terrero ya lixiviado, es la utilización de bacterias sulfato reductoras con ayuda de material orgánico, en el caso específico, con restos orgánicos. Dando así la posibilidad a las bacterias de encontrar en la basura orgánica fuente de carbono y fuente de energía, mientras que a su vez aumentaría el valor de pH. Sin embargo esta situación solo sería posible (viable) si el proceso de lixiviación se lleva a cabo por partes, sobreponiendo materia orgánica sobre el material lixiviado o bien revolviendo ambas partes (material lixiviado y materia orgánica). Esta opción sería más *a priori* pensando en el futuro para evitar el DAM, sin embargo en este momento no es tan viable debido a que implicaría una etapa dentro del proceso, lo que impactaría directamente en un incremento de los costos.

El material orgánico juega un papel crucial en los sistemas pasivos biológicos ya que proporcionan lugares de adsorción de metales, nutrientes y zonas de fijación para microorganismos que realizan funciones esenciales. El uso de una comunidad de microorganismos es necesario para degradar componentes recalcitrantes y producir componentes orgánicos simples para ser usados por las BSR (Skousen, 2016). Estas bacterias en conjunto con otros microorganismos (como las arqueas, entre otros) son componentes para el ciclo del carbono (Girguis, 2005).

Uso de Bacterias Sulfato Reductoras para obtener la neutralización de un terrero lixiviado

Partiendo de haber logrado un pH de cuatro y de tener el número mínimo de nutrientes para regar las bacterias, un punto importante que se propone en este documento es la utilización de una fuente de energía y fuente de carbono adecuada, para lo cual se analizaron documentos sobre el tema de BSR, teniendo como principales puntos que la bacteria necesita un compuesto fácil de asimilar para la obtención del carbono necesario en donde a su vez obtenga la energía para desarrollarse de manera adecuada. Los compuestos que cumplen con ambos elementos son precisamente alcoholes de bajo peso molecular tales metanol, etanol o propanol. No se plantea un alcohol de una cadena más larga puesto que ya no sería tan fácil de asimilar para las bacterias. Teniendo como mejor opción el uso de etanol ya que éste compuesto se asimila más rápido por la bacteria que el metanol, aunque ambos alcoholes son efectivos como fuentes de carbón (Tsukamoto, 2003).

Los nutrientes a utilizar varían según cada autor (Zapata, 2010), sin embargo, todos coinciden en la utilización de sales ricas en sodio, calcio, magnesio o hierro (cationes) mientras que los aniones son fosfatos o carbonatos, con ayuda de soportes de carbono de extractos de levadura o lactatos, o en algunos casos citrato de sodio. Esto permite la creación de biopelículas, que son importantes debido a que ayuda a la supervivencia y a un mejor crecimiento de las BSR,

puesto que se forma una capa protectora que segregan los microorganismos envolviendo átomos de carbono que utilizan como reserva de alimento.

Se debe utilizar el mayor número de bacterias vivas en un inóculo, con el fin de propiciar a su vez, una mayor actividad microbiana, para lo que es necesario el agregar más sales y nutrientes ya sea en el mismo inóculo o regando una porción equitativa a las bacterias ya presentes en el terrero.

Una ventaja de utilizar la tecnología de biorremediación con bacterias en un terrero lixiviado que ya ha cumplido su vida útil, es que ya se cuenta con la infraestructura necesaria para el riego de las bacterias en el terrero, puesto que se puede utilizar la misma tubería que se utilizó en el proceso de lixiviación, evitándose así un gasto.

La remediación del lugar dependerá de la mineralogía presente y la bacteria con la que se cuente, por lo que será necesario realizar pruebas de laboratorio con las cuales se cumpla la recuperación de los terreros. Sin embargo, se puede realizar pruebas de manera general añadiendo biomasa (medio de cultivo mas bacterias sulfato reductoras) en proporciones de 5%, 10% y 20% con respecto a la masa que se busca remediar y así verificar en que caso se da mejores resultados.

Por otra parte si la remediación del material no se logra en las pruebas de laboratorio, solo queda reforzar a las bacterias o reforzar las condiciones adecuadas para la estimulación de la actividad microbiana, incrementando así el pH del material o bien agregando nuevos nutrientes que se adapten de mejor manera al metabolismo microbiano.

Otra alternativa en caso de no cumplir con la remediación es agregar un mayor volumen de biomasa, incrementando así, la posibilidad de la interacción de las bacterias con los sulfatos presentes en el terrero, de tal manera que se propicie la actividad bacteriana a mayor escala.

