

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**"DESARROLLO, OPTIMIZACIÓN E INTEGRACIÓN DE TECNOLOGÍAS
SUSTENTABLES A BASE DE UN BIORREACTOR EMPACADO DE FLUJO
ASCENDENTE Y UN HUMEDAL ARTIFICIAL DE FLUJO HORIZONTAL SUB-
SUPERFICIAL PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA CONTAMINADA CON
CROMO Y PLOMO"**

POR:

M. en C. JULIA MARIANA MÁRQUEZ REYES

**Como requisito para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

NOVIEMBRE, 2013

**"DESARROLLO, OPTIMIZACIÓN E INTEGRACIÓN DE TECNOLOGÍAS
SUSTENTABLES A BASE DE UN BIORREACTOR EMPACADO DE FLUJO
ASCENDENTE Y UN HUMEDAL ARTIFICIAL DE FLUJO HORIZONTAL SUB-
SUPERFICIAL PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA CONTAMINADA CON
CROMO Y PLOMO"**

Comisión de Tesis

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
Presidente
(Director de Tesis)

Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos
Secretario

Dr. Benito Pereyra Alférez
Vocal

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Vocal

Dr. Jorge Luis Guzmán Mar
Vocal

Dr. Ulrico Javier López Chuken
Director Externo

Dr. Arcadio Valdez González
Asesor

DEDICATORIA

A todas las personas que me han y siguen enseñando a actuar como un mejor ser humano. Afortunadamente la lista es larga, pero quienes la encabezan han estado al pendiente sin importar las circunstancias: mis padres, hermanos y mi nana/abuela.

A mi amigo, tocayo, compañero y esposo

"Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay hombres que luchan todo un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos. Pero hay los que luchan toda la vida: esos son los imprescindibles"(Bertolt Brecht).

"No tengo talentos especiales, pero sí soy profundamente curioso" (Albert Einstein).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por la oportunidad brindada al incorporarme a un programa de posgrado.

A todas las personas del Instituto de Biotecnología (UANL) que directa o indirectamente me ayudaron en la realización del presente trabajo de tesis.

Al Dr. Hugo Alberto Luna Olvera, Dr. Ulrico Lopez Chuken y al Dr. Arcadio Vasquez, por sus aportaciones, recomendaciones y tiempo dedicado durante este trabajo de investigación.

A la Dra. Lilia Morales, Dr. Jorge Guzmán Mar, Dr. Benito Pereira y al Dr. Carlos Hernández Luna por su tiempo, comentarios y recomendaciones que realizarán para enriquecer este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Madrid por la oportunidad de realizar una estancia de investigación en la facultad de Ciencias en el Departamento de Química Agrícola bajo la dirección del Dr. Jesús Peñalosa.

A la M. en C. Adriana Liñán Montes, Berenice López y Flor E. Palomar por su apoyo incondicional en el análisis de metales realizado en la Facultad de Química de la UANL.

A todas esas personas que hicieron la diferencia en mi estadia como estudiante de la UANL, muchas Gracias !!!! Mayra Treviño, Diana Aguirre, Emmanuel Garza, Omar Tovar, Esther Martínez, Silvia Iracheta, Ituriel Vargas, Antonio Lozano, Antonio Garibay, Luis E. Flores, Adriana Obregón, Ana Laura Vázquez, Enrique Castrejón, Fernando Ornelas, Orquídea Pérez y David Melgoza.

Y por supuesto a todos mis amigos peludos que he tenido la fortuna de conocer desde mi llegada a la sultana del norte

TABLA DE CONTENIDO

| | Pág |
|--|------|
| Tabla de Contenido..... | V |
| Lista de Figuras..... | VIII |
| Lista de Tablas..... | X |
| Lista de abreviaturas..... | XII |
| Resumen..... | 1 |
| Abstract..... | 3 |
| 1. Introducción..... | 5 |
| 2. Antecedentes..... | 7 |
| 2.1. Problemática ambiental..... | 7 |
| 2.1.1. Cromo en el ambiente..... | 8 |
| 2.1.2. Plomo en el ambiente..... | 8 |
| 2.2. Tecnologías convencionales de remoción de metales pesados..... | 9 |
| 2.3. Bacterias reductoras de sulfato | 11 |
| 2.3.1. Toxicidad de los metales en las BRS..... | 12 |
| 2.3.2. Consorcios microbianos en la naturaleza..... | 13 |
| 2.3.3. Fuente de carbono en las BRS..... | 13 |
| 2.3.4. Biorreactores..... | 16 |
| 2.4. Humedales artificiales..... | 17 |
| 2.4.1. Tipos de humedales..... | 18 |
| 2.4.2. Especies vegetales presentes en humedales..... | 18 |
| 2.4.3. Mecanismos de acumulación y asimilación de nutrientes en plantas..... | 21 |
| 2.4.4. Remoción de metales pesados por plantas..... | 22 |
| 2.4.5. Diseño de humedales | 24 |
| 3. Justificación..... | 28 |
| 4. Objetivos..... | 29 |
| 5. Materiales y Métodos..... | 29 |
| 5.1. Consorcio reductor de sulfatos (CRS)..... | 30 |
| 5.1.1. Aislamiento de consorcios..... | 30 |
| 5.1.2. Selección del consorcio reductor de sulfato..... | 31 |
| 5.1.3. Sustrato orgánico..... | 31 |
| 5.1.4. Afinidad al sustrato y pH..... | 31 |

| | |
|---|----|
| 5.1.5. Adsorción de metales sobre la turba pre-tratada..... | 32 |
| 5.1.6. Efecto del plomo (II) y cromo (IV) sobre la actividad reductora de sulfato..... | 32 |
| 5.1.7. Operación del biorreactor | 33 |
| 5.2. Humedal artificial..... | 34 |
| 5.2.1. Elección del material vegetal..... | 34 |
| 5.2.2. Material vegetal y condiciones de crecimiento y mantenimiento..... | 35 |
| 5.2.3. Efectos de los metales pesados sobre la germinación de semillas de berro..... | 36 |
| 5.2.4. Comportamiento del berro (<i>Nasturtium officinale</i>) en presencia de Pb (II) y Cr (VI)..... | 36 |
| 5.2.5. Efecto del pH sobre el crecimiento del berro (<i>Nasturtium officinale</i>) | 38 |
| 5.2.6. Operación del humedal artificial | 38 |
| 5.3. Montaje y operación del sistema biorreactor-humedal artificial.... | 39 |
| 5.4. Análisis estadístico..... | 41 |
| 6. Resultados y Discusión..... | 42 |
| 6.1. Consorcio reductor de sulfato..... | 42 |
| 6.1.1. Selección del inóculo | 42 |
| 6.1.2. Sustrato orgánico..... | 45 |
| 6.1.3. Afinidad a sustrato..... | 48 |
| 6.1.4. pH..... | 50 |
| 6.1.5. Adsorción de metales sobre la turba pre-tratada..... | 51 |
| 6.1.6. Tolerancia de plomo (II) y cromo (VI) del consorcio reductor de sulfato | 53 |
| 6.1.7. Remoción de plomo y cromo en un reactor de flujo ascendente..... | 56 |
| 6.2. Humedal artificial..... | 59 |
| 6.2.1. Selección del material vegetal..... | 59 |
| 6.2.2. Germinación de semillas de berro (<i>Nasturtium officinale</i>) | 67 |
| 6.2.3. Germinación de semillas de berro (<i>Nasturtium officinale</i>) a valores distintos de pH..... | 69 |
| 6.2.4. Germinación de semillas de berro (<i>Nasturtium officinale</i>) expuestas a Pb y Cr (VI)..... | 69 |
| 6.2.5. Exposición de planta de berro (<i>Nasturtium officinale</i>) a | |

| | |
|--|-----|
| diferentes concentraciones mono y bimetálicas de Pb (II) y Cr (VI)..... | 72 |
| 6.2.6. Respuesta de las plantas de berro (<i>Nasturtium officinale</i>) expuesto a distintos valore de pH..... | 86 |
| 6.2.7. Humedal artificial..... | 89 |
| 6.3. Operación del sistema de tratamiento (Biorreactor-Humedal)..... | 95 |
| 7. Conclusiones..... | 107 |
| 8. Recomendaciones..... | 110 |
| 10. Bibliografía..... | 111 |
| 11. Anexos..... | 122 |

Lista de Figuras

| | Pág. |
|-----------|--|
| Figura 1 | Diagrama de la degradación anaerobia de polímeros orgánicos. 15 |
| Figura 2 | Representación esquemática de los procesos y alcances de la ingeniería de biorreactores 16 |
| Figura 3 | Esquema de un humedal artificial de flujo sub-superficial horizontal..... 18 |
| Figura 4 | Concentración de metales totales en las muestras de suelo en la cual se realizaron los aislamientos bacterianos..... 43 |
| Figura 5 | Concentración específica de H ₂ S biogénico de los ocho consorcios reductores de sulfato..... 44 |
| Figura 6 | Velocidad de producción específica de H ₂ S de C5 en presencia de distintas concentraciones de TBT..... 49 |
| Figura 7 | Producción específica de sulfuro biogénico del C5 a distintos pH..... 51 |
| Figura 8 | Concentración de Pb (II) y Cr (VI) a distintos tiempos de contacto con la turba pre-tratada..... 52 |
| Figura 9 | Velocidad específica de producción de H ₂ S biogénico bajos distintas concentraciones de Pb (II) y Cr (VI)..... 54 |
| Figura 10 | Concentraciones del efluente del biorreactor: Cr, Pb, SO ₄ ²⁻ y DQO..... 58 |
| Figura 11 | Concentración total de Pb y Cr en hojas, tallo y raíz de hierbabuena y berro..... 60 |
| Figura 12 | Acumulación y el factor de bioconcentración total de Pb y Cr en hojas, tallo y raíz de hierbabuena y berro..... 61 |
| Figura 13 | Berro (<i>Nasturtium officinale</i>): Porcentaje de evaporación en presencia de Pb (II) y Cr (VI), control con cubierta y control sin cubierta..... 63 |
| Figura 14 | Hierbabuena (<i>Mentha sp.</i>): Porcentaje de evaporación en presencia de Pb (II) y Cr (VI), control con cubierta y control sin cubierta..... 64 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| Figura 15 | Germinación de semillas de berro (<i>Nasturtium officinale</i>) expuestas a distintos valores de pH..... | 68 |
| Figura 16 | Porcentajes de germinación a distintas concentraciones de Pb (II) y Cr (VI)..... | 70 |
| Figura 17 | Longitud de raíces y cotiledón de las plántulas a diferentes concentraciones de Cr (VI) y longitud de raíces de las plántulas germinadas a las diferentes concentraciones de Pb (II)..... | 71 |
| Figura 18 | Concentraciones de Cr (VI) en las distintas fracciones del berro (<i>Nasturtium officinale</i>): hojas, tallos, raíces y brotes..... | 73 |
| Figura 19 | Concentraciones de Pb (II) en las distintas fracciones del berro (<i>Nasturtium officinale</i>): hojas, tallos, raíces y brotes..... | 74 |
| Figura 20 | Velocidades de crecimiento relativo de berro (<i>Nasturtium officinale</i>) en presencia de concentraciones mono y bimetálicas de Pb (II) y Cr (VI)..... | 77 |
| Figura 21 | Velocidades de crecimiento relativo de berro (<i>Nasturtium officinale</i>) en presencia de distintos valores de pH..... | 87 |
| Figura 22 | Concentraciones de clorofila a, b y total cuantificada cuando el berro (<i>Nasturtium officinale</i>) está expuesto a distintos valores de valores de pH..... | 88 |
| Figura 23 | Concentraciones de cromo y valores de pH del efluente del humedal horizontal sub-superficial..... | 91 |
| Figura 24 | Concentraciones de clorofila total y cromo cuantificadas en la operación del humedal horizontal sub-superficial..... | 92 |
| Figura 25 | Determinación de pH y potencial redox en el efluente del biorreactor (A) y el humedal artificial (B)..... | 98 |
| Figura 26 | Cuantificación de sulfatos (SO_4^{2-}) y nitratos (NO_3^-) en el efluente del biorreactor y el humedal artificial..... | 100 |
| Figura 27 | Porcentaje de remoción total de Cr, Pb y DQO del efluente del biorreactor y el humedal artificial..... | 105 |

Lista de tablas

| | Pág. |
|----------|--|
| Tabla 1 | Resumen de criterios de diseño para humedales construidos 27 |
| Tabla 2 | Producción de H ₂ S biogénico por los consorcios bacterianos según la concentración metales (Pb y Cr) y profundidad de muestreo..... 45 |
| Tabla 3 | Parámetros cinéticos del consorcio C5 determinados por el tiempo de exposición de la turba pre-tratada con HCl..... 47 |
| Tabla 4 | Porcentaje de crecimiento de berro (<i>Nasturtium officinale</i>) y hierbabuena (<i>Mentha sp.</i>) en presencia de Pb (II) y Cr(VI) al final del experimento..... 62 |
| Tabla 5 | Porcentaje de germinación de berro (<i>Nasturtium officinale</i>) a distintos fotoperiodos y soluciones que promueven humedad..... 68 |
| Tabla 6 | Concentraciones de plomo y cromo obtenidas al someter al berro a distintas concentraciones en mezclas bimetálicas..... 75 |
| Tabla 7 | Índice de tolerancia, factor de bioconcentración y factor de translocación de berro (<i>Nasturtium oficinalle</i>) en presencia de Pb (II) y Cr (VI)..... 80 |
| Tabla 8 | Índice de tolerancia, factor de bioconcentración y factor de translocación de <i>Nasturtium oficinalle</i> en presencia de concentraciones bimetálicas Pb (II) y Cr (VI)..... 81 |
| Tabla 9 | Concentración de clorofila al estar expuesto a Pb (II) y Cr (VI)..... 84 |
| Tabla 10 | Concentración de clorofila total en las plantas de berro (<i>Nasturtium officinale</i>) expuesta a concentraciones bimetálicas Pb (II)-Cr(VI)..... 86 |
| Tabla 11 | Concentraciones totales de Pb y Cr cuantificadas en los diferentes controles del humedal artificial..... 90 |
| Tabla 12 | Resultados obtenidos de la modelación de los iones presentes dentro del humedal artificial..... 94 |
| Tabla 13 | Crecimiento del berro (<i>Nasturtium officinale</i>) durante la operación del sistema de tratamiento 101 |

| | | |
|----------|--|-----|
| Tabla 14 | Cuantificación de clorofila a lo largo de los días que opero el humedal artificial..... | 101 |
| Tabla 15 | Concentraciones de cromo y plomo en berro (<i>Nasturtium officinale</i>) a distintos tiempos de operación del humedal..... | 103 |

Lista de abreviaturas

| | |
|-----|--|
| ARS | Actividad reductora de sulfato |
| AGV | Ácidos grasos volátiles |
| BB | Berro |
| BR | Biorreactor |
| BRS | Bacterias reductoras de sulfato |
| C5 | Consortio bacteriano reductor de sulfato |
| COT | Carbono orgánico total |
| DAM | Drenaje ácido de mina |
| DQO | Demanda química de oxígeno |
| EAA | Espectrometría de absorción atómica |
| Eh | Potencial de óxido-reducción con respecto al electrodo estándar de hidrógeno |
| EPT | Elementos potencialmente tóxicos |
| HH | Hierbabuena |
| OD | Oxígeno disuelto |
| POR | Potencial óxido reducción |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| SHE | Electrodo de hidrógeno |
| SSV | Sólido suspendidos volátiles |
| TH | Turba |
| THT | Turba pre-tratada |
| TRH | Tiempo de retención hidráulico |

Resumen

La contaminación ambiental se ha incrementado con el paso de los años y por tal razón diariamente se realizan innovaciones en los procesos tecnológicos utilizados para reducir y prevenir los problemas ambientales. Uno de los principales contaminantes de cuerpos de agua a nivel mundial son los metales pesados debido a su alto grado de toxicidad. En las últimas tres décadas la biotecnología ambiental juega un papel trascendente en el estudio e implementación de procesos de tratamiento donde los organismos son los protagonistas en dichos procesos. Existe poca información sobre el acoplamiento de un proceso biotecnológico anaerobio con un aerobio. Por lo que, en el presente trabajo de tesis se evaluó bajo ciertas condiciones experimentales por separado y en conjunto un biorreactor empacado de flujo ascendente con actividad sulfato reductora y un humedal artificial horizontal de flujo sub-superficial. Se estudió el efecto de la turba pre-tratada sobre la actividad de un consorcio microbiano sulfato reductor para eliminar cromo (Cr VI) y plomo (Pb II) en solución. La comunidad bacteriana más activa (235.7 mmol H₂S/g SSV) fue seleccionada entre ocho consorcios. Como fuente de carbono se empleó turba la cual fue tratada por 10 min con 20% de HCl, está presentó una elevada capacidad para adsorber iones de la solución. La constante de afinidad de sustrato (K_s) fue 740 g DQO/L y la relación DQO/SO₄²⁻ fue de 0.71. Se presentó la mayor producción de sulfuro biogénico a pH 5. Se utilizó un biorreactor de lecho empacado de flujo ascendente con un flujo de 8.3 mL/min por 180 h y tiempo de retención hidráulico (TRH) de 0.8 h obteniendo una eficiencia de remoción del 90 % para el plomo y 65 % para el cromo. La eficiencia de remoción estuvo relacionada con la toxicidad del metal pesado sobre las comunidades bacterianas. El berro (*Nasturtium officinale*) se empleó como especie vegetal rizofiltradora dentro del humedal horizontal de flujo sub-superficial. Es de fácil propagación y crece en sistemas inundados. Las semillas de berro (*Nasturtium officinale*) en presencia del metal (5- 200 mg /L) no mostraron disminución en el porcentaje de germinación pero si en crecimiento de la plántula. Concentraciones monométalicas superiores a 3 mg Cr (VI)/L; 12 mg Pb

(II)/L y concentraciones bimetalicas superiores 5 mg Pb (II) – 5 mg Cr (VI) disminuyen el crecimiento de la planta en más del 50 %. A pH 6 se favorece el crecimiento, pero soporta rangos de pH de 5 a 8. En el estudio se demostró que el berro (*Nasturtium officinale*) demostró ser capaz de acumular cromo y plomo en raíces > tallos = brotes > hojas. Los valores obtenidos de factor de bioconcentración (>1) y factor de traslocación (>1) sugieren que esta especie vegetal puede ser utilizada en programas de fitoestabilización. El humedal artificial horizontal de flujo sub-superficial fue eficiente en la remoción del 98 % del cromo total. Sin embargo, este porcentaje estuvo repartido entre la retención en plantas del 2.3 %; por el sustrato rocoso (grava) con el 53 % y el restante 44.2 % no se sabe con certeza cuál fue el mecanismo que actuó para su retención. Mientras que para el plomo las plantas retuvieron 610 mg/kg y cerca del 80 % del plomo (II) se precipitó favoreció por el pH (7.8) del medio acuso y la interacción con la grava debido a su composición química basada principalmente en aluminosilicatos. El software Visual Minteq 3.0 mostró como resultado, que los compuestos formados están asociados principalmente a carbonatos [$\text{Pb}(\text{CO}_3)_2$, PbCO_3 y PbHCO_3^+]. El sistema de tratamiento empleado del biorreactor con actividad sulfato reductora y el humedal artificial sembrado con *Nasturtium officinale* removieron el 98.2 % de Pb total y 95.7 % de Cr total.

Abstract

Over the last decades, the environmental pollution has significantly increased worldwide. In view of this, different technological processes aimed to reduce and prevent environmental problems are improved on a daily basis. One of the main water pollutants are the heavy metals. Over the last years, the environmental biotechnology has played an important role in the study and implementation of treatment processes based on the activity of living organisms. There exists scarce information on anaerobic biotechnology processes being coupled to aerobic processes. Therefore, in the present thesis study, an up-flow, packed bioreactor having sulfate-reducing activity was evaluated under specific experimental conditions. Similarly, a horizontal, subsurface flow, artificial wetland was evaluated. Both systems were evaluated individually and in conjunction in order to determine their potential to remove heavy metals. The effect of pretreated peat moss on the ability of a sulfate-reducing microbial consortium to eliminate chromium (VI) and lead (II) in solution was evaluated. The most active bacterial community (235.7 mmol H₂S/g SSV) was selected among eight consortia. Peat moss was employed as carbon source and it was pretreated with 20% HCl for 10 min. The material presented a high capacity to adsorb ions from the solution. The substrate affinity constant K_s was 740 g COD/L and the estimated COD/SO₄²⁻ proportion was 0.71. The highest production of biogenic sulfate occurred under pH 5. An up-flow, packed bed bioreactor was utilized and run for 180 h with a 8.3 mL/min flow and 0.8 h TRH. The removal efficiency was related with the toxicity of the heavy metal on the bacterial communities. Watercress (*Nasturtium officinale*) was employed as a rhizofiltering plant species in the subsurface, horizontal artificial wetland. This species is easily propagated and it grows well in flooded systems. Watercress seeds did not show a decrease in germination rate under the presence of heavy metal (5 - 200 mg/L), however, the seedlings growth was reduced. Concentrations above 3 mg Cr (VI)/L; 12 mg Pb (II)/L and a mixture of 5 mg Pb (II) – 5 mg Cr (VI) caused a decrease of 50% in the final plant growth. At pH 6, plant growth is normal, although it withstands a pH range from 5 to 8. It was demonstrated that watercress is capable of accumulating chromium and lead in roots > stalks = buds

> leaves. Estimated bio-concentration values (>1) and translocation factors (>1) suggest that this plant species is viable to be used as part of phyto-stabilization programs. The subsurface, horizontal, artificial wetland performed efficiently by removing 98% of total chromium. Nevertheless, this removed proportion is accounted to plants (2.3%), pebble substrate (53%) and an unaccounted proportion (44.2%) that was removed by an unknown process. For lead, watercress seedlings removed 610 mg/kg and almost 80% of lead (II) was precipitated under a process improved by pH 7.8 and the interaction with pebbles. The software Visual Minteq 3.0 indicated that the formed compounds were mainly associated with carbonates [$\text{Pb}(\text{CO}_3)_2$, PbCO_3 y PbHCO_3^+]. The treatment system consisting in bioreactor having sulfate-reducing activity and the artificial wetland seeded with *Nasturtium officinale* removed 98.2 % of total Pb and 95.7 % of total Cr.

1. Introducción

A lo largo de su historia la actividad humana ha ocasionado daños a los ecosistemas y han alterado la composición original del aire, el agua y los suelos. Generando diversos problemas de contaminación que pueden ocurrir por diversas vías, entre ellas las operaciones industriales, las emisiones, fugas y derramas accidentales, descargas de efluentes y residuos. En estas operaciones frecuentemente se involucran mezclas de distintos agentes contaminantes, dentro de ellos tenemos los metales pesados, como Pb (II) y el Cr (VI). Los metales pesados influyen negativamente en la salud de humanos y animales para lo cual es necesario realizar estudios que permitan conocer el comportamiento de estos contaminantes dentro de los ecosistemas para desarrollar estrategias de saneamiento. En las últimas décadas se ha incrementado el estudio e implementación de herramientas biotecnológicas para contrarrestar los daños ambientales y de salud pública que han causado los metales pesados.

El uso de bacterias reductoras de sulfato (BRS) es una alternativa para minimizar la concentración de iones metálicos en solución. Las BRS utilizan sulfato (SO_4^{2-}) como aceptor final de electrones durante su metabolismo de materia orgánica y lo transforman a sulfuro de hidrógeno (H_2S) el cual bajo condiciones adecuadas de potencial de hidrógeno (pH) y potencial óxido reducción (POR) forma sulfuros metálicos insolubles.

En distintas partes del mundo se ha utilizado los humedales naturales como sistema de tratamiento de aguas residuales contaminadas por metales pesado, debido a su capacidad de depuración, por dicha cualidad se empezaron a diseñar sistemas de tratamiento que simularan las condiciones de dichos ecosistemas, dando inicio la aparición de humedales construidos. En México, el uso de los humedales como sistemas de tratamiento no está muy estudiada, sin embargo, su aplicación es una alternativa viable debido a su bajo mantenimiento y costo de

instalación-operación, una efectividad de remoción para compuestos orgánicos e inorgánicos.

Sin embargo existe muy poca información publicada referente a la implementación de sistemas de tratamiento combinados, empleando las tecnologías antes mencionadas. En el presente estudio se diseñó y construyó un sistema de tratamiento biológico conformado por un proceso de tratamiento anaerobio y un procesos de tratamiento aerobio. Se aisló de un sitio contaminado por actividad minera un consorcio que presentó actividad reductora de sulfato (ARS) y se acondiciono dentro de un biorreactor empacado de flujo ascendente acoplado a un humedal artificial horizontal de flujo sub-superficial sembrado de plantas de berro (*Nasturtium officinale*).

2. Antecedentes

2.1. Problemática ambiental

El agua es un recurso natural de vital importancia ecológica y económica, pero su mal manejo y distribución ha ocasionado que los cuerpos de agua estén expuestos a distintos daños ambientales. La contaminación del agua, suelo y aire es un problema que enfrenta la humanidad. El agua es empleada en todos los sectores económicos y sociales, y después de ser utilizada, su composición es gravemente alterada, ya que pueden incorporarse distintos tipos de contaminantes (orgánicos, inorgánicos y biológicos).

Uno de los principales contaminantes que afectan a los cuerpos de agua a nivel mundial son los metales pesados, donde la contaminación de agua se ha incrementado en las últimas décadas principalmente debido a descargas de aguas residuales industriales y minería. Estas últimas generando efluentes con características del drenaje ácido de mina (AMD) con bajo pH, altas concentraciones de sulfato y distintas concentraciones de metales tóxicos solubles como: Cu (II), Fe (II y III), Al (II), Pb (II), As (III y V) y Cr (III y VI) (Costa *et al.*, 2008; Choudhary y Sheoran, 2011).

Algunos metales son esenciales para la vida ya que participan en procesos metabólicos de gran importancia (e.g. Cu, Fe, Mn, Ni y Zn). Pero si se encuentran en elevadas concentraciones pueden llegar a ser tóxicos, esto se debe a su producto de solubilidad, capacidad de absorción, transporte dentro de las células y alta reactividad, dando como resultado principalmente estrés oxidativo y reemplazo de metales esenciales. La acumulación de metales pesados (e.g., Cd, Cr, Cu, Hg y Zn) en humanos, puede generar severas consecuencias en el desarrollo: anormalidades en el desarrollo, carcinogénesis y defectos del control neuromuscular (Thiele, 1995). Además, tal clase de contaminación también

puede afectar profundamente tanto a las comunidades vegetales como a las microbianas. (Pagnanelli *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011).

2.1.1. Cromo en el ambiente

Es un elemento natural que se encuentra en rocas, plantas, animales, suelo y gases volcánicos. Los compuestos de Cr más comunes en la naturaleza, son aquellos que presentan un estado de valencia de 0, III y VI. El Cr (III) es considerado un nutriente esencial y es bastante común en el ambiente, mientras que la presencia de Cr 0 y VI, regularmente se asocia con el desecho de residuos industriales en la forma de cromatos o dicromatos, siendo éstas moléculas, altamente tóxicas y solubles en agua. La movilidad del Cr (VI) es muy alta ya que los iones del cromato y dicromato se encuentran con carga negativa a un pH >3, haciendo baja su adsorción a minerales y compuestos orgánicos (Xu y Jaffé, 2006).

El Cr (VI) puede causar daños al sistema respiratorio, malestar estomacal, úlceras, daño al hígado y riñón. Para ciertos compuestos, el contacto con la piel puede causar ulceraciones y reacciones alérgicas e incrementa el riesgo de padecer cáncer (ATSDR, 2007). En la normatividad mexicana no existe una concentración máxima de Cr (VI) que pueda estar presente en agua para consumo humano (NOM-201-SSA1-2002). El límite máximo permisible (promedio diario) en ríos, embalses naturales y artificiales y aguas costeras para cromo total es de 1 mg /L (NOM-001-SEMARNAT- 1996).

2.1.2. Plomo en el ambiente

Se encuentra naturalmente en forma mineral asociado a sulfuros (PbS) como galena. Principalmente lo encontramos como Pb (II), aunque también puede presentarse es estado de oxidación de (IV), constituyendo varios minerales que son insolubles en agua (Pérez, 2007). El Pb (II) presenta la propiedad de

remplazar al K, Ba, Sr y Ca, tanto en sitios de adsorción como en redes cristalinas, esto es debido a que se comporta como un metal alcalinotérreo y es el que presenta menor movilidad entre los metales (Pérez, 2007).

El límite máximo permisible de plomo en agua de consumo humano es de 0.01 mg/L para plomo (NOM-201-SSA1-2002) y en cuerpos de agua el límite permisible (promedio diario) es de 1mg/L (NOM-001-SEMARNAT- 1996). El plomo puede afectar a casi todos los órganos y sistemas del cuerpo, siendo el más propenso el sistema nervioso, produce debilidad en dedos, muñecas y tobillos, daño en cerebro y riñones (ATSDR, 2007).

2.2. Tecnologías convencionales de remoción de metales pesados

Las tecnologías desarrolladas en las últimas dos décadas para tratar efluentes contaminados por metales pesados se basan en métodos de precipitación/co-precipitación, oxidación química (foto-oxidación), oxidación-reducción química, intercambio iónico, filtración, tratamientos electroquímicos, osmosis inversa, tecnologías de membrana, evaporación entre otros (Ahluwalia y Goyal, 2007). Sin embargo estas tecnologías tienden a elevar los costos de saneamiento, no son amigables con el ambiente y/o generan gran cantidad de residuos (Tekerekopoulou *et al.*, 2010). Con el objetivo de minimizar algunos de los inconvenientes antes mencionados, ha sido necesario desarrollar con tecnologías alternativas para realizar los procesos de saneamiento o remediación de agua y suelos contaminados.

La biotecnología ambiental se basa en el desarrollo de tecnologías innovadoras que emplean organismos o partes de organismos como herramienta para remediar un problema de contaminación. Anteriormente, los microorganismos sólo habían sido considerados como intermediarios en los ciclos biogeoquímicos de los elementos, sin embargo, los problemas ambientales de la actualidad han

ocasionado que los microorganismos jueguen un papel trascendente en la mitigación de la contaminación ambiental (Atlas y Bartha, 2002).

En las últimas décadas el empleo de las bacterias reductoras de sulfato (BRS) se ha incrementado en tecnologías biológicas para abatir la contaminación por compuestos azufrados, metales pesados, materia orgánica y xenobióticos. Holt *et al.* (1994) y White *et al.* (1997), han descrito a las BRS como células procariotas con diámetros entre 0.4 y 3 μm , presentes en sistemas anóxicos con potenciales oxido reducción cercanos a -200 mv/SHE. Estos organismos emplean nitrógeno amoniacal como fuente del elemento y reducen iones sulfato (SO_4^{2-}) hasta sulfuro de hidrógeno (H_2S) de manera no asimilativa, es decir, liberando H_2S al ambiente (Gottschalk, 1986).

Otra alternativa biotecnológica que ha ido en aumento en cuanto a su aplicación son los humedales artificiales. La convención RAMSAR define a un humedal natural a cualquier extensión de marismas, pantanos y turberas, o superficies cubiertas de aguas sean éstas de régimen artificial o natural, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros, así como humedales artificiales los estanques de tratamiento de aguas residuales y embalses (Ramsar, 2006). En dicho estudio se utilizó un humedal artificial para el tratamiento de suelos y aguas contaminadas. Un humedal artificial representa un estanque(s) superficial relleno con algún tipo de material de soporte (tierra, arena o grava) y plantado con vegetación tolerante a condiciones de saturación de agua, con el objetivo de remediar suelos y aguas contaminadas (USEPA, 1998).

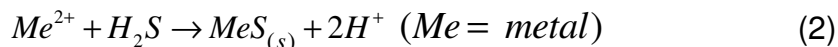
2.3. Bacterias reductoras de sulfato (BRS)

Los organismos reductores de sulfato son miembros muy importantes de las comunidades microbianas con mucho interés biotecnológico y ambiental ya que pueden existir en suelo, sedimentos, aguas residuales, agua marina y fresca, cavidad bucal e intestino de muchos animales incluyendo el humano (Matias P, M., *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2001). Las BRS son microorganismos procariontes que pueden usar el SO_4^{2-} , S elemental, NO_3^- , dimetilsulfóxido, MnO_2 (Mn^{4+}), Fe_2O_3 (Fe^{3+}) y H_2AsO_4^- como aceptor final de electrones (Oremland y Stolz 2003). Son considerados microorganismos estrictamente anaerobios y se encuentran en hábitats anóxicos y ricos en SO_4^{2-} donde las concentraciones pueden alcanzar hasta los 2800 mg/L (Barton y Hamilton, 2007). A las BRS les favorecen valores de pH entre 5.5 y 7.0; potencial oxido-reducción entre 0 a -240mV, requieren de un sustrato orgánico como fuente de energía y iones SO_4^{2-} como aceptores de electrones, un soporte físico donde se puedan inmovilizar y una relación carbono-nitrógeno-fósforo (C:N:P) de 100:5:1 (Phifer *et al.*, 2001). La reacción de oxidación de materia orgánica por BSR que involucra la reducción de sulfatos hasta sulfuro de hidrógeno puede representarse por la siguiente expresión estequiométrica general (Ecuación 1):



Esta expresión considera la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos (CH_2O) como donadores de electrones: acetato, propionato, etanol, lactato, estiércol, residuos de papelera, residuos de madera, composta de hongos, alfalfa, turba entre otros (Wakao *et al.* 1974; Bechard *et al.*, 1994; White y Gadd, 1996; Waybrant *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2000; Harris y Ragussa 2001; Benner *et al.*, 2002; Amos *et al.*, 2003). El sulfuro de hidrógeno generado biológicamente del sulfuro de hidrógeno reacciona con los metales disueltos formando precipitados de sulfuro metálico menos solubles ecuación (2), por tal, motivo BSR son más persistentes que otras comunidades ya que se reduce el efecto tóxico del

metal mediante este mecanismo. Sin embargo, la reducción de sulfato incrementa la alcalinidad elevando los valores de pH.



Dentro de las BSR se pueden distinguir dos grandes grupos metabólicos. El primero, que comprende las especies que oxidan incompletamente sus substratos a acetato. Y el segundo, que agrupo a las especies que en principio son capaces de oxidar los compuestos orgánicos incluyendo acetato completamente a CO₂ (Barton y Hamilton 2007). A la fecha, se han documentado especies de BRS tanto heterótrofas como autótrofas, así como aquellas que pueden crecer en limitadas concentraciones o ausencia total de sulfatos, propiedad que resulta muy valiosa en procesos biotecnológicos. Las BSR también pueden obtener energía de la fermentación de materia orgánica en ausencia de sulfato, permitiéndoles sobrevivir en reactores anaerobios bajo condiciones de limitación de sulfato (Muyzer y Stams, 2008).

2.3.1. Toxicidad de los metales en las BRS

Los efectos tóxicos de los metales sobre las células de las BSR incluyen desplazamiento y/o sustitución de iones esenciales para sitios celulares, además de bloqueos de grupos funcionales (enzimas y ácidos nucleicos) y sistema esencial de transporte de nutrientes dando como resultado la desnaturalización e inactivación de enzimas y destrucción de la integridad de la membrana celular (Sani *et al.*, 2001; Cabrera *et al.*, 2006). Entre la variedad de mecanismos de protección celular que los microorganismos han desarrollado contra los metales pesados, destacan la barrera permeable, transporte activo, secuestro intracelular, destoxificación enzimática, adsorción, metilación, oxidación y reducción (Bruins *et al.*, 2000; Zahoor y Rehman, 2009). La habilidad del microorganismo a resistir la toxicidad del metal depende de la movilidad, biodisponibilidad y toxicidad de cada metal pesado (Kieu *et al.*, 2011).

2.3.2. Consorcios microbianos en la naturaleza

Los consorcios microbianos son ubicuos en la naturaleza y participan en innumerables procesos de gran importancia para el hombre, ya sea desde aquellos relacionados al tratamiento de aguas de desecho y la remediación ambiental, hasta la digestión de alimentos en el intestino (E-bac, 2000). En un consorcio los organismos realizan actividades co-metabólicas benéficas para toda la comunidad. Desde hace tiempo se sabe que los consorcios microbianos son mucho más eficientes en la degradación de residuos orgánicos complejos que las cepas de organismos individuales, o incluso que las mezclas combinadas de microorganismos con diversa capacidad metabólica (Vallejos-Ríos, 2011). Estos podrían incluir organismos proteolíticos, sacarolíticos, lipolíticos y celulósicos (son capaces de degradar las proteínas y aminoácidos; azúcares, lípidos y celulosa respectivamente). La diversidad metabólica conjunta, permite que el consorcio pueda trabajar de manera muy eficiente al degradar una variedad de complejos orgánicos sólidos (E-bac, 2000).

2.3.3. Fuentes de carbono en las BRS

La competencia por los sustratos carbonados y micronutrientes, constituye uno de los mayores retos a la supervivencia y desarrollo para las BRS ya que compiten contra otras bacterias anaerobias y aquellas aeróbicas que pueden utilizar aceptores finales de electrones al sulfato como: NO_3^- (reductores de nitrato), Mn (IV) (reductores de manganeso), Fe (III) (reductores de hierro) and CO_2 (metanógenas) (Wejima *et al.*, 2000). La termodinámica estudiada por Phifer y Col. (2001), predice que las bacterias tienen el siguiente orden con respecto al uso del aceptor de electrones: bacterias aerobias ($\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$), desnitrificantes ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), reductoras de manganeso ($\text{MnO}_2 \rightarrow \text{MnCO}_3$), reductoras de hierro ($\text{FeOOH} \rightarrow \text{FeCO}_3$), sulfato reductoras ($\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HS}^-$) y metanogénicas ($\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4$).

Distintos autores han demostrado (ver apartado 2.3) que las BRS pueden utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos como donadores de electrones, entre ellos: acetato, propionato, etanol, lactato entre otros. Sin embargo, existe una gran variedad de sustratos carbonados que se generan como desechos sólidos en las cadenas productivas de la industria alimenticia, agropecuaria y maderera, y que muchos de los cuales, no se han estudiado como fuente de este elemento para estas comunidades bacterianas. Hasta la fecha, no se tiene reportes de procesos biotecnológicos haciendo uso de BRS alimentadas con turba (peat moss). La turba es un producto empelado como abono en jardinería ya que es una mezcla de briofitas recolectadas en turberas, humedales o zonas inundadas (Zagury *et al.*, 2006), esto la hace residuo económico y abundante. Entre las consideraciones más importantes para seleccionar la fuente de carbono en un proceso biotecnológico, se encuentran: la complejidad de su estructura química y su velocidad de degradación, aunque esta última puede depender en gran medida de la concentración del sustrato; la biomasa utilizada y las características del reactor empleado (Phifer, et al., 2001). Es muy importante considerar que la actividad y eficiencia de las BSR están fuertemente relacionadas a la capacidad de otros microorganismos del consorcio microbiano para metabolizar los compuestos de alto peso molecular en compuestos de estructuras más sencillas y de fácil asimilación.

En la Figura 1, se muestra la descomposición de microorganismos que intervienen en la degradación de la materia orgánica, para que se lleve a cabo el proceso de sulfato reducción:

- ∞ Hidrólisis: es la desintegración de la materia orgánica compleja e insoluble. En este paso, los carbohidratos, proteínas y lípidos son hidrolizados a azúcares monoméricos, aminoácidos y ácidos grasos de estructuras complejas.
- ∞ Acidogénesis: las bacterias acidogénicas toman las moléculas orgánicas de la etapa anterior para convertirlas en ácidos grasos volátiles (AGV) tales como butírico, propiónico y acético entre otros.

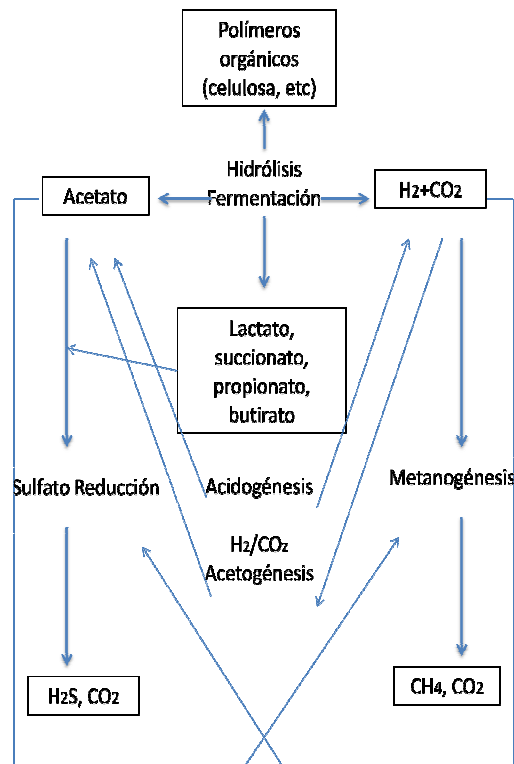


Figura 1. Diagrama de la degradación anaerobia de polímeros orgánicos (Modificado de Lens *et al.*, 2000).

- ∞ Acetogénesis: consiste en la conversión de AGV a acetato e hidrógeno.
- ∞ Metanogénesis: es la información de metano por la descarboxilación de acetato por microorganismos metanogénicos acetotróficos y por la hidrogenación de dióxido de carbono por microorganismos hidrogenotróficos.

Debido a la complejidad de los sustratos sólidos es necesario darles un tratamiento para reducir su complejidad estructural y facilitar su utilización por los microorganismos seleccionados para el proceso.

2.3.4. Biorreactores

Por definición, un biorreactor es un recipiente donde ocurre una reacción o cambio biológico (Celis-García *et al.*, 2007). Los sistemas biológicos implicados dentro de esta definición incluyen enzimas, microorganismos, células animales, células vegetales y tejidos (Wang y Zhong, 2007). El biorreactor es un lugar en el que se proporciona un entorno externo óptimo para satisfacer las necesidades del sistema de reacción biológica, de manera que se consigue un alto rendimiento del bioproceso.

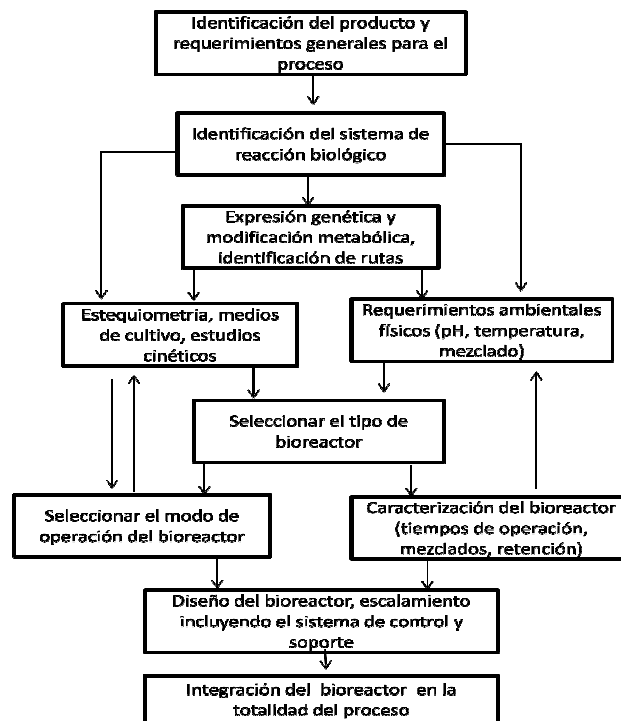


Figura 2. Representación esquemática de los procesos y alcances de la ingeniería de biorreactores (Modificado de Wang y Zhong, 2007).

Existen interacciones complejas entre el sistema biológico y los aspectos físicos y químicos de este proceso. La óptima operación de un bioproceso particular a nivel de biorreactor, hace necesario realizar intensos estudios (ver Figura 2) sobre los sistemas biológicos, tales como: el crecimiento celular y el metabolismo, la manipulación genética, y tipos de proteínas u otro producto de

expresión. Para lo cual es indispensable proveer del entorno físico y químico adecuado a las células para que el bioproceso que lleve a cabo con éxito.

Existe una gran variedad de biorreactores y distintas configuraciones (serie, paralelo, batch, continuo, semi-continuo), tales como el tanque agitado, lecho fijo, lecho fluidizado, lechos de goteo, de recirculación (Air-lift) y columna de burbujeo (Celis-García, 2007; Cirik *et al.*, 2013). Para controlar los parámetros de funcionamiento del biorreactor (nutrientes, pH, oxígeno disuelto, temperatura, etc.) es necesario favorecer las funciones deseadas de las células vivas o enzimas. El biorreactor elegido debe ser caracterizado y optimizado funcionalmente, ya que el éxito depende en gran medida de sus sistemas de control y apoyo.

En este caso, para que un sistema de tratamiento de agua remueva eficientemente los metales pesados en solución, debe considerarse la actividad reductora de sulfatos en función del: pH, temperatura, disponibilidad del sustrato orgánico como fuente de carbono, relación DQO/SO₄²⁻, concentración del metal en solución, diversidad metabólica, origen de la comunidad bacteriana y resistencia de la comunidad a los iones metálicos (Blowes *et al.* 1995; Choudhary y Sheoran 2011).

2.4. Humedales artificiales

Los humedales artificiales son áreas que se encuentran llenas de agua con plantas emergentes como espadañas, carrizos, juncos (Figura 3) que aprovechan las interacciones con los microorganismos y la atmósfera para remover la materia orgánica (Ramsar, 2006). La vegetación sirve como soporte para la formación de películas bacterianas y permite la transferencia de oxígeno. El uso de humedales artificiales se ha extendido a innumerables aplicaciones, por ejemplo, para tratar aguas municipales, industriales, agrícolas y subterráneas (Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010).

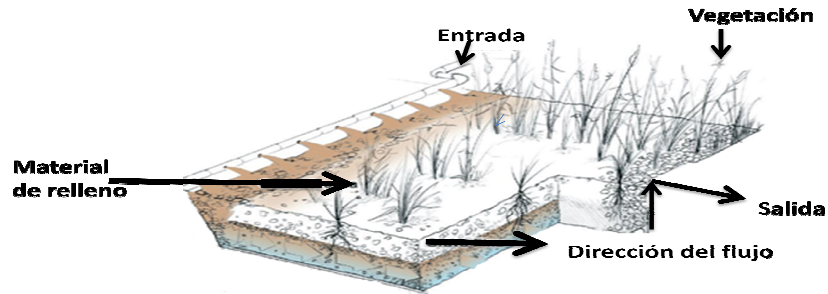


Figura 3. Esquema de un humedal artificial de flujo sub-superficial horizontal (tomado del Instituto Tecnológico de Canarias, España, 2013).

2.4.1. Tipos de humedales

Existen dos clasificaciones generales de humedales artificiales, los sistemas de flujo libre y los sistemas de flujo subsuperficial. Primeros, cuentan con el nivel de agua por arriba de la superficie del medio de soporte, el flujo de agua pasa a través de la grava y de la vegetación que puede incluir juncos, cañas, espadaña y enneas, las cuales están sembradas o fijas (Metcalf y Eddy, 1996). Los sistemas de flujo subsuperficial, son de lecho o canal que contiene un medio apropiado, la vegetación emergente es la misma que en los humedales libres. El nivel de agua e mantiene por debajo de la superficie del soporte, el agua fluye únicamente a través del lecho de grava que sirve para el crecimiento de la película microbiana, que es la responsable en gran medida del tratamiento, las raíces penetran hasta el fondo del lecho (Metcalf y Eddy, 1996).

2.4.2. Especies vegetales presentes en humedales

En los sistemas de humedales la vegetación cumple con distintas funciones entre ellas; las hojas y tallos sumergidos se degradan convirtiéndose en abono para el sistema, proveen de superficie para el desarrollo bacteriano, son un medio de filtración y adsorción de sólidos, atenúan la luz del sol y así previenen el crecimiento de algas, reducen los efectos del viento en el agua y son importantes

en la transferencia de gases para y desde las partes sumergidas de las plantas (Marchand *et al.*, 2010).

Algunas de las especies vegetales utilizadas en los distintos tipos de humedales artificiales son: *Mentha aquatica*, *Phragmites communis*, *Typha latifolia*, *Chara corallina*, *Lemna gibba*, *Juncus pallidus* (Marchand *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Para estos tipos de sistemas se pueden implementar plantas flotantes, subsumergidas o emergentes. Es posible que en un sistema se pueda implementar el uso de policultivos que puedan ser compatibles en un sistema de tratamiento. Se recomienda utilizar plantas locales del área a tratar ya que son las más aptas para sobrellevar las condiciones ambientales del lugar (temperaturas, sequías, plagas y enfermedades).

El berro (*Nasturtium officinale*) pertenece a la familia Brassicaceae (Cruciferae) o familia de la mostaza, que consta de unos 350 géneros y más de 3,000 especies (Smith, 2007). Algunas plantas conocidas comúnmente en esta familia incluyen brócoli, col y coliflor. Las Brassicaceae contienen un conjunto de compuestos glicosinolatos, conocidos como aceites de mostaza, que son característicos en la identificación de la familia (Smith, 2007). El berro (*Nasturtium officinale*) es una hierba acuática perenne nativa de Europa y naturalizada en América. Crece en las corrientes frías, cerca de manantiales, o en el suelo húmedo en riberas de los ríos, le favorece crecer en agua corriente a velocidad. Este vegetal es utilizado como ensalada verde y hierba medicinal (Howard, 1976). El valor nutritivo de esta planta proviene de su contenido de beta caroteno (vitamina A), ácido aspártico (Vitamina C), calcio, ácido fólico, hierro, yodo y fósforo. También contiene arginina, glicina, lisina, triptófano, el antioxidante a-tocoferol (Palaniswamy y McAvoy, 2001). El berro (*Nasturtium officinale*) es de libre flotación, por las raíces adventicias formadas en cada nodo, típicamente por debajo del agua. Las hojas son compuestas redondas u oblongas. Tiene pequeñas flores blancas con la corola en forma de cruz, se desarrollan en racimos alargados y florecen de abril a junio. Las frutas son silicuas con un largo promedio entre 1.27-2.54 cm y 2 semillas por

lóculo (Smith, 2007). Existen diversas variedades de berro (*Nasturtium officinale*), dependiendo de su uso gastronómico y de las condiciones del ecosistema en el que se cultiven. Las más significativas son:

- ∞ De hoja fina: de conservación difícil, su sabor presenta menor intensidad.
- ∞ Carnoso: fuertes tallos y hojas gruesas, carnosas. Con mayores cualidades para su conservación, es comestible toda la planta.
- ∞ Gros Noir o Gros vert: cultivado en Inglaterra.
- ∞ Boulanger: debido a que sus hojas son muy anchas, es una variedad utilizada habitualmente en ensaladas. Su cultivo se encuentra muy extendido en Francia.
- ∞ Piquard: hojas de gran rendimiento aunque pequeñas, excelente en purés y sopas.
- ∞ Berro, Lépedo o Mastuerzo (*Lepidium sáativum*). Parecido a una gramínea, de tallos erectos cercanos a los 60 centímetros, de sabor picante, similar a la mostaza.

El berro (*Nasturtium officinale*) puede tolerar una amplia gama de condiciones de luz y sombra. En condiciones óptimas logrando la fotosíntesis entre 300 a 1.000 mol m⁻² s⁻¹, con un buen rango objetivo entre 200 a 500 mol m⁻² s⁻¹. Las intensidades de luz por debajo de 100 mmol m⁻² s⁻¹ es poca luz, las plantas acuáticas tienen un punto de compensación mínima requerida entre 15 a 85 mol m⁻² s⁻¹ para seguir con vida (Pushak, 1997). Requiere una alta cantidad de nitrógeno y crece mejor en un rango de pH de 4.3 a 8.3, se favorece su crecimiento a temperaturas entre 20 - 28 °C (Simon *et al.*, 1984), su crecimiento es directamente proporcional a la cantidad de nutrientes en el agua (Schorer *et al.*, 2000). El berro comercial se propaga a través de semillas o por cortes en las extremidades. En el primer método, las semillas germinan después de 5 a 10 de la siembra, y a diferencia de la segunda metodología, es la estrategia de elección debido al bajo riesgo de propagación del virus del mosaico del nabo, a diferencia cuando se propaga por cortes en las extremidades (Palaniswamy y McAvoy, 2001). La cosecha del berro se realiza cuando la planta alcanzan una altura de 18

cm alrededor del día 35 (en verano) y 50 (en primavera y otoño) o de 6 a 7 semanas después de la siembra (Palaniswamy y McAvoy, 2001). La cosecha se realiza en intervalos de 15 a 30 días.

Sin embargo, su crecimiento puede verse mermado por la presencia de algunas plagas tales como la cochinilla (*Armadillidium vulgare*) la cual se come parte de la plantas, algas, lenteja de agua, manchas foliares producidas por *Cercospora sp*, virus de la mancha amarilla, artrópodos terrestres (*Gammarus pulex*), ácaros ciclamen (*Steneotarsonemus pallidus*) trematodos hepáticos, y varias especies de áfidos (Smith, 2007).

2.4.3. Mecanismos de acumulación y asimilación de nutrientes en plantas

Los compuestos son transportados en forma de iones a la raíz de la planta, debido a que, en la transpiración de las plantas se genera un gradiente que permite el flujo hacia la raíz, es como ocurre principalmente el mecanismo de absorción de nutrientes al interior de la planta (Ca^{2+} , Mg^{2+} , NO_3^- , Cl^- y H_3BO_3). Tal flujo de nutrientes, es dependiente de una serie de variables físico-químicas relacionadas al suelo, como la textura, pH, humedad y temperatura, así como del grado y distribución del sistema radicular de la misma planta o la naturaleza química y solubilidad de los compuestos a transportarse (López, 2009). La rizósfera (área de suelo alrededor de la raíz) contiene usualmente una baja cantidad de nutrientes. Hecho que por sí solo genera la formación de un gradiente de concentración y como consecuencia, la migración de minerales como el potasio o el fósforo del suelo hacia la raíz a través del fenómeno de difusión. En suelos de pH ácido, esta difusión resulta más eficiente que en condiciones alcalinas. Asimismo, debido a que existe una estrecha relación entre la absorción de nutrientes y el volumen de la raíz, no existe duda que las asociaciones micorrízicas (simbiosis entre vegetales y especies fúngicas) pueden favorecer substancialmente el desarrollo de biomasa radicular y por lo tanto, la propicia nutrición y crecimiento de la planta (Calvente *et al.*, 1999).

Los iones alcanzan la zona de absorción de la raíz por difusión a través de la solución salina del suelo, son arrastrados por el movimiento del agua hacia la raíz o entran en contacto con las zonas de absorción a medida que la raíz crece (Fernández y Maldonado, 2000). Las raíces capturan a los metales hidratados o a los complejos metal-quelante por medio de sistemas de transporte de bombas primarias, canales iónicos y transportadores. Dentro de las células los metales son quelados principalmente por fitoquelatinas; el exceso de metales es transportado a la vacuola vía el xilema principalmente por la histidina y ácido cítrico. Después de penetrar al apoplasto de las hojas, los metales se distribuyen dentro de las células, manteniendo en cada organelo las concentraciones dentro de rangos específicos (Clemens *et al.*, 2002).

2.4.4. Remoción de metales pesados por plantas

El uso de cualquier tipo de humedal para remover nutrientes, sólidos suspendidos, patógenos y compuestos inorgánicos es relativamente reciente, ya que se comenzó en los años 80's (Campbell, 1999). No obstante, aunque hasta el día de hoy persisten muchas interrogantes sobre la amplitud restauradora de los humedales construidos, no queda duda que los metales pesados, son removidos exitosamente por estos sistemas mediante fenómenos de adsorción, precipitación y acomplejamiento. Definitivamente, la presencia de macrofitos en el humedal favorece su homeostasis, ya que la inclusión de restos orgánicos y oxígeno, estimulan comunidades microbianas específicas y su capacidad para oxidar metales en el entorno de su rizósfera (Cooper *et al.*, 1996; Kadlec *et al.*, 2000).

La adsorción y el intercambio catiónico contemplan la retención de partículas o de sustancias disueltas en la solución ya sea en la planta o la superficie de la matriz. En una solución, la reacción de intercambio catiónico ocurre cuando los iones metálicos cargados positivamente, se unen a los grupos funcionales con cargas negativas de la superficie del material adsorbente (como los de tipo carboxilo - COOH⁻ presentes en los ácidos de los suaves tejidos

radiculares (Kadlec *et al.*, 2000). Skousen y Col. (1994), señalan que la simple colocación de turba o aserrín en el humedal, es suficiente para remover por adsorción, entre el 50-80 % de los iones metálicos en solución. Lo anterior, debido en gran parte a la extensa área superficial que abarcan estas partículas y sus grupos funcionales que interaccionan con los iones metálicos.

Dentro del humedal, se conforman macro y microambientes tanto aeróbicos como anaeróbicos, cuya diversidad bacteriana difiere significativamente entre sí. Las bacterias que oxidan metales se ubican regularmente en la zona aeróbica, donde ocurre su precipitación en forma de óxidos, mientras que las bacterias sulfato reductoras se encuentran presentes en las zonas anaerobias donde causan esta precipitación en forma de sulfuros metálicos (Choi *et al.*, 2006). Los dos procesos más importantes para la oxidación de un metal y poder removerlo son por la acción de *Thiobacillus ferrooxidans* y la precipitación subsecuente del oxi-hidróxido del hierro. La desventaja de la oxidación es que produce iones de hidrógeno, provocando aumento de acidez.

La reducción de sulfato por medio microbiano consume iones de sulfato y produce hidrógeno sulfuroso y alcalinidad (ver apartado 2.3). El H_2S se disuelve e ioniza para liberar iones sulfuro, los cuales reaccionan con los iones del metal en solución y produce precipitados metálicos. La precipitación de metales en forma de sulfuros, tiene ventajas adicionales, entre las que se incluyen: la reducción de acidez en el medio; y la contención de precipitados en el reactor durante periodos con excesivos influentes debido a que los complejos formados precipitan más rápido, son más densos y difíciles de arrastrar. La acumulación de metales en la parte aérea y raíz de las plantas dependerá de la disponibilidad, la especie vegetal a utilizar, las propiedades fisicoquímicas del metal, toxicidad y variables ambientales (Violante *et al.*, 2010).

2.4.5 Diseño de humedales

El diseño hidráulico de un humedal se basa en un flujo a pistón uniforme que pasa a través de la sección del humedal sin canales preferenciales. Un diseño válido requiere tener en cuenta consideraciones hidráulicas, y de eficiencia de remoción. El contaminante que requiera la mayor área para su remoción, será el factor limitante en el diseño y controlará el tamaño del humedal. Una vez conocida el área, las ecuaciones térmicas pueden ser usadas para estimar la temperatura del agua en el humedal y luego, realizar cálculos hidráulicos para determinar la relación final (largo/ancho) y la velocidad de flujo. Uno de los aspectos fundamentales en el diseño y operación de un humedal de flujo sub-superficial, es la consistencia que requiere la magnitud del caudal a lo largo de todo el periodo de funcionamiento. Lo cual, solo es posible a través de un cuidadoso diseño hidráulico y los esquemas apropiados de construcción. El flujo a través del humedal debe superar la resistencia por fricción generada por las raíces, plantas y sólidos acumulados. La mejor solución referente de construcción, es proveer al humedal de un fondo con una pendiente suficiente para permitir un buen drenaje cuando amerite y una salida de altura variable con el nivel del agua.

Un diseño conservador debe asumir que no existen pérdidas por filtración y adoptar una estimación razonable de las pérdidas por evapotranspiración y ganancias por lluvias de los registros históricos del lugar. Esto requiere una primera suposición del área superficial del humedal para poder calcular el agua extra que entra o sale. Por lo general se asume que el caudal de entrada y salida son iguales. El tiempo de retención hidráulica en el humedal puede ser calculado por medio de las ecuaciones 3 y 4:

$$t = \frac{L.W.y.n}{Q} \quad (3)$$

Dónde:

L = Largo de la celda del humedal, m.

W = Ancho de la celda del humedal, m.

y = Profundidad de la celda del humedal, m.

n = Porosidad, o espacio disponible para el flujo del agua a través del humedal, porcentaje expresado como decimal.

Q = Caudal medio a través del humedal, m³/d.

Q_e = Caudal de salida, m³/d.

Q_o = Caudal de ingreso, m³/d.

$$Q = \frac{Q_e + Q_o}{2} \quad (4)$$

La relación largo-ancho tiene una gran influencia en el régimen hidráulico y en la resistencia al flujo del sistema. En teoría, grandes relaciones largo/ancho=10 o superiores asegurarían un flujo a pistón, pero tienen el inconveniente que en la parte alta se desbordan debido al incremento en la resistencia al flujo causado por la acumulación de residuos de vegetación, principalmente en sistemas de flujo libre, por tanto, relaciones de 1/1 hasta aproximadamente 3/1 ó 4/1 resultan aceptables.

El caudal de agua en un humedal de flujo libre es descrito por la ecuación de Manning definido en flujos de canales abiertos. La velocidad de flujo en el humedal es descrita por la ecuación 5 depende de la profundidad el agua, de la pendiente de la superficie del agua y de la densidad de la vegetación. Otras aplicaciones de la ecuación de Manning para canales abiertos suponen que la resistencia por fricción solamente ocurre en el fondo y en las paredes del canal.

$$L = \left[\frac{As \cdot y^{8/3} \cdot m^{1/2} \cdot 86400}{a \cdot Q} \right]^{2/3} \quad (5)$$

Dónde:

Q = Caudal, m³/d.

W = Ancho de la celda de humedal, m.

As = Área superficial de la celda de humedal, m².

L = Longitud de la celda de humedal, m.

m = Pendiente del fondo del lecho, % expresado como decimal

y = Profundidad del agua en el humedal, m.

a = Factor de resistencia, s.m^{1/6}

a = 0.4 s.m^{1/6} para vegetación escasa y >40 cm.

a=1.6 s.m^{1/6} para vegetación moderadamente densa con profundidades de agua residual de y=30 cm.

A= 6.4 s.m^{1/6} para vegetación muy densa y capa de residuos, en humedales y <30 cm¹.

Una relación largo-ancho ≤ 3:1 suele ser la mejor selección desde el punto de vista costo-eficiencia, pero otras combinaciones de longitud y gradiente hidráulico son posibles también de modo que se pueda ajustar la forma del humedal al sitio y su topografía.

El valor de la pendiente (m) usado en la ecuación, está típicamente entre el 10 y 30% de la pérdida de carga disponible. La máxima pérdida de carga disponible es igual al total de la profundidad del agua (y) del humedal cuando m=100%.

La temperatura es un parámetro muy importante en el diseño de humedales independiente del tipo de humedal, ya que las condiciones de temperatura afectan las actividades físicas y biológicas en el sistema. Se dice que cuando las temperaturas son muy bajas la capacidad para remover nitrógeno disminuye

considerablemente. En la Tabla 1 se muestran algunos de los parámetros a considerar en el diseño y construcción de un humedal artificial.

Tabla 1. Resumen de criterios de diseño para humedales construidos (modificada de Whittar, 1993)

| Variable | Consideración |
|-----------------------------|---|
| Profundidad de agua (cm) | <45 |
| Número de células | Múltiples |
| Relación largo × ancho | >4 :1 |
| Velocidad de flujo (pies/s) | 0.1 - 1 |
| Tiempo de retención (días) | 0.25 - 75 |
| Sustratos | Rocosos, hongos, composta, turba, aserrín, estiércol y fertilizante |

3. Justificación

En la actualidad existen diversos contaminantes que han sido considerados como prioritarios para su tratamiento o eliminación de los ecosistemas. Los metales pesados entran en dicha clasificación; son compuestos con alto peso molecular a los cuales no se les puede modificar su composición química, la única forma de tratarlos es cambiando su estado de oxidación o bien extraerlos del ecosistema. Estos contaminantes tienen la facilidad de acuerdo a sus características fisicoquímicas de moverse por distintas matrices ambientales y pueden llegar a bioacumularse en distintos organismos vivos. Está comprobado que algunos de los metales pesados son altamente tóxicos, clasificándolos como teratogénicos y carcinogénicos (Leónard y Gerbe, 1996). En la actualidad existen diversas tecnologías para minimizar el impacto de los metales pesados en la biosfera. Estos se basan en procesos físicos, químicos y biológicos. Sin embargo las dos primeras generan una elevada cantidad de subproductos los cuales tienen que ser tratados por procesos secundarios o en su defecto pueden llegar a ser más tóxicos.

La apremiante necesidad de generar tecnologías biológicas para la restauración de ambientes contaminados por metales pesados, en conjunción con el estado actual del conocimiento sobre la operación de biorreactores empacados de flujo ascendente a base de bacterias anaerobias reductoras de sulfatos y el diseño de humedales artificiales de flujo horizontal sub-superficial aerobios, acondicionados con especies vegetales capaces de acumular o estabilizar iones metálicos tóxicos, y la carencia de estudios sobre el acoplamiento de dos sistemas de tratamiento como los antes mencionados generaron el interés de configurar ambos procesos en paralelo.

4. Objetivo General

Implementación de bioprocesos sustentables para la remoción de plomo (II) y cromo (Cr) en aguas de desecho y suelo contaminado.

4.1. Objetivos Específicos

- ∞ Establecer el consorcio bacteriano como fuente de inoculó para el bioproceso.
- ∞ Desarrollar un proceso para la hidrólisis de turba a formas asimilables para el consorcio bacteriano.
- ∞ Establecer el proceso de generación de sulfuro de hidrógeno como agente precipitante.
- ∞ Diseñar del reactor continuo de flujo ascendente y establecimiento de las condiciones de operación para estabilizar Pb (II) y Cr (VI) en solución.
- ∞ Seleccionar el material vegetal para el estudio, evaluando su capacidad de acumular y/o estabilizar en un sistema batch.
- ∞ Determinar la concentración máxima tolerable de Pb (II) y Cr (VI) para el material vegetal.
- ∞ Diseño del humedal artificial y establecer las condiciones de operación para remover Pb (II) y Cr (VI) en solución.
- ∞ Evaluación de la estabilidad y eficiencia del sistema para la remoción de Pb y Cr total.

5. Materiales y Métodos

5.1. Consorcio reductor de sulfatos (CRS)

5.1.1. Aislamiento de consorcios

Los consorcios bacterianos reductores de sulfatos utilizados en este estudio, fueron obtenidos a partir de un sitio urbano céntrico en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México. Este sitio comprendía 55 hectáreas donde operó una industria minera desde finales del siglo XIX hasta 1993. Del sitio seleccionado, se tomaron 10 muestras de suelo en noviembre del 2010 para determinar la concentración de metales totales y para el aislamiento de los consorcios entre 0-5 cm y 5-10 cm de profundidad, en las cuales se trató de preservar las condiciones anaerobias al colocarlas dentro de bolsas plásticas y eliminar la mayor cantidad de aire para luego transportarlas al laboratorio. De cada muestra se introdujo 1 g de suelo en un tubo de ensayo con tapón de rosca conteniendo el medio de cultivo Postgate modificado: NH_4Cl (1g/L), KH_2PO_4 (0.5 g/L), Na_2SO_4 (4.5 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.04 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.06 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.004 g/L), citrato de sodio (0.6 g/L), ácido ascórbico (0.1g/L), lactato de sodio (2.3 mL/L), acetato de sodio (2.5 g/L), extracto de levadura (1.0 g/L) a pH 7, y se incubaron por 30 días a 35°C. Después de este periodo los tubos que presentaron una coloración negra se tomaron como indicadores de la presencia de comunidades microbianas sulfato reductoras capaces de precipitar iones metálicos. De estos, se tomó 1 mL del sobrenadante para inocularlo en sistemas estáticos tipo batch que consistieron en botellas serológicas de 120 mL de volumen con septa de polietileno de alta densidad y conteniendo 117 mL de medio de cultivo Postgate modificado ajustado a un potencial de hidrógeno (pH) 7 con HCl o NaOH 0.1 M, los cuales se incubaron a 35°C durante 30 días. La actividad reductora de sulfatos (ARS) de los consorcios bacterianos aislados fue cuantificada mediante la producción de sulfuro de hidrógeno (Cord-Rowish, 1975) y en base a esta variable se seleccionaron los

cuatro consorcios de mayor actividad para subsecuentes ensayos. En este caso, los experimentos se realizaron por duplicado.

5.1.2. Selección del consorcio reductor de sulfato

Como se menciona en el apartado anterior los consorcios C1 al C8 se volvieron a las mismas condiciones ya mencionadas en medio Postgate y se eligió el consorcio de trabajo. Se consideraron parámetros tales como: tiempo duración de la fase lag, mayor producción de H₂S (q) y velocidad de producción de H₂S (q_{max}). El experimento se realizó por triplicado.

5.1.3. Sustrato orgánico

La turba (TB) comercial usado comúnmente como acondicionador de suelo de jardín (ver anexo 2) fue tratado con HCl a distintas concentraciones (20, 60 y 80% v/v) durante diferentes tiempos (10, 20, 30 y 60 min) a temperatura ambiente. Esta hidrólisis ácida se detuvo mediante la adición de NaOH concentrado hasta alcanzar un valor de pH 7 ± 0.3 , seguido de una centrifugación a 2500 rpm por 10 min. Los residuos orgánicos generados en los diferentes tratamientos fueron secados a 50°C por 48 h en una estufa de convección, esterilizados en autoclave a 121°C por 15 min y luego almacenados en frascos de polietileno para su posterior uso como fuente de carbono por los consorcios bacterianos seleccionados tanto en los sistemas batch como en los experimentos con el biorreactor de flujo continuo. En ambos casos, se evaluó la producción de H₂S como índice de la eficiencia del tratamiento.

5.1.4. Afinidad al sustrato y pH

La afinidad del consorcio C5 por el sustrato empleado como fuente de carbono (turba pre-tratada, TBT) se midió en experimentos de 31 días de duración que incluyeron tratamientos con distintas concentraciones (175, 359, 525, 700 y

1400 mg/L) de TBT: incorporado en el medio salino de crecimiento: NH_4Cl (1 g/L), KH_2PO_4 (0.5 g/L), Na_2SO_4 (4.5 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.04 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.06 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.004 g/L), ácido ascórbico (0.1 g/L) y $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2\text{S}$ (0.1 g/L) el cual se ajustó a pH 7. Asimismo, se evaluó durante 38 días el comportamiento del consorcio C5 en distintos valores de pH (4.5, 6.0, 7.0 y 7.5) empleando 800 mg/L de TBT como fuente de carbono. En ambos casos, la biomasa inicial consistió en una concentración de inóculo conocida, la temperatura de incubación se mantuvo constante a 35°C y se cuantificó a lo largo del tiempo la producción de H_2S . Los experimentos se realizaron por triplicado.

5.1.5. Adsorción de metales sobre la turba pre-tratada

Para determinar cinéticas de adsorción del Pb (II) y Cr (VI) sobre la turba sin tratamiento (TB) y la turba pre-tratada (TBT) se pesaron 0.2 g de la turba en matraces Erlenmeyer por triplicado y 50 mL de solución de Pb (II) y Cr (VI) a concentraciones de 5, 50 y 100 mg/L a pH 5, manteniendo una velocidad de agitación de 200 rpm y 25°C. Se tomaron 2 mL de cada solución al tiempo: 0, 3, 6, 9, 15, 30, 60, 120 y 1440 min. La solución se filtró (No. poro 0.2 μm) y acidificó con HNO_3 para su posterior análisis por espectrometría de absorción atómica (EAA) (GBC, modelo 932 AA). Las sales metálicas empleadas en todo el trabajo experimental fueron $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y CrK_2CrO_4 respectivamente.

5.1.6. Efecto del plomo (II) y cromo (VI) sobre la actividad reductora de sulfato

En el sistema batch se evaluó la ARS como H_2S producido por el consorcio C5 en medio salino ajustado a pH 4 y enriquecido con 740 mg/L de TBT en respuesta a un gradiente de concentraciones de Pb (200, 500, 800, 1100, 1300 y 1500 mg/L) y Cr VI (5, 15, 30, 40 y 80 mg/L). Todos los experimentos realizados por triplicado se mantuvieron a 35°C durante 30 días.

5.1.7. Operación del biorreactor

Se diseñó un biorreactor (BR) de flujo ascendente empacado con dimensiones de 60 cm de altura, 4.6 cm de diámetro interno y capacidad de 520 mL; equipado con tres puertos de muestreo separados entre sí por una distancia de 15 cm (ver anexo 2). El flujo de entrada se mantuvo constante mediante el uso de una bomba peristáltica a 0.5 L/h. El material empacado dentro de la columna fue polietileno reciclado (con un área superficial total de 1700 cm²), previamente lavado y esterilizado para eliminar interferencias.

El funcionamiento del BR se dividió en dos fases: a) acondicionamiento y b) trabajo. En la primera fase se inocularon 1.49×10^8 células/mL del consorcio C5 y se adicionaron 6.2 g de TBT como fuente de carbono y se hizo recircular medio salino a pH 5 para promover el crecimiento bacteriano. El tiempo de retención hidráulico (TRH) establecido fue de 1.04 h. Para mantener constantes las condiciones de temperatura a 35 ± 3 °C se acondicionó una incubadora (Napco, model 320) donde se introdujo el BR y se mantuvo allí durante 20 días. A lo largo de este experimento se determinó el pH y el potencial óxido reducción (POR) en los tres puertos de muestreo. Transcurrida la fase de acondicionamiento, se prepararon 3L de solución salina enriquecida con 1520, 10 y 50 mg/L de SO₄²⁻, Cr (VI) y Pb (II) respectivamente. Se operó el biorreactor bajo las mismas condiciones de pH y temperatura previamente mencionadas. En este caso el tiempo de operación fue de 180 h. Al efluente se le determinó: pH, POR, demanda química de oxígeno (DQO), SO₄²⁻, Pb y Cr (ver anexo 1).

5.2. Humedal artificial

5.2.1. Elección del material vegetal

El material vegetal empleado al inicio del estudio, consistió en las especies de berro (*Nasturtium officinale*) y hierbabuena (*Mentha sp.*). Se adquirieron plantas de entre 8 y 15 cm de longitud en un supermercado local, las cuáles no contaban con raíces, por lo que fue necesario promover la propagación de las raíces mediante un enraizador comercial (super TRON) de siguiente composición porcentual (%): 6 N; 4 K; 8 Ca; 2 Zn; 1 ácidos húmicos; 20 activadores biológicos y 59 de enzimas orgánicas inertes. Posteriormente las plantas se colocaron en un recipiente con agua por 25 y 15 días la hierbabuena y el berro respectivamente, hasta se observó la propagación de raíces.

En un recipiente de polietileno de 1L se trasplantaron tres plantas de berro (*Nasturtium officinale*) y adicionaron 100 mg Pb/L ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) en un volumen de 200 mL empleando agua potable para consumo humano y 500 g de sustrato rocoso como soporte. En otro recipiente con similares adiciones a las antes mencionadas, 50 mg Cr/L (K_2CrO_4). El mismo procedimiento se empleó para la hierbabuena (*Mentha sp.*) pero colocando cuatro plantas por recipiente y ambos sistemas se prepararon por duplicado. A cada recipiente se le colocó en la parte superior una cubierta plástica con orificios que permitieran el crecimiento de las plantas.

Durante el transcurso de este experimento, cada 2 o 3 días se hizo la reposición del agua perdida para tratar de mantener el volumen inicial de 200 mL. Se utilizaron dos controles para cada tipo de planta; uno descubierto y otro cubierto con plástico para distinguir la pérdida de agua por evaporación y evapotranspiración respectivamente. Los tratamientos se mantuvieron a 25°C con un fotoperiodo de 24 h durante 10 días dentro de una cámara ambiental (Lab-Line Instruments, INC, Biotronette Mark III). Cada planta fue pesada y su longitud

medida al inicio y final del experimento. Transcurrido el periodo experimental, las plantas fueron lavadas con agua destilada para eliminar el metal adsorbido en la superficie de estas. Posteriormente, se separaron las hojas, tallos y raíces y fueron secadas inicialmente por 48 h a 25 °C seguido de un secado a 50 °C por 24 h.

Para la cuantificación total de metales (Cr y Pb) se pesaron aproximadamente 200 mg de muestra seca para cada fracción de biomasa (raíz, tallo y hoja) y se sometieron a una digestión ácida con H₂O₂/ HNO₃ (3:10) a 85 °C por 10 min, posteriormente se filtró y aforó a 10 mL para su posterior cuantificación por Espectrometría de Absorción Atómica (EAA, GBC Mod. 932AA). El porcentaje de crecimiento de las plantas se determinó por la diferencia de la biomasa inicial y final causada como respuesta a la exposición del metal. La evaporación y evapotranspiración de estos experimentos, fue calculada por diferencia del volumen inicial y el añadido (200 mL) en los días donde se repuso el agua.

5.2.2. Condiciones de crecimiento y mantenimiento del material vegetal

Para los experimentos de germinación se emplearon semillas de berro (*Nasturtium officinale*) que fueron adquiridas de un establecimiento en el Estado de México, México. Las semillas fueron germinadas dentro de una caja Petri por 10 días bajo condiciones de distintos fotoperiodo 0, 16 y 24 h de luz a 25 ± 3 °C en un filtro humedecido con agua destilada y solución nutritiva denominada L-C (López-Chuken, 2005) que contiene (g/L): 101 KNO₃; 27.2 KH₂PO₄; 98.6 MgSO₄·7H₂O; 295 Ca(NO₃)₂· 4H₂O; 1 NH₄Cl; 4.5 Na₂SO₄; 0.06 CaCl₂; 1.3 FeSO₄·7H₂O; 0.2 ZnSO₄·7H₂O; 0.08 CuSO₄·7H₂O. Para los experimentos de hidroponía y el humedal artificial se adquirieron plantas de berro (*Nasturtium officinale*) de aproximadamente 10-15 cm y se trataron como se indica en el apartado 5.2.1.

Los tallos de las plantas se sumergieron por 10 min en la solución enraizadora (1:10 V/V) y se colocaron en una bandeja plástica que contenía solución nutritiva L-C. El pH de la solución se mantuvo a 5 ± 0.2 por titulación con soluciones de HCl o NaOH (0.1M) cuando fue requerido. El crecimiento de las plantas se realizó bajo condiciones controladas en una cámara climática (Biotronette Mark III) bajo un fotosistema con un flux de densidad de $270 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}^2$, y un fotoperiodo de 16/8 h luz-obscuridad, temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ y aireación continua. Transcurrido el tiempo se seleccionaron las plantas en mejores condiciones fisiológicas para los posteriores experimentos.

5.2.3. Efecto de los metales pesados sobre la germinación de semillas de berro

Las semillas fueron germinadas (15 por tratamiento) bajo condiciones de obscuridad a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ en un filtro humedecido con agua destilada dentro de una caja Petri por 10 días. a) control con agua destilada; b) soluciones de plomo (0, 5, 20, 70, 120, 220 mg/L); c) soluciones de cromo (VI) (0, 5, 10, 30, 90, 150 mg/L); y d) soluciones acidas o alcalinas (pH: 3, 4, 7, 6, 7 y 8). Al término del experimento, se cuantificó el porcentaje de germinación, la longitud y número de raíces, así con la longitud y ancho de cotiledón en cada plántula de acuerdo a lo propuesto por Tenent (1985). La velocidad de crecimiento relativo se calculó de acuerdo a lo descrito por Mitchell y Tur (1975). El experimento se realizó por sextuplicado

5.2.4. Comportamiento del berro (*Nasturtium officinale*) en presencia de Pb (II) y Cr (VI)

En recipientes plásticos de 1L se colocaron 3 plantas de 10 cm de longitud (3 por tratamiento) con solución nutritiva L-C, por duplicado y distintas concentraciones monometálicas de Pb (II) y Cr (VI) 3, 6, 12, 15 y 20 mg/L y bimetálicas de Pb (II)-Cr (VI) (mg/L): 5-5; 10-5 y 5-10. El experimento se mantuvo por 20 y 18 días para Pb (II) y Cr (VI) respectivamente, bajo similares condiciones

descritas en el apartado 5.2.2. Cada 4 días se hizo recambio de las soluciones metálicas para evitar la concentración del metal en la solución debido a pérdidas por evaporación/evapotranspiración. Transcurrido el tiempo las plantas fueron lavadas con agua destilada para eliminar los elementos adsorbidos. Las plantas fueron pesadas y se fragmentaron en hojas, tallo, raíz y brotes (según fue el caso) y se llevaron a sequedad total (30 h a 50 °C, dentro de una estufa) para realizar la cuantificación total de metales. El análisis se realizó por triplicado. Se tomó una fracción de hoja fresca para la cuantificación de la clorofila A, B y total descrito por Lichtenthaler (1987).