Este proceso de biorremediación se puede hacer de manera simultánea con la explotación de mina, es decir, se puede hacer de manera progresiva en el cual el volumen total de biomasa a regar se puede dividir en el lapso de tiempo que se desee, regulando los flujos en la tubería. De tal manera que no es necesario esperar el cierre de mina para ir implementando esta alternativa.

Discusión de la propuesta de biorremediación

La biorremediación con bacterias sulfato reductoras de un terrero lixiviado, es una alternativa que se debe considerar emplear ya que aunque la normatividad tan solo pide la estabilización química, con las bacterias sulfato reductoras y material orgánico se podría conseguir una transformación química y darle así un nuevo uso a algo que ya estaba considerado como desecho además de las ventajas que presenta en comparación con otras tecnologías convencionales, tales como:

- Menor costo a comparación de las tecnologías convencionales (uso de reactivos químicos)
- Los contaminantes son usualmente convertidos a productos inocuos
- Permite el uso continuo del sitio al regenerarlo
- Toma menos tiempo a comparación de la remediación con los métodos químicos o físicos.
- Relativamente fácil de implementar.
- Ofrece flexibilidad de los sistemas y aplicaciones.
- Puede ser integrado con otras tecnologías como en humedales o con ayuda de materia orgánica o bien con el uso de reactivos.
- Elimina costos de transporte y la responsabilidad asociada mediante el uso de infraestructura ya presente en el terrero (tuberías).
- Aplicable en zonas inaccesibles por otros métodos de tratamiento.
- Rentable. Puesto que se puede obtener solución con metales recuperables.
- Cuenta con la aceptación pública positiva, debido a que el resultado de utilizar esta tecnología (biorremediación), es la recuperación de un terrero que estaba contaminado y no tiene consecuencias dañinas para el ambiente.

La investigación y desarrollo de la biorremediación va en aumento, por lo que se espera se mejoren las condiciones aplicables a la tecnología, o bien, se encuentre la manera de reciclar los valores que se obtienen en la solución final del proceso, haciendo así, aún más rentable ésta alternativa.

En términos generales se tienen dos casos; el primero que se refiere al proceso de remediación de un problema existente para ser remediado con BSR, mientras que el segundo caso en donde se tiene una propuesta innovadora debido a que; es una tecnología que puede implementarse de manera simultánea con la explotación de mina ya que cuando el material es confinado al mismo tiempo se pueden incluir las BSR, evitando problemas de DAM, además de que se puede llevarse a cabo sin necesidad de llegar al cierre de mina y hacerlo de manera progresiva. De tal manera que los insumos a utilizar se pueden aplicar en el lapso de tiempo que convenga.

Si bien, en este documento se plantea la biorremediación a través de bacterias sulfato reductoras de un terrero lixiviado que presenta condiciones extremas (pH ácido), al remediarse, se asume que las bacterias logran el mismo efecto o mayor en condiciones similares o menores dentro de mina, por ejemplo, en el tratamiento de drenaje ácido de mina o en jales.

Conclusiones y recomendaciones

- La biorremediación empleando bacterias es una tecnología que va en ascenso debido a los bajos costos de operación, a la fácil implementación, a la compatibilidad con otras tecnologías y a la flexibilidad de los microorganismos para adaptarse al medio ambiente. Siendo así una alternativa viable para la regeneración de un material que ya ha sido explotado y que ha perdido su interés económico, sin embargo debido a las políticas ambientales actuales no es posible dejar abandonado estos materiales, teniendo así que remediarlo para evitar drenajes ácidos y reincorporarlos al medio ambiente sin ser contaminantes. El uso de esta tecnología permite la bioprecipitación de diferentes especies químicas, fenómeno que se da gracias a la actividad de las bacterias sulfato reductoras. Como tema aparte de la biorremediación dependiendo de las características presentes en el material se puede obtener otro punto a favor al captar valores minerales que los procesos de beneficio convencionales no logran obtener y así tener una recuperación de materiales considerados agotados. Al implementar esta tecnología en un terrero lixiviado, justo antes de ser desechado se puede emplear la misma infraestructura para el riego de las bacterias y sus nutrimentos lo que permite reducir los costos de operación en donde dicho proceso puede llevarse de manera simultánea con la explotación de la mina, es decir, no es necesario esperar al cierre de mina para empezar con las actividades de bioremediación. Es una alternativa en principio fácil de aplicar, los únicos cuidados a atender es la incorporación de nutrientes que permitan el crecimiento de los microorganismos. Se recomienda hacer pruebas con bacterias sulfato reductoras acidófilas, las cuales estarían mejor adaptadas a condiciones extremas presentes en el terrero lixiviado o bien buscar tropicalizar a la bacteria para obtener mejores resultados.