Se evaluó el índice de tolerancia (IT) del berro (*Nasturtium officinale*) a Pb (II) y Cr (VI) basado en el rendimiento de la biomasa (Shi *et al.*, 2011), Ecuación 6. Donde Bt (g/planta) es la cantidad de biomasa que creció en presencia del metal y Bc (g/planta) es la biomasa del control.

$$IT = Bt / Bc \quad (6)$$

El factor de bioconcentración (FBC) representa la relación (Ecuación 7) del metal presente en la raíz y la cantidad de metal presente en la solución (Ribiero de Souza *et al.*, 2012). Es decir es la disponibilidad que tiene la planta para adsorber al metal de la solución y translocarlo en sus tejidos (Liu *et al.*, 2008). Donde C_{raíz} (mg/kg) representa la concentración del metal en las raíces y C_{sol} (mg/kg) representa la concentración del metal en la solución.

$$FBC = C_{brotes} / C_{solución} \quad (7)$$

El factor de translocación (FT) estima la disponibilidad de la planta (Ecuación 8) para translocar al metal en raíces y tallos (Liu *et al.*, 2008). Donde A_{tallo} (mg/kg) representa la concentración acumulada del metal en tallo y A_{raíz} (mg/kg) representa la concentración total acumulada en raíz.

$$FT = A_{brotes} / A_{raíces} \quad (8)$$

5.2.5. Efecto del pH sobre el crecimiento del berro (*Nasturtium officinale*)

En recipientes plásticos de 1L se colocaron 3 plantas con solución nutritiva L-C y distintos valores de pH: 5, 6, 7 y 8 ajustados con NaOH y HCl según fue el caso. Estos tratamientos y sus duplicados se mantuvieron por 25 días bajo las condiciones mencionadas anteriormente (ver apartado 5.2.2.). Cada tercer o cuarto día se tomó una muestra foliar de la planta para determinar clorofila A, B y total (Lichtenthaler, 1987). Cada planta fue medida y pesada al inicio y final del experimento para determinar la velocidad relativa de crecimiento.

5.2.6. Operación del humedal artificial

Se construyó un humedal sub-superficial de material plástico de alta densidad, con las siguientes dimensiones 85cm × 44cm × 13cm (Largo × Acho × Profundo). Se estableció una pendiente del 2% de inclinación. En el interior de este, se aplicó una cama de 5 cm de profundidad de grava con un diámetro promedio de 3 cm. La porosidad experimental en el humedal fue del 24.1%, dando un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 2.1 días y un volumen de tratamiento de 5 L. Durante los primeros 10 días del experimento, se hizo recircular la solución nutritiva L-C ajustada a pH 4, para después sustituirla con una preparación sintética, consistente en la solución nutritiva L-C complementada con Pb (II) y Cr (VI) a concentraciones de 100 y 30 mg/L, respectivamente, la cual se ajustó a pH 3 y se mantuvo en recirculación por 2 días más. A partir del día 13, dio inicio la fase experimental al sustituir nuevamente la solución sintética en el humedal artificial y sembrar 50 plantas de berro (ver apartado 5.2.2) de 10 cm de longitud. Durante un periodo de 11 días bajo las condiciones ambientales descritas en el apartado 5.2.2, se determinó el crecimiento de las plantas a través de la medición de clorofila total y se estuvo cuantificando el pH del efluente. También se determinó la concentración total de metales tanto en las plantas como el efluente. De acuerdo a la fase de acondicionamiento (2días) y de operación (11días) la concentración total que entro al humedal fue de 200 y 60 mg/L de Pb (II) y Cr (VI).

La predicción de los compuestos resultantes de la interacción entre el lecho rocoso y los metales solubles, se realizó con el software Visual Minteq 3.0. El balance total de materia para el Cr y Pb, fue calculado empleando la ecuación 9 modificada por Olmos-Márquez et al. (2010).

$$[\text{Me entrada}] = [\text{Me efluente}] + [\text{Me plantas}] - [\text{Me no cuantificada}] \quad (\text{Ecuación 9})$$

Los tratamientos control de este experimento se prepararon por triplicado usando recipientes de plástico de 1 L conteniendo 100 g de sustrato rocoso y 150 mL de agua destilada o solución sintética, además de un tratamiento similar a este último donde se incluyeron plantas y otro adicional solo con solución sintética y plantas. Las condiciones de preparación para los especímenes vegetales fueron iguales a las descritas en el apartado 5.2.1., pero en este caso, el pH de las soluciones se ajustó a 5. Después de 7 días se cuantificó la concentración de los metales tanto en las soluciones y las plantas, además de la concentración de clorofila en los tratamientos con plantas.

Las condiciones de trabajo son las mencionadas en el apartado 5.2.1. El pH de los controles se ajustó a 5 con NaOH y HCl según fue el caso. El experimento se realizó por 7 días y se cuantificó la cantidad de clorofila para cada tratamiento al inicio y final del experimento; así como la concentración de metal en berro (*Nasturtium officinale*) y matrices acuosas. El sustrato rocoso empleado fue grava de río con un diámetro promedio de 3 cm, compuesta principalmente de silicatos.

5.3. Operación del sistema biorreactor-humedal artificial

Las condiciones ambientales del humedal artificial se mantuvieron similares a las mencionadas en el apartado 5.2.6 en el cual se colocaron 85 plantas de berro (*Nasturtium officinale*). La integración de ambos procesos requirió realizar modificaciones en las condiciones individuales de operación. En este caso, el empaque empleado en el biorreactor fue cambiado por una mezcla de piedra de

río con piedra volcánica, en proporciones 50:50. El TRH fue ajustado a 0.86 h con un flujo de 10 mL/min y se inocularon 20 ml del consorcio sulfato reductor en medio de cultivo formulado con 11.7 g de TBT total. Antes de comenzar la operación conjunta, se procedió a estabilizar las condiciones del reactor mediante la recirculación de solución salina durante los 8 días previos a la inoculación. Por su parte, las condiciones del humedal artificial fueron las mismas a las previamente establecidas, pero usando 85 plantas por ensayo y un caudal de 11 y 16 mL/min influente/efluente, respectivamente. Para el acondicionamiento del humedal, se hizo recircular la solución nutritiva L-C durante 3 días.

Transcurrido las dos fases de acondicionamiento independiente para cada sistema se prepararon 10 litros de solución sintética (pH 4): solución salina + solución nutritiva L-C + iones metálicos (150 mg Pb (II) /L y 15 mg Cr (VI)/L). La solución sintética se recirculó en el sistema en paralelo por 24 h. Posteriormente se preparó nueva solución sintética y se comenzó con el experimento. El biorreactor fue operado por 42 días y el humedal artificial por 32 días. Todos los días se colectaron 10 mL del efluente del biorreactor y 10 mL del efluente del humedal artificial. Se determinó el pH y POR inmediatamente después de la colecta y se congelaron 4 mL de muestra para posteriormente analizar sulfatos, nitratos y DQO, los 6 mL restantes se acidificaron con HNO₃ para su posterior análisis de metales totales. Al terminar el periodo de operación del humedal artificial, el material vegetal se procesó y analizado de igual forma a lo explicado en el apartado 5.2.3. Terminado los 42 días de operación del biorreactor se separaron los dos tipos de sustratos rocosos y se retiró la TBT adsorbida con agua corriente. Ambos sustratos se colocaron por 24 h a 50 °C para llevar a sequedad y se pesaron, posteriormente se llevaron a 500 °C por 2 h y enfriado el sustrato se volvieron a pesar para conocer la cantidad de biomasa microbiana en cada sustrato.

5.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos fueron sometidos al análisis de varianza de una vía (ANOVA) y a la comparación de medias por la prueba de Tukey's usando el software SPSS, v. 17 (SPS, Chicago, IL, USA). Para la predicción de precipitados dentro del humedal artificial se utilizó el software Visual Minteq 3.0. Las gráficas fueron preparadas mediante el software OriginPro v. 7.0.

6. Resultados y Discusión

6.1. Consorcio reductor de sulfato

6.1.1. Selección del inóculo

Se decidió aislar microorganismos nativos de un sitio contaminado por desechos mineros, debido a ya que están adaptados a sobrevivir en la presencia de altas concentraciones de una variedad de metales. Se ha comprobado que los consorcios nativos contienen una amplia comunidad de especies microbianas capaces de utilizar fuentes complejas carbono, y así generar las condiciones reductoras necesarias para obtener una mayor resistencia a las altas concentraciones de metales tóxicos en solución (Cetin, 2008).

Las muestras de suelo contenían 14.8% de materia orgánica, resultados similares fueron reportados por Cárdenas (2010) y Grimaldo (2011) para el mismo suelo. Se cuantificó un 12.3 % de carbonatos, los parámetros antes mencionados sirven de referencia para conocer la cantidad de carbono que tenían las comunidades aisladas para realizar sus funciones metabólicas y la capacidad del suelo a amortiguar la acidez del suelo. La concentración de metales totales se observa en la Figura 4, donde se puede apreciar que en la muestras de suelo la mayor concentración de metales está relacionada a Fe, Mn y Pb. De acuerdo a la NOM-147-SEMARNAT/SAA1-2004 los límites máximos permisibles para el Pb en suelo son de 400 mg/kg y 800 mg/kg para suelos de uso residencial e industrial respectivamente, indicando que el sitio de muestreo sobrepasa los valores permitidos por la regulación ambiental en México. La concentración de cromo total en las muestras es muy baja (3mg/kg), sin embargo por sus características fisicoquímicas es un metal que causa graves problemas ambientales y de salud pública lo cual lo hace de un contaminante prioritario. Este parámetro nos indica

que los consorcios aislados serán más tolerantes a concentraciones elevadas de Fe, Mn y Pb debido a que el suelo es rico en dichos metales.

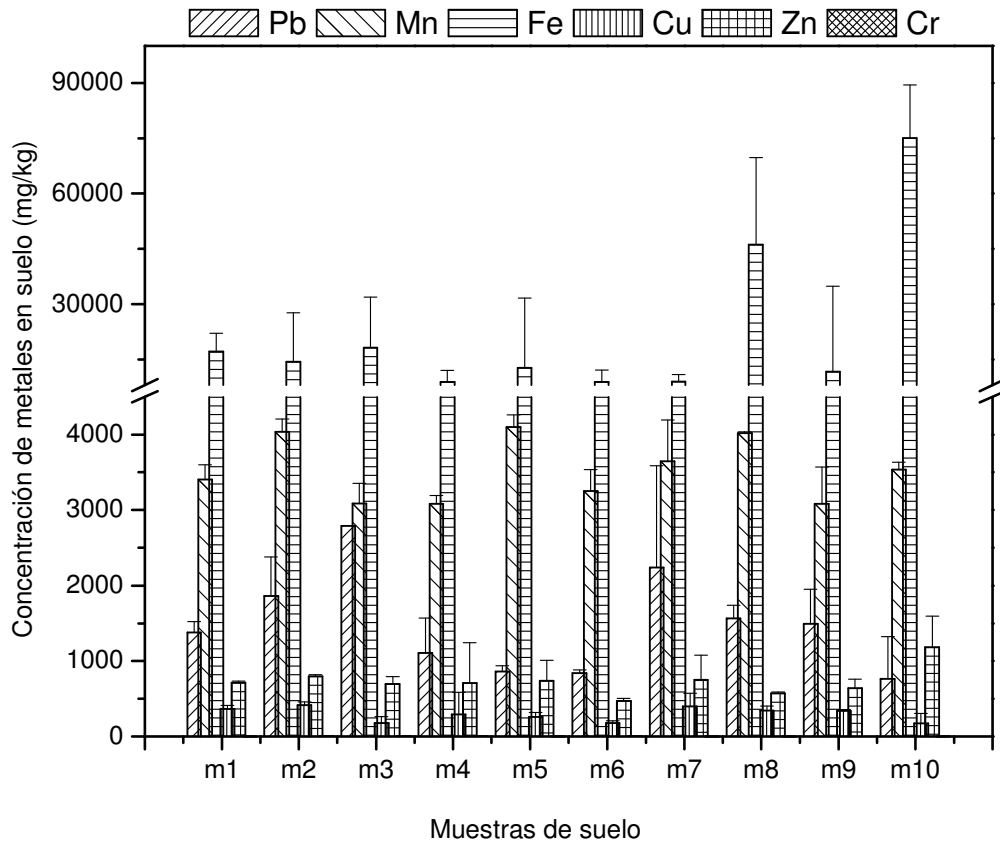


Figura 4. Concentración de metales totales en las muestras de suelo en la cual se realizaron los aislamientos bacterianos. Desviaciones estándar de 3 réplicas.

De las muestras de suelo tomadas a distintas profundidades se lograron aislar ocho consorcios sulfato reductores (denominados C1 a C8) la variable que se consideró como un indicador positivo del aislamiento fue el precipitado de sulfuro de hierro.

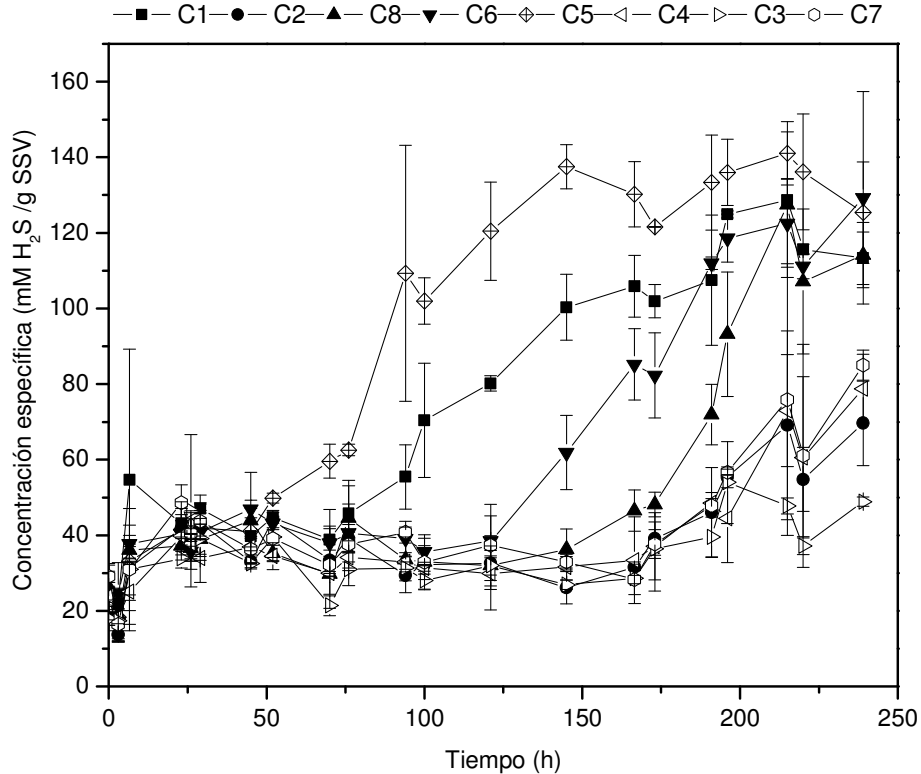


Figura 5. Concentración específica de H₂S biogénico de los ocho consorcios reductores de sulfato. Las barras representa la desviación estándar entre 2 réplicas.

En la Figura 5 se ilustra la cinética de la ARS de los ocho consorcios aislados, donde resulta evidente desde las primeras horas, la capacidad de los aislamientos C1, C5, C6 y C8, para crecer en las condiciones propicias para reducir sulfatos y producir H₂S. Por tal motivo, estos consorcios fueron seleccionados para los siguientes ensayos y el resto fueron resguardados para futuros estudios.

Para decidir con cuál de los cuatro consorcios que presentaron mayor actividad reductora de sulfato se calculó nuevamente la producción de H₂S biogénico en otro experimento bajo las mismas condiciones experimentales. Entre las variables a considerar para definir el consorcio de trabajo, se incluyeron: fase

lag, actividad reductora de sulfato y tolerancia a Pb (II) y Cr (VI) en el suelo de origen. La Tabla 2 muestra que el consorcio C5 presentó la mayor producción (235.7 mmol H₂S/g SSV) en un tiempo de 100 h, con una fase lag de 23 h, lo cual implica la integración de una comunidad compleja con la mejor capacidad para producir este metabolito de interés práctico en la remoción de metales. Este hecho se ve relacionado con las condiciones ambientales en las que fue colectado dicho consorcio a 10 cm de profundidad, se reduce la transferencia de oxígeno favoreciendo la selección natural de comunidades de BRS. Por lo anterior, este consorcio fue seleccionado como el de trabajo para los posteriores experimentos.

Tabla 2. Producción de H₂S biogénico por los consorcios bacterianos según la concentración metales (Pb y Cr) y profundidad de muestreo

| Consorcio | q_{\max} (mmol H ₂ S g ⁻¹ SSV) | Pb (mg/kg) | Cr total (mg/kg) | Profundidad (cm) |
|-----------|--|------------|------------------|------------------|
| C1 | 196.6 | 1862 ± 513 | 4.41 ± 6.3 | 0-5 |
| C5 | 235.7 | 2792 ± 143 | 3.15 ± 0.5 | 5-10 |
| C6 | 88.8 | 860 ± 8.12 | 2.22 ± 0.85 | 0-5 |
| C8 | 128.5 | 1564 ± 172 | 1.06 ± 0.62 | 0-5 |

n=3. Valor promedio ± Desviación estándar

6.1.2. Sustrato orgánico

Se ha demostrado que las BRS pueden utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos como donadores de electrones, entre ellos acetato, propionato, etanol, lactato, compostas vegetales, estiércol, residuos de madera y alfalfa. Un sustrato no reportado como fuente de carbono para estos microorganismos en procesos biotecnológicos es la turba (TB), sustrato muy utilizado en procesos de adsorción. La TB es típicamente utilizado como adsorbente por su bajo costo, de origen natural y tener una alta eficiencia de remoción de iones metálicos (Champgane *et al.*, 2008; Clyde *et al.*, 2010; Bulgariu *et al.*, 2012). Está compuesto de materia orgánica compleja (lignina, celulosa y

sustancias húmicas) en distintos estados de descomposición y con grupos funcionales (aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, hidróxidos fenólicos y esterres) que tiene la capacidad de interactuar con los cationes por procesos de superficie de adsorción, quelación e intercambio iónico (Champagne *et al.*, 2008). La TB favorece el crecimiento de comunidades bacterianas por ser un material altamente poroso y una fuente de carbono de lenta y compleja degradación. No existen reportes sobre el comportamiento de la ARS empleando TBT como una fuente de carbono.

Uno de los factores a considerar para una buena eficiencia del proceso reductor de sulfato es la fuente de carbono donadora de electrones. Para elegir una fuente de carbono sólida es necesario considerar; la complejidad del sustrato para ser degradado, la digestibilidad de los compuestos de carbono y la proporción C:N:P (Gilbert *et al.*, 2003). Debido a que la TB tiene su origen en un grupo de entre 150 a 350 especies de briófitas (De Labouyale y Mellado, 1856) y que es un sustrato orgánico complejo, se sometió a un proceso de hidrólisis para facilitar su degradación y asimilación por él consorcio.

En la Tabla 3 se muestra que no existe una relación directa entre los distintos tiempos de hidrólisis, pero si entre las concentraciones de HCl. Los parámetros cinéticos, incluidos la constante cinética de primer-orden (k), la concentración máxima de sulfuro biogénico y la velocidad específica máxima (r_{\max}) fueron determinadas por el modelo sigmoidal de Gompertz y la fase lag se calculó experimentalmente (Labastida *et al.*, 2012).

Tabla 3. Parámetros cinéticos del consorcio C5 determinados por el tiempo de exposición de la turba pre-tratada con HCl

| % HCl | Tiempo de exposición (min) | r_{max} (mmol H ₂ S g ⁻¹ SSVh ⁻¹) | k | t_c | Fase Lag (h) | R |
|-------|----------------------------|--|-------|-------|--------------|-------|
| 20 | 10 | 0.326 | 0.003 | 320.6 | 194 | 0.903 |
| | 30 | 0.157 | 0.003 | 207.7 | 123 | 0.902 |
| | 60 | 0.219 | 0.003 | 318.3 | 223 | 0.908 |
| 60 | 10 | 0.226 | 0.002 | 349.1 | 164 | 0.918 |
| | 30 | 0.326 | 0.003 | 320.6 | 147 | 0.946 |
| | 60 | 0.349 | 0.003 | 426.3 | 233 | 0.933 |
| 80 | 10 | 0.346 | 0.003 | 403.6 | 147 | 0.941 |
| | 30 | 0.337 | 0.003 | 343.1 | 91 | 0.933 |
| | 60 | 0.286 | 0.003 | 326.2 | 147 | 0.939 |

Se observó que a mayor concentración de HCl y tiempo de exposición no se encuentra una relación directamente proporcional con la producción de sulfuro de hidrógeno. Este comportamiento se explica por la diversidad metabólica y número de bacterias con distintos metabolismos específicos ya que no es posible que cada alícuota de inóculo presente la misma diversidad metabólica capaz de utilizar con la misma eficiencia TBT.

Se encontraron valores distintos de tiempo máximos de producción de sulfuro biogénico (t_c) y tiempos de fase lag. Considerando dichos factores y el factor económico, se eligió trabajar con la TBT la cual fue tratado con HCl al 20% y 10 min de contacto, ya que presentó comportamientos promedios de producción de H₂S biogénico, fase lag y tiempo máximos de producción. Una ventaja adicional consiste en que en dicho tratamiento se minimizan los costos de operación para un tentativo proceso a mayor escala posteriormente. No existen referencias de pre-tratar la turba para favorecer la actividad microbiana de un consorcio con actividad reductora de sulfatos. Este método se considera una alternativa muy viable para estimular la actividad de bacterias reductoras de sulfato durante un

proceso biotecnológico, ya que de otra manera, la turba es una fuente de lenta y difícil degradación debido a su complejidad estructural, por lo cual, la hidrólisis ácida en los tiempos y formas que aquí se documentado, favorecerá la disponibilidad carbono para las comunidades microbianas.

6.1.3. Afinidad a sustrato

La velocidad específica máxima de producción de sulfuro biogénico y la constante de afinidad a sustrato (K_s) fueron determinadas con distintas concentraciones de TBT (0.07 a 0.58 g DQO/L). La Figura 6 muestra la curva tipo Monod obtenida para el ajuste experimental, con una correlación de 0.984, donde r_{max} fue 1.13 mmol H_2S/g SSV-h y la constante de afinidad K_s fue de 740 g DQO/L. La relación DQO/SO_4^{2-} calculada fue de 0.71. De acuerdo con Sahinkaya y Gungor (2010) relaciones COD/sulfate 0.85 y 1.25 favorecen la eficiencia del proceso de reducción de sulfatos y además evitan la competencia entre comunidades metanogénicas y reductoras de sulfato por la disponibilidad del sustrato. Sin embargo, algunas SRB oxidan los sustratos completamente a CO_2 y otras incompletamente a acetato (Nagpal *et al.*, 2000). Por lo anterior se sugiere que el consorcio C5 contiene un número mayor de BRS oxidantes incompletas, que promueven la acumulación de acetato el cuál es un factor limitante para la reducción de sulfato e incluso puede llegar a ser un inhibidor (Alper *et al.*, 2009). La producción de los ácidos orgánicos generados por el sustrato y el metabolismo de BRS en forma no dissociada, son altamente tóxicos para las BRS y reducen la eficiencia de su actividad.

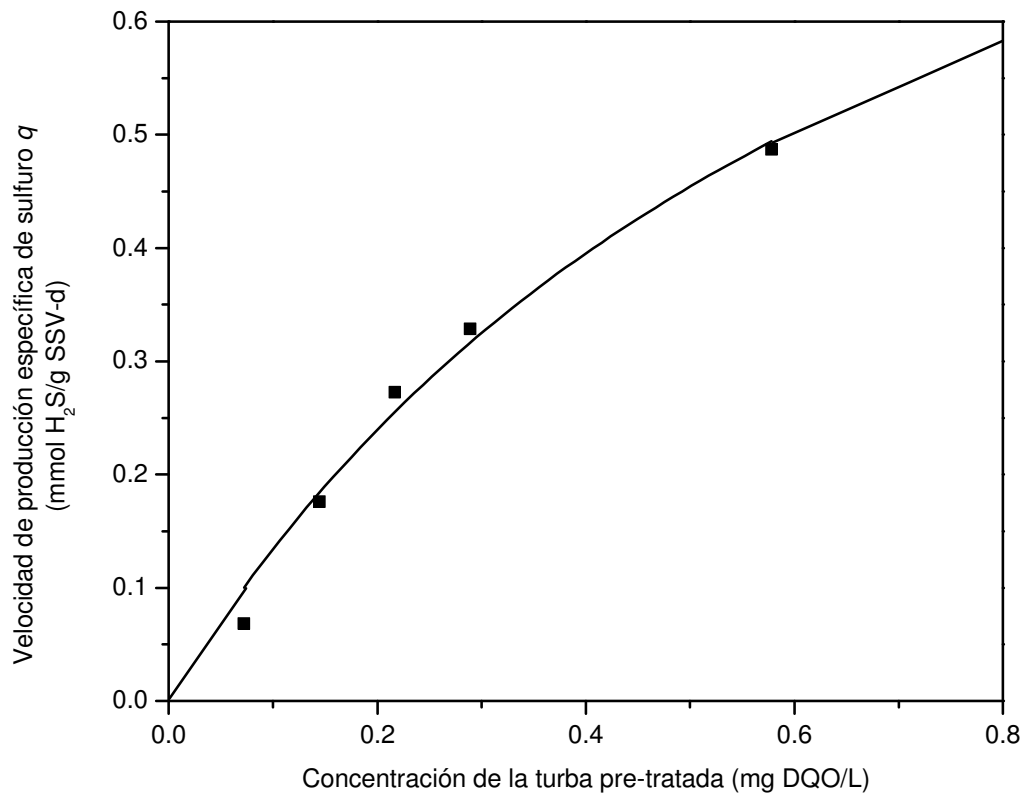


Figura 6. Velocidad de producción específica de H₂S de C5 en presencia de distintas concentraciones de TBT.

El pre-tratamiento de la turba favorece su utilización para las BRS, sin embargo es una fuente de nutrientes compleja y las comunidades bacterianas tienen que degradarla a fragmentos simples para poder ser metabolizarlos, lo que resulta en un proceso lento con fases lag muy grandes.

La TBT puede ser utilizada en los procesos de sulfato reducción como una fuente de carbono barata y accesible. Se tiene que considerar que este material es un adsorbente natural por lo que no se descarta que adsorba cierta concentración no cuantificada de sulfuro de hidrógeno biogénico.

6.1.4. pH

El pH es un importante factor a considerar para reducir el sulfato ya que puede generar que este se presente en diferentes formas tales como H_2S , HS^- y S^{2-} (Al-Zuhair *et al.*, 2008). En la Figura 7 se demuestra que el consorcio C5 presenta una mayor producción de sulfuro de hidrógeno a $\text{pH } 5 > \text{pH } 6 = \text{pH } 7 > \text{pH } 7.5 > \text{pH } 4.5$. Jiménez-Rodríguez (2009) encontró que a un pH 5.5 se mantiene constante la producción de H_2S sin efectos inhibitorios del Fe, Cu, Zn o del mismo H_2S . Estudios indican que cuando el valor es cercano a neutro el H_2S es un inhibidor de ARS ya que penetra el citoplasma y reacciona con los puentes disulfuro de la célula. Por lo tanto, la concentración de sulfuro no ionizado es una variable a tener en cuenta al aproximarse a valores neutros y a valores superiores al neutro se encuentra el H_2S en formas disociadas. En el presente estudio se observó que el consorcio C5 es más sensible a concentraciones de H_2S ya que presentó menor actividad. En el caso de valores de pH 4.5, esta toxicidad se puede deber a la especie no-disociada de sulfuro y al mismo valor de pH. Cabe resaltar que la turba presenta un pH ácido por su origen natural. Sin embargo la producción de sulfuro de hidrógeno biogénico no se ve afectada.

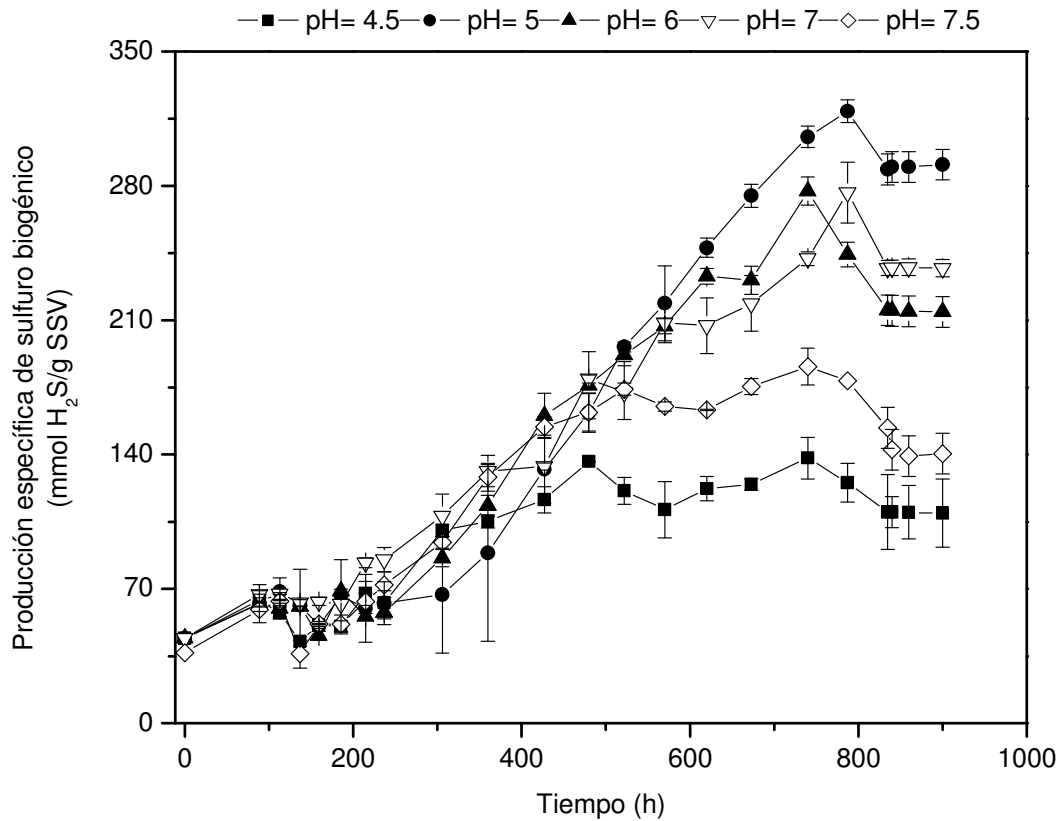


Figura 7. Producción específica de sulfuro biogénico del C5 a distintos pH. La observada es la desviación estándar $n=3$.

6.1.5. Adsorción de metales sobre la turba pre-tratada

La turba ha sido reportada como un adsorbente natural y de fácil utilización además de ser económico. La turba está compuesto de materia orgánica compleja y tiene la capacidad de interaccionar con los cationes por procesos de superficie de adsorción, quelación e intercambio iónico (Champagne *et al.*, 2008). Este comportamiento se ve claramente comprobado en la Figura 8 ya que se observa claramente que a pocos minutos de poner en contacto la solución metálica con la turba, está adsorbe más del 80% del metal en la solución. Sin importar la concentración del metal en general se observa el mismo comportamiento.

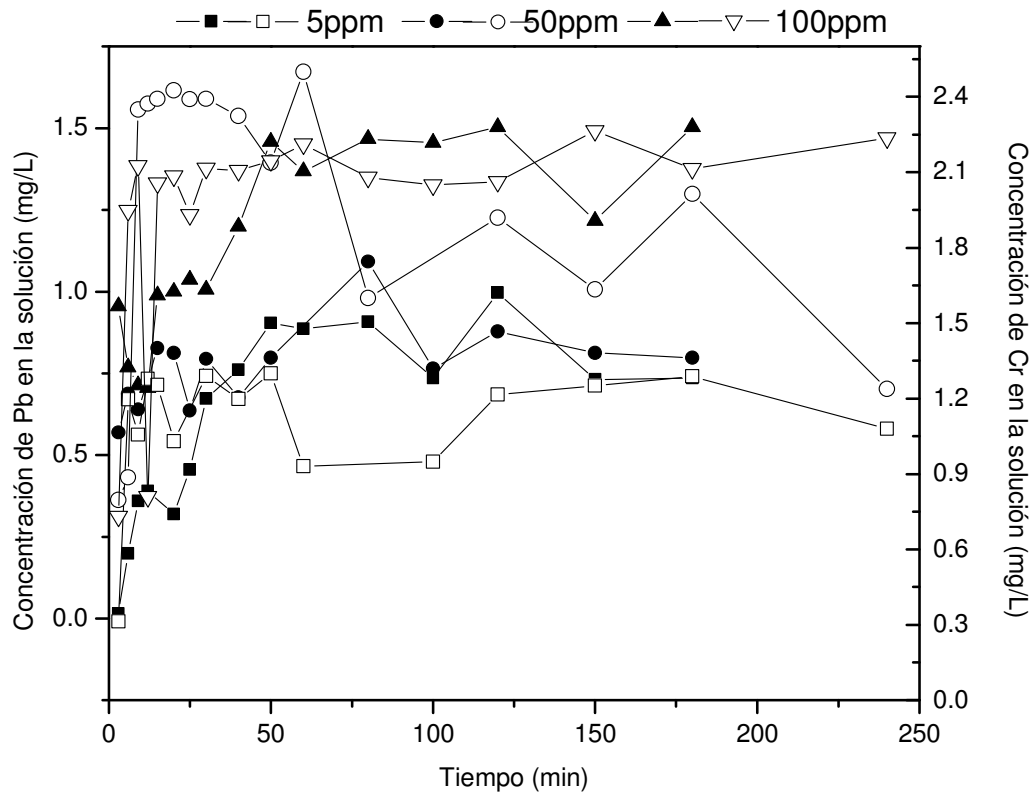


Figura 8. Concentración de (símbolos rellenos) Pb (II) y (símbolos no rellenos) Cr (total) a distintos tiempos de contacto con la turba pre-tratada.

El proceso de adsorción se considera en los siguientes experimentos de biorreactores con la finalidad de no subestimar el proceso de remoción de metales pesados por actividad reductora de sulfato. A la fecha, no existen reportes sobre la adsorción de H_2S en la turba; sin embargo de acuerdo a los grupos funcionales que forman parte de su estructura, se sugiere que puede llegar a adsorber una proporción de H_2S biogénico. Pero en el presente estudio no se considera dicha sugerencia.

6.1.6. Tolerancia de plomo (II) y cromo (VI) del consorcio reductor de sulfato

En presencia de plomo, los valores de r_{\max} decaen exponencialmente cuando la concentración del metal aumenta (Figura 9). Estas mismas tendencias donde se observa la interacción de los iones plomo con los grupos sulfhidrilos (-SH) que son inhibidos por competencia con los iones de los metales pesados que son esenciales para la actividad celular o por la formación de una barrera física causada por la precipitación del sulfuro de plomo sobre la superficie celular (Nies *et al.*, 1999; Labastida-Nuñez *et al.*, 2012).

Sin embargo, a 200 mg Pb (II)/L no se afectó la producción de sulfuro de hidrógeno, mostrando una tendencia similar al control. Este efecto del plomo se ha tratado de explicar con modelos biológicos, los cuales indican mecanismos de precipitación extracelular o intracelular causada por la interacción con la cisteína, la cual depende de grupos amino, carboxilo y tiol (Borremans *et al.*, 2001). Otros estudios han demostrado que concentraciones bajas de plomo y presencia de H₂S, pueden tener un efecto benéfico al precipitar como sulfuro metálico, además de favorecer la producción de biomasa al disminuir de la toxicidad del plomo (Utgikar *et al.*, 2002).

Los datos obtenidos a partir de la ecuación de decaimiento de primer orden, indican que a 557.5 mg Pb (II)/L se mantendría el 50% de actividad reductora de sulfato. Esta tendencia se confirma en la Figura 9, ya que traspasando el umbral experimental de 500 mg/L, el decaimiento de la actividad reductora de sulfato es considerable. La ARS disminuyó conforme se incrementó la concentración del Cr (VI), de acuerdo a la ecuación de decaimiento de primer orden a 2.6 mg/L, se reduce en un 50% la ARS. Estas mismas tendencias han sido observadas por Kieu y Col. (2011).

La diferencia entre las concentraciones inhibitorias de Pb (II) y Cr (VI) se debe a la toxicidad propia del metal sobre la célula y a las características ambientales de las cuales proviene el consorcio. Como se puede observar en la Tabla 2, las concentraciones totales de los metales en el sitio del cual fue aislado el consorcio C5, fueron de 2972 mg/kg y 3.15 mg/kg para plomo y cromo, respectivamente. Lo anterior indica que el consorcio C5 tiene una mayor tolerancia a altas concentraciones de plomo, sugiriendo que las comunidades microbianas promueven una respuesta fenotípica a la exposición tóxica, tal como lo reporta Labastida-Núñez y Col. (2012).

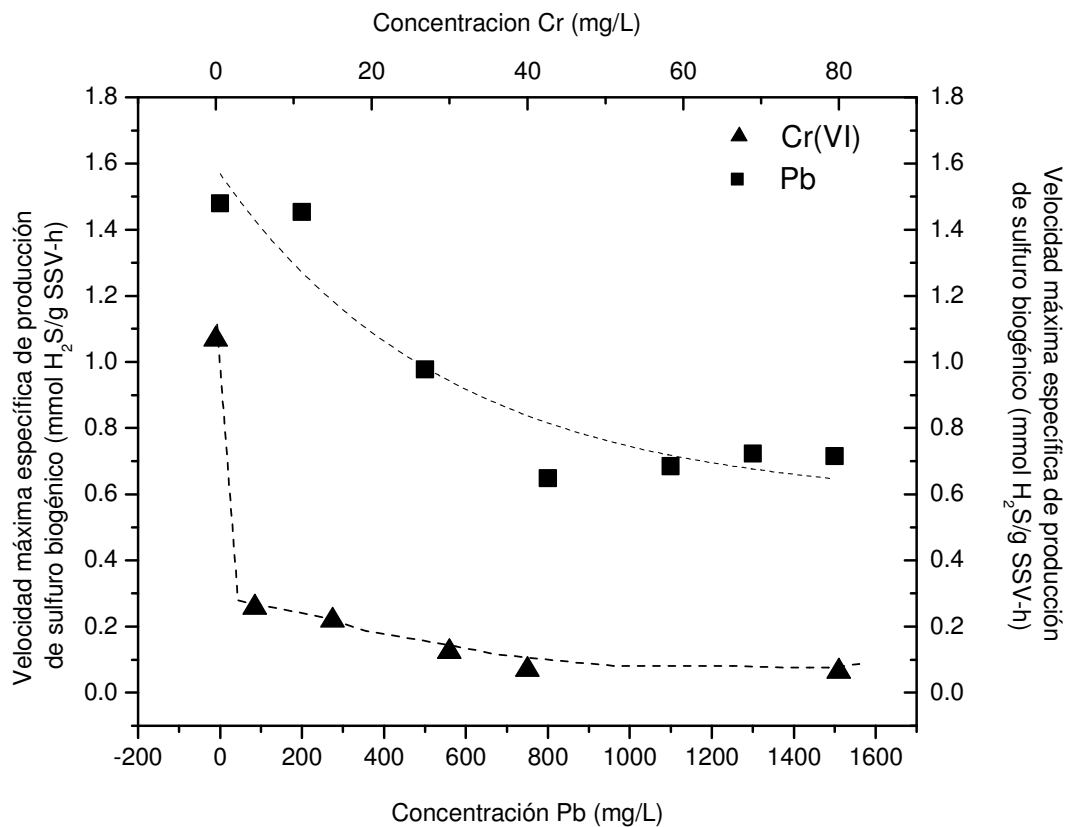


Figura 9. Velocidad específica de producción de H₂S biogénico bajo distintas concentraciones de Pb (II) y Cr (VI). Los datos fueron ajustados usando una ecuación de decaimiento de segundo orden.

El nivel de toxicidad del Cr (VI) afecta la tasa de consumo de sustrato, el metabolismo microbiano y la síntesis de biomoléculas tales como el trifosfato de adenosina (ATP) (Vaipoulou y Gikas, 2012). La reducción del Cr (VI) se llevó a cabo (1) enzimáticamente, donde el ion cromato del citocromo C3 y la hidrogenasa son los posibles promotores de la reducción, (2) químicamente, por la reacción del H₂S producido durante la reducción desasimilatoria del sulfato y (3) mediante adsorción por el material sólido que puede ser utilizado como soporte o fuente de carbono (Cetin *et al.*, 2008; Pagnanelli *et al.*, 2012; Sahinkaya *et al.*, 2012). Aunque el Cr (III) es menos tóxico que el Cr (VI) estudios demuestran que ambas formas químicas tienen efectos negativos sobre los microorganismos. El Cr (III) no es un producto estable ya que usualmente se precipita en forma de Cr(OH)₃ y en medio acuoso puede solubilizarse con facilidad (Kieu *et al.*, 2011; Pagnanelli *et al.*, 2012).

El tipo y concentración del sustrato orgánico juega un papel importante en la reducción del Cr (VI) ya que actúan como donadores de electrones en la reducción metabólica y pueden afectar la velocidad de la respiración microbiana (Kevser *et al.*, 2013). El metal precipitado que se acumula en la superficie celular puede tener un efecto adverso en la actividad de BRS, ya que los sulfuros metálicos actúan como barreras evitando el acceso de metabolitos necesarios para la célula (Utgikar *et al.*, 2002, Herrata *et al.*, 2007, Kieu, 2011).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio varían a los reportados por otros estudios ya que la inhibición del metal sobre el consorcio C5 depende directamente de la diversidad de las especies que lo conforman, su origen y los factores fisicoquímicos predominantes. Asumiendo que la turba adsorba una proporción de los iones metálicos, las concentraciones tolerables encontradas para el consorcio C5 nos dan información básica para realizar un escalamiento del proceso. La turba es un adsorbente de iones metálicos pero con el tiempo se degradará lentamente por ARS. Las BRS promoverán la precipitación de sulfuros metálicos, de los iones que vuelvan a la solución por desorción de la

TBT. En este caso, fue conveniente mantener la concentración del metal por debajo del umbral de tolerancia de la comunidad reductora de sulfato empleada. Se sugiere considerar los tres principales mecanismos de remoción (enzimática, química, adsorción) de metales para de esta forma no sobreestimar el proceso de reductor de sulfato.

6.1.7. Remoción de Pb (II) y Cr (VI) en un reactor de flujo ascendente

En la fase de acondicionamiento, el potencial oxido reducción en los dos puertos de muestreo alcanzó -280 mV, mientras que en el último puerto el valor alcanzado fue de -38 mV. Al final de la fase de acondicionamiento el pH determinado en los tres puertos de muestreo fue de 6.3, sugiriendo que la actividad bacteriana amortiguó la acidez del influente (pH 5) e incrementó su concentración de biomasa; una observación similar fue reportada por Hoa y Col. (2007). Se observó crecimiento bacteriano sobre el material de relleno, el cual fue evidenciado por un cambio gradual de color por la formación de FeS como precipitado negro. La fase de acondicionamiento se mantuvo por 20 días, para favorecer el crecimiento y adaptación de la biomasa microbiana.

En la fase de operación, la solución sintética presentó una temperatura de $35 \pm 5^\circ\text{C}$ debido a que se introdujo dentro de la incubadora donde se encontraba el biorreactor, de esta forma evitando gradientes de temperatura y a la vez, manteniendo la velocidad de descomposición del sustrato y la solubilidad del sulfuro de hidrógeno para favorecer la ARS. El tiempo de operación fue de 180 h, manteniendo un flujo de 8.3 ml/min. Debido a las condiciones hidráulicas, el potencial POR alcanzó valores cercanos a $+100$ mV en el efluente.

Este comportamiento en el incremento de los valores de POR, no se debió a la deficiencia de sulfato ya que en el tiempo de operación de 180 h se cuantificó 600 mg SO_4^{2-} /L. Se sugiere que la disminución del POR está directamente relacionada con la toxicidad de los metales que generan disminución de la actividad bacteriana. Resultados obtenidos en otros estudios, han demostrado que

una mezcla de metales puede tener efectos sinérgicos o efectos tóxicos acumulativos (Kieu *et al.*, 2011). Otro factor que pudo haber tenido relación con este evento, pudo ser el TRH, que en este caso fue de 1.04 h, el cual puede considerarse que es muy bajo al compararlo con otros estudios similares de sulfato reducción (Sahinkaya y Gungor, 2010; Mayesa *et al.*, 2011; Sahinkaya *et al.*, 2011). Esta condición de operación no permitió a las comunidades bacterianas generar rápidamente las condiciones adecuadas para que el proceso de reducción de sulfato se incrementara. Aun así la remoción de sulfatos fue del 73.3% y de materia orgánica del 76.5% lo que indica que a pesar del comportamiento no deseable del POR se mantuvo la actividad reductora de sulfato.

El sistema utilizado bajo las condiciones de operación descritas removió 90% de Pb y 65 % de Cr total. En la Figura 10 se observa que en las primeras cuatro horas de operación se presentó un fenómeno físico de adsorción y desorción de los iones metálicos sobre la TBT, esto puede deberse a la interacción de los iones metálicos con los grupos funcionales de la turba y la formación de precipitados metálicos. Aproximadamente el 40 % del plomo del influente precipitó en las primeras 4 horas por la reacción con el H₂S combinado con el incremento del pH a valores superiores a 5, sumado con el proceso de adsorción en TBT.

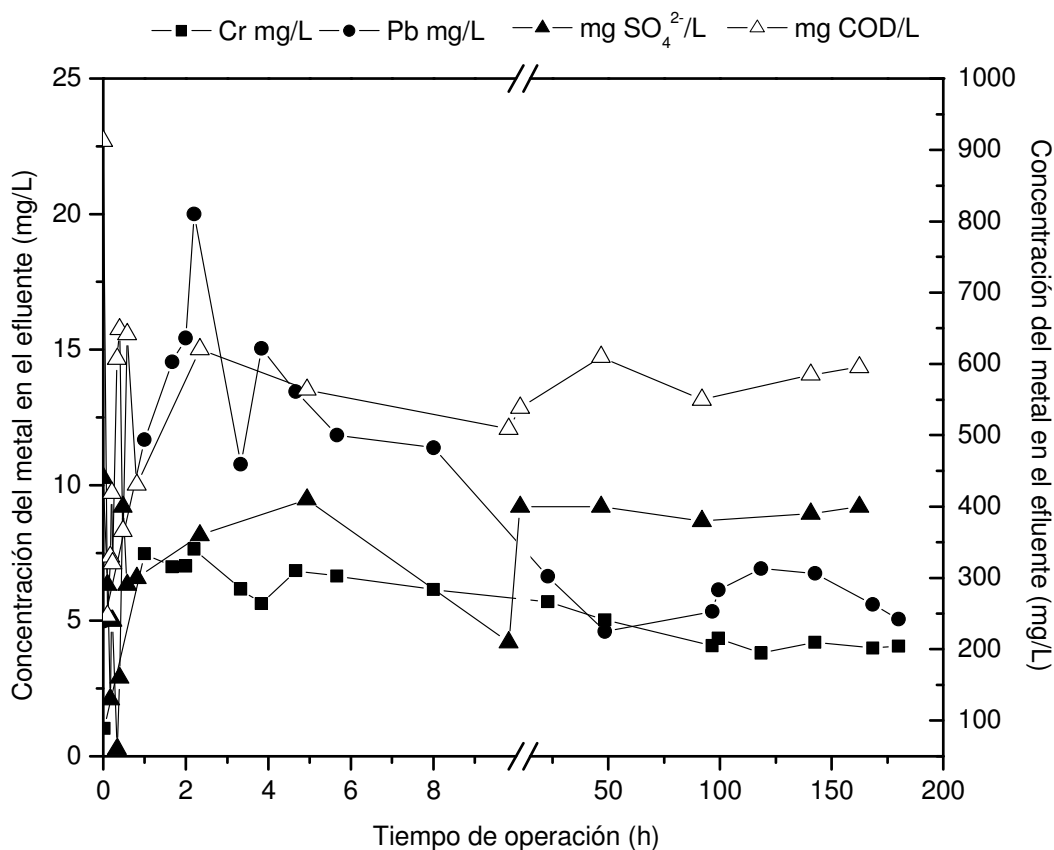


Figura 10. Concentraciones totales de Cr, Pb , SO₄²⁻ y DQO en el efluente del biorreactor.

El porcentaje de remoción del Pb total en las 180 h de operación del reactor fue del 90%. Se estimó que el 40% de dicho metal removido se debió a las condiciones de operación que promovían la formación de precipitados de sulfuro de plomo o asociaciones de oxihidróxidos de Fe o Mn (Costa *et al.*, 2008).

La adsorción de metales sobre la turba ya ha sido reportada en otros estudios (Pagnanelli *et al.*, 2010; Bulgariu *et al.*, 2012). Para el Cr (VI) se apreció un comportamiento similar, después de la hora 4 se alcanzó un equilibrio entre el Cr (VI) adsorbido (25%) y el disuelto (75%), por lo que los procesos de adsorción dejaron de ser el mecanismo prioritario para la remoción total del Cr. Por lo tanto

la ARS removi6 el 38% del Cr total disuelto, mientras que un 37% no se removi6 en el tiempo de operaci6n del biorreactor. Pagnanelli y Col. (2012), reportaron una remoci6n del 87% Cr (VI) en el efluente del biorreactor donde se utiliz6 etanol como fuente de carbono con un flujo de alimentaci6n de 0.5 mL/min., Singh y Col. (2012) reportaron una remoci6n del 49.8% de plomo a la salida de biorreactor con un THR de 3 d6as empleando glucosa, fructosa, sacarosa y lactato como fuentes de carbono.

6.2. Humedal artificial

6.2.1. Selecci6n del material vegetal

En la Figura 11 se muestran las concentraciones totales de Pb y Cr en las distintas partes del berro (*Nasturtium officinale*) (BB) y la hierbabuena (HH), encontr6ndose la mayor concentraci6n para ambas en ra6z>tallo> hoja. A diferencia del Pb (II) el Cr (total) present6 mayores niveles de acumulaci6n en las plantas a pesar de que se aplic6 la mitad de la concentraci6n en la soluci6n. Este comportamiento del Pb (II) se debi6 posiblemente a la formaci6n de complejos insolubles por estar en contacto con la soluci6n nutritiva L-C. Comparando las especies de plantas, se puede ver que el berro (*Nasturtium officinale*) tiene mayor capacidad de bioextracci6n que la hierbabuena. Posiblemente debido al corto tiempo de exposici6n de las plantas a los metales durante el experimento, no se pudo ver una translocaci6n considerable de las ra6ces a las hojas de ambas plantas.

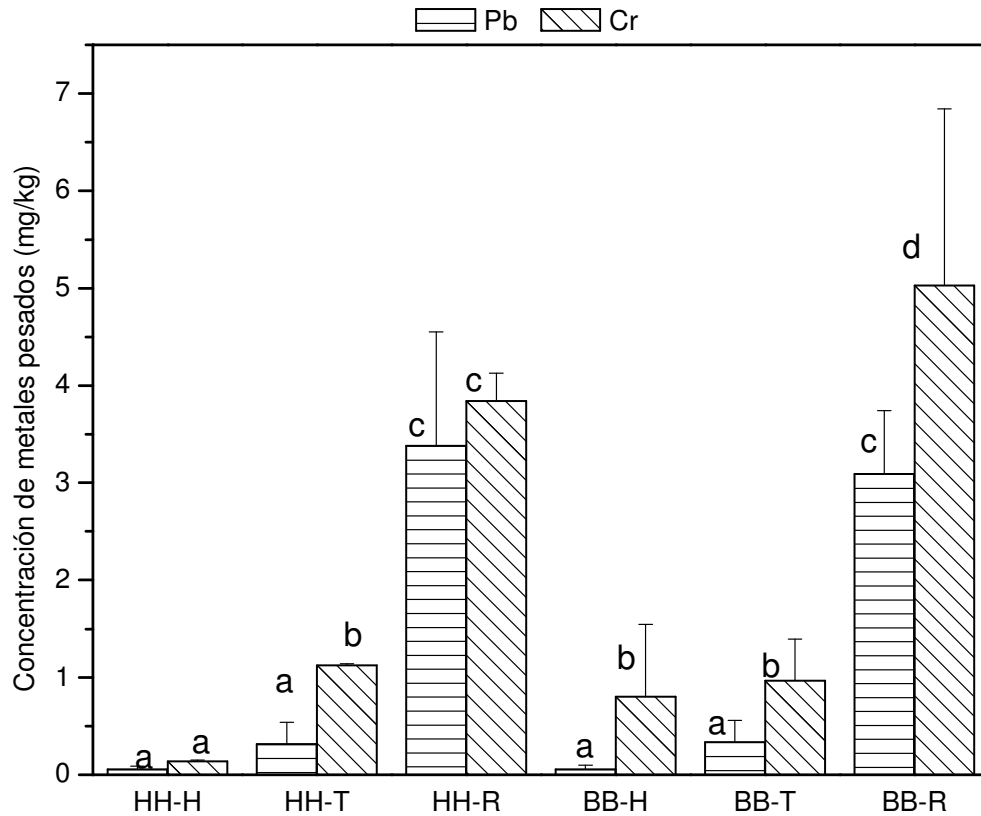


Figura 11. Concentración total de Pb y Cr en hojas (H), tallo (T) y raíz (R) de *Mentha sp.* (HH) y berro (*Nasturtium officinale*) (BB) (base seca). Las barras representan la desviación estándar entre las muestras (HH; n=8 BB; n= 6). Las letras representan diferencias significativas entre partes similares de las plantas ($p < 0.05$).

La acumulación del metal se calculó por la diferencia de la concentración final del metal en la planta vs la basal de la planta, confirmando que el berro (*Nasturtium officinale*) (Figura 12) tiene mayor capacidad de bioextracción, principalmente de Cr en raíz>tallo>hoja; para el Pb (II) se aprecia el mismo comportamiento, sin embargo, no se encontró acumulación en hojas. Mientras que la hierbabuena (*Mentha sp.*) presentó mayor acumulación en raíz>tallo>hoja encontrándose mayor retención en tallo de cromo. El factor de bioconcentración (FBC) del Cr fue mayor en raíces, siendo mayor en berro (*Nasturtium officinale*)

(0.1) que en hierbabuena (*Mentha sp.*) (0.07), mientras que las hojas de ambas plantas presentan FBC bajo 0.0005. No se tiene conocimiento de otros estudios con estas especies vegetales por lo cual no se puede comparar directamente los resultados obtenidos. Sin embargo Duman y Ozturk en el 2010, reportaron que exponiendo al berro (*Nasturtium officinale*) a níquel (1-25 mg/L) la acumulación en raíces y hojas aumentó conforme aumenta el tiempo de exposición. Ozturk y Col. (2010) demostraron que el berro (*Nasturtium officinale*) tiene la capacidad de acumular hasta 1012 $\mu\text{g/g}$ seco de arsénico en sus hojas.

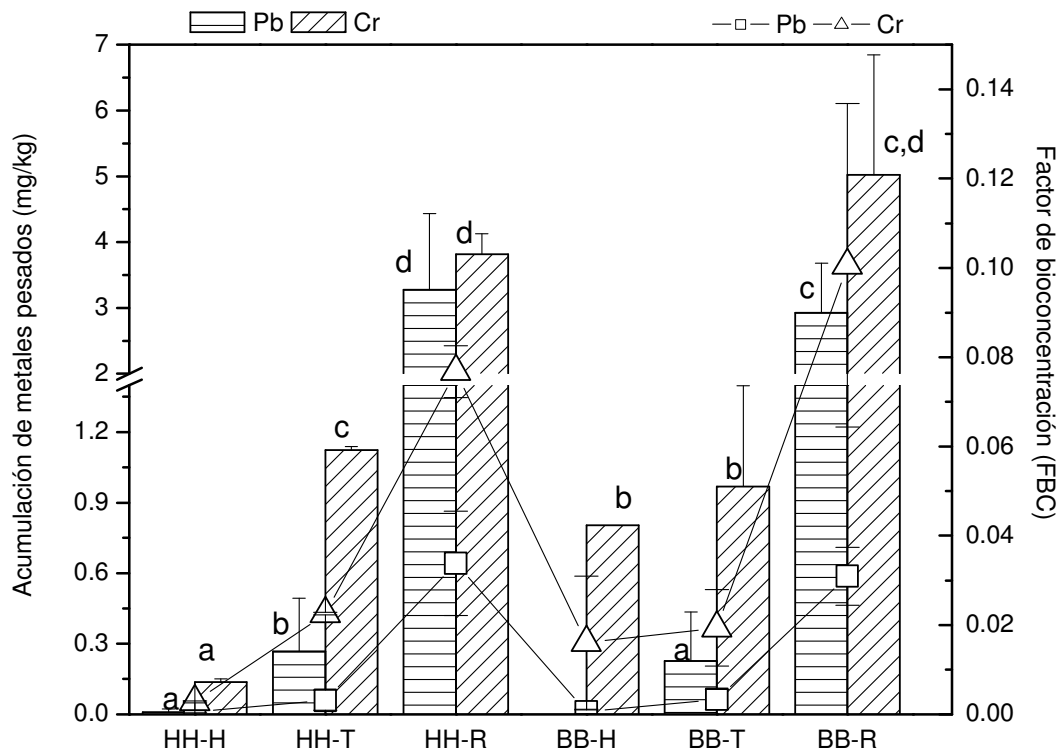


Figura 12. Acumulación y el factor de bioconcentración de Pb y Cr total en hojas (H), tallo (T) y raíz (R) de hierbabuena (HH) y berro (BB). Las barras representan la desviación estándar entre las muestras (HH; n=8 BB; n= 6). Las letras representan las diferencias significativas entre partes similares de las plantas ($p < 0.05$).

En la Tabla 4 se observa un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento para el berro (*Nasturtium officinale*) en presencia de Cr (VI) (-53%) que para la hierbabuena (*Mentha sp.*) (-30%) comparados con su respectivo control (9%). Mientras que la inhibición del crecimiento por Pb (II) solo se observó en el berro (*Nasturtium officinale*) con -15% ya que la hierbabuena (*Mentha sp.*) no fue afectada ya que se observó un crecimiento del 14%, sólo un 5% menos que su respectivo control.

En la Figura 13 se observa el porcentaje de evapotranspiración del berro (*Nasturtium officinale*). Donde se puede apreciar que en presencia de Cr (VI) la cantidad de agua evapotranspirada fue disminuyendo conforme avanzaron los días del experimento comenzando con un 11% y finalizando al día 10 con 0%, de evapotranspiración es decir los 200 mL de solución inicial. Además, pudo notarse en ese día una marchitez completa de la planta. En presencia de Pb (II) se consumieron aproximadamente 6.6 mL por día, este comportamiento fue constante a lo largo del experimento. Existen algunas diferencias en los controles ya que sólo en el día 2 (46% y 43% CCT y CST respectivamente) y 7 (42.2% y 42.1% CCT y CST respectivamente) ambos tuvieron un porcentaje de evaporación/evapotranspiración similar. Lo cual indica que la pérdida máxima de agua fue por evapotranspiración de las plantas y no por evaporación.

Tabla 4. Porcentaje de crecimiento de berro (*Nasturtium officinale*) y hierbabuena (*Mentha sp.*) en presencia de Pb (II) y Cr (VI) comparado con el inicio del experimento (10 días)

| Tratamiento | Crecimiento de Berro (%) | Crecimiento de Hierbabuena (%) |
|---------------|--------------------------|--------------------------------|
| Pb (100 mg/L) | -15 | 14 |
| Cr (50 mg/L) | -53 | -30 |
| Control | 9 | 19 |

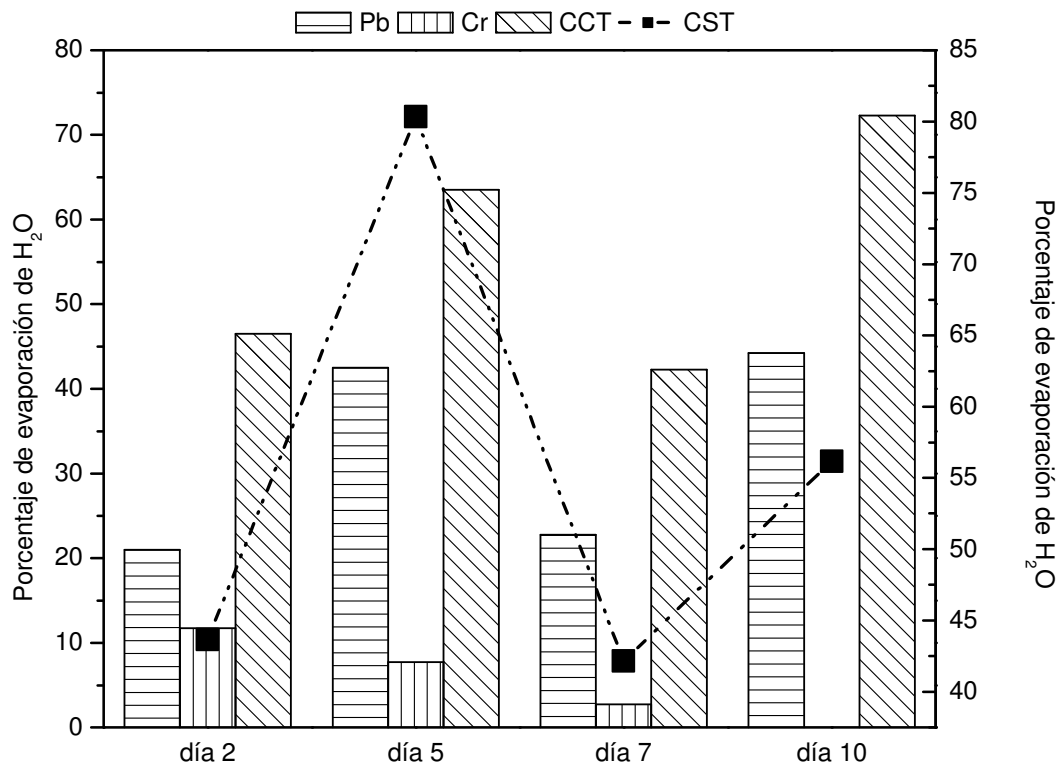


Figura 13. Berro (*Nasturtium officinale*): Porcentaje de evaporación en presencia de Pb (II) y Cr (VI), control con cubierta (CCT) y control sin cubierta (CST).

El porcentaje de evapotranspiración para la hierbabuena (*Mentha sp.*) (Figura 14) en presencia de Pb (II) se mantuvo entre 17 % y 15 % los primeros 5 días, para el día 8 alcanzó 37 % y en el día 10 llegó a 51 %. Lo que respecta al Cr (VI), la evapotranspiración se mantuvo en un intervalo entre 5 % y 13 %. Los controles de la hierbabuena (*Mentha sp.*) tuvieron un comportamiento similar a los controles de berro (*Nasturtium officinale*), ya que en el día 5 (15 % y 16 % CCT y CST respectivamente) y 10 (54 % y 57 % CCT y CST respectivamente) ambos tuvieron un porcentaje de evaporación/evapotranspiración similar, pudiendo apreciar que conforme transcurrían los días del experimento aumentaba la evapotranspiración.

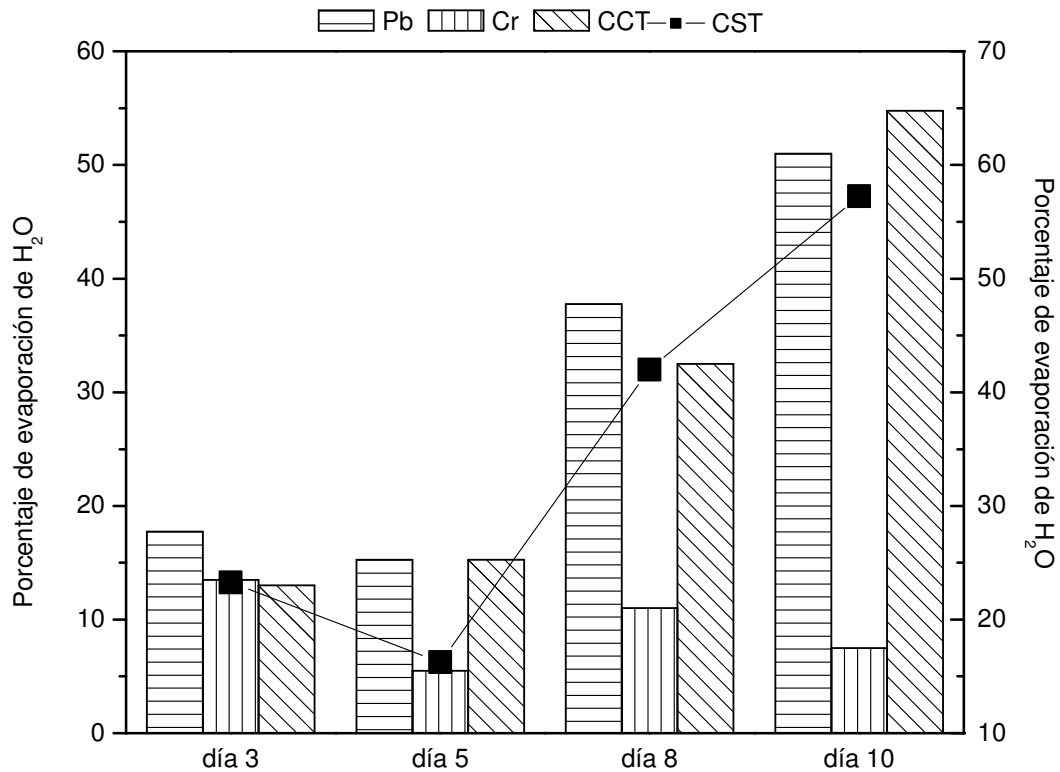


Figura 14. Hierbabuena (*Mentha sp.*): Porcentaje de evaporación en presencia de Pb (II) y Cr (VI), control con cubierta (CCT) y control sin cubierta (CST).

Suñe y Col. (2007) han explicado que los mecanismos de adsorción, quelación e intercambio de iones son diferentes entre las especies vegetales y se explican por translocación biológica, procesos químicos (precipitación de metales en la raíz de la planta), diferencias de concentración y propiedades químicas de cada metal pesado. De acuerdo a los resultados obtenidos se deriva que el berro (*Nasturtium officinale*) y la hierbabuena (*Mentha sp.*) tienen la capacidad de bioextraer cromo y plomo a pesar de no ser elementos esenciales para desarrollar funciones fisiológicas. Algunas especies de plantas han desarrollado mecanismos para la acumulación de metales pesados, tales como la formación de un complejo

coordinado del metal con los ácidos orgánicos (citrato, oxalato, malato), proteínas (metalotioneínas), pequeños péptidos (glutación, fitoquelatinas), y aminoácidos (cisteína), y por último, los complejos de coordinación son transportados hacia las vacuolas y la pared celular de la planta (Hall, 2002; Alonso-Castro *et al.*, 2009).

La concentración de Cr total en raíz para ambas plantas son equiparables con lo reportado para *Silybum marianum* 5.4 mg kg⁻¹, *Sinapis arvensis* 5.8 mg kg⁻¹ (Bruneti *et al.*, 2009). En lo que se refiere a Pb en raíz; *Lolium perenne* 0.4 mg kg⁻¹, *Trifolium repens* 0.3 mg kg⁻¹, *Stipa austroitalica* 0.7 mg Kg⁻¹ (Bidar *et al.*, 2008; Bruneti *et al.*, 2009).

El FBC de ambas especies vegetales es pequeño comparado con lo reportado para otras plantas, por ejemplo, Alonso-Castro y Col. (2007), quienes encontraron un FBC de 300 para *Typha latifolia* en presencia de Pb. Debido a que los valores calculados en el presente trabajo son inferiores a 0.1, se puede hablar que ambas plantas presentan un comportamiento que indica que el mismo crecimiento en biomasa de la planta diluye la acumulación de metales, a niveles menores a la concentración que la encontrada en la solución. En general, los porcentajes de crecimiento para cada planta se pueden relacionar directamente con la cantidad de agua que necesita para su mantenimiento fisiológico y por el estrés fitotóxico al cual fueron sometidas.

El hábitat del berro (*Nasturtium officinale*) es un sistema inundado ya que requieren mayor cantidad de agua en el medio para sobrevivir y debido a que bajo las condiciones del presente experimento no se les repuso el agua diariamente, es posible que esto provocará estrés fisiológico dando como resultado una mayor extracción de metal. Fernández-Going y Col. (2013), concluyen resultados similares del comportamiento del berro (*Nasturtium officinale*) debido a que su hazienda natural es en arroyos someros donde la biomasa que produce puede llegar hasta los 200 g/m². La hierbabuena (*Mentha sp.*), por otra parte, no se encuentra naturalmente en hábitats inundados y por lo tanto no presentó el mismo

comportamiento. Cabe resaltar que las plantas estuvieron en estrés por la presencia del metal y por escasos de nutrientes ya que se empleó como medio de cultivo, únicamente agua potable previamente tratada por un sistema de eliminación de nutrientes. La capacidad de evapotranspiración puede estar relacionada con las características fisiológicas de la plantas ya que el berro (*Nasturtium officinale*) nuevamente presentó mayor porcentaje de evapotranspiración, quizás esta propiedad sea debido a la adaptación para vivir en orillas de ríos y arroyos.

Los resultados de la presente investigación y bajo las condiciones experimentales descritas sugieren que ambas plantas estudiadas tienen la posibilidad de ser empleadas como una alternativa de rizofiltración. Definiendo esta como el uso de raíces para absorber y adsorber contaminantes del agua y de otros efluentes acuosos (Carpena y Bernal, 2007), ya que demostraron tener la capacidad de acumular en su raíz 3.9 mg Cr (total)/kg y 5 mg Cr (total)/kg en hierbabuena (*Mentha sp.*) y berro (*Nasturtium officinale*) respectivamente. El berro (*Nasturtium officinale*) presentó mayor inhibición de crecimiento (-53%) en presencia de Cr (VI) que la hierbabuena (*Mentha sp.*) (-30%). El Pb (II) causó inhibición de crecimiento solo en berro (*Nasturtium officinale*) (-15%) ya que la hierbabuena (*Mentha sp.*) tuvo un crecimiento aceptable de 14% comparado con el 19% de su control respectivo. El berro (*Nasturtium officinale*) puede llegar a evapotranspirar hasta 50% del volumen agua que contenía al metal pesado bajo las condiciones de este trabajo de investigación (10 días), generando así una alternativa para reducir los volúmenes de líquidos contaminados con metales pesados y a su vez minimizar los costos de disposición final del residuo. Además las plantas no requieren un estricto aporte de nutrientes ya que bajo las condiciones experimentales mostraron crecimiento, lo cual se reflejó en la ganancia de biomasa de los controles, abriendo la opción que con un mayor aporte de nutrientes ambas plantas puedan incrementar su capacidad de rizofiltración.

Sin embargo, debido a las características del humedal artificial horizontal sub-superficial, empleado en esta investigación, se considera que la excesiva humedad favorecería significativamente al berro (*Nasturtium officinale*) ya que estas condiciones fisiológicamente le benefician mucho más que a la hierbabuena (*Mentha sp.*).

6.2.2. Germinación de semillas de berro (*Nasturtium officinale*)

Para determinar el mejor método para germinar las semillas de berro se probaron distintos fotoperiodos y se utilizó agua destilada y solución nutritiva L-C para generar la humedad adecuada y promover la germinación. En la Tabla 5 se aprecia una marcada tendencia del agua destilada y la completa oscuridad para la favorecer la germinación de las semillas del berro. Aunque las comparaciones estadísticas de estos no revelaron diferencias significativas respecto a los demás tratamientos, se decidió seleccionar las anteriores condiciones y la temperatura a 25 ± 3 °C como el procedimiento regular para germinar semillas en los sucesivos experimentos.

Una consideración que se debe de tomar es la cantidad de luz que se incide sobre el berro (*Nasturtium officinale*) ya que se ha demostrado que a mayor intensidad de luz la planta se ve favorecida en su crecimiento. Morfológicamente el berro (*Nasturtium officinale*) tiene la capacidad de adaptarse a distintas intensidades lumínicas (Going *et al.*, 2008), por lo que puede utilizarse en lugares con diferente incidencia de radiación solar.

Tabla 5. Germinación de semillas de berro (*Nasturtium officinale*) a distintos fotoperiodos y soluciones nutritivas.

| Fotoperiodo (h) | Porcentaje de Germinación | |
|-----------------|---------------------------|------------------------|
| | Agua destilada | Solución nutritiva L-C |
| 0 | 90 ± 3.4 | 75 ± 9.3 |
| 16 | 80 ± 6.6 | 82 ± 7.4 |
| 24 | 79 ± 18 | 64 ± 7.6 |

n=6. Valor promedio ± Desviación estándar

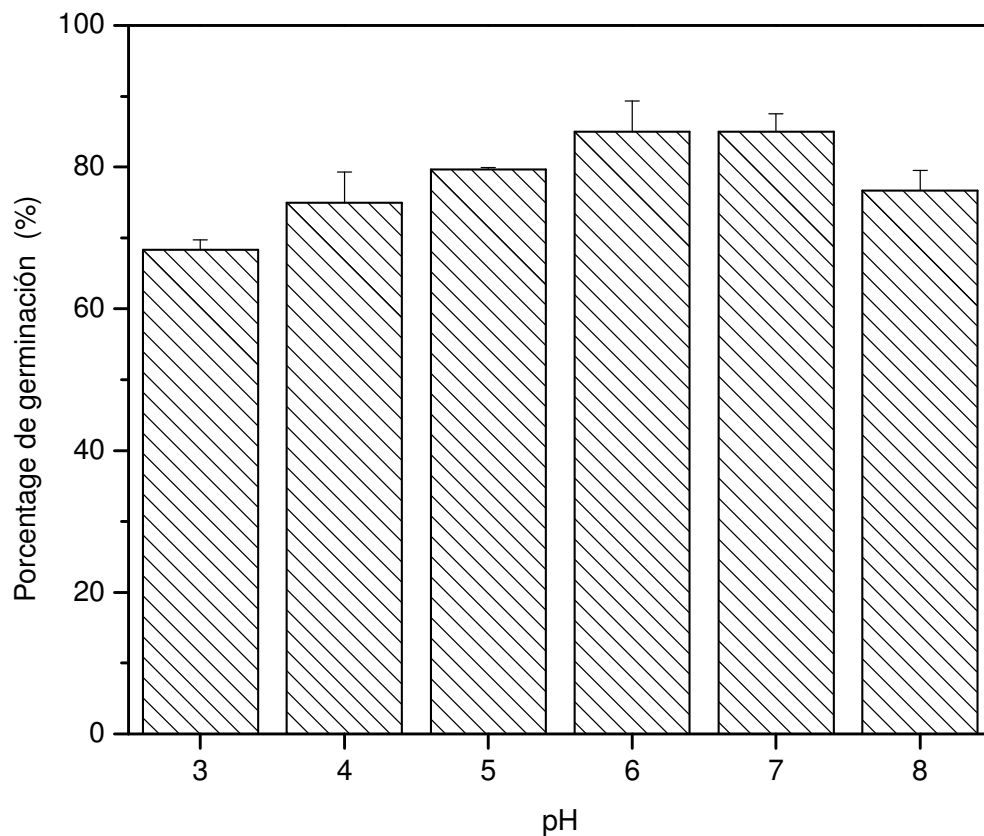


Figura 15. Germinación de semillas de berro (*Nasturtium officinale*) expuestas a distintos valores de pH. Las barras representan la desviación estándar entre las muestras (n=6).

6.2.3. Germinación de semillas de berro (*Nasturtium officinale*) a distintos valores de pH

Los resultados de la Figura 15 indican que el porcentaje de germinación de las semillas de berro (*Nasturtium officinale*) tiene una relación con los valores de pH empleados para la prueba. Observándose que a valores de pH 3 se tiene el porcentaje más bajo de germinación (69%), mientras que a valores de pH 7 y 8, se registraron los mejores niveles de germinación (~87%). No se encontraron diferencias significativas entre los valores de pH 4 al 7. Similares resultados encontró Howard (1976) en valores de pH que favorecen el crecimiento del berro (*Nasturtium officinale*).

6.2.4. Germinación de semillas de berro (*Nasturtium officinale*) expuestas a Pb (II) y Cr (VI)

Las semillas tratadas tuvieron un 90% de germinación lo que indica una buena viabilidad para las pruebas a pesar de que no hubo un control estricto en la adquisición de las semillas. Considerando la germinación como la ruptura del pericarpio, no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos presentados en la Figura 16.

Considerando estrictamente que la formación del embrión (plántula) está constituida por radícula, tallito o plúmula y cotiledones; no se encontraron diferencias significativas en longitud y ancho del dicotiledón. El único parámetro de crecimiento donde se manifestaron tales diferencias, fue la longitud de la raíz en presencia de Pb (II), observándose claramente que al aumentar la concentración del metal la longitud disminuye drásticamente (Figura 17). Resultados similares a lo anterior, ocurrió para el Cr (VI) respecto a la longitud de la raíz, mientras que los cotiledones presentaron diferencias significativas, particularmente a 30 mg/L donde se obtuvo la mayor longitud. Una posible explicación a este hecho podría sugerir que los metales pesados no son utilizados

por las plantas como nutrientes esenciales, sino por el contrario, resultan tóxicos potenciales que pueden acumularse en sus tejidos causando intoxicación, decremento de la fertilidad, daño celular y disfunción de varios órganos (Ribeiro *et al.*, 2005).