Contenido de figuras

<i>Ilustración 1. Diagrama de métodos de monitoreo para conteo de bacteria</i>	7
<i>Ilustración 2. Espectrofotómetro</i>	8
<i>Ilustración 3. Nefelómetro</i>	8
<i>Ilustración 4. Detalle de la rejilla de una cámara de Neubauer</i>	8
<i>Ilustración 5. Recuento con alta concentración celular</i>	9
<i>Ilustración 6. Recuento de 5 cuadros grandes en una cámara de Neubauer</i>	9
<i>Ilustración 7. Fisión binaria</i>	10
<i>Ilustración 8. Fases de crecimiento de una población bacteriana</i>	10
<i>Ilustración 9. Clasificación de bacterias en función de su capacidad para degradar materia orgánica</i>	14
<i>Ilustración 10. Biopelícula al microscopio</i>	16
<i>Ilustración 11. Formación de biopelículas</i>	17
<i>Ilustración 12. Degradación anaerobia en presencia de sulfato</i>	24
<i>Ilustración 13. Texturas de un suelo</i>	26
<i>Ilustración 14. Sistema de Lixiviación</i>	28
<i>Ilustración 15. Sistema de lixiviación en terreros</i>	31
<i>Ilustración 16. Componentes de un medio de cultivo Postgate C</i>	43
<i>Ilustración 17. Preparación de medio de cultivo Postgate C</i>	43
<i>Ilustración 18. Reactor de lecho de lodos de flujo ascendente, RALLFA, a escala de laboratorio</i>	44

Contenido de tablas

Tabla 1. Fases de crecimiento de una población bacteriana.....	11
Tabla 2. Compuestos azufrados con sus respectivos estados de oxidación y compuestos donadores de electrones utilizados por las BSR.....	16
Tabla 3. Contenido de medio Postgate.....	18
Tabla 4. Compuestos utilizados como fuente de carbono para bacterias....	25
Tabla 5. Clasificación de un suelo en función de su pH.....	29
Tabla 6. Componentes de un medio de cultivo Postgate para BSR.....	41

Bibliografía

Revistas científicas

Demergasso, C. (2010). Microbial succession during a heap bioleaching cycle of low grade coppersulfides. *Hidrometallurgy* .

Ehrlich, H. (2008). Principles of desmineralization: Modern strategies for the isolation of organic frameworks. *Science Direct* .

Gutierrez, A. V. (2007). *Revistas Bolivianas*. Obtenido de Aislamiento y cultivo de bacterias sulfato reductoras acidófilas para la producción de sulfuro biogénico para la precipitación de metales pesados.

Lara, R. (2009). interfacial insights of pyrite colonized by *Acidithiobacillus thiooxidans* cells under acidic conditions. *Hidrometallurgy* .

Rodríguez Gallego J. L (2002) Biorremediación, Aspectos tecnológicos y aplicación al vertido prestige. Universidad de Oviedo

Tang, K. (2008). Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*.

Rocío Pacheco L. (2008). *Reproducción y crecimiento bacteriano*. Universidad Central de Venezuela, Venezuela.

Villar J.M.. (2017). *Biotecnología*. Obtenido de la revista *fertiberia*

Wiklander, L. (1975). The role of neutral salts in the ion exchange between acid precipitation and soil. *Department of soil science, Royal Agricultural College of Sweden* .

Libros

Biswas, A. K. (1993). El cobre, Metalurgia extractiva. En A. K. Biswas, *El cobre, Metalurgia extractiva*. México: Limusa, S.A. de C.V.

Cardona, M. T. (2007). *Manual de laboratorio de microbiología general*. Universidad de Caldas.

Gama, R. (2013). *Manual de prácticas de microbiología general*. Ciudad de México: Facultad de química, UNAM.

Zapata, H. V. (2010). *Manual de prácticas de microbiología del suelo*. Bogota, Colombia: Facultad de ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

Tesis

Calderon, M. C. (2008). *Caracterización fenotípica de la cepa sulfato reductora termofila USB A 53 aislada del manantial termal ojo del diablo en Paipa, Pontificia Universidad Javeria, Facultad de ciencias, Boyaca*. Bogota.

Sánchez, N. A. (2016). *Remoción de sulfato y metales pesados en medios filtrantes de piedra caliza con bacterias sulfato reductoras*. Santiago de Chile: Facultad de ciencias físicas y matemáticas, Universidad de Chile.

Valenzuela, R. A. (2010). *Bioprecipitación de cobre por sulfato-reducción en un reactor de lodos granulares expandidos*. Universidad de Sonora (UNISON), Hermosillo, Sonora.

Vergara, F. G. (2014). *Tesis "Aislamiento y caracterización de microorganismos en un humedal artificial localizado en el valle de Mezquital, estado de Hidalgo"*. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Ciudad de México.

Vicente, M. S. (2006). *Uso de bacterias SR inmovilizadas para la precipitación de metales pesados*. Facultad de ciencias exactas de la Universidad de la Plata, Argentina.

Virginia, A. (2010). *Evaluación del potencial de generación de sulfuro por la acción de las bacterias sulfato reductoras y sus posibles aplicaciones en el tratamiento de drenajes ácidos de mina*. Quito.

Zamora, D. H. (2013). *Estudio de un sistema anaerobio de laboratorio con bacterias sulfato reductoras para el tratamiento del efluente de flotación de una planta minera*. México, D.F.: Facultad de química, UNAM.

Páginas web

Calderon, M. C. (2008). *Caracterización fenotípica de la cepa sulfato reductora termofila USB A 53 aislada del manantial termal ojo del diablo en paipa, Boyaca*. Bogota.

Lara, R. (2009). *interfacial insights of pyrite colonized by Acidithiobacillus thiooxidans cells under acidic conditions*. *Hidrometallurgy*.

Cardona, M. T. (2007). *Manual de laboratorio de microbiología general*. universidad de caldas.

Coto, J. r. (5 de junio de 2013). *Redicces*. Obtenido de Biotecnología y biorremediación: <http://www.redicces.org.sv/jspui/bitstream/10972/2429/1/biotecnologia%20y%20bioremediacion.pdf>

Andrea, I. S. (2013). *Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage*. *journal of Hazardous materials*.

Aristabal, V. (2014). *Prezi*. Obtenido de Crecimiento panctónico y biopelículas: <https://prezi.com/8dyy69xxogww/crecimiento-planctonico-y-biopelículas/>

- BioSigma. (2017). *Biosigma*. Obtenido de Biorremediación de productos mineros: <http://www.biosigma.cl/productos-y-servicios/bioremediacion-de-productos-mineros/>
- Biswas, A. K. (1993). El cobre, Metalurgia extractiva. En A. K. Biswas, *El cobre, Metalurgia extractiva*. México: Limusa, S.A. de C.V.
- Degado, J. A. (14 de Febrero de 2013). *SlideShare*. Obtenido de Procesos de Biorremediación en suelo contaminados por hidrocarburos: <https://es.slideshare.net/DiegoL26/biorremediacion-hidrocarburos>
- Demergasso, C. (2010). Microbial succession during a heap bioleaching cycle of low grade coppersulfides. *Hidrometallurgy*.
- Díaz, R. (1995). *Manual practico de microbiología*. Barcelona: Masson, S.A.
- Díaz, R. (2018). *EcuRed Conocimiento con todos y para todos*. Obtenido de Lixiviación: <https://www.ecured.cu/Lixiviaci%C3%B3n>
- Díaz, R. A. (2010). *SCRIBD*. Obtenido de Remediación bacteriana de cocontaminantes industriales: <https://es.scribd.com/doc/32163854/REMEDIACION-BACTERIANA-UNICA>
- Elliott, P. (1998). Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. *Pergamon*.
- Ehrlich, H. (junio de 2008). Principles of desmineralization: Modern strategies for the isolation of organic frameworks. *Science Direct*. Obtenido de Principles of desmineralization: Modern strategies for the isolation of organic frameworks.
- Gallego, j. L. (2002). Biorremediación, Aspectos tecnológicos y aplicación del prestigio. *Universidad de Oviedo*.
- Gama, R. (2013). *Manual de prácticas de microbiología general*. Ciudad de México: Facultad de química, UNAM.
- García, Y. P. (Diciembre de 2016). *Ciencia Cierta*. Obtenido de Degradación microbiana de compuestos xenobióticos: <http://www.cienciacierta.uadec.mx/articulos/cc48/Degradacion.pdf>
- Garzón, E. (20 de mayo de 2015). *Prezi*. Obtenido de características y componentes del suelo: <https://prezi.com/uzm3oeeynjnd/caracteristicas-y-componentes-del-suelo/>
- Girguis, P. R. (2005). Growth and Population Dynamics of Anaerobic Methane- Oxidizing Archea and Sulfate- Reducing Bacteria in a Continous- Flow Bioreactor. *Applied and enviromental microbiology*.
- GreenFacts. (2017). *GreenFacts*. Obtenido de Biofilm: <https://www.greenfacts.org/es/glosario/abc/biofilm.htm>
- Gutierrez, A. V. (Diciembre de 2007). *Revistas Bolivianas*. Obtenido de Aislamiento y cultivo de bacterias sulfato reductoras acidófilas para la producción de sulfuro biogénico para la precipitación de metales pesados: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1813-53632007000100002&lng=es&nrm=iso
- Ibañez, J. J. (25 de marzo de 2007). *Madri+d, blogs*. Obtenido de Funciones de los organismos del suelo: La biota edáfica: <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2007/03/25/62254>
- Jallath, J. E. (2018). Acid drainage neutralization and trace metals removal by a two-step system with carbonated rocks, Estado de Mexico, Mexico. *CrossMark*.
- Jong, T. (2006). Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. *Water research*.