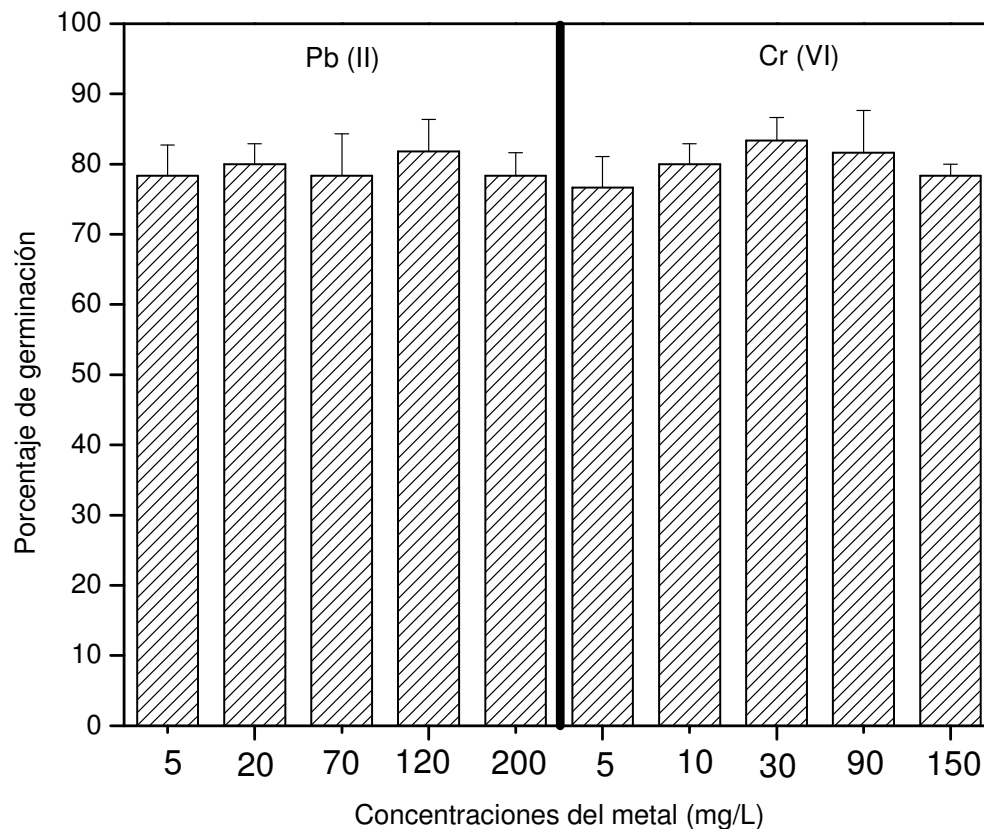


Figura 16. Porcentajes de germinación a distintas concentraciones de Pb (II) y Cr (VI), las barras representan el error estándar $n=6$.

Los porcentajes de germinación en presencia de Pb (II) y Cr (VI) deben de considerarse de acuerdo a un tamaño determinado de tallo y cotiledón ya que este último es el principal nutriente en esta fase. Está consideración asegura el crecimiento de la planta después de la fase de germinación.

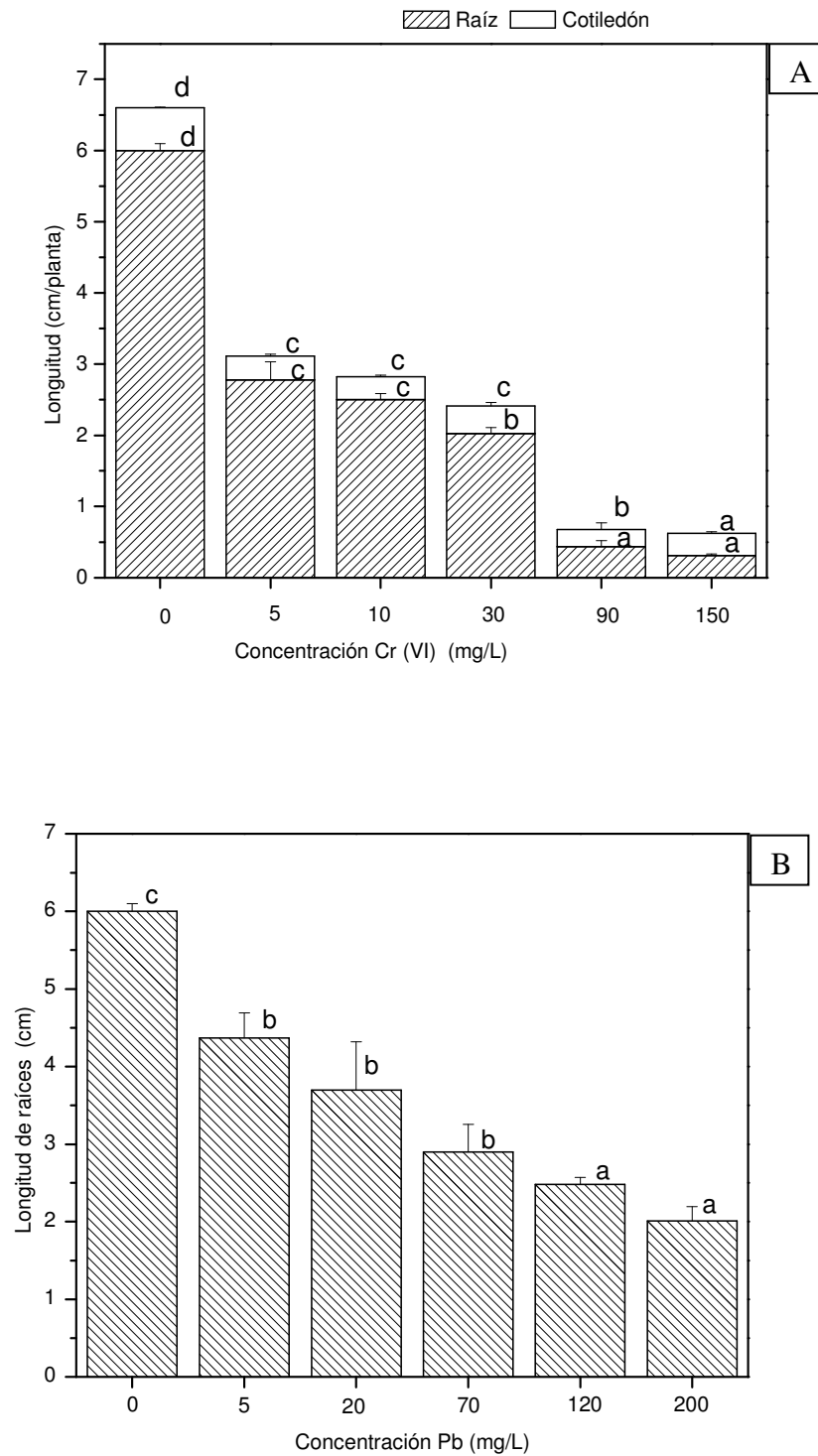


Figura 17. Longitud de raíces y cotiledón de las plántulas a diferentes concentraciones de Cr (VI) (A), Longitud de raíces de las plántulas germinadas a las diferentes concentraciones de Pb (B); las barras representan en error estándar n=6. Las letras indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

De acuerdo con los datos de la Figura 17 para lograr un porcentaje de germinación cercano al 80 % la concentración total biodisponible tendría que ser inferior a los 70 mg/L para ambos metales en las condiciones de pH cercanos a 5 y fotoperiodo de 16/8 h luz–obscuridad. Debido a que no se tiene la certeza de cuántas de estas semillas germinadas podrían llegar a la madurez no se recomienda utilizar el porcentaje de germinación como variable para medir la toxicidad del metal. López-Luna en el 2009, concluyó lo mismo cuando evaluó a germinación de sorgo, avena y trigo en presencia de cromo. Con los resultados obtenidos se sugiere que un aumento en la concentración de los metales pueda provocar una reducción significativa del porcentaje de germinación.

6.2.5. Exposición de plantas de berro (*Nasturtium officinale*) a diferentes concentraciones mono y bimetálicas de Pb (II) y Cr (VI)

El efecto de la exposición del berro al Pb (II) y Cr (VI) en forma individual y combinada, se esquematiza en las Figuras 18 y 19. Pudo notarse que el incremento en la concentración de Cr (VI) indujo la mayor acumulación en hojas, pero este efecto fue diferente al exponerse al Pb (II). La presencia de Cr (VI) en tallo fue similar en las tres primeras concentraciones (3, 6 y 12 mg/L), y en concentraciones superiores no se encontraron diferencias. La concentración de Pb (II) en tallo fue mayor cuando el metal se aplicó a 12 mg/L. Por su parte, en raíces la tendencias se observaron de la siguiente manera: a mayores concentraciones de exposición ocurrió una mayor retención de Pb total; a diferencia del Cr (VI), donde la mayor retención se presentó en las a menores dosis de exposición.

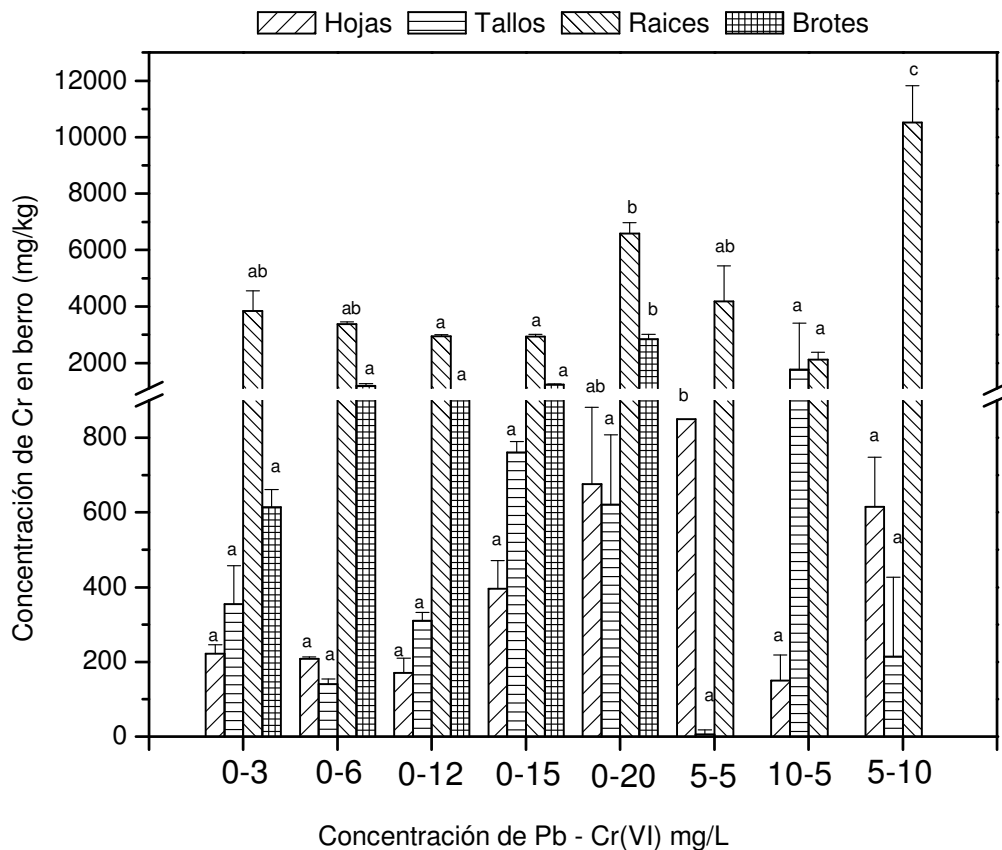


Figura 18. Concentraciones de Cr (VI) en las distintas fracciones del berro (*Nasturtium officinale*): hojas, tallos, raíces y brotes. Las barras representan en error estándar n=6. Las letras indican diferencias estadísticas entre partes similares de las plantas ($p<0.05$).

Keser y Saygideger (2010), cuantificaron en hojas secas de berro (*Nasturtium officinale*) 121.56 $\mu\text{g Pb/g}$ y en tallo seco 121.66 $\mu\text{g Pb/g}$. En dicho estudio, las plantas que fueron expuestas a Cr (VI) y Pb (II) mostraron una mayor acumulación del metal a medida que aumentaba la concentración a excepción de las raíces en presencia de plomo. La acumulación de ambos metales se da en raíces>brotes>tallos>hojas. Este comportamiento del cromo acumulado principalmente en raíces y brotes ya ha sido reportado para otras especies vegetales (Avudainayagam *et al.*, 2003; López-Luna *et al.*, 2009). Con respecto a

las plantas control, los tratamientos presentaron amarillamiento en hojas y tallo; en algunos casos adelgazamiento del tallo y pérdida de rigidez.

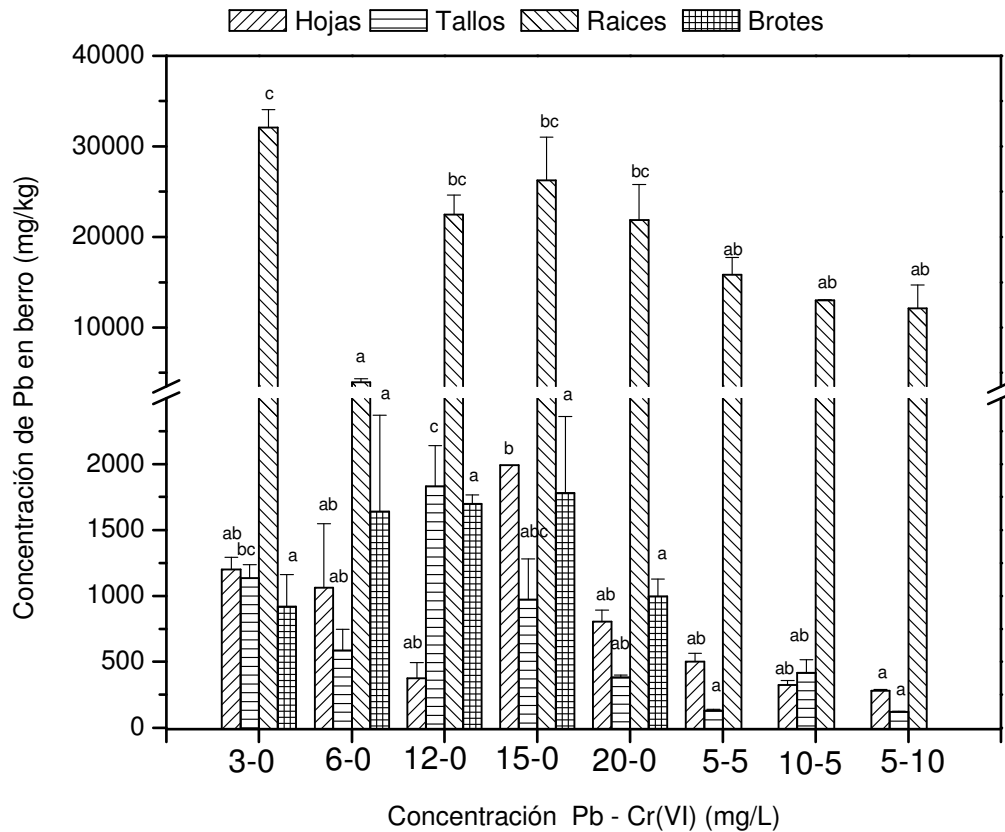


Figura 19. Concentraciones de Pb en las distintas fracciones del berro (*Nasturtium officinale*): hojas, tallos, raíces y brotes. Las barras representan en error estándar n=6. Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre partes similares de las plantas ($p < 0.05$).

Los efectos de la exposición del berro (*Nasturtium officinale*) expuestos a distintas concentraciones bimetálicas se muestra en la Tabla 6, donde se aprecia que hay diferencias de acumulación del Cr (VI) y Pb (II) independientemente de la concentración. En proporciones de 5mg Cr (VI)/L- 5mg Pb (II)/L no se observó crecimiento de brotes nuevos. Para el cromo se observó una sinergia entre las

distintas fracciones de la planta, a bajas concentraciones del metal en la parte aérea, altas concentraciones en raíces o tallo. Mientras, que cuando se cuantifica mayor concentración en hojas y tallo, la concentración obtenida en raíces es muy similar a la de tallos y raíz o tallos y hojas. Estos resultados indican que conforme se va acumulando el cromo en raíces la planta tiene la facilidad de translocarlo en partes aéreas, sin embargo también se observó que el berro (*Nasturtium officinale*) es susceptible a concentraciones elevadas de Cr (VI).

Tabla 6. Concentraciones de plomo y cromo obtenidas al exponer al berro (*Nasturtium officinale*) a distintas concentraciones bimetálicas.

| Concentración | Fracción | Cr (VI) (mg/kg) | Pb (mg/kg) |
|-------------------------|----------|-----------------|--------------|
| 3 mg Pb/L – 3 mg Cr/L | Hoja | 0.2 ± 0.01a | 0.4 ± 0.06a |
| | Tallo | 7.1 ± 4.0a | 6.8 ± 3.3a |
| | Raíz | 0.3 ± 0.6b | 0.9 ± 0.3b |
| | Brote | 1.4 ± 0.1b | 2.8 ± 0.3b |
| 5 mg Pb/L – 5 mg Cr/L | Hoja | 0.85 ± 0.15b | 0.53 ± 0.01a |
| | Tallo | 0.17 ± 0.06b | 0.17 ± 0.01b |
| | Raíz | 9.3 ± 0.84a | 16 ± 3.0a |
| | Brote | SM | SM |
| 12 mg Pb/L – 12 mg Cr/L | Hoja | 0.16 ± 0.19a | 0.30 ± 0.05a |
| | Tallo | 12 ± 0.33a | 7.2 ± 0.32a |
| | Raíz | 0.32 ± 0.08a | 1.35 ± 0.4b |
| | Brote | 2.0 ± 0.72b | 6.1 ± 1.4a |
| 10 mg Pb/L – 5 mg Cr/L | Hoja | 0.15 ± 0.01a | 0.35 ± 0.1a |
| | Tallo | 7.6 ± 4.0a | 0.46 ± 0.17b |
| | Raíz | 7.0 ± 3.4b | 13.0 ± 0.2a |
| | Brote | 0.90 ± 0.001b | 5.01 ± 0.01a |
| 5 mg Pb/L – 10 mg Cr/L | Hoja | 0.62 ± 0.13b | 0.31 ± 0.01a |
| | Tallo | 0.43 ± 0.25b | 0.16 ± 0.01b |
| | Raíz | 2.12 ± 0.4ab | 13.7 ± 2.7a |
| | Brote | 0.65 ± 0.001b | 4.9 ± 0.01a |

SM. Sin muestra para realizar el análisis. Los valores son promedios con su respectivo error estándar. Las letras representan las comparaciones de medias entre tratamientos para partes similares de las plantas ($p < 0.01$).

Zhang y Col. (2007), encontraron que al exponer al lirio amarillo (*I. pseudacorus*) a 0.201 mg/L y 0.211 mg/L de Cr y Pb respectivamente, este tuvo la capacidad de retener el 24.58% de Cr y 21.30% de Pb. Ribiero de Souza y Col. (2012), emplearon especies de *Brazilian leguminous* las cuales acumulan el 95% de Pb en raíces> hojas=tallos y encontraron que concentraciones entre 30 y 300 mg/kg de peso seco de brotes ya eran tóxicos para las plantas.

Los berros en concentraciones monometálicas presentaron una mayor acumulación conforme aumenta la concentración en la solución (Tabla 6), esto puede ser explicado por el estrés al que es sometida la planta y está directamente relacionado con la cantidad de agua que requiere fisiológicamente el berro (*Nasturtium officinale*) para sobrevivir. Otras especies de plantas en presencia de concentraciones elevadas del metal en la matriz líquida o sólida, tienden a incrementar la acumulación del metal en hojas y tallos (Singh y Agrawal, 2010; Ribeiro de Souza, 2012). En otros estudios donde se utilizó maíz (*Zea mays*) se observó que la translocación del Pb es muy baja. Para ambos metales el berro (*Nasturtium officinale*) tiene la capacidad de bioacumular en raíces>tallos=brotes>hojas la mayor concentración del metal biodisponible.

Es importante recalcar que el cultivo de berro (*Nasturtium officinale*) en México se da en suelo y este juega un papel esencial en la disminución de la concentración disponible del metal para la planta, disminuyendo a su vez su bioacumulación. Dependiendo de la mezcla de concentraciones Pb (II)-Cr (VI) podemos encontrar la translocación del metal en distintas partes de la planta.

Para conocer a mayor detalle cuales son las concentraciones tolerables del berro (*Nasturtium officinale*) a ambos metales se calcularon sus velocidades de crecimiento relativo, por medio de la diferencia de sus pesos al inicio y final, de los experimentos encontrándose lo que se muestra en la Figura 20. En concentraciones monometálicas la velocidad de crecimiento para el berro

(*Nasturtium officinale*) cae drásticamente en 3 mg/L y 12 mg /L de Cr (VI) y Pb (II) respectivamente.

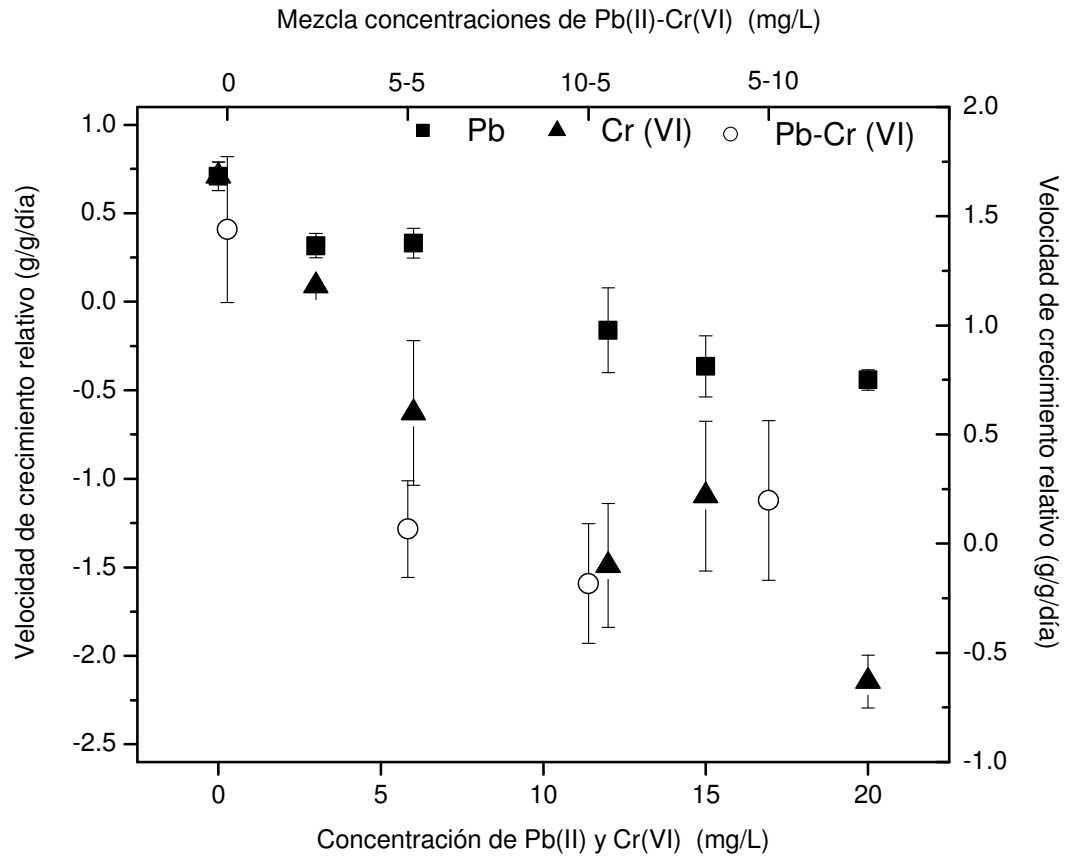


Figura 20. Velocidades de crecimiento relativo de berro (*Nasturtium officinale*) en presencia de concentraciones mono y bimetálicas de Pb (II) y Cr (VI). Las barras representan en error estándar n=6.

Reafirmando que el berro (*Nasturtium officinale*) es más tolerante al Pb (II) comparado con el Cr (VI), se sugiere que esta tolerancia se debe al grado de toxicidad del metal el cual es más bajo que el Cr (VI). El cromo (VI) está considerado como metal pesado muy tóxico para los organismos vivos, ya que el Cr (III) puede acumularse en membrana y el Cr (VI) transpasa la membrana penetrando el citoplasma y reaccionando con el material celular (Gikas y Romanos, 2006). El cromo produce clorosis foliar, reduce el crecimiento y puede

causar la muerte de la planta (Vajpayee *et al.*, 2000). Causa daño oxidativo a biomoléculas de lípidos y proteínas (Shanker *et al.*, 2004). Se encuentra bien documentado que el cromo inhibe el fotosistema II de la fotosíntesis (Davies *et al.*, 2002).

Las concentraciones bimetálicas indican que desde la primera combinación de 5 mg Pb (II) – 5 mg Cr (VI) la tasa de crecimiento cae dramáticamente. Esto se puede deber a un fenómeno de la sinergia de toxicidad de los metales sobre la planta; de acuerdo a los resultados encontrados concentraciones monometálicas superiores a 3 mg Cr (VI)/L son tóxicas para el berro (*Nasturtium officinale*). Las combinaciones superiores de dichos concentraciones serán altamente tóxicas para esta planta, consideración que hay que tomar en cuenta para el diseño y montaje del humedal artificial.

Los mecanismos que tienen las plantas para tolerar los excesos de metales en su biomasa van desde biosíntesis de compuestos por quelación de ácidos orgánicos, fitoquelatinas y metalotioninas; retención del metal en las raíces para prevenir la translocación en tallos e inmovilización del metal en la pared celular (Shaw, 1989; Almeida *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2009). La asociación de raíces con microorganismos de suelo y/o agua tales como las micorrizas pueden atenuar el efecto negativo de las altas concentraciones del metal (Andrade *et al.*, 2003; Bothe *et al.*, 2010). El FBC del berro (*Nasturtium officinale*) está en el orden de 0.08 a 0.63, son valores un poco mayores a los reportados por Ribiero de Souza (2012) que están en el rango de 0.001 a 0.005. De acuerdo a lo reportado por Shi y Col. (2011), plantas con valores de FT y FBC por debajo de 1.0, son apropiadas para realizar programas de fitoestabilización, ya que dicho valor bajo indica que la especie es capaz de acumular bajas concentraciones de metal y translocarlo en los brotes. Se calcularon valores inferiores a 1.0 para ambos parámetros en concentraciones monometálicas. El índice de tolerancia encontrado para cada tratamiento (Tabla 7) va decreciendo conforme aumenta la concentración para ambos metales, mientras que el factor de translocación es mayor a 6 mg Pb(II)/L y

15 mg Cr(VI)/L, lo que indica que el berro (*Nasturtium officinale*) tiene mayor capacidad de movilizar el cromo a partes aéreas, pudiendo generar problemas de salud pública en caso de que esta hortaliza sea regada con agua contaminada con Cr(VI), ya que este elemento puede biomagnificarse a través de los distintos eslabones de la cadena alimenticia.

Las plantas presentan dos defensas principales mecanismos de detoxificación. El primer sistema de defensa está integrado por varios antioxidantes que combaten el incremento de la producción de $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , y HO^{\cdot} (ROS, por sus siglas en inglés), debido a que dichos compuestos se producen en la membrana lipídica, generando estrés oxidativo (Tewari *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007). El primer mecanismo se ha observado únicamente en especies vegetales expuestas a estrés (Lind *et al.*, 2007). Diferentes estudios han evaluado la respuesta fisiológica y los mecanismos de detoxificación de semillas y plantas, encontrando que la actividad enzimática de la superoxidosa dismutasa, catalasa, peroxidasa, ascorbato peroxidasa y glutatión peroxidasa son mecanismos enzimáticos que juegan un papel esencial para que la planta sea tolerante a distintas concentraciones de metales pesados (Noctor y Foyer, 1998; Gratão *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010;). El segundo sistema de defensa consiste en la liberación de prolina, ligandos, ácidos orgánicos y fitoquelatinas los cuales disminuyen la toxicidad de los metales pesados en las células vegetales (Mishra *et al.*, 2006). Las fitoquelatinas llegan a formar complejos con los metales pesados, favoreciendo así la disminución de su toxicidad hacia la planta (Kawakami *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2006; Ribeiro de Souza, *et al.*, 2012). Las plantas es a través de las vacuolas o estructuras lignocelulíticas que se encuentran en la raíz, dando como resultado menor concentración del metal en la parte aérea (Shanker *et al.*, 2005; Hanc *et al.*, 2009; Peralta-Valdaes, *et al.*, 2009).

Tabla 7. Índice de tolerancia, factor de bioconcentración y factor de translocación de *Nasturtium officinale* en presencia de Pb (II) y Cr (VI)

| Concentración (mg/L) | Pb | | | Cr | | |
|-------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| | IT | FBC (mg/kg) | FT (mg/kg) | IT | FBC (mg/kg) | FT (mg/kg) |
| 3 | 0.39 ± 0.01a | 0.71 ± 0.1a | 0.06 ± 0.00c | 0.18 ± 0.01a | 0.34 ± 0.1a | 0.19 ± 0.06c |
| 6 | 0.25 ± 0.02a | 0.48 ± 0.2a | 0.63 ± 0.23a | 0.16 ± 0.08a | 0.23 ± 0.01a | 0.41 ± 0.03b |
| 12 | 0.21 ± 0.01a | 0.17 ± 0.01b | 0.09 ± 0.003c | 0.13 ± 0.01a | 0.1 ± 0.001b | 0.40 ± 0.07b |
| 15 | 0.2 ± 0.01a | 0.26 ± 0.02b | 0.15 ± 0.02b | 0.11 ± 0.02a | 0.1 ± 0.005b | 0.55 ± 0.01a |
| 20 | 0.02 ± 0.01b | 0.09 ± 0.01c | 0.08 ± 0.005c | 0.04 ± 0.001b | 0.17 ± 0.002a | 0.53 ± 0.03a |

Los valores son promedios con su respectivo error estándar. Las letras representan las comparaciones de medias entre tratamientos similares ($p < 0.05$).

La exposición del berro a soluciones combinadas de metales, mostró que independientemente de la proporción de Pb (II) y Cr (VI), no existieron diferencias significativas en su índice de tolerancia. De forma interesante, se observó que el FBC (Tabla 8) es mayor para el Pb (II) cuando el Cr (VI) se encuentra en mayor proporción (5:10 mg/L Pb-Cr) y el factor de translocación es mayor cuando ambos metales se encuentran en el mismo orden de magnitud (5:5 mg/L Pb-Cr). La mayor acumulación de Cr (VI) en la planta pudo ocurrir posiblemente por el cambio de estado de oxidación del metal en el medio acuoso, transformándolo a Cr (III), y de esta forma química ser aprovechado como micronutriente. El Pb (II) a diferencia del Cr (VI) no puede reducir su estado de oxidación manteniendo siempre su mismo nivel de toxicidad. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio se sugiere que puede haber una sinergia entre ambos metales, favoreciendo la acumulación de Cr. No se descarta que la actividad enzimática y la producción de compuestos como las fitoquelatinas intervengan en el comportamiento observado.

Tabla 8. Tolerancia, acumulación y translocación de soluciones bimetálicas en plantas de berro (*Nasturtium officinale*)

| Metales | Concentración (mg/L) | TI | BFC (mg/kg) | TF (mg/kg) |
|---------|-------------------------|-------------|----------------|-----------------|
| Pb-Cr | 5 - 5 | 0.32 ± 0.02 | 0.17 ± 0.1 a | 0.23 ± 0.01 b |
| | | | 0.10 ± 0.06 a | 0.03 ± 0.01 a |
| Pb-Cr | 10 - 5 | 0.26 ± 0.03 | 0.03 ± 0.001 b | 0.094 ± 0.002 a |
| | | | 0.43 ± 0.01 a | 0.033 ± 0.01 a |
| Pb-Cr | 5 - 10 | 0.37 ± 0.03 | 0.61 ± 0.02 a | 0.06 ± 0.001 a |
| | | | 0.08 ± 0.007 b | 0.04 ± 0.008 a |

Los valores son promedios con su respectivo error estándar. Las letras representan las comparaciones de medias entre tratamientos ($p < 0.01$). Para BFC y TF se muestra primero la concentración para Pb(II) y debajo la concentración para Cr (VI).

El transporte del Cr (VI) a través de la planta se lleva a cabo por mecanismos de portadores de nutrientes esenciales como SO_4^{2-} , Fe, S y P debido a su similitud estructural y cuando se da una alta acumulación de Cr (VI) se reduce la absorción de Fe, K, Mg, Mn, P y Ca (Gardea - Torresdey *et al.*, 2005). La mayor parte del Pb que es absorbido por las raíces se encuentra depositado extracelular (asociado de fosfato y carbonato), o se une a sitios de iones intercambiables dentro de la pared celular (Sahi *et al.*, 2002). Mientras que el resto se mueve a través de los canales de calcio y se deposita cerca de la endodermis o tejidos del floema (Huang y Cunningham, 1996; Antosiewicz, 2005). El almacenamiento de Pb en las distintas células vegetales depende del tipo de planta (Santos y Rodriguez, 2011).

El Cr (VI) inhibe la actividad de la membrana de plasmática (H^+ -ATPasa), reduciendo el crecimiento de raíces y la capacidad que tiene éstas para penetración en el suelo. Se ha propuesto que el Cr (VI) daña los cloroplastos debido a la reacción que se da en los centros de oxidación de agua, esto es debido a la reducción de la disponibilidad de Ca y Mn; y por la interferencia con algunas enzimas del ciclo de Calvin. El Cr (VI) afecta la tasa de transpiración, la conducción estomática y la tasa fotosintética (Santos y Rodriguez, 2011).

Los principales efectos de Pb que se produce son la disminución en la germinación, fotosíntesis, crecimiento de tallo y raíces, nutrición mineral, y actividades enzimáticas (Santos y Rodriguez, 2011). La presencia de Pb se genera déficit de agua, aumenta la intensidad de transpiración, la presión osmótica de savia de la célula, el potencial de agua de xilema y reduce el tamaño de las estomas (Santos y Rodriguez, 2011). El plomo se transporta a la membrana plasmática por medio de ATPasas de tipo P, ya que se confunde con metales esenciales. Además puede formar complejos con la cisteína (polipeptido de bajo peso molecular), la cual es formadora de fitoquelatinas y también puede ser transportado por mecanismos de similitud de Pb-acetato, Pb-nitrato y Pb-sulfato (Sharma *et al.*, 2005).

Kaser y Saygideger en el 2010 demuestran que la toxicidad del Pb (II) en plantas de *Nasturtium officinale* causa estrés oxidativo y los antioxidantes que produce la planta como medida de protección la ayudan a contrarrestar el daño provocado en las células debido a la presencia del metal. Sin embargo a concentraciones superiores de 100 mg/L de Pb (II) la protección enzimática es anulada y el metabolismo de la planta es seriamente afectado.

Los resultados obtenidos por Duman y Ozkar (2010), indican que el berro (*Nasturtium officinale*) puede acumular una cantidad significativa de níquel (60 mg/kg en peso seco), y pueden regular eficazmente los aumentos de concentración de dicho elemento debido a la producción de superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa. Por lo anterior dichos autores indican que el *Nasturtium officinale* puede ser utilizado como planta fitoremediadora en ecosistemas acuáticos con concentraciones moderadas de níquel.

Con los resultados obtenidos en este estudio se puede proponer al berro (*Nasturtium officinale*) como una opción para ser utilizada en programas de fitoestabilización de Cr (VI) >Pb (II). Sin embargo, se recomienda estudiar a mayor detalle los mecanismos de protección que activa la planta en las diferentes etapas de vida, ya que se muy probablemente los mecanismos involucrados serán diferentes (Lloret et al., 2004). El berro (*Nasturtium officinale*) es una planta acuática la cual ha sido evaluada recientemente en otros estudios, demostrando ser viable para acumular Cu y Zn en altas concentraciones y Ni en bajas (Kara, 2005), así como acumular 25 veces más Pb en las hojas que en tallos (Kaser y Saygideger, 2010).

Sin lugar a dudas, la concentración de clorofila en las plantas resulta ser un indicador fisiológico un muy valioso para medir sobre los efectos de su exposición a los metales pesados. En la Tabla 9 se muestran los resultados de clorofila total cuantificados en las plantas de berro (*Nasturtium officinale*) expuestas a las concentraciones monometálicas de Pb (II) y Cr (VI) a lo largo del periodo

experimental. Para Cr (VI) el experimento se finalizó al día 18 debido a que las plantas comenzaron a presentar clorosis en el 90 % de la superficie foliar, en concentraciones de 15 y 20 mg/L de Cr (VI) el berro (*Nasturtium officinale*) tenía inhibido el procesos de fotosíntesis esto se sugiere por la presencia de la clorosis foliar. En este mismo periodo de tiempo (18 días) se encontraron diferencias estadísticas de todos los tratamientos con respecto al control. Se observó daño en la planta a concentraciones de 3 y 6 mg Cr (VI)/L, lo cual coincide con los resultados de crecimiento relativo del berro (*Nasturtium officinale*).

Observaciones similares se han tenido al exponer otras plantas a concentraciones distintas de plomo y cromo, esto es causado por la deficiencia de nutrientes y la inhibición del fotosistema I y II generando alteraciones en la cantidad de clorofila y carotenoides producidos (Vázquez *et al.*, 1987; Boswell y Sharma, 2002; Sharma y Dubey 2005). La sustitución del átomo central de la clorofila (Mg) por Pb in vivo evita que se capture la luz dando como resultado ruptura de la fotosíntesis (Küpper *et al.*, 1996). Los síntomas visibles en la planta son manchas cloróticas, lesiones necróticas, envejecimiento y crecimiento atrofiado (Santos y Rodríguez, 2011).

Tabla 9. Concentración de clorofila total presente en berro al estar expuesto a Pb (II) y Cr (VI)

| Concentración (mg/L) | Clorofila total (mg/g) cuantificado en distintos días | | | | | |
|-------------------------|--|-------------|-------------|---------------|------------|-----------|
| | Pb (II) | | | Cr(VI) | | |
| | 1 | 10 | 20 | 1 | 10 | 18 |
| Control | 0.20±0.05a | 0.26±0.01a | 0.3±0.05a | 0.2±0.5a | 0.26±0.01a | 0.3±0.05b |
| 3 | 0.12±0.09b | 0.12 ±0.09c | 0.1±0.03b | 0.1±0.05a | 0.06±0.9b | 0.2±0.01b |
| 6 | 0.15±0.03a | 0.25 ±0.07a | 0.13± 0.07b | 0.1±0.08a | 0.1±0.01a | 0.2±0.04b |
| 12 | 0.11±0.08b | 0.10±0.02c | 0.2±0.01a | 0.2±0.04b | 0.1±0.04a | 0.3±0.08b |
| 15 | 0.17±0.08a | 0.18±0.06b | 0.2±0.08a | 0.08±0.2b | 0.03±0.04b | 5±0.06a |
| 20 | 0.18±0.01a | 0.15±0.08b | 0.18±0.05b | 0.09±0.6b | 0.03±0.05b | 0.4±0.05a |

Los valores son promedios con su respectivo error estándar. Las letras representan las comparaciones de medias entre tratamientos para el mismo periodo de tiempo ($p < 0.05$).

En lo que se refiere al Pb el experimento se mantuvo hasta el día 20 ya que la apariencia de las plantas de berro (*Nasturtium officinale*) era mejor. Se encontraron diferencias significativas entre los días que se muestreo. En la última toma de muestra se observó que las concentraciones que abarcaron de 6 a 12 mg Pb/L mostraron diferencias estadísticas con respecto al control pero no entre ellas. Esto se puede deber a la capacidad que tiene la planta para acumular una máxima concentración de Pb independientemente de la concentración disponible que se encuentre en la matriz acuosa. El análisis de los metales en el ultimo día experimental demuestra que hay diferencias entre el grado de toxicidad entre los metales nuevamente recalando que el Cr (VI) es más tóxico para el berro (*Nasturtium officinale*) debido lo cual se comprueba con la concentración baja de clorofila total cuantificada.

Los efectos tóxicos del Pb incluyen cese del crecimiento radicular y clorosis (Ribiero de Souza *et al.*, 2012), debido a su alta afinidad a grupos sulfhídricos, lo que inhibe la actividad de algunas enzimas, causando alteraciones en la nutrición mineral, balance de agua y síntesis de hormonas (Gopal y Rizvi, 2008). No obstante a lo anterior también existen plantas resistentes a Pb que no se ven afectados por estos eventos fisiológicos (Zhivotovsky *et al.*, 2011). La clorosis foliar se puede deber a la deficiencia de hierro (clorosis férrica) la cual produce acumulación de ácidos orgánicos (málico y láctico) en las raíces y partes aéreas. Dicho fenómeno puede ocurrir por dos mecanismos, el primero es influenciado por el contenido de hierro total presente en las membranas tilacoidales; ya que al desarrollarse la clorosis se disminuye el número de tilacoides. El segundo mecanismo es debido a la baja disponibilidad de hierro en las hojas. La inhibición de la biosíntesis de la clorofila a causa del hierro es resultado de un deterioro de la síntesis proteica (Férrandez-López, *et al.*, 1990).

La Tabla 10 muestra los resultados de clorofila total cuantificados a las plantas de berro (*Nasturtium officinale*) expuestas a concentraciones bimetálicas de Pb (II) y Cr (VI). Encontrándose diferencias significativas en el último día de

muestreo cuando ambos metales se encuentran en mayor proporción uno con respecto al otro. Se observa una disminución de la clorofila total que transcurre del día experimental 10 al 18 lo que indica que en ese periodo de tiempo la planta sufrió el mayor daño fisiológico sugiriendo que aumentando el tiempo experimental la planta moriría bajo dichas concentraciones. Esta información se complementa con los resultados encontrados en las velocidades de crecimiento relativo (Figura 28).

Tabla 10. Concentración de clorofila total en las plantas de berro (*Nasturtium officinale*) expuesta a concentraciones bimetálicas Pb (II)-Cr(VI).

| Tratamiento | Concentración (mg/L) | Clorofila total (mg/g) | | |
|-------------|----------------------|------------------------|-------------|-------------|
| | | 1d | 10 d | 18 d |
| Blanco | 0 | 0.20 ± 0.5a | 0.26 ± 0.9a | 0.3 ± 0.5a |
| Cr (VI)-Pb | 5-5 | 0.17 ± 0.5a | 0.20 ± 0.8a | 0.14 ± 0.8a |
| Cr (VI)-Pb | 5-10 | 0.16 ± 1.8a | 0.19 ± 0.7a | 0.07 ± 0.6b |
| Cr (VI)-Pb | 10-5 | 0.12 ± 0.8a | 0.17 ± 0.4a | 0.06 ± 0.2b |

Los valores son promedios con su respectivo error estándar. n=3. Las letras representan las comparaciones de medias entre tratamientos ($p < 0.05$).

6.2.6. Respuesta de las plantas de berro (*Nasturtium officinale*) expuesto a distintos valores de pH

Los resultados se muestran en la Figura 21, donde se observa la velocidad de crecimiento. Observándose que independientemente del valor de pH (5, 6, 7 y 8) el peso de la planta no cambia considerablemente. Sin embargo la longitud de la planta si muestra una tendencia, a pH 6 la planta aumenta considerablemente su tamaño. Los valores de pH elegidos para diseñar este experimento se pensaron en relación al pH resultante del efluente del biorreactor, debido a que sería el influente que alimentaría al humedal artificial. De acuerdo a los resultados obtenidos en este experimento cualquier pH que se utilice para experimentos

futuros no afectará la velocidad de crecimiento relativo, debido que el peso es similar para todos los valores de pH.

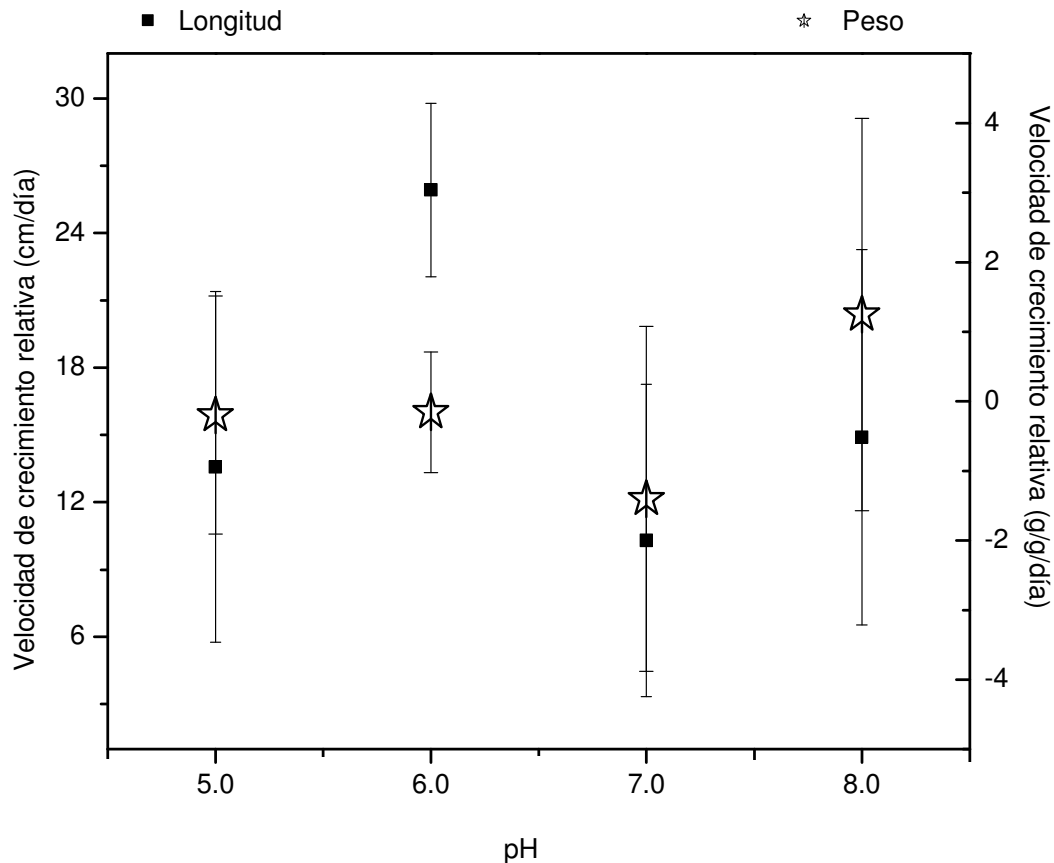


Figura 21. Velocidades de crecimiento relativo de berro (*Nasturtium officinale*) en presencia de distintos valores de pH. Las barras representan el error estándar. n=6.

En la Figura 22 se observan las concentraciones cuantificadas de clorofila A, B y total de las plantas de *Nasturtium officinale* que se expusieron a distintos valores de pH. Los resultados proyectan que la clorofila disminuye conforme avanzaron los días, mientras que la clorofila B y total presentó un comportamiento inverso. Las diferencias estadísticas significativas se encontraron en los últimos

días de muestreo donde se produjo mayor clorofila de acuerdo a lo siguientes valores de pH: $8 < 6 < 5 < 7$.

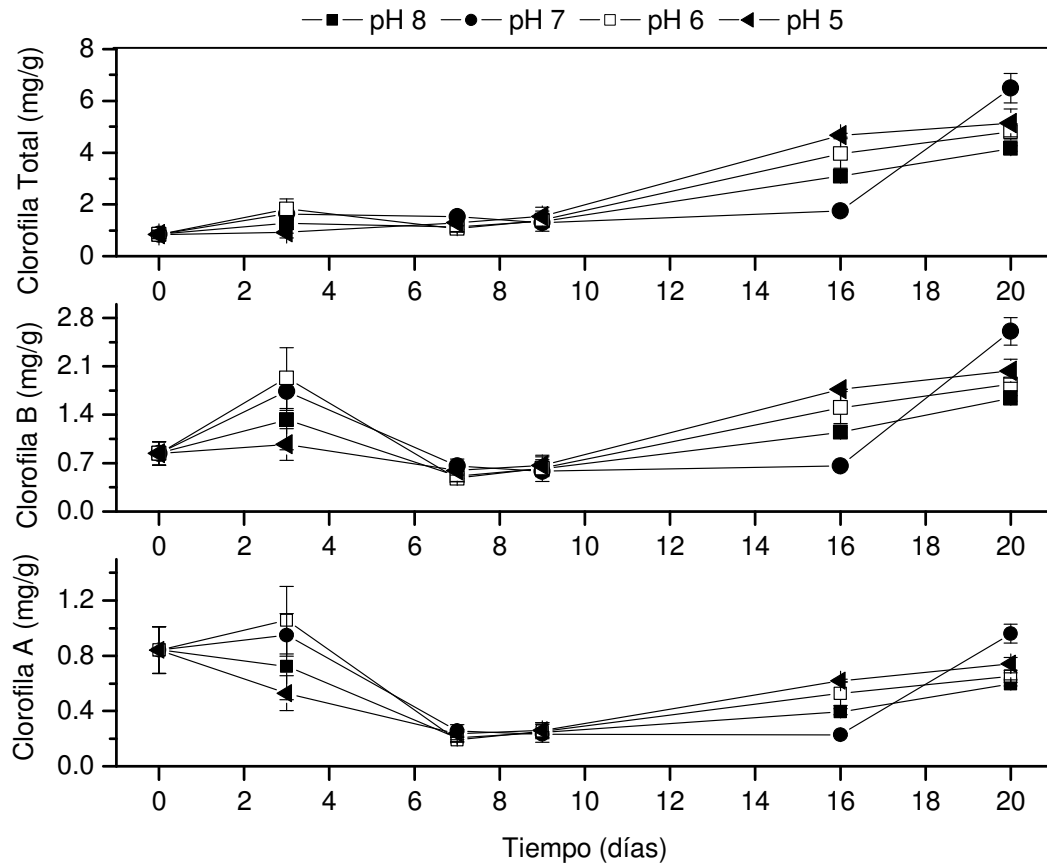


Figura 22. Concentraciones de clorofila A, B y total en plantas de berro (*Nasturtium officinale*) expuestas a distintos valores de valores de pH. Las barras representan en error estándar n=6.

6.2.7. Humedal artificial

Para conocer la concentración real de la solución metálica sintética se prepararon los distintos controles descritos en el apartado 5.2.6.2. Con los resultados obtenidos (Tabla 11) se realizó un balance de masa para Pb y Cr, considerando la utilización de 500 g de grava de río.

Balance para el plomo: la concentración inicial fue de 150 mg/L de los cuales las plantas retuvieron 610 mg/kg y la concentración residual fue de 31 mg/L. Llegando a la conclusión que cerca del 80% de plomo se precipitó. Este comportamiento es debido a la presencia de grava la cual está formada por piedras calizas, granito, dolomita, arsenisca, cuarzo y cuarcita (Barth, 1952). El pH de la solución fue superior a 7.8, se ha reportado que el Pb precipita como hidróxido de plomo a valores de pH superiores a 7.5 (Labastida-Nuñez *et al.*, 2012).

Balance para el cromo: la concentración inicial fue de 30 mg Cr (VI)/L, de ella las plantas retuvieron 151 mg/L y la concentración residual fue de 15.86 mg Cr/L indicando que el 50% del Cr (total) fue precipitado. Nuevamente este comportamiento fue influenciado por las mismas condiciones que promueve el sustrato rocoso (grava) de acuerdo a su composición química, formando óxidos u oxihidróxidos de cromo. El Cr (VI) puede reaccionar con los hidróxidos presentes sufriendo una reducción a Cr (III), donde este último sirve como micronutriente por las plantas.

Es importante recalcar que pueden existir interacciones entre ambos iones metálicos, las cuales no son cuantificadas en este estudio pero que pueden interferir en el balance de masa total.

Tabla 11. Concentraciones totales de Pb y Cr cuantificadas en los diferentes controles del humedal artificial

| Controles | Concentración (mg/L y mg/kg) | | pH |
|---------------------------------------|------------------------------|--------------|-----------|
| | Pb | Cr | |
| Solución nutritiva L-C | LC | LC | 7.3 ± 0.3 |
| Grava+ solución nutritiva L-C+ planta | LC | 75.6 ± 12.2 | 7.7 ± 0.3 |
| Planta + metal | 610 ± 30 | 151.1 ± 24.3 | 8 ± 0.2 |
| Grava+ metal | 31 ± 0.1 | 15.86 ± 7.2 | 7.5 ± 0.3 |

Los valores son promedios con su respectivo error estándar. n=3. LC: concentración por debajo del límite de cuantificación.

El humedal horizontal de flujo sub-superficial fue acondicionado por 12 días y contenía 50 plantas de berro (*Nasturtium officinale*). El humedal operó por 12 días con un volumen de recirculación del 33 % y solución sintética (30 mg Cr (VI)/L y 100 mg Pb (II)/L) a pH 3. A lo largo de los días de operación del humedal se determinó el pH del efluente y la concentración de los iones metálicos. El comportamiento de los metales fue el mismo que tuvieron en los controles cuando se encontraban en contacto con el sustrato rocoso. La concentración de Pb total estuvo por debajo del límite de cuantificación tanto en el efluente como en la biomasa vegetal.

En la Figura 23 se observa la concentración de Cr (total) en el efluente y los valores de pH obtenidos. La concentración de Cr desde el día 1 de operación cayó a 3.5 mg/L y osciló hasta los 1.5 mg/L a lo largo del tiempo de operación. Los valores de pH en los primeros tres días de operación oscilaron entre 3 y 3.2; en el día cuatro el pH tuvo un incremento considerable de dos unidades hasta alcanzar un valor de 5.5. El resto de los días el pH se mantuvo en un rango de 5.5 - 6.5. Este comportamiento se debió al amortiguamiento de los iones silicio, calcio, sodio, aluminio, hierro y magnesio presentes en la grava y que nuevamente propiciaron la precipitación del Pb (II) y precipitación y/o reducción del Cr (VI).

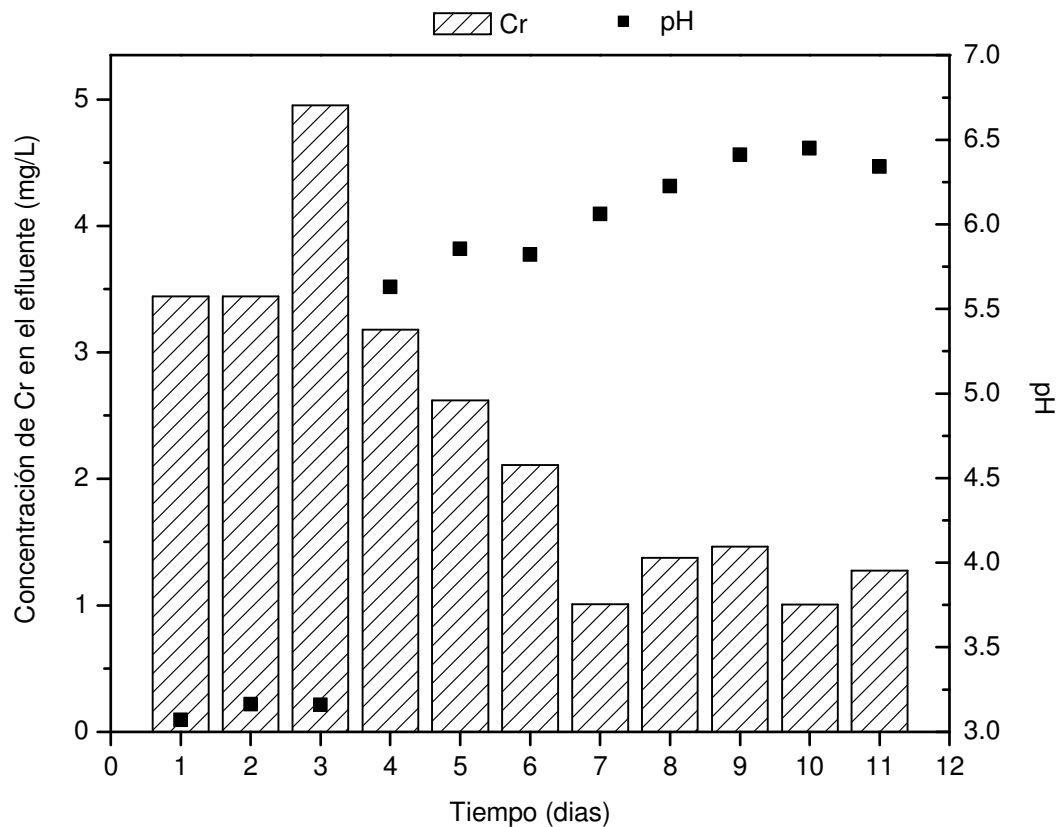


Figura 23. Concentraciones de cromo y valores de pH del efluente del humedal horizontal sub-superficial.

En la Figura 24 se muestra la concentración de Cr (total) y de clorofila total en la biomasa vegetal. Se encontró que la concentración de Cr (total) en la biomasa vegetal en el día uno fue la más alta que el resto de los días que operó el humedal, ya que, conforme transcurrieron los días no hubo diferencias estadísticamente de la concentración de Cr (total) en la biomasa. Este comportamiento puede estar relacionado con la capacidad que tiene la planta en retener el metal y el nivel de tolerancia que tenga frente a la sinergia de Pb (II) y Cr (VI).

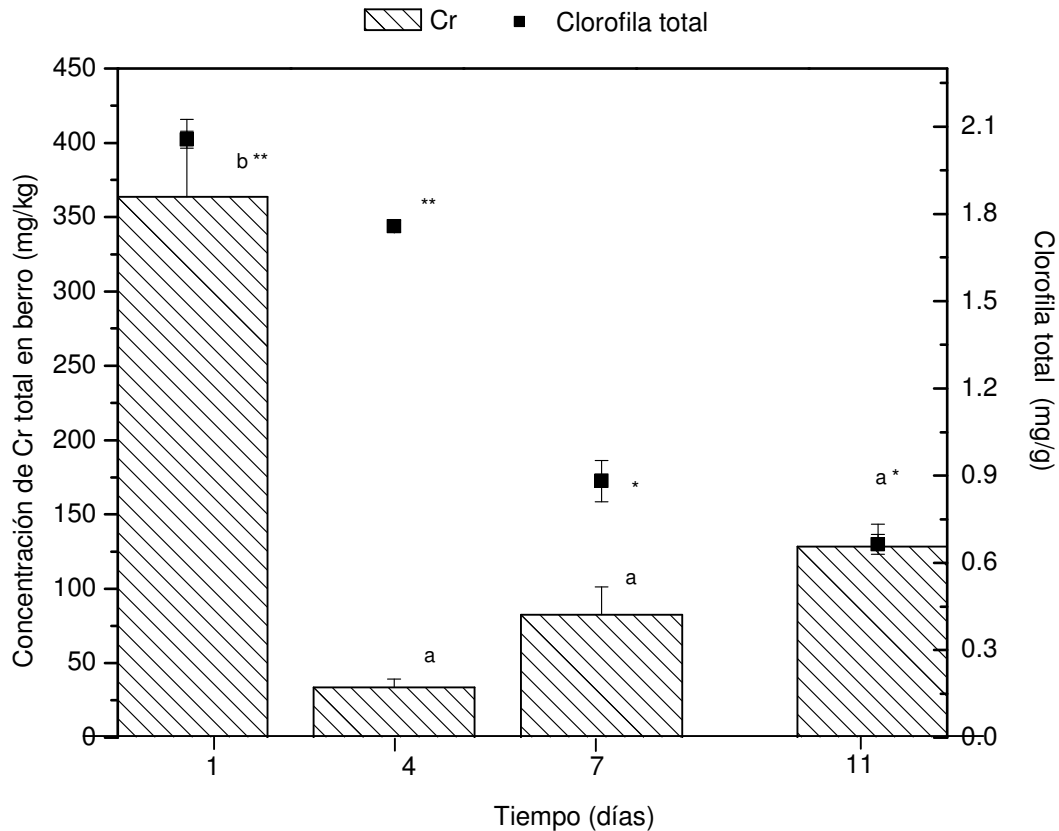


Figura 24. Concentraciones de clorofila total y cromo cuantificadas en la operación del humedal horizontal sub-superficial. Las barras representan en error estándar $n=4$. Las letras minúsculas y mayúsculas indican las diferencias estadísticas entre concentración de Cr (total) y clorofila total respectivamente ($p<0.05$).

El daño fisiológico sobre la planta se comprueba por la baja cantidad de clorofila total a lo largo del experimento. Además, visualmente se observó un efecto progresivo clorosis foliar que se fue extendiendo a lo largo del experimento, en algunos casos se observó reblandecimiento del tallo. Esto último se pudo deber a una infección recurrente en este tipo de planta la cual es propiciada por el virus de la mancha amarilla que promueve la putrefacción del tallo. Resultados similares obtuvo Smith (2007), cuando empleo berro (*Nasturtium officinale*) para remover materia orgánica de efluentes acuícolas, este daño en la planta puede verse favorecido por la presencia de niveles bajos de oxígeno disuelto en el agua.

Considerando la Ecuación 9 se realizó el balance de masa para el Cr tomando en cuenta que se repuso el 66 % del volumen total de la solución sintética ya que el 33 % del volumen fue recirculado.

Se obtuvo lo siguiente: $1.5\text{mg} / L + 0.94\text{mg} / L + 47.7\text{mg} / L + 47.4\text{mg} / L - 39.86\text{mg} / L$

La concentración a la salida del efluente fue del 1.35 % es decir lo que no se removi3 por ning3n medio (f3sico-qu3mico y/o biol3gico), las plantas retuvieron el 2.3 %, el sustrato rocoso (grava) retuvo el 53 % y el 44.2 % restante no se sabe con certeza cu3l fue el mecanismo que actu3 para su retenci3n. Considerando lo anterior el porcentaje de remoci3n dentro del humedal fue del 95 %. Los fen3menos de adsorci3n y/o desorci3n del metal sobre un sustrato en combinaci3n con un valor de pH entre 6 y 6.5, promueve la reducci3n de Cr (VI) a Cr (III) seguido de una formaci3n de complejos o precipitaci3n con distintos grupos funcionales (Hellerich *et al.*, 2008).

Para conocer a mayor detalle cuales fueron las posibles especies de Cr y Pb que se formaron dentro del lecho del humedal se hizo uso del software Visual MINTEQ VER 3.0. La siguiente informaci3n fue requerida como datos de entrada para el programa; pH de 6.3, se consider3 que la fuerza i3nica fue igual a cero y concentraci3n de cationes y aniones empleados (mol/L): NO_3^- 2.24, PO_4^{2-} 0.20, SO_4^{2-} 0.43, NH_4^+ 0.01, K^+ 1.203, Cl^- 0.01, Ca^{2+} 1.24, Na^{2+} 0.06, Mg^{2+} 0.4, Pb^{2+} 0.0003, CrO_4^{2-} 1.5×10^{-4} , Fe^{2+} 1.43×10^{-5} . Se consider3 la primera simulaci3n sin el sustrato rocoso y una segunda simulaci3n considerando que la grava aporta CO_3^{2-} (2 mol/L) y Ca^{2+} (1 mol/L), para ver el efecto del carbonato c3lcico que conforma principalmente a la grava. Los resultados arrojados por el software se encuentran en la Tabla 12, en la cual podemos apreciar que existe una diferencia marcada cuando se simula el comportamiento del Pb (II) y Cr (VI) con la grava y en ausencia de ella. Se forman compuestos c3lcicos de Pb y Cr algunos de ellos son poco solubles y pueden llegar a precipitar, dando como resultado la disminuci3n de la concentraci3n del metal en la soluci3n.

Tabla 12. Modelación de especies de Pb y Cr formados en el humedal horizontal sub-superficial alimentado con un efluente contaminado con estos metales.

| Ion metálico | Solución sintética | | Solución sintética más grava | |
|--------------|--|----------------|---|----------------|
| | Compuesto | Porcentaje (%) | Compuesto | Porcentaje (%) |
| Pb | Pb ²⁺ | 2.02 | PbCl ⁺ | 0.054 |
| | PbSO ₄ | 5.168 | Pb(SO) ₄ | 1.001 |
| | Pb(SO ₄) ₂ ²⁻ | 0.163 | Pb(SO ₄) ₂ ²⁻ | 0.094 |
| | PbNO ₃ ⁺ | 31.886 | PbNO ₃ ⁺ | 2.712 |
| | Pb(NO ₃) ₂ | 57.779 | Pb(NO ₃) ₂ | 6.467 |
| | PbH ₂ PO ₄ ⁺ | 0.389 | PbH ₂ PO ₄ ⁺ | 0.71 |
| | PbHPO ₄ | 1.956 | PbHPO ₄ | 0.358 |
| | PbOH ⁺ | 0.102 | Pb(CO ₃) ₂ ²⁻ | 3.455 |
| | PbCl ⁺ | 0.530 | PbCO ₃ | 24.389 |
| Cr | | | PbHCO ₃ ⁺ | 61.261 |
| | CrO ₄ ²⁻ NaCrO ₄ ⁻ | 0.796 | CrO ₄ ²⁻ | 2.197 |
| | KHCrO ₄ ⁻ | 0.175 | NaCrO ₄ ⁻ | 0.355 |
| | HCrO ₄ ⁻ | 2.022 | KHCrO ₄ ⁻ | 4.664 |
| | CaCrO ₄ | 1.292 | HCrO ₄ ⁻ | 3.563 |
| | CrO ₃ HPO ₄ ²⁻ | 95.683 | CaCrO ₄ | 88.973 |
| | | 0.031 | CrO ₃ HPO ₄ ²⁻ | 0.243 |

Los compuestos que se forman principalmente del Pb son Pb(NO₃)₂, Pb(CO₃)₂, PbCO₃ y PbHCO₃⁺ y para el Cr son CaCrO₄ y KCrO₄⁻. Cabe resaltar que esta aproximación no considera la presencia de compuestos orgánicos, tales como productos de degradación de la biomasa vegetal la cual podría modificar la formación de compuestos dentro del humedal.

Watson y Col. (1989) concluyen que existen muchos mecanismos para la remoción de compuesto (orgánicos e inorgánicos) en un humedal construido tales como la adsorción, formación de complejos, precipitación, adsorción de las plantas

y asimilación biótica. Al mismo tiempo, muchos microorganismos que habitan en las raíces de las plantas sumergidas pueden ayudar a la degradación, retención y/o asimilación de los contaminantes que la planta adsorba (Zhang, *et al.*, 2007)

6.3. Operación del sistema de tratamiento (biorreactor-humedal)

El sistema propuesto en esta investigación para la remoción de metales en efluentes, fue diseñado debido a la escasa información existente sobre biorreactores anaerobios y humedales horizontales sub-superficiales combinados para tratamiento de Pb (II) y Cr (VI). Ambos sistemas se han estudiado intensamente de forma individual para eliminar metales pesados en matrices acuosas, pero mucho se desconoce aún sobre las limitantes de tecnologías conjuntas.

Los humedales artificiales de flujo horizontal son generalmente dominados por condiciones anaeróbicas en el fondo. Pedescoll y Col. (2011a, 2011b), evaluaron el riesgo de obstrucción y la eficiencia de eliminación de contaminantes de los humedales cuando se utilizó un digestor anaeróbico como un tratamiento primario alternativa al sedimentador convencional. Colocar un reactor anaerobio disminuye la cantidad de sólidos que se puedan acumular y disminuyen el potencial óxido-reducción dentro del humedal (Pedescoll *et al.*, 2011a; de la Varga *et al.*, 2013).

Por lo anterior se decidió colocar el sistema anaerobio como primer tratamiento debido y por los resultados obtenidos en la secciones 6.1 ya que el sistema biológico presentó mayor tolerancia a altas concentraciones de metales en solución, favorecido por la presencia de la turba tratada por hidrólisis ácida (TBT) la cual presentó un alto grado de interacción con los iones metálicos debido a procesos de adsorción.

Y los resultados obtenidos en las secciones 6.2 sobre el humedal artificial, donde se observó que el berro (*Nasturtium officinale*) es susceptible a concentraciones elevada de Cr (VI). Además la grava empleada como sustrato rocoso tiene la capacidad de amortiguar la acidez elevando el pH y de esta manera promover la reducción del Cr (VI) y la precipitación del Pb (II). Tomando en cuenta las consideraciones antes mencionadas, se preparó un sistema de tratamiento el cual operó por 32 días en forma continua. Este tiempo de operación fue determinado por la apariencia de las plantas dentro del humedal artificial, ya que comenzaron a presentar daños visibles en tallo. Tal efecto, para las plantas fue debido al POR cuantificado en el efluente del humedal. En la Figura 25 se pueden observar los valores POR obtenidos, los cuales son bajos para un cuerpo de agua que contiene plantas que crecen ordinariamente en cuerpos de agua corriente. Según baja el potencial POR en aguas y sedimentos, se observa una disminución en la concentración de oxígeno disuelto y la reducción de iones y moléculas importantes para la nutrición de microorganismos y formas de vida superior. Marin (2003), indica que ambientes de agua dulce en equilibrio con el oxígeno atmosférico, tienen valores POR alrededor de +800 mV (0.8 V), mientras que el ORP para aguas oceánicas superficiales generalmente oscila entre +400 y +435 mV (a un pH entre 7.6 y 8.3). Cuando la concentración de oxígeno en dichos ambientes disminuye, el POR también disminuye. En solución muchos compuestos químicos modifican su reactividad, solubilidad y movilidad (ej. Fe, S, N, C, P, y varios elementos metálicos) de acuerdo a la concentración de oxígeno disuelto (Marin, 2003).

Los valores de POR presentes dentro del biorreactor son los óptimos para que la ARS este presente, sin embargo, al añadir nueva solución sintética cada octavo día se observa un incremento del POR el cual fue amortiguado por la ARS. El aumento del potencial POR dentro del biorreactor es afectado por el TRH, ya que fue de 0.86 h, y usualmente se emplean TRH en el orden de días. La mezcla de grava y piedra volcánica usada como sustrato de soporte para la formación de la biopelícula microbiana, resultó bastante adecuada, ya que en ambas matrices

se logró desarrollar una importante biomasa, aunque en el segundo caso, se cuantificó una mayor proliferación de microorganismos, probablemente debido en parte a la estructura porosa. Dato que sugiere una excelente oportunidad de usar este sustrato para mejorar la proliferación de BRS. Considerando las dimensiones del humedal artificial y volumen de tratamiento del biorreactor, el efluente de este último tenía que ser suficiente para alimentar al humedal, propiciando que las condiciones de POR no se mantuvieran constantes dentro el biorreactor. El comportamiento del pH dentro del biorreactor mostró oscilaciones similares, cada vez que se añadió nueva solución al sistema los valores disminuyeron, pero con el paso de los días fueron aumentando. Se llega apreciar una ligera tendencia de disminución del pH, se sugiere que es debido al consumo constante de compuestos cálcicos que amortiguan la disminución del pH.

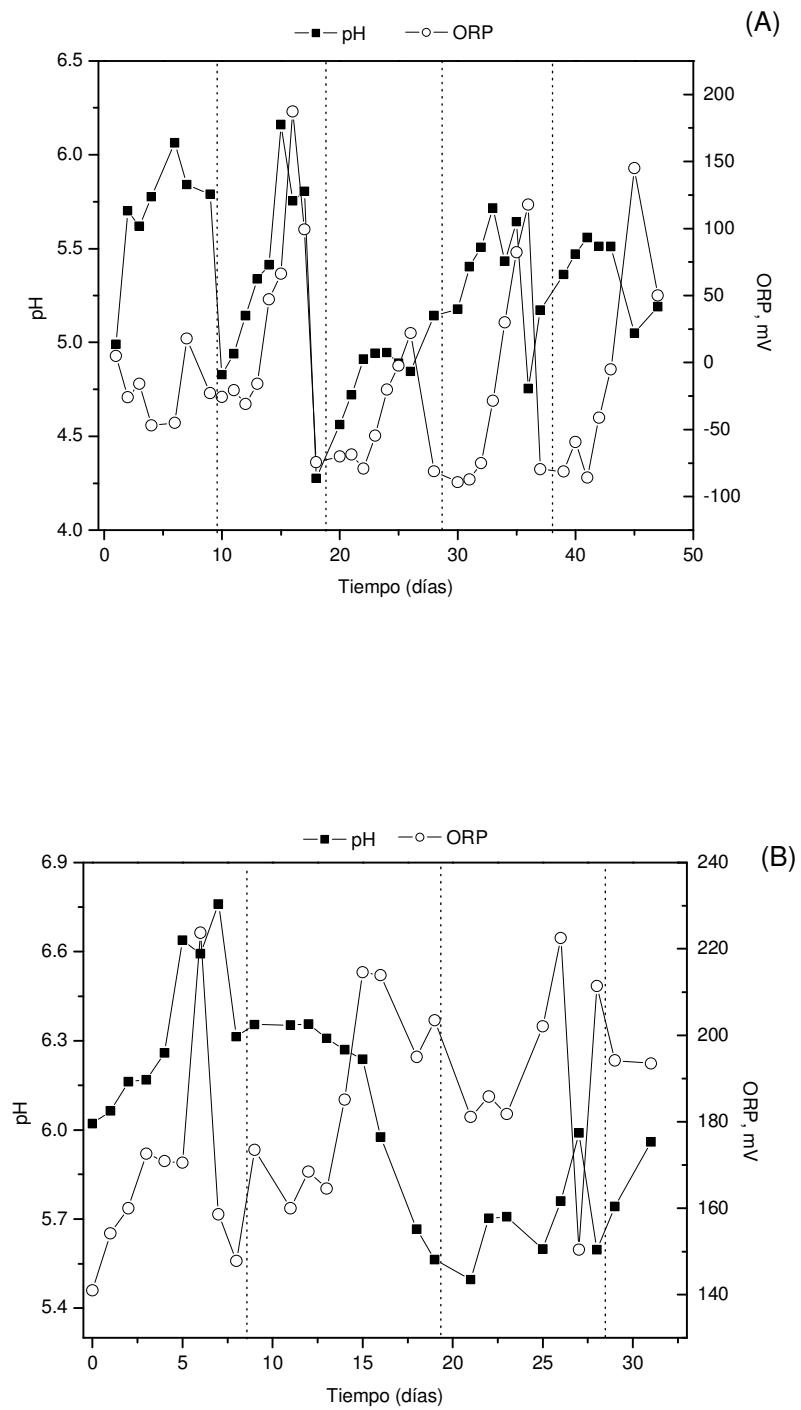


Figura 25. Determinación de pH y POR en el efluente del biorreactor (A) y el humedal artificial (B).

Dentro del humedal el pH se mantuvo por arriba de 6 en los primeros 15 días, posteriormente los valores comenzaron a bajar hasta el último día que se alcanzó un valor de 5.7. Con lo que respecto a la influencia del pH sobre la biomasa vegetal, en los experimentos previos no se observó ningún daño cuando la planta se expuso a un rango de valores de pH, por lo que se concluye que el daño observado en las plantas es por deficiencia de oxígeno en raíces que conlleva a la reducción de la absorción de nutrientes.

Las concentraciones de sulfato dentro del biorreactor y humedal fueron aumentando con el paso de los días, debido a posibles acumulaciones originadas por los recambios de la solución sintética. Indicando que fue un reactivo en exceso para el biorreactor ya que las comunidades reductoras de sulfato no lograron transformar el SO_4^{2-} a H_2S . El humedal siguió el mismo comportamiento (Figura 26) de acumulación de SO_4^{2-} . Mientras las concentraciones de nitratos en el efluente del biorreactor fueron disminuyendo a lo largo de los días experimentales, en el humedal fueron aumentando. Este último comportamiento posiblemente se deba a la descomposición de fragmentos de plantas, producto de la actividad de microorganismos que se desarrollaron dentro del humedal y que favorecen la descomposición vegetal.

Para evaluar el crecimiento del berro (*Nasturtium officinale*) a lo largo del experimento se determinaron distintos parámetros los cuales se muestran en la Tabla 13. Las plantas incrementaron el doble de su tamaño y generaron más ramas, triplicaron su peso y tuvieron una alta producción de brotes. Considerándose este último parámetro como una ventaja para el experimento ya que se promueve la proliferación del berro (*Nasturtium officinale*) a lo largo del humedal artificial.

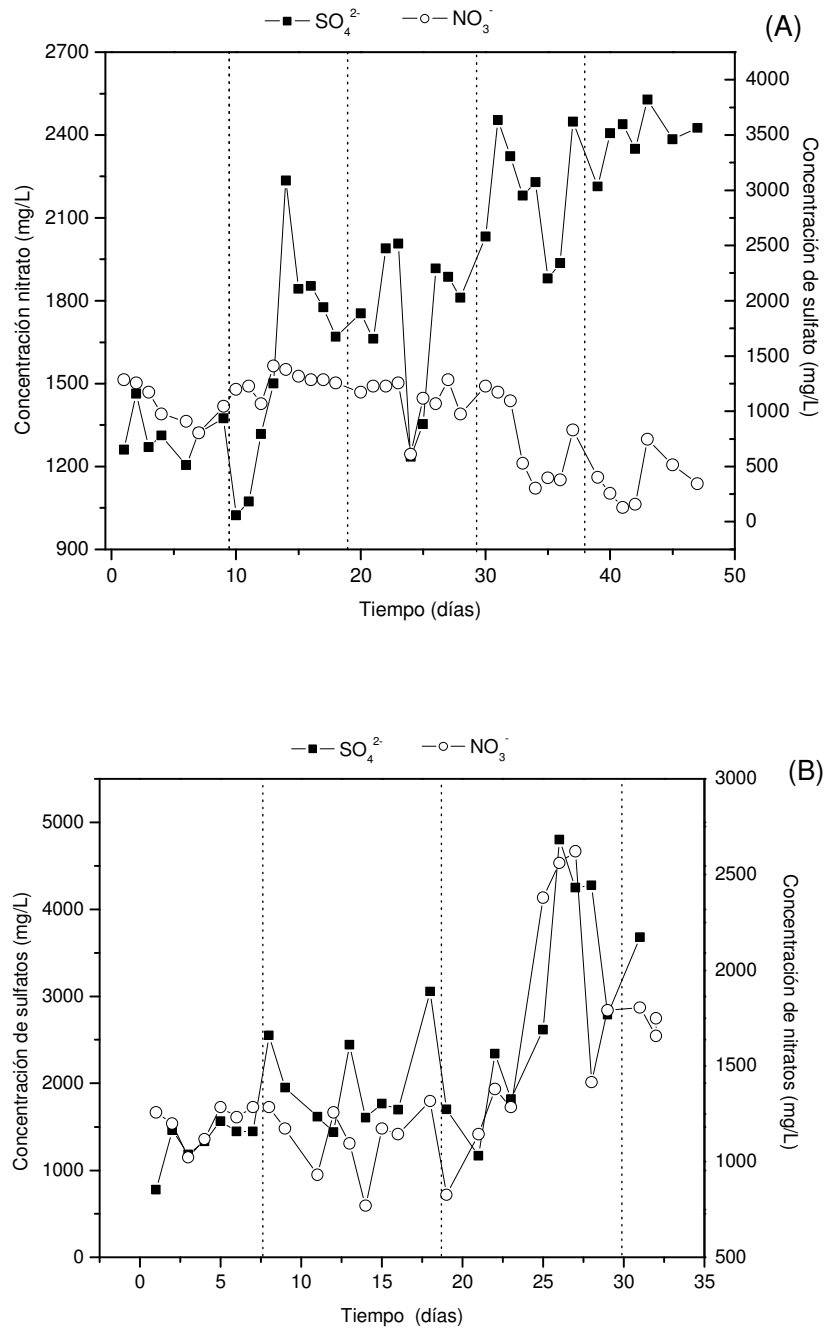


Figura 26. Concentración de sulfatos (SO_4^{2-}) y nitratos (NO_3^-) en el efluente del biorreactor (A) y el humedal artificial (B).

Tabla 13. Crecimiento del berro (*Nasturtium officinale*) durante la operación del sistema de tratamiento

| Día experimental | Longitud (cm) | Peso (g) | No. Ramas | No. Brotes |
|------------------|---------------|--------------|--------------|-------------|
| 7 | 15.4 ± 7.4b | 1.6 ± 0.04 b | 4.5 ± 11.4 a | 0.15 ± 1 b |
| 11 | 23 ± 31 b | 3.2 ± 4.2 a | 6.3 ± 7.4 a | 1.5 ± 7.5 a |
| 13 | 20 ± 35 b | 1.1 ± 2.7 a | 5 ± 35 a | 1.5 ± 4.7 a |
| 28 | 26 ± 10 b | 4.3 ± 2.8 a | 8.3 ± 16.5a | 2.1 ± 2.8 a |
| 32 | 29.1 ± 38a | 6.1 ± 27 a | 11.5 ± 6.7a | 2.7 ± 12 a |

Los valores son promedios con su respectivo error estándar. Las letras representan las comparaciones de medias entre el mismo período de tiempo ($p < 0.05$).