- Mendietta, E. (2016). *Eco agua*. Obtenido de Tratamiento de aguas residuales por biorremediación: <http://www.liceopalmira.edu.uy/Ecoagua.pdf>
- Nazar, L. (2007). *SciELO Chile*. Obtenido de Biofilms bacterianos: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162007000100011
- Pacheco, R. (2008). *Reproducción y crecimiento bacteriano*. Venezuela: Universidad Central de Venezuela.
- Sánchez, L. R. (2013). *ptolomeo*. Obtenido de Residuos mineros y la generación de drenaje ácido: <http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/2556/TESIS.pdf?sequence=1>
- Sánchez, N. A. (2016). *Remoción de sulfato y metales pesados en medios filtrantes de piedra caliza con bacterias sulfato reductoras*. Santiago de Chile: Facultad de ciencias físicas y matemáticas, Universidad de Chile.
- Skousen, J. (2016). Review of Passive Systems for Acid Mine Drainage Treatment. *CrossMark*.
- Spanish Oxford Living Dictionaries*. (2018). Recuperado el julio de 2018, de <https://es.oxforddictionaries.com/definicion/desmineralizacion>
- Tang, K. (2008). Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, 22.
- Tsukamoto, T. K. (2003). Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. *Water Research*.
- Valenzuela, R. A. (2010). *Bioprecipitación de cobre por sulfato-reducción en un reactor de lodos granulares expandidos*. Obtenido de Bacterias sulfato reductoras: <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/22284/Capitulo2.pdf>
- Vergara, F. G. (junio de 2014). *Tesis "aislamiento y caracterización de microorganismos en un humedal artificial localizado en el valle de Mezquital, estado de Hidalgo"*. Obtenido de https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_santana_vergara.pdf
- Villar, J. (2017). *Fertiberia*. Obtenido de Biotecnología: <http://regency.org/suspdf/sp/ch12.pdf>
- Vicente, M. S. (2006). *SeDiCl UNLP*. Obtenido de Uso de bacterias SR inmovilizadas para la precipitación de metales pesados: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2191/Documento_completo.pdf?sequence=1
- Virginia, A. (2010). *Evaluación del potencial de generación de sulfuro por la acción de las bacterias sulfato reductoras y sus posibles aplicaciones en el tratamiento de drenajes ácidos de mina*. Quito.
- Vivek, P. (2003). Quantification of toxic and inhibitory impact of copper and zinc on mixed cultures of sulfate-reducing bacteria. *Wiley Periodicals Inc*.
- Wiklander, L. (1975). The role of neutral salts in the ion exchange between acid precipitation and soil. *Department of soil science, Royal agricultural college of Sweden*.
- www.tendencias21.net*. (2017).

- Zamora, D. H. (2013). *Estudio de un sistema anaerobio de laboratorio con bacterias sulfato reductoras para el tratamiento del efluente de flotación de una planta minera*. México, D.F.: Facultad de química, UNAM.
- Zapata, H. V. (2010). *Manual de prácticas de microbiología del suelo*. Bogota, Colombia: Facultad de ciencias de la universidad nacional de Colombia.
- Zhang, M. (2016). Preparation of immobilized sulfate reducing bacteria (SRB) granules for effective bioremediation of acid mine drainage and bacterial community analysis. *Minerals Engineering*.