Para evaluar el estrés fisiológico de las plantas se cuantificó la clorofila a lo largo de los días experimentales (Tabla 14) encontrándose que la concentración de la clorofila total aumento, mientras que las clorofilas A y B oscilaron entre 0.74 - 22 g/L y 0.6 - 0.04 g/L respectivamente. Estas oscilaciones en las concentraciones se pueden deber a adaptabilidad que sufrió la planta al estar en contacto con los iones metálicos y el valor del POR.

Tabla 14. Concentración de clorofila del berro (*Nasturtium officinale*) durante la operación del sistema de tratamiento

| Días | Clorofila A (mg/g) | Clorofila B (mg/g) | Clorofila total (mg/g) |
|------|--------------------|--------------------|------------------------|
| 0 | 0.74 ± 0.2b | 0.52 ± 0.08a | 1.13 ± 0.4b |
| 4 | 0.97 ± 0.2a | 0.65 ± 0.1a | 1.145 ± 0.4b |
| 7 | 0.90 ± 0.1a | 0.63 ± 0.04a | 1.37 ± 0.2a |
| 10 | 0.96 ± 0.4a | 0.59 ± 0.02a | 1.38 ± 0.8a |
| 14 | 0.22 ± 0.001d | 0.16 ± 0.001c | 0.34 ± 0.001c |
| 18 | 0.44 ± 0.2c | 0.31 ± 0.08b | 0.67 ± 0.4c |
| 23 | 0.72 ± 0.01b | 0.45 ± 0.05b | 1.05 ± 0.31b |
| 27 | 0.72 ± 0.1b | 0.045 ± 0.05d | 1.05 ± 0.31b |
| 32 | 0.97 ± 0.1a | 0.04 ± 0.04d | 1.46 ± 0.2a |

Los valores son promedios con su respectivo error estándar. Las letras representan las comparaciones de medias entre tratamientos ($p < 0.05$).

Estos parámetros indican indirectamente que la concentración disponible de los metales para las plantas fue inferior a los originales, ya que no se logró ver en el periodo experimental una inhibición en el crecimiento del berro (*Nasturtium officinale*).

Es importante considerar que debe de existir una sinergia entre un potencial de óxido reducción bajo el cual produce una disminución en la concentración de oxígeno disuelto en combinación con la concentración del metal en solución. Seguramente esta combinación merma el crecimiento normal que debió de tener el berro (*Nasturtium officinale*) en el sistema experimental.

Las concentraciones de Pb (II) alteran morfológicamente a la planta, los efectos más comunes son inhibición del crecimiento en el sistema radicular, clorosis y necrosis en hojas y oscurecimiento en las venas de las hojas (Cenkci *et al.*, 2010). Sin embargo el primer síntoma que presentaron las plantas fue el reblandecimiento del tallo, de acuerdo a las variables analizadas dentro del humedal la combinación de los metales en solución, la baja concentración de oxígeno disuelto y una posible infección por el virus amarillo propicio dicha sintomatología sobre el berro (*Nasturtium officinale*). El daño más evidente que se presentó a lo largo de todos los experimentos fue la clorosis foliar.

Al día experimental 13 se extrajeron 10 plantas y se fraccionaron para cuantificar la concentración de metales. Encontrándose nuevamente que el berro (*Nasturtium officinale*) acumula Pb en raíz>brote>hoja>tallo, el mismo comportamiento se mantuvo hasta el final del experimento (Tabla 15). Mientras que al día 13 se cuantificó mayor concentración de Cr en brotes>raíces>hojas>tallos, pero al final del experimento el cromo se encontró en raíz>brote>hoja=tallo.

Con estos resultados podemos concluir que el berro (*Nasturtium officinale*) tiene la capacidad de estabilizar el Pb (II) y Cr (VI) en raíces y posteriormente translocarlo en partes aéreas y brotes. Esta planta prolifera abundantemente en espacios inundados con agua corriente, propiciando que la biomasa sembrada al inicio del tratamiento pueda ser cosechada en un periodo máximo de 40 días, considerando que las primeras plantas sean trasplantadas dentro del humedal y las posteriores cosechas sean producto de la propagación de las primeras plantas. De esta forma el sistema de tratamiento se mantendría constante dentro del humedal.

Tabla 15. Concentraciones totales de Cr y Pb en berro (*Nasturtium officinale*) a distintos tiempos de operación del humedal.

| | Plomo (mg/kg) | | Cromo (mg/kg) | |
|--------|----------------|--------------|---------------|----------------|
| | 13 días | 32 días | 13 días | 32 días |
| Hojas | 81.1 ± 21.7c | 33.4 ± 14c | 30.9 ± 4.1c | 25.2 ± 7.1 c |
| Tallos | 21.4 ± 10.1c | 6.5 ± 2.5d | 20 ± 1.8 d* | 25.2 ± 17.1c** |
| Raíces | 1461.5 ± 350a* | 368 ± 59 b** | 348.8 ± 84b | 289.1 ± 69a |
| Brotes | 197 ± 82b | 1795 ± 42a | 610.2 ± 127a | 235 ± 8.7b |

Los valores son promedios con su respectivo error estándar n= 10. Las letras representan las comparaciones de medias entre tratamientos para partes similares de las plantas (p<0.05) y los símbolos (*) las diferencias de la parte de la planta con respecto a los días.

En la Figura 27 se muestran los porcentajes de remoción totales de Pb, Cr y DQO para el biorreactor y el humedal. La remoción dentro del biorreactor tuvo el mismo patrón de comportamiento que el pH y potencial POR. Cada vez que se alimenta al sistema nueva solución metálica, el porcentaje de remoción disminuyó hasta un 15 % para el Cr, pero previo a este evento, el porcentaje de remoción alcanzaba un 70 %. Sin embargo, se puede observar una tendencia a decrecer el porcentaje de remoción de Cr. Dicho comportamiento fue propiciado por la disminución de la ARS debido a la acumulación del metal precipitado dentro del biorreactor que a pesar de estar reducido tiende a ser tóxico para los microorganismos. También existe disminución de sitios activos

dentro de la turba (TBT) los cuales tiene la capacidad de reaccionan con el metal para formar un complejo y adsorberlo; además de la desorción del metal que estaba atrapado dentro de la turba. Es importante recalcar que la TBT es la fuente de carbono para las BRS y constantemente se está degradando por lo que está liberando el metal que se encontraba adsorbido. Por estas observaciones es conveniente detener la operación del biorreactor y hacer un retrolavado para eliminar el metal precipitado para disminuir de esta forma su toxicidad a las BRS y para añadir más fuente de carbono para las comunidades. Para sugerir con mayor certeza cada cuanto tiempo es conveniente realizar dicha operación, es necesario profundizar y optimizar el proceso de tratamiento dentro del biorreactor.

Considerando los promedios obtenidos de remoción a lo largo del tiempo experimental para el biorreactor el porcentaje de remoción fue del 80 % y del 57 % para plomo y cromo respectivamente. El porcentaje de remoción de DQO dentro del biorreactor fue superior al 95 %, este porcentaje cuantificado a lo largo del experimento indica que el carbono soluble generado de la degradación de la TBT fue aprovechado eficientemente por las BRS. Por su parte el humedal también presentó porcentajes de remoción superiores al 90 % de DQO. Recordando que es un sistema de tratamiento y conociendo que el biorreactor no removió el 5 % de DQO. Se sugiere que dicho porcentaje fue aprovechado por microorganismos y/o plantas dentro del humedal para realizar funciones fisiológicas. El humedal removió 91 % de Pb y 66.6 % de Cr que entró en el sistema, por acción de las plantas, por la interacción del sustrato rocoso que promovió la precipitación del plomo y por la posible interacción de microorganismos que se encontraban dentro del humedal. Siendo este el porcentaje de remoción final del sistema de tratamiento.

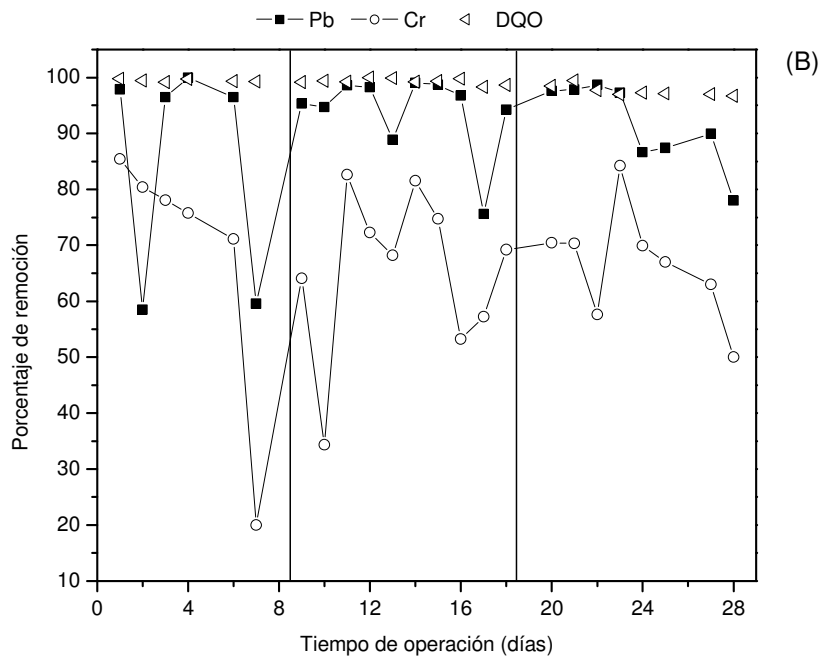
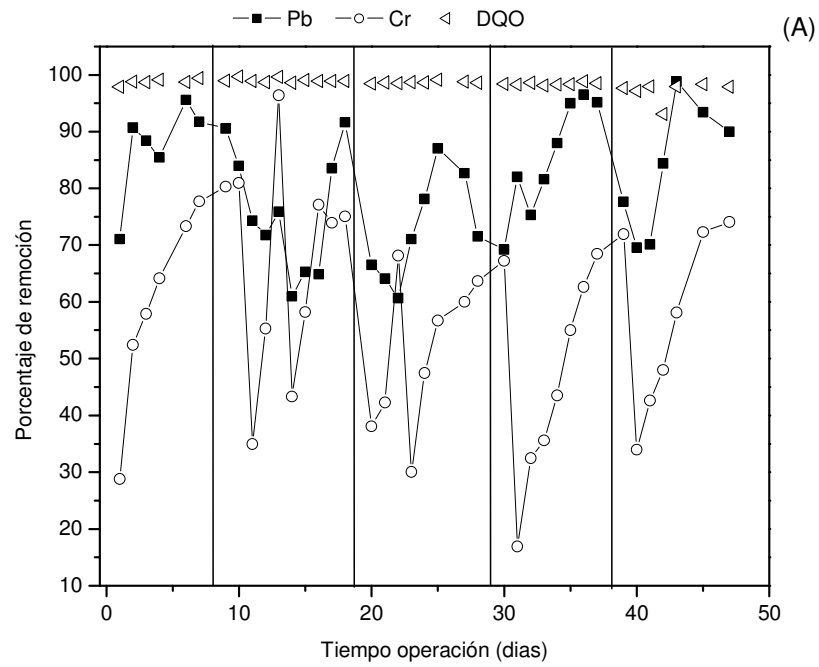


Figura 27. Porcentaje de remoción total de Cr, Pb y DQO en el efluente del biorreactor (A) y el humedal artificial (B).

De la Varga y Col. (2013) en un sistema similar en el cual emplearon dos humedales artificiales alimentados por un reactor anaerobio de flujo ascendente encontraron porcentajes de remoción similares para Pb y Cr superiores al 90%, sin embargo no especifican que tipo de vegetación emplearon para dicho sistema.

Es importante recalcar que debido a que el potencial POR dentro del humedal se encontraba fluctuando (100-200 mV) no se descarta que en el fondo habitaran BRS procedentes del biorreactor. Las condiciones anaerobias en humedales horizontales han sido previamente reportadas (Pedescol *et al.*, 2011).

Haciendo el balance de masa total para ambos sistemas de tratamiento se encontró que remueven el 98.2 % de plomo y 95.7 % de cromo en solución. Estos resultados indican que el sistema de tratamiento propuesto en el presente estudio es eficiente para la remoción de estos metales en matrices acuosa. Cabe resaltar que existieron en el estudio variables no cuantificadas, no controladas y no consideradas en el sistema, esto debido a la complejidad del mismo y a la poca información que existe sobre un acoplamiento de un sistema anaerobio con un aerobio.

Este estudio provee de información sobre aspectos básicos que se tiene que considerar para la implementación de un sistema de dicha naturaleza, así como un panorama general de las fortalezas y debilidades que tiene cada proceso y por lo tanto la posibilidad de mejoras al sistema de tratamiento. Una de las consideraciones más importantes que se debe de tener en cuenta en cualquier sistema de tratamiento es que siempre se presentan mezclas de contaminantes (orgánicos e inorgánicos) y estos pueden provocar diferencias en resultados previamente obtenidos.

7. Conclusiones

- ∞ El sitio de muestreo proporciono ocho consorcios reductores de sulfato. La selección del consorcio de trabajo C5 se hizo considerando la mayor producción de sulfuro de hidrógeno biogénico.
- ∞ El consorcio microbiano aislado (C5) del sitio contaminado por metales pesados demostró ser tolerante a concentraciones máximas de 550 mg Pb (II)/L y 2.6 mg Cr (VI)/L.
- ∞ El pre-tratamiento de la turba (10 % HCl, 10 min) es una alternativa como fuente de carbono por ser económica y sustentable que promueve la actividad sulfato reductora ya que aportan la cantidad necesaria de carbono para mantener la producción de H₂S. La concentración de consumo necesaria para el consorcio es de 740 mg/L. Y funciona como adsorbente natural, convirtiendo a esta fuente de nutrientes en un sistema pasivo de adsorción de iones metálicos.
- ∞ El pH óptimo para que el consorcio C5 reduzca sulfato es de 5, sin embargo debido a sus funciones metabólicas producen metabolitos que pueden amortiguar el pH del medio si este es inferior al pH óptimo encontrado.
- ∞ Dentro del biorreactor empacado de flujo ascendente los porcentajes de remoción para Pb y Cr fueron del 90 % y 65 % respectivamente (10 mg Cr (VI) y 50 mg Pb (II)/L). Estos porcentajes van directamente relacionados con las propiedades fisicoquímicas de los metales, siendo el cromo muy tóxico la comunidad bacteriana es más susceptible a sufrir daño celular. Mientras que el plomo es un elemento que puede formar complejos con

otros compuestos y precipitar fácilmente con un ligero cambio de pH en la solución.

- ∞ El tiempo de retención hidráulico de 0.8 h empleado para el biorreactor fue muy corto generando fluctuaciones en el potencial de oxidación-reducción, lo que conllevó a que a las comunidades bacterianas perdieran eficiencia en la remoción del metal.
- ∞ El porcentaje de germinación del berro (*Nasturtium officinale*) en presencia de Pb (II) y Cr (VI) (0 – 20 mg/L) no se vio afectado. Sin embargo, el crecimiento de las plántulas fue menor conforme aumentaba la concentración de cromo. El plomo tuvo un impacto menor sobre el crecimiento de la planta (tamaño de tallo y codiledón), pero probablemente aumentando más la concentración en el medio el comportamiento de la plántula sería el mismo que el observado en el cromo.
- ∞ A pH de 6.0 se tiene un aumento considerable de la longitud de la planta, sin embargo a valores distintos a ese el berro (*Nasturtium officinale*) tiene la capacidad de sobrevivir ya que el peso de la planta no cambia considerablemente.
- ∞ Para ambos metales el berro (*Nasturtium officinale*) tiene la capacidad de bioacumular en raíces>tallo=brotos>hojas la mayor concentración del metal biodisponible. Se encontró que el berro (*Nasturtium officinale*) tiene valores de FT y FBC por debajo de 1.0 convirtiéndolo en una opción apropiada para realizar programas de fitoestabilización, ya que dicho valor bajo indica que la especie es capaz de acumular bajas concentraciones de metal y translocarlo en los brotes.
- ∞ En concentraciones monometálicas la velocidad de crecimiento para el berro (*Nasturtium officinale*) cae drásticamente cuando se encuentran 3

mg/L y 12 mg /L de Cr (VI) y Pb (II) respectivamente. Las concentraciones bimetalicas indican que a concentraciones superiores a 3 mg Pb (II) – 5 mg Cr (VI) la tasa de crecimiento cae dramáticamente. Esto se puede deber a la sinergia de toxicidad de los metales sobre la planta.

- ∞ El balance de metal indican que el 80% del Pb (total) y el 50% del Cr (total) precipitaron, las plantas retuvieron 610 mg Pb (total)/kg y 151 mg Cr (total)/kg. La concentración residual del efluente fue de 1.35 %, y un 44.2% de la concentración de los metales no se sabe con certeza cuál fue el mecanismo que actuó para su retención. El porcentaje de remoción dentro de humedal fue del 95 % para el cromo.
- ∞ El berro (*Nasturtium officinale*) dentro del sistema de tratamiento biorreactor-humedal acumuló Pb (total) en raíz>brote>hoja>tallo. Mientras que el Cr (total) se encontró en raíz>brote>hoja=tallo. El porcentaje de remoción total de DQO dentro del biorreactor fue superior al 95 % y dentro del humedal de un 90 % de DQO. La remoción del sistema de tratamiento fue del 98.2 % de Pb y 95.7 % de Cr.

8. Recomendaciones

- ∞ Realizar estudios enzimáticos para ver los efectos que tienen los metales sobre los mecanismos antioxidantes del berro (*Nasturtium officinale*), se sugiere estudiar la superoxidaza dismutasa (SOD), peroxidasa (POD), catalasa (CAT), peroxidasa ascorbato (APX), glutationato peroxidasa (GPX), fitoquelatinas, pigmentos fotosintéticos y peroxidación lipídica.

- ∞ Modificar los parámetros hidráulicos del biorreactor - humedal y profundizar sobre los tiempos necesarios para realizar limpiezas en ambos sistemas para favorecer el proceso de remoción.

- ∞ Variar las concentraciones de cromo y plomo para comparar las eficiencias de remoción.

- ∞ Estudiar otras especies vegetales endémicas del México que no estén estudiadas y realizar policultivos dentro del humedal.

- ∞ Probar distintas fuentes de carbono sólidas para promover la actividad de las bacterias reductoras sulfato.

9. Anexos

ANEXO 1 Técnicas analíticas

1.1. pH y potencial oxido-reducción

El pH y el Eh fueron medidos con un medidor digital pH/Eh inmediatamente después de ser colectados con una jeringa estéril de 5 mL. El pH de las soluciones se evaluaron de acuerdo al método 4500-B del Standard Methods para la evaluación de agua y agua residual (APHA, 2005), mediante electrodo de referencia Ag/AgCl. Un medidor digital pH /Eh (Beckman, N395) fue usado para medir el potencial redox (Eh). La concentración de sulfato fue medida con un método turbidimétrico (Beckman, DU 650) (APHA-AWWA-WEF, 2005).

1.2. Cuantificación de metales totales en suelo, agua y material vegetal

Para realizar la digestión ácida del suelo se colocaron 0.5 g en un matraz Erlenmeyer con 25 mL de una solución HCl:HNO₃ (3:1, v/v) y se calentando a 180°C por 40 min. Para la determinación de Pb y Cr se pesó 0.2 g de muestra vegetal y se mezclaron con 15 mL de H₂O₂:HNO₃ (1:2, v/v) calentando a 180°C por 15 min. Transcurrido el tiempo se dejó enfriar, se filtró empleando un filtro No. 42 y se aforó a 25 mL. Todas las muestras se dejaron enfriar, se filtró empleando un filtro No. 42 y se aforó a 25 ml. Para muestras acuosas se tomaron 10 mL de solución la cual se filtró (filtro No. 42), se acidificó (HNO₃ concentrado) y se aforo a 25 mL para su posterior análisis.

La concentración total de metales se determinó usando un espectrómetro de absorción atómica (GBC, modelo 932 AA) los límites de cuantificación fueron 0.5 mg/L y 0.8 mg/L para plomo y cromo respectivamente. La mezcla de gases empleada fue aire:acetileno (3.5:1.5, mL/min). Se emplearon lámparas de cátodo hueco específico (PHOTRON_{PTY.LTD}) con una corriente de operación de 5 mA y 6mA para Cry y Pb respectivamente.

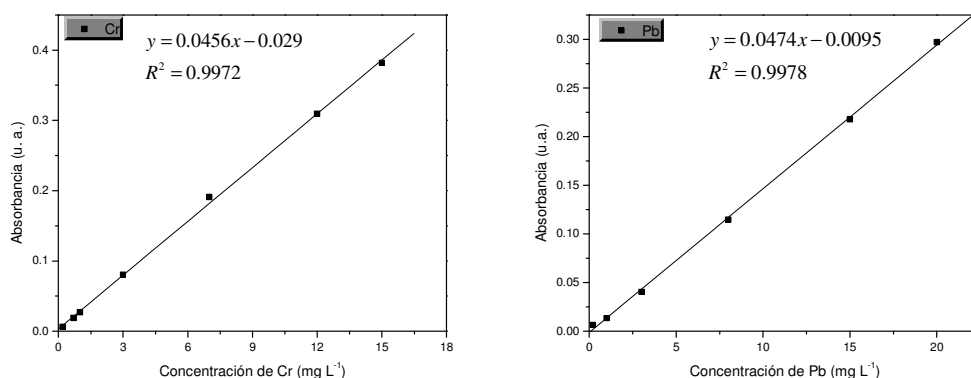


Figura 1. Curvas de calibración empleadas para cuantificar plomo y cromo en matrices líquidas y sólidas

El cálculo de los límites de detección y cuantificación, se evaluó a partir de diez muestras blanco empleando agua bidestilada, preparadas en las mismas condiciones que el resto de las muestras. El Límite de detección y cuantificación fueron de 0.001 mg/L y 0.005 mg/L respectivamente

1.3. Determinación de materia orgánica y carbonatos

En crisoles previamente calcinados a 550 °C por 30 min se colocaron 2 g del suelo, se pesaron para obtener el peso inicial (Pi), posteriormente se introdujeron a una mufla (marca) a 500 °C por 1h, transcurrido el tiempo se dejaron enfriar y se pesaron para obtener por diferencia de pesos el peso de la materia orgánica calcinada (Pmo) finalmente se regresaron a la mufla por 1 h a 1000 °C una vez enfriados se determinó el peso atribuible a carbonatos (Pca) por diferencia de peso de Pmo. Se consideró la muestra 3, 5 y 8 del muestreo previo para este análisis y se realizó por triplicado.

1.4. Determinación de sulfuro de hidrogeno en medio líquido

La determinación del sulfuro de hidrógeno, se determinó de una curva de calibración preparada a partir de una serie de diez muestras, cuyo intervalo de concentraciones fue de 0.25 a 21 mM de sulfuro sódico (Na₂S·9H₂O) a pH 7. Para ello, se añadieron volúmenes adecuados de la disolución patrón de Na₂S de 100 mM, llenándose con agua hasta el aforo. Los espectros de absorción se

registraron frente a un blanco reactivo con una resolución de 0.2 nm cuantificando a una longitud de onda de 480 nm (Beckman DU 650) (Cord-Ruwisch, 1985).

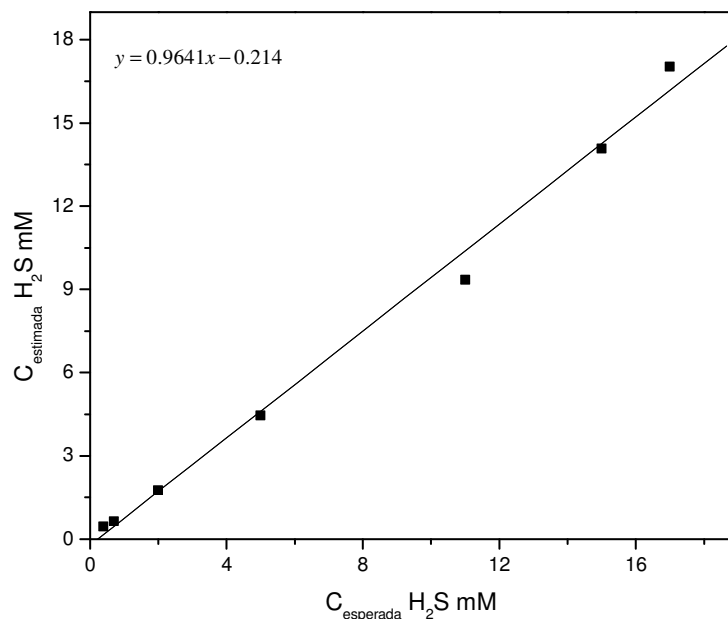


Figura 2. Concentración esperada y estimada de H₂S por espectrofotometría Uv-vis ($R^2=0.999$).

Los límites de detección (0.02 mg/L) y cuantificación (0.09 mg/L), se estimaron a partir de una serie de 10 blancos reactivos, preparados en las condiciones descritas anteriormente. La repetibilidad del método se estableció a partir de una serie de 10 muestras, cuya composición en Na₂S·9H₂O fue de 4 mM. La validación externa del método se llevó a cabo a través de una serie de siete muestras. El intervalo de concentración fue el mismo que para la calibración pero con diferentes concentraciones de Na₂S. Estas muestras se prepararon y analizaron en las mismas condiciones que la serie de calibración.

Para la cuantificación del sulfuro disuelto se tomó 0.1 mL de muestra mediante una jeringa de insulina, la muestra se hizo reaccionar en 4.0 mL de una solución 0.005 M de sulfato de cobre (CuSO₄) y 0.05 M de ácido clorhídrico (HCl),

inmediatamente se midió la absorbancia a la longitud de onda de 480 nm por espectrofotometría UV-Vis.

1.5. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La DQO se determinó de acuerdo a lo establecido por el Standard Methods (2005d), empleando una solución de digestión (1.5 mL) de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) de alto rango, 3.5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y sin eliminar las interferencias por nitritos. La curva de calibración se elaboró utilizando como estándar biftalato de potasio ($KHC_8H_4O_4$) se preparó una serie de seis muestras cuyo intervalo de concentración fue de 100 a 600 $\mu g mL^{-1}$ de $KHC_8H_4O_4$. La validación externa del método se llevó a cabo a través de la serie de muestras cuya composición fue la misma que las utilizadas en la calibración pero a distintas concentraciones. Las muestras se mantuvieron en reflujo por 2 h a 150 °C.

Los espectros de absorción se registraron frente a un blanco reactivo, en el intervalo de 550 a 650 nm, con una resolución de 0.2 nm y se cuantificó a la longitud de onda de 600 nm, empleando un espectrofotómetro UV-vis (Mca. Beckmann, DU, 650). Se pesó 0.5 g de BIOS, colocándolo en un matraz aforado de 500 mL aforado con HCL 0.01M, se mantuvo en agitación la solución al momento de tomar los 2.5 mL de muestra la cual se mezcló con el $K_2Cr_2O_7$ y el H_2SO_4 , se trataron las muestras de la misma manera que las preparadas para la curva de calibración.

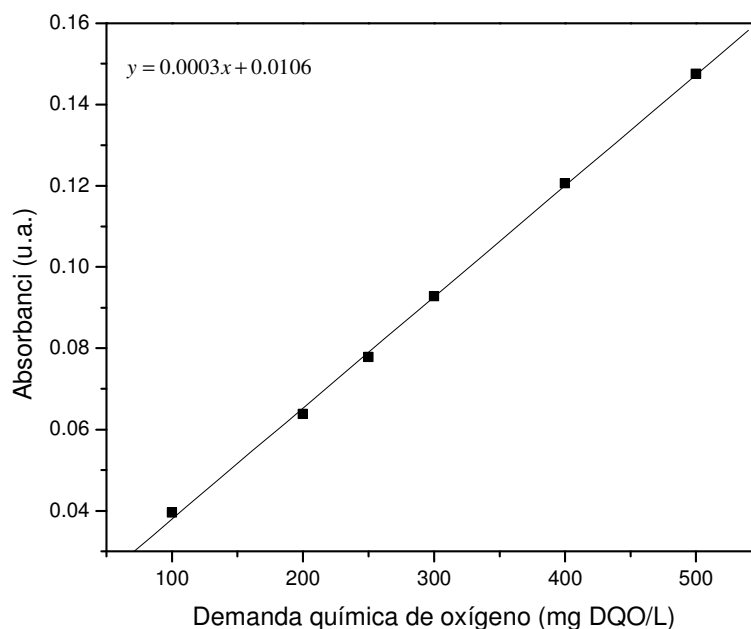


Figura 3. Curva de calibración empleada para cuantificar la demanda química de oxígeno ($r= 0.999$)

1.6. Cuantificación de biomasa

En cada uno de los experimentos realizados con los consorcios microbianos, se llevó el control de la cantidad de biomasa presente en los sistemas al inicio y al final de cada experimento. La cuantificación de la biomasa microbiana se determinó por conteo celular empleando un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 600 nm (Bio-Rad, SmartSec 3000).

La biomasa se cuantificó indirectamente relacionándola con el valor de sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el sistema. Para la determinación de los SSV se siguió el método 2540 G descrito en el Métodos Estándar (Eaton, *et al.*, 2005). En este método se establece que los SSV se establecen por diferencia de pesos entre la muestra seca a 105 °C y la muestra calcinada a 550 °C en una mufla (VULCAN 3-550PD NEY) obteniendo el equivalente de la fracción orgánica contenida en la muestra que es referida como sólidos suspendidos volátiles (SSV).

$$SSV = \frac{(A - B) * 1000}{\text{Volumen de muestra (mL)}} \quad (10)$$

Dónde:

A= peso de la muestra seca

B= peso de la muestra calcinada

1.7. Clorofila

Se tomó 0.2 g de hoja en peso fresco, la cual fue colocada en un mortero y se maceró con 10 mL de acetona al 80%. Posteriormente se filtró y se realizó la cuantificación por espectrofotometría UV-Vis a longitudes de onda de 645 nm y 663 nm. Cada análisis se realizó por triplicado, el cálculo de clorofila a, b y total fue realizado utilizando la Ecuación 11, 12 y 13 con los siguientes algoritmos matemáticos (Lehninger A. 1982).

$$\text{Clorofila a} = \frac{12.7 * A_{663} - 2.69 * A_{645} * V}{a * 1000 * W} \quad (11)$$

$$\text{Clorofila b} = \frac{22.9 * A_{645} - 2.69 * A_{663} * V}{a * 1000 * W} \quad (12)$$

$$\text{Clorofila total} = \frac{20.2 * A_{645} + 8.02 * A_{663} * V}{a * 1000 * W} \quad (13)$$

Dónde:

V= volumen de la muestra (L)

W= peso de la muestra fresca (g)

A= absorbancia a las longitudes de 645 nm y 663 nm

1.8. Sulfatos

El método (4-188) fue modificado del propuesto en APHA (2005) utilizando la curva de calibración para bajas concentraciones de sulfato y se variaron los volúmenes de muestra y solución amortiguadora utilizada. La curva de calibración se preparó con una serie de diez muestras, cuyo intervalo de concentraciones fue de 1 a 10 mg mL⁻¹ de sulfato de sodio (Na₂SO₄) y 20 mL de solución amortiguadora a pH 7 (MgCl₂ · 6H₂O; CH₃COONa · 3H₂O; KNO₃; Na₂SO₄;

CH₃COOH). Se agregó 0.1 g de BaCl₂ a la muestra y se puso en agitación por 1 min.

Los espectros de absorción se registraron frente a un blanco reactivo, en el intervalo de 350 a 450 nm, con una resolución de 0.2 nm y se determinó la absorbancia a la longitud de onda de 420 nm, empleando un espectrofotómetro UV-Vis (Mca. Beckmann, DU, 650).

1.9. Nitratos

Se preparó una solución patrón de KNO₃ el cual previamente fue secado a 105 °C durante 24 h. Se pesó 0.3626 g y añadieron 2 mL CHCl₃ y se aforó a 1L con agua destilada, teniendo una concentración final de 100 mg/L. La curva de calibración se preparó con una serie de seis muestras, cuyo intervalo de concentraciones fue de 1 a 600 mg/mL de NO₃⁻ la determinación de la absorción se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 220 nm (APHA, 2005). Posteriormente se cuantificó la concentración en las muestras a la misma longitud de onda.

Anexo 2

Fotografías de los distintos materiales y materias primas empleadas en el presente estudio



Figura 1. Precipitado negro característico por la formación de sulfuro de hierro que se forma al reaccionar con el H_2S biogénico.

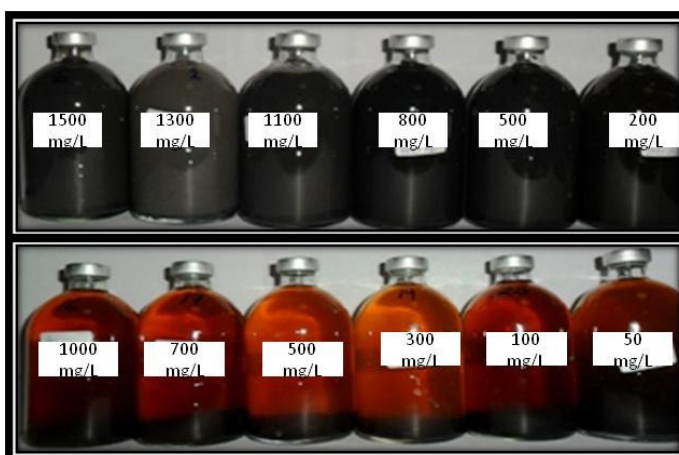


Figura 2. Sistema batch empleado para evaluar la tolerancias del CSR a diferentes concentraciones de (arriba) Pb (II) y (abajo) Cr (VI).



Figura 3. Turba comercial utilizada como fuente de carbono para el consorcio de trabajo

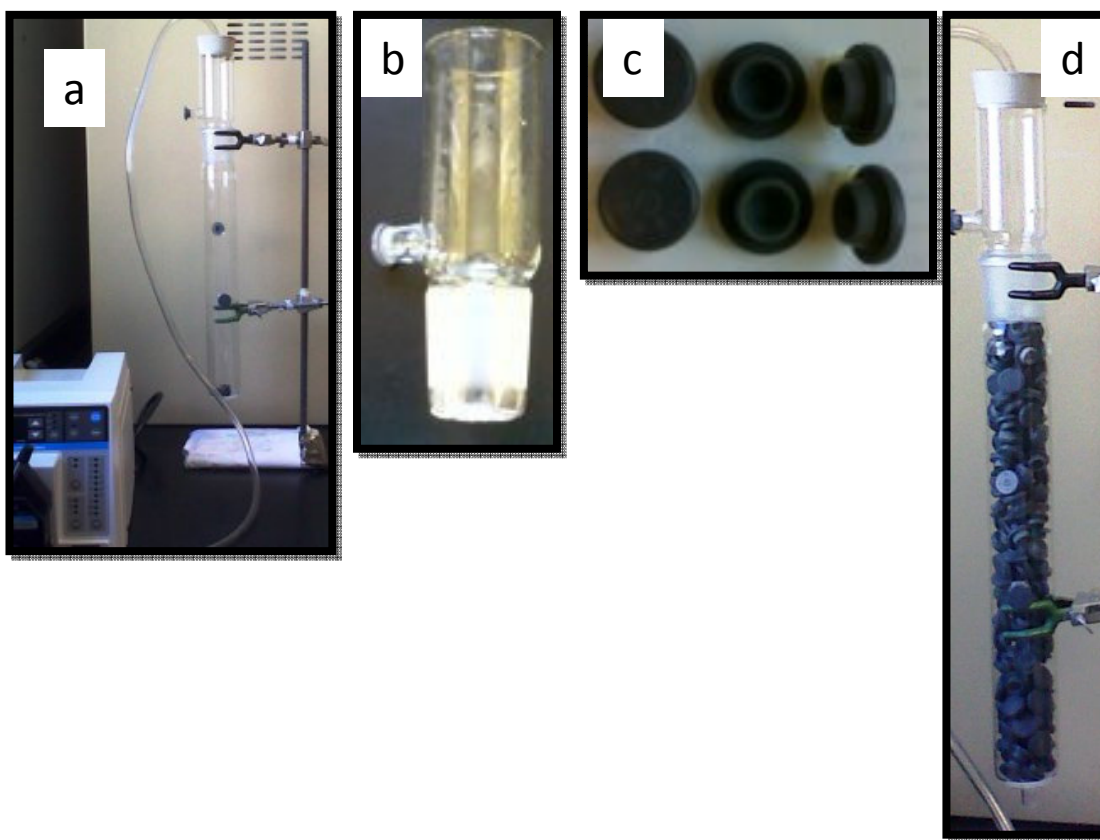


Figura 4. (a) Biorreactor dividido en dos partes con 3 puertos de muestreo; (b) parte superior removible del biorreactor; (c) material plástico de relleno; (d) parte inferior del biorreactor empacado.



Figura 5. Biorreactor empacado de flujo ascendente (izq) y precipitados de color blanco dentro del biorreactor debido a la presencia de H_2S biogénico.



Figura 6. Semillas de berro (*Nasturtium officinale*) (izq) y plantas de berro (*Nasturtium officinale*) (der) empleadas en este estudio.



Figura 7. Humedal artificial de polietileno de alta densidad utilizado en el este estudio.



Figura 8. Sistema de tratamiento en paralelo para remover Pb (II) y Cr (VI); conformado por el biorreactor empacado de flujo ascendente y el humedal artificial horizontal de flujo sub-superficial.

10. Bibliografía

- Agency for Toxic Substances & Disease Registry. ToxFAQs for: Lead and Arsenic. 2007. <http://www.atsdr.cdc.gov>. ATSDR.
- Alonso-Castro, A. J., Carranza- Alvarez, C., Alfaro-De la Torre, Ma. C., Chávez-Guerrero, L. y García-De la Cruz R. F. (2009) Removal and accumulation of cadmium and lead by *Typha latifolia* exposed to single and mixed metal solution. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57:688–696.
- Al-Zuhair, S., El-Naas, M.H., Al-Hassani, H., (2008) Sulfate inhibition effect on sulfate reducing bacteria. *J. Biochem. Tech.* 1(2), 39-44
- Andrade, S. A., Silveira, P.L., Azevedo, R. A., Silveira, A.P., Schiavinato, M.A. y Mazzafera, P. (2010) Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environ. Exp. Bot.* 68, 198-207.
- Antosiewicz, D.M. (2005) Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. *Environ. Pollut.* 134, 23-34.
- APHA-AWWA-WEF (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- Atlas, R. M. y Bartha, R. (2002) *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Addison Wesley, Madrid. pp. 279-287.
- Avudainayagam, S. Megharaj, M. Owens, G. . Kookana, R.S., Chittleborough, D. y Naidu, R. (2003) Chemistry of chromium in soils with emphasis on tannery waste sites, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 178, 53–91.
- Barth, T. F. W. (1952) *Theoretical Petrology: A Textbook on the Origin and the Evolution of Rocks*. New York. Wiley; London: Chapman & Hall. 387 pp.
- Barton, L.L. y Hamilton, W.A. (2007) *Sulphate-reducing Bacteria Environmental and Engineered Systems*. Cambridge University Press The Edinburgh Building, Cambridge CB2 8RU, UK.
- Bayrakdar, A., Sahinkaya, E., Gungor, M., Uyanik, S. y Atasoy, A.D. (2009) Performance of sulfidogenic anaerobic baffled reactor (ABR) treating acidic and zinc-containing wastewater. *Bioresour Technol.* 100, 4354–4360.

-
- Bidar, G., Verdin, A., Garçon, G., Pruvot, C., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., Douay, F. y Shirali, P. (2008) Changes in fatty acid composition and content of two plants (*Lolium perenne* and *Trifolium repens*) grown during 6 and 18 months in a metal (Pb, Cd, Zn) contaminated field. *Water Air Soil Pollut.* 192, 281–291.
- Blowes, D.W., Ptacek, C.J., Bain, J.G., Waybrant, K.R. y Robertson, W.D. (1995) Treatment of mine drainage using in-situ permeable reactive walls. In: *Proc. of Sudbury '95- Mining and the Environment*, vol. 3, Sudbury, Ontario. CANMET, Canada, Ontario. pp. 979–987.
- Blowes, D.W., Ptacek, C.J., Bain, J.G., Waybrant, K.R. y Robertson, W.D. (1995) Treatment of mine drainage using in-situ permeable reactive walls. In: *Proc. of Sudbury. Mining and the Environment*, vol. 3, Sudbury, Ontario. CANMET, Canada, Ontario. pp. 979–987.
- Borremans, B., Hobman, J.L., Provoost, A., Brown, N.L. y Van der Lelie, D. (2001) Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J Bacteriol.* 183, 5651–5658.
- Boswell, C., Sharma, N.C. y Sahi, S.V. (2002) Copper tolerance and accumulation potential of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 546–553.
- Bothe, H., Regvar, M. y Turnau, K. (2010) Arbuscular mycorrhiza, heavy metal, and salt tolerance. *Soil Biol.* 19, 87-111.
- Bruins, M.R., Kapil, S. y Oehme, F.W. (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45,198-207.
- Brunetti, G., Soler-Rovira, P., Farrag, K. y Senesi, N. (2009) Tolerance and accumulation of heavy metals by wild plant species grown in contaminated soils in Apulia region, Southern Italy. *Plant Soil.* 318, 285–298.
- Bulgariu, L., Bulgariu, D., y Macoveanu, M. (2012) Characteristics of sorption of uncomplexed and complexed Pb(II) from aqueous solutions onto peat. *Chem. Pap.* 66 (4), 239–247.
- Calvente, R., Palenzuela, J., García, C., Azcón-Aguilar, C., y Barea, J. (1999) Microrrización de plantas de olivo micropropagadas. XIII Reunión de la sociedad Española de Fisiología Vegetal: VI congreso Hispano-Luso, Universidad de Sevilla, España, Pag. 149.
- Cárdenas Lara, Iván Israel (2010) Efecto de la aplicación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular en la biodisponibilidad de metales pesados en un sistema de fitoextracción. Maestría en Ciencias Orientación en Procesos Sustentables. FCQ, UANL.
-

- Carpena, R.O. y Bernal M. P (2007) Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas*. 16 (2), 1-3.
- Celis-García, L.B., Razo-Flores, E. y Monroy, O. (2007) Performance of a down-flow fluidized-bed reactor under sulfate reduction conditions using volatile fatty acids as electron donors. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 771-779.
- Genkci, S., Cigerci, I.H., Yıldız, M., Ozay, C., Bozdog, A. y Terzi, H.(2010) Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa L.* *Environ. Exp. Bot.* 67, 467–473.
- Cetin, D., Dönmez, S. y Dönmez, G. (2008) The treatment of textile wastewater including chromium (VI) and reactive dye by sulfate-reducing bacterial enrichment. *J. Environ. Manag.* 88, 76–82.
- Champagne, P., Geel, V. y Parker W. (2008) Impact of temperature and loading on the mitigation of AMD in peat biofilter columns. *Mine Water Environ.* 27, 225–240.
- Cirik, K., Dursun, N., Şahinkaya, E., Çinar, Ö. (2013) Effect of electron donor source on the treatment of Cr(VI)-containing textile wastewater using sulfate-reducing fluidized bed reactors (FBRs), *Bioresour. Technol.* 133, 414-420.
- Choi, J., Park, S., Jaffe, P. (2006) The effect of emergent macrophytes on the dynamics of sulfur species and trace metals in wetland sediments. *Environ. Pollut.* 140, 286-293.
- Choudhary, R.P. y Sheoran, A.S. (2011) Comparative study of cellulose waste versus organic waste as substrate in a sulfate reducing bioreactor. *Bioresour. Technol.* 102, 4319–4324.
- Cirik, K., Dursun, N., Şahinkaya, E., Çinar, Ö. (2013) Effect of electron donor source on the treatment of Cr(VI)-containing textile wastewater using sulfate-reducing fluidized bed reactors (FBRs). *Bioresour. Technol.* 133, 414-420.
- Clemens, S. Palmgren, M.G. y Kraemer, U. (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends. Plant Sci.* 7, 309–315.
- Clyde, E.J., Champagne, P. y Jamieson, H.E. (2010) The use of passive treatment alternatives for the mitigation of acidic drainage at the Williams Brother mine, California: Bench-scale study. *Appl. Geochem.* 25, 958–971.
- Cord-Ruwisch, R., (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 4, 33-36.
-

-
- Costa, M.C., Martins, M., Jesus, C. y Duarte J.C. (2008) Treatment of Acid Mine drainage by sulphate-reducing bacteria using low cost matrices. *Water Air Soil Pollut.* 189, 149–162.
- Cunningham, S. D., Anderson, T.A., Schwab, A.P. y Hsu, F.C. (1996) Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* 56, 55-114.
- Davies, F.T., Puryear, J.D., Newton, R.J., Egilla, J.N. y Grossi, J.A.S. (2002) Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. *J. Plant Nutr.* 25, 2389–2407.
- De la Varga, D., Díaz M. A., Ruiz, I. y Soto, M. (2013a) Heavy metal removal in an UASB-CW system treating municipal wastewater. *Chemosphere.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.043>
- De la Varga, D., Díaz, M.A., Ruiz, I., Soto, M. (2013b) Avoiding clogging in constructed wetlands by using anaerobic digesters as pretreatment. *Ecol. Eng.* 52, 262–269.
- Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R. y Acevedo-Sandoval, O. (2011) Phytoremediation: an alternative to eliminate pollution. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 14, 597 - 612.
- Duman, F. y Oztur, k. F. (2012) Nickel accumulation and its effect on biomass, protein content and antioxidative enzymes in roots and leaves of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *J. Environ. Sci.* 22, 526–532.
- E-bac 2000. The Environmental Company. Wastewater Treatment Solutions. Página: <http://www.ebac2000.com/ebac.htm> (Fecha de acceso: 21 de Junio del 2013).
- Fernández, M., Gil. y Pardos J. A., (1996) Supervivencia y crecimiento en vivero de plantas de cinco procedencias de *Pinus pinaster* Ait. Bajo diferentes regímenes hídricos. *Invest. Agr. Sist. For.* 5, 19-23.
- Fernandez-Going, B., Even, T., y Simpson, J. (2013) The effect of different nutrient concentrations on the growth rate and nitrogen storage of watercress. *Hydrobiology.* 705, 63-74.
- Fernández-López, J. A., Almela Ruíz, L. y Fernández Rubio, J. (1990) La nutrición férrica de las plantas. El problema de la clorosis. Secretaria de Publicaciones, Universidad de Murcia, pag. 28.
- Gardea-Torresdey, J.L., de la Rosa, G., Peralta-Videa, J.R., Montes, M., Cruz-Jimenez, G. y Cano-Aguilera, I. (2005) Differential uptake and transport of
-

- trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 48: 225-232.
- Gikas, P. y Romanos, P. (2006) Effects of tri-valent (Cr(III)) and hexavalent (Cr(VI)) chromium on the growth of activated sludge. J. Haz. Mat. 133, 212–217.
- Gilbert, O., De Pablo, J., Corina, J.L. y Ayora C. (2003) Evaluation of municipal compost/limestone/iron mixtures as filling material for permeable reactive barriers for in-situ acid mine drainage treatment. J. Chem. Technol. Biot. 78, 489-496.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J. y Azevedo, R.A. (2005) Making the life of heavy-metal stressed plants a little easier, Funct. Plant Biol. 32, 481–494.
- Grimaldo H. Cinthya D. (2011). Evaluación del efecto de enmiendas sobre la fitoestabilización de un suelo contaminado por Pb y Zn. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Going B., Simpson, J. y Even, T. (2008) The influence of light on the growth of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). Hydrobiologia. 60, 75–85.
- Gopal, R. y Rizvi, A. H. (2008) Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish. Chemosphere 70, 1539-1544.
- Gottschalk. G. (1986) Bacterial metabolism. Springer, New York, 260-264pp.
- Gupta, D.K., Nicoloso, F.T., Schetinger M.R.C., Rossato, L.V., Pereira, L.B., Castro, G.Y., Srivastava, S. y Tripathi, R.D. (2009) Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. J. Hazard. Mater. 172, 479–484.
- Hagenfeldt, L. Arvidsson, A. y Larsson, A. (1978) Glutathione and gamma-glutamylcysteine in whole blood, plasma and erythrocytes. Clin. Chim. Acta. 85, 167.
- Hall, J. L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J. Exp. Bot. 53, 1–11.
- Hanc, A., Baralkiewicz, D., Piechalak, A., Tomaszewska, B., Wagner, B. y Bulska, E. (2009) An analysis of long-distance root to leaf transport of lead in *Pisum sativum* plants by laser ablation-ICP-MS. Int. J. Environ. Anal. Chem. 89, 651-659.
- Hellerich, L. A., Nikolaidis, N.P. y Dobbs G. M. (2008) Evaluation of the potential for the natural attenuation of hexavalent chromium within a sub-wetland ground water. J. Environ. Manage. 88, 1513–1524.

-
- Hoa, T.T.H., Liamleam, W. y Annachhatre, A.P. (2007) Lead removal through biological sulfate reduction process. *Bioresour. Technol.* 98, 2538 –2548.
- Holt. J., Krieg, N., Peter, H. A., Staley, J. y Stanley, W. (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, William & Wilkins Eds. Baltimore.
- Howard, H.W. (1976) Watercress *Rorippa nasturtium-aquaticum* (Cruciferae), In: *Evolution of crop plants*. N.W. Simmonds, Longman, London. p. 62-64. <http://www.thekrib.com/Plants/Tech/intensorama.html>
- Huang, J.W. y Cunningham, S.D. (1996) Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.* 134, 75-84.
- Instituto tecnológico de canarias, <http://www.itccanarias.org>, revisado en junio, del 2013.
- Jiménez-Rodríguez, A.M., Durán-Barrantes, M.M., Borja, R., Sánchez, E., Colmenarejo, M.F. y Raposo F. (2009) Heavy metals removal from acid mine drainage water using biogenic hydrogen sulphide and effluent from anaerobic treatment: Effect of pH. *J. Hazard. Mater.* 165, 759–765.
- Kara, Y. (2005) Bioaccumulation of Cu, Zn and Ni from the wastewater by treated *Nasturtium officinale*. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2(1), 63–67.
- Keser G. y Saygideger S. (2010) Effects of lead on the activities of antioxidant enzymes in watercress, *Nasturtium officinale* R. Br. *Biol. Trace. Elem. Res.* 137, 235–243.
- Kieu, H.T.Q., Müller, E. y Horn, H. (2011) Heavy metal removal in anaerobic semi-continuous stirred tank reactors by a consortium of sulfate-reducing bacteria. *Water Res.* 45, 3863 -3870.
- Küpper, H. Küpper, F. y Spiller, M. (1999) Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants *J. Exp. Bot.* 47, 259-266.
- Labastida-Nuñez, I., Lázaro, I., Celis, L.B., Razo-Flores, E., Cruz, R. y Briones-Gallardo R. (2013) Kinetic of biogenic sulfide production for microbial consortia isolated from soils with different bioaccessible concentrations of lead. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 10, 827-836.
- Laboulaye, C. y Mellado, F. (1856) *Diccionario de artes y manufacturas de agricultura de minas*. Liberia Española, Madrid.
- Lehninger A. 1982. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York.
- Lens, P., Omil, F., Lema, J.M. y Hulshoff, P. (2000). *Biological treatment of*
-

- organic sulfate-rich wastewaters. Environmental Technologies to treat sulfur pollution-principles and Engineering. Edited by Lens P.N.L. y Hulshoff Pol L. IWA, pp. 153-168.
- Leónard, A. y Gerber, G. (1996) Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of antimony compounds. *Mutat. Res-Rev. Genet.* 336 (1), 1-8.
- Lin, R., Wang, X. R., Luo, Y., Du, W. C., Guo, H. Y. y Yin, D. Q. (2007) Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere*, 69: 89–98.
- Liu, X.H., Gao, Y.T., Sardar, K., Duan, G., Chen, A.K., Ling, L., Zao, L., Zhonghan, L. y Xuecan, W. (2008) Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on contaminated sites and their potential accumulation capacity in Heqing, Yunnan. *J. Environ. Sci.* 20, 1469-1474.
- Lloret, F., Penuelas, J. y Estiarte, M. (2004) Experimental evidence of reduced diversity of seedling due to climate modification in a Mediterranean-type community. *Glob. Change Biol.* 10: 248–258.
- López-Chuken U.J. (2005). The Effect of Chloro-complexation on Cadmium Uptake by Plants. Tesis de Doctorado. The University of Nottingham, Reino Unido. 171p.
- López, M. G. (2009) Distribución y fitodisponibilidad de metales pesados (Sb, Hg, As) en los jales de la mina de antimonio de Wadley, estado de San Luis Potosí. Universidad Autónoma de México.
- López-Luna, J., González-Chávez, M.C., Esparza-García, F.J., Rodríguez-Vázquez, R. (2009) Toxicity assessment of soil amended with tannery sludge, trivalent chromium and hexavalente chromium, using wheat, oat and sorghum plants. *J. Hazard. Mater.* 163, 829–834.
- Marchand L., Mench, M., Jacob, D.L. y Otte, M.L. (2010) Metal and metalloid removal in constructed wetlands, with emphasis on the importance of plants and standardized measurements: A review. *Envir Pollut.* 158, 3447-3461.
- Marin Galvin R. (2003) Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos, tratamiento y control de la calidad de agua. Ediciones Díaz de Santos, S.A., Madrid, pp 155.
- Mayesa, W.M., Davisa, J., Silva V. y Jarvis, A.P. (2011) Treatment of zinc-rich acid mine water in low residence time bioreactors incorporating waste shells and methanol dosing. *J. Hazard. Mater* 193, 279– 287.
- Melcalf y Eddy, Inc. Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. Tercera edición. Volumen 2. México 1996.

- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Kumar, R., Seth, C. S. y Gupta, D. K. 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*, 65: 1027–1039.
- Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Livingston, A. y Peeva, L. (2000) Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: an experimental and modeling study. *Biotechnol. Bioeng.* 70, 533-543.
- Nies D.H., (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 730-750.
- Noctor, G. y Foyer, N. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 49, 249–279.
- Norma oficial mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en agua y bienes nacionales.
- Norma oficial mexicana NOM-201-SSA1-2002. Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias.
- Norma oficial mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio.
- Olmos-Márquez, M. A., Alarcón-Herrera, M. T. y Martín-Domínguez, I. R. (2012) Performance of *Eleocharis macrostachya* and its importance for arsenic retention in constructed wetlands. *Environ Sci Pollut Res.* 19, 763–771.
- Ortiz-Cano, H. G., Trejo-Calzada, R. Valdez-Cepeda, R. D., Arreola-Ávila, J. G., Flores-Hernández, A. y López-Ariza, B. (2009) Fitoextracción de plomo y cadmio en suelos contaminados usando quelite (*Amaranthus hybridus* L.) y mocorrizas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15, 161-168.
- Ozturk, F., Duman F., Leblebici Z. y Temizgul, R. (2010) Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. *Environ. Exp. Bot.* 69, 167–174.
- Pagnanelli, F., Cruz Viggi, C. y Toro, L., (2010) Isolation and quantification of cadmium removal mechanisms in batch reactors inoculated by sulphate reducing bacteria: Biosorption versus bioprecipitation. *Bioresour Technol.* 101, 2981–2987.
- Pagnanelli, F., Cruz Viggi, C., Cibati, A., Uccelletti, D., Toro, L. y Palleschi, C. (2012) Biotreatment of Cr(VI) contaminated waters by sulphate reducing bacteria fed with ethanol. *J. Hazard. Mater.* 199–200, 186–192.

-
- Palaniswamy, U.R. y McAvoy, R.J. (2001) Watercress: A salad crop with chemopreventative potential. *Hort Technol* 11, 622-626.
- Pedescoll, A., Corzo, A., Álvarez, E., García, J. y Puigagut, J. (2011a) The effect of primary treatment and flow regime on clogging development in horizontal subsurface flow constructed wetlands: an experimental evaluation. *Water Res.* 45, 3579–3589.
- Pedescoll, A., Corzo, A., Álvarez, E., Puigagut, J., García, J. (2011b) Contaminant removal efficiency depending on primary treatment and operational strategy in horizontal subsurface flow treatment wetlands. *Ecol. Eng.* 37, 372–380.
- Peralta-Videa, J. R., Lopez, M. L., Narayan, M., Saupe, G. y Gardea-Torresdey, J. L. (2009) The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1665–1677.
- Pérez Rodríguez R. Y. (2007) Comportamiento geoquímico de plomo en sedimentos acuáticos contaminados con residuos mineros. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Phifer, M., Turick, C. y Millings, M. (2001). D-Area Coal Pile Basin Sulfate Reduction. Literature Review and Feasibility Report. Westinghouse Savannah River Company, Savannah River site <http://sti.srs.gov/fulltext/tr2001371/tr2001371.pdf>.
- Pushak, S. (1997) Foot-candles, lux, lumens, sunlight, PAR. 2 Revizado: 23 Marzo del 2013.
- Ribeiro de Souza, S. R., López de Andrade, S.A. y Anjos de Souza, L., y Aparecida, M. (2012) Lead tolerance and phytoremediation potential of Brazilian leguminous tree species at the seedling stage. *J. Environ. Manage.* 110, 299- 307.
- Ribeiro, O. C., Vollaire, Y. y Sanchez-Chardi, A. (2005) Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquat. Toxicol.* 74, 53–69.
- Sahi, S.V., Bryant, N.L., Sharma, N.C. y Singh, S.R. (2002) Characterization of a Lead Hyperaccumulator Shrub, *Sesbania drummondii*. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4676-4680.
- Sahinkaya, E., Kilic, A., Altun, M., Komnitsas, K., Lens, P.N.L. (2012b) Hexavalente Chromium Reduction in a sulfur reducing packed-bed bioreactor. *J. Hazard. Mater.* 219-220, 253-259.
-

-
- Sahinkaya, E. y Gungor M. (2010) Comparison of sulfidogenic up-flow and down-flow fluidized-bed reactors for the biotreatment of acidic metal-containing wastewater. *Bioresour. Technol.* 101, 9508–9514.
- Sahinkaya, E., Altun, M., Bektas, S. y Komnitsas, K., (2012a) Bioreduction of Cr(VI) from acidic wastewaters in a sulfidogenic ABR. *Miner. Eng.* 32, 38–419 44.
- Sahinkaya, E., Gunes, F.M., Ucar, D. y Kaksonen, A.H. (2011) Sulfidogenic fluidized bed treatment of real acid mine drainage water. *Bioresour. Technol.* 102, 683–689.
- Santos, C. y Rodriguez, E. (2011) Review on some emerging endpoints of chromium (VI) and lead phytotoxicity. In *Botany*, Ed. Mworio J., In Tech, Disponible en : http://cdn.intechopen.com/pdfs/32713/InTech-Review_on_some_emerging_endpoints_of_chromium_vi_and_lead_phytotoxicity.pdf
- Schorer, A., Shneider S., y Melzer, A. (2000) The importance of submerged macrophytes as indicators for the nutrient concentration in a small stream. *Limnologica* 30, 351-358.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H. y Avudainayagam, S. (2005) Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31, 739–753.
- Sharma, N. C., Gardea-Torresdey, J. L., Parsons, J. y Sahi, S. V. (2004) Chemical speciation and cellular deposition of lead in *Sesbania drummondii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2068–2073.
- Sharma, P. y Dubey, R.S. (2005) Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 35-52.
- Shaw, A.J., 1989. *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. CRC Press, New York.
- Shi, X., Zhang, X., Chen, G., Chen, Y., Wang, L., Shan, X., 2011. Seedling growth and metal accumulation of selected woody species in copper and lead/zinc mine tailings. *J. Environ. Sci.* 23, 266-274.
- Simon, J.E., Chadwick, A.F. y Craker, L.E. (1984) *Herbs: An Indexed Bibliography. The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone*. 6 Jan 2005. <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/med-aro/factsheets/WATERCRESS.html>>.
- Singh, R., Kumar, A., Kirrolia, A., Kumar, R., Yadav, N., Bishnoi, N.R. y Lohchab, R.K. (2011) Removal of sulphate, COD and Cr(VI) in simulated and real
-

- wastewater by sulphate reducing bacteria enrichment in small bioreactor and FTIR study. *Bioresour Technol.* 102, 677–682.
- Singh, R., Kumar, A., Kirrolia, A., Kumar, R., Yadav, N., Bishnoi, N.R., Rajesh, Lohchab R.K. (2011) Removal of sulphate, COD and Cr(VI) in simulated and real wastewater by sulphate reducing bacteria enrichment in small bioreactor and FTIR study. *Bioresour. Technol.* 102, 677–682.
- Singh, R.P. y Agrawal, M. (2010) Variations in heavy metal accumulation, growth and yield of rice plants grown at different sewage sludge amendment rates. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 632–641.
- Smith, E. N. (2007) Watercress (*Nasturtium officinale*) Production Utilizing Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) Flow-through Aquaculture Effluent. Davis College of Agriculture, Forestry, and Consumer Sciences at West Virginia University. Morgantown, West Virginia.
- Suñe, N., Sánchez, G., Caffaratti, S., Maine, M. A. (2007) Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. *Environ. Pollut.* 145, 467–473.
- Tekerlekopoulou, A.G., Tsiamis, G., Dermou, E., Siozios, S., Bourtzis, K. y Vayenas, D.V., (2010) The effect of carbon source on microbial community structure and Cr(VI) reduction rate. *Biotechnol. Bioeng.* 107, 478-487.
- Tennant D. (1975) A test of a modified line intersects method of estimating root length. *J. Ecol.* 63, 995–1001.
- Tewari, R. K., Kumar, P., Sharma, P. N. y Bisht, S. S. (2002) Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Science*, 162: 381–388.
- Utgikar, V.P., Harmon, S.M., Chaudhary, N., Tabak, H.H., Govind, R. y Haines, J.R. (2002) Inhibition of sulfate-reducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage. *Environ. Toxicol.* 17(1), 40–48.
- Vaiopoulou, E. y Gikas, P. (2012) Effects of chromium on activated sludge and on the performance of wastewater treatment plants: A review. *Water Res.* 46, 549-570.
- Vajpayee, P., Sharma, S.C., Tripathi, R.D., Rai, U.N. y Yunus, M. (1999) Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera Gaertn.* *Chemosphere.* 39: 2159-2169.
- Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Ali, M.B. y Singh, S.N. (2000) Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and

-
- protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere*. 41, 1075–1082.
- Vallejos-Ríos B.B. (2011) Evaluación de un consorcio microbiano con actividad sulfatorreductora empleando celulosa como sustrato, para la remoción de arsénico presente en agua. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Vazquez, M.D., Poschenrieder, C. y Barcelo, J.(1987) Chromium (VI) induced structural and ultra structural changes in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *Ann. Bot.* 59, 427–438.
- Violante, A., Cozzolino, V., Perelomov, L., Caporale A.G. y Pigna M. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments (2010) *J. Soil. Sci. Plant Nutr.* 10 (3): 268–292.
- Wang, S.J. y Zhong, J.J. (2007). Bioprocessing for value-added products from renewable resources, new technologies and applications. Chapter 6. *Bioreactor engineering*. Elsevier, Oxford, UK.
- Wang, J., Li, W., Zhang, C. y Ke, S (2010) Physiological responses and detoxification mechanisms to Pb, Zn, Cu and Cd in young seedlings of *Paulownia fortune*. *J. Environ. Sci.* 22(12) 1916–1922.
- Watson, J. T., Reed, S. C. y Kadlec, R. H. (1989) Performance expectations and loading rates for constructed wetlands. In: *Constructed wetlands for wastewater treatment: municipal, industrial and agricultural*. Ed. Hammer, D. A. Chelsea, MI: Lewis Publishers. 315 – 319.
- Weijma, J., Hulshoff, P., Stams, A. y Lettinga, G. (2000) Performance of thermophilic sulfate and sulfite reducing high rate anaerobic reactor fed with methanol. *Biodegradation*. 11, 429-439.
- White, C., Sayer, J.A. y Gadd, G. M. (1997) Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. *FEMS Microbiol Rev.* 20, 503-516.
- Xu, S. y Jaffé, P.R.(2006) Effects of plants on the removal of hexavalent chromium in wetland sediments. 2006. *J. Environ. Qual.* 35, 334 – 341.
- Yawata, Y. y Tanaka, K.R. (1973) Red cell glutathione reductase: mechanism of action of inhibitors. *Biochim. Biophys.* 321, 72.
- Zagury, G., Kulnieks, V. y Neculita, C. (2006) Characterization and reactivity assessment of organic substrates for sulphate-reducing bacteria in acid mine drainage treatment. *Chemosphere* 64: 944–954.
- Zayed, A., Suvarnalatha, G. y Terry, N. (1998) Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *J. Environ. Qual.* 27, 715–721.
-

- Zhang, B.Y., Zheng, B. y Sharp, R. (2010) Phytoremediation in Engineered Wetlands: Mechanisms and Applications. *Procedia Environ. Sci.* 2, 1315–1325.
- Zhang, X., Liu, P., Yang, Y. y Chen, W. (2007) Phytoremediation of urban wastewater by model wetlands with ornamental hydrophytes. *J Envirol. Sci.* 19, 902–909.
- Zhang, F. Q., Wang, Y. S., Lou, Z. P. y Dong, J. D. (2007) Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*). *Chemosphere.* 67: 44–50.
- Zhivotovsky, O. P., Kuzovkina, Y.A., Schulthess, C.P., Morris, T. y Pettinelli, D. (2011) Lead uptake and translocation by Willows in pot and field experiments. *Int. J. Phytoremediation* 13, 731-749.



Removal of chromium and lead by a sulfate-reducing consortium using peat moss as carbon source



Julia Mariana Márquez-Reyes^a, Ulrico Javier López-Chuken^b, Arcadio Valdez-González^c, Hugo Alberto Luna-Olvera^{a,*}

^a Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico

^b Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico

^c Laboratorio de Acuicultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Cd. Universitaria A.P. F-67, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66450, Mexico

HIGHLIGHTS

- Peat moss is an inexpensive and available natural carbon source for SRB.
- Pre-treated peat moss rapidly promoted the establishment of SRB in a bioreactor.
- The experimental bioreactor removed 90% of Pb and 65% of Cr (VI).

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2013

Received in revised form 15 June 2013

Accepted 19 June 2013

Available online 27 June 2013

Keywords:

Sulfate-reducing consortium

Peat moss

Chromium removal

Lead removal

Kinetic parameters

ABSTRACT

The effect of pre-treated peat moss on the ability of a sulfate-reducing microbial consortium to remove chromium and lead in solution was evaluated. The most active bacterial community (235.7 mmol H₂S/g VSS) was selected from among eight consortia. The peat moss was pre-treated with different HCl concentrations and contact times. The best combination of treatments was 20% HCl for 10 min. The constant substrate affinity K_s was 740 mg COD/L and the ratio COD/SO₄²⁻ was 0.71. At pH 5, higher production of biogenic sulfide was observed. The up-flowpacked bed bioreactor operated at a flow of 8.3 mL/min for 180 h to obtain removal efficiency (by sulfate-reducing activity) of 90% lead and 65% chromium. It is important to consider that peat moss is a natural adsorbent that further influences the removal efficiency of metal ions.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The use of inexpensive and sustainable complementary technologies is nowadays necessary to improve treatments for the removal of toxic metal ions from water. Sulfate-reducing bacteria (SRB) are prokaryotic microbes that can use elemental S, SO₄²⁻, NO₃⁻, dimethyl sulfoxide, MnO₂ (Mn⁴⁺), Fe₂O₃ (Fe³⁺) and H₂AsO₄⁻ as final electron acceptors. These bacteria are considered strictly anaerobic organisms and inhabitants of anoxic and SO₄²⁻ enriched environments, where concentrations are reported to reach up to 2800 mg SO₄²⁻/L (Barton and Hamilton, 2007). The main SRB metal detoxification process is based on their production of biogenic hydrogen sulfide, which reacts with dissolved metal ions and reduces its toxicity to the sulfate-reducing communities due to the precipitation of the metal. This process also helps in the

neutralization of water pH through the bicarbonate produced by microbial metabolism. The SRB have also developed other capabilities to protect themselves against toxicity through several mechanisms, such as permeable barriers, active transport, intracellular sequestration, adsorption, methylation, oxidation, reduction and enzymatic detoxification of the metal to a less toxic form (Bruins et al., 2000). The ability of SRB to withstand the toxicity depends on the mobility, bioavailability and toxicity of each heavy metal (Kieu et al., 2011).

Choudhary and Sheoran (2011) reported that SRB can use a wide variety of organic substrates as electron donors (e.g. acetate, propionate, ethanol, lactate, sheep and cattle manure, paper sludge, alfalfa, woodchips, sawdust and mushroom compost). A crucial factor for obtaining high efficiency in the sulfate-reducing process is the selection of an appropriate carbon source as electron donor. In order to select a viable carbon source, the complexity of the substrate to be degraded should be considered, along with the digestibility of carbon compounds and the C:N:P ratio (Gilbert et al., 2003). Peat moss is structurally comprised of groups of

* Corresponding author. Tel.: +52 8183294000 x6436.

E-mail addresses: drhugoluna@aol.com, hugo.lunaol@uanl.edu.com (H.A. Luna-Olvera).

bryophytes belonging to 150–350 plant species; thus, it is a complex organic substrate (Gobat et al., 2004).

Peat moss consists of complex organic matter (lignin, cellulose and humic substances) in various stages of decomposition. These complex matrices contains functional groups (aldehydes, ketones, carboxylic acids, esters and phenolic hydroxides) having the capacity to interact with cations for surface processes of adsorption, chelation and ion exchange (Champagne et al., 2008). Peat moss favors the growth of bacterial communities by being a highly porous material and a slow-releasing source of complex carbon. Scarce information is currently available on the use of peat moss, which is widely used as a substrate in adsorption processes, as a carbon source (Zagury et al., 2006). Peat moss is typically used as an adsorbent since, it is inexpensive, widely available and is highly efficient in the removal of metal ions (Champagne et al., 2008; Clyde et al., 2010; Bulgariu et al., 2012).

Under experimental conditions, an efficient process of sulfate-reduction requires an adequate control of factors such as pH, temperature, availability of organic substrate, COD/SO₄²⁻ ratio (chemical oxygen demand), metal concentration in solution, bacterial metabolic diversity, origin of the bacterial community and community resistance (Blowes et al., 1995; Choudhary and Sheoran, 2011). The development of innovative remediation technologies can benefit from the use of biological treatments using SBR cultivated in alternative carbon sources, which in turn, also function as an inexpensive adsorbent. To date, there are no reports on the behavior of the sulfate-reducing activity (SRA) using pre-treated peat moss as a carbon source. The peat moss treatment accelerates the degradation processes favoring reducing-sulfate activity (SRA).

In this context, the aim of the present study was to isolate a bacterial consortium from an urban site impacted by smelting operations in Monterrey, Nuevo León, Mexico to evaluate the sulfate-reducing activity and tolerance to lead (Pb) and chromium (Cr) (VI) at different pH values. For this purpose, pre-treated peat moss was used as a sole carbon source to promote sulfate-reducing activity in a batch system and in an upflow- packed bed bioreactor. A thermally controlled bioreactor was used to determine the removal of SO₄²⁻, Cr (VI) and Pb, as well as the profiles of COD, pH and oxide reduction potential (Eh).

2. Methods

2.1. Isolation of consortia

The sulfate-reducing consortia (SRC) used in this study were obtained from an urban site in Monterrey, Mexico. The land was formerly owned by a smelting company which abandoned the site after almost 80 years of operations as an area of waste disposal.

At the selected site, eight soil samples were taken from the 0–10 cm soil profile. Samples were placed in sealed plastic bags at nearly anaerobic conditions and were immediately transported to a laboratory. From each sample, 1 g of soil was transferred to screw cap test tubes filled with culture media containing modified Postgate media: NH₄Cl (1 g/L), KH₂PO₄ (0.5 g/L), Na₂SO₄ (4.5 g/L), CaCl₂·2H₂O (0.04 g/L), MgSO₄·7H₂O (0.06 g/L), FeSO₄·7H₂O (0.004 g/L), sodium citrate (0.6 g/L), ascorbic acid (0.1 g/L), sodium lactate (2.3 mL/L), sodium acetate (2.5 g/L) and yeast extract (1.0 g/L) at pH 7. These sub-samples were incubated for 30 days at 35 °C. At this point, the presence of black sediment in tubes containing culture media was considered to be an indicator of the presence of sulfate-reducing microbial consortia capable of precipitating metal ions. From these preselected tubes, 1 mL sample of supernatant was taken to inoculate a batch-type, static system. The batch system consisted of 125 mL serum bottles that were sealed with neoprene stoppers and aluminum crimps. The bottles were pre-filled

with 117 mL of modified Postgate culture medium adjusted at pH 7 with HCl or 0.1 M NaOH, and were incubated at 35 °C for 30 days. The sulfate-reducing activity of eight isolated bacterial consortia was quantified by measuring the hydrogen sulfide production, and based on this variable; the four consortia showing the highest sulfate-reducing activity were selected for subsequent experiments.

2.2. Organic substrate

Commercial peat moss used as garden compost was pre-treated with hydrochloric acid at different concentrations (20, 60 and 80% v/v) and different contact times (10, 30 and 60 min). This acidic hydrolysis was stopped by addition of concentrated NaOH until reaching a pH value of 7 ± 0.3. Pre-treated peat moss (TPM) samples were centrifuged at 2500 rpm for 10 min and the organic precipitate collected from the different treatments was dried at 50 °C for 48 h using a convection oven. Samples were sterilized in autoclave (121 °C, 15 min) and then stored in polyethylene bottles for later use as a carbon source. In both systems, batch and upflow packed bed bioreactor, the production of H₂S was used as an index of treatment efficiency.

2.3. pH and substrate affinity

The consortium affinity for the substrate as a carbon source was measured during 31 days at different concentrations (175, 359, 525, 700 and 1400 mg/L) of TPM incorporated in saline medium: NH₄Cl (1 g/L), KH₂PO₄ (0.5 g/L), Na₂SO₄ (4.5 g/L), CaCl₂·2H₂O (0.04 g/L), MgSO₄·7H₂O (0.06 g/L), FeSO₄·7H₂O (0.004 g/L), ascorbic acid (0.1 g/L) and C₂H₃NaO₂S (0.1 g/L) which was adjusted to pH 7. Additionally, the selected consortium behavior was evaluated during 38 days at different pH values (4.5, 5.0, 6.0, 7.0 and 7.5) using 800 mg/L of PMT as carbon source. In both cases, initial inoculums consisted of a known biomass concentration. The incubation temperature was kept constant at 35 °C and the production of H₂S was quantified as described below. All the experiments were performed in duplicate.

2.4. Effect of lead and chromium (VI) on the sulfate-reducing consortia

In a batch system, the consortium showing the best-performance was evaluated for its sulfate-reducing activity (SRA) in terms of H₂S produced in saline medium (adjusted to pH 4 and enriched with 740 mg/L of TPM) in response to a gradient concentration of Pb (200, 500, 800, 1100, 1300 and 1500 mg/L) and Cr VI (5, 15, 30, 40 and 80 mg/L). All experiments were conducted twice at a temperature maintained at 35 °C for a period of 30 days. The metal salts used in this assays included Pb(NO₃)₂ and CrK₂CrO₄, respectively.

2.5. Bioreactor operation

The procedures were performed in a glass upflow-packed bioreactor (BR) having the following dimensions: 60 cm high, 4.6 cm of inner diameter and 520 mL capacity. The bioreactor was designed with three sampling ports separated by 15 cm segments. The inlet flow rate was maintained constant by using a peristaltic pump set at 0.5 L/h. The packing material employed was recycled polyethylene (with a total surface area of 1700 cm²). Before running the BR, this packing material was prewashed and sterilized to remove interferences.

The BR operation was divided into two phases: (a) conditioning, and (b) operation. In the first phase, 6.2 g of TPM was added as a carbon source and recirculated. Saline media at pH 5 was then inoculated with 1.49 × 10⁸ cells/mL of the selected consortium to promote bacterial growth. The hydraulic retention time (HRT)

was set at 1.04 h. In order to maintain the temperature constant at 35 ± 3 °C, the BR was placed into an incubator (Napco, model 320) for 20 days. Throughout the experiment, the pH and the oxidation–reduction potential (Eh) were measured in the three sampling ports. After the conditioning phase, 3 L of enriched saline medium were prepared with 1520 mg of SO_4^{2-} /L, 10 mg/L of Cr (VI) and 50 mg/L Pb and introduced into the system. The BR was operated under the same pH and temperature conditions mentioned above. In this case, the operating time was 180 h and the pH, Eh and COD (chemical oxygen demand), SO_4^{2-} , Pb and Cr concentrations were determined in the effluent.

2.6. Analytical techniques

Pb and Cr concentrations in soil were determined by digesting 0.5 g of soil in 25 mL HCl + HNO_3 (3:1 v/v) heated to 180 °C for 40 min. The mixture was allowed to cool down and then it was filtered using a filter No. 42. Volumes were adjusted to 25 mL and the total metal concentration was determined using an atomic absorption spectrometer (AAS) (GBC 932 AA model). The pH and Eh in the effluent were measured with a digital pH/Eh meter (Beckman, N395) immediately after samples were collected into a 5 mL sterile syringe. The pH of the solutions was evaluated according to method 4500-B (APHA, 2005). The same pH/Eh meter was used to measure the redox potential (ORP) using an Ag/AgCl reference electrode. The sulfate concentration was measured by the turbidimetric method using a UV–Vis spectrophotometer (Beckman DU 650) (APHA, 2005). The hydrogen sulfide was determined according to the method proposed by Cord-Ruwisch (1985). COD determination was carried out by the closed reflux technique employing potassium permanganate as oxidizing agent (APHA, 2005). The quantification of microbial biomass was determined by means of cell counts using a spectrophotometer at 600 nm (Bio-Rad, SmartSec 3000) and the method of volatile suspended solids (APHA, 2005). For the total metal analysis of the effluent, 5 mL samples were collected and filtered through a No. 42 filter. pH in samples was adjusted to 2 by adding concentrated HNO_3 . The solution was brought to 25 mL in polyethylene bottles.

3. Results and discussion

3.1. Selection of inoculums

Isolated native microorganisms collected from sites polluted by heavy metal concentrations have the advantage of being naturally adapted to survive in the presence of several metals having varying concentrations over time. Furthermore, a native consortium contains more than one organism capable of generating the reduction conditions required to carry out the complete oxidation of the carbon source. Some bacteria are resistant to high metal concentrations in solution (Cetin et al., 2008; Labastida-Núñez et al., 2013).

In the present study, eight consortia of SRB were isolated and evaluated. Consortia showing higher sulfate-reducing activity were selected for the respective assays. In the present study, the bacterial consortium was not characterized. Biogenic sulfide production was calculated for all the isolated consortia (Table 1). The consortium C5 reached the highest sulfide production (235.7 mmol H_2S /g VSS) over a period of 100 h, with a lag phase of 23 h. This involved the integration of a complex community having the best ability to produce this metabolite of practical interest in the removal of metals. This process is certainly related to the predominant environmental conditions occurring where the consortium was collected. As samples were obtained at a depth of 0–10 cm, reduced oxygen transfer favored the natural selection of SRB. This particular consortium was selected for subsequent experimental work. Although

Table 1

Specific production of hydrogen sulfide by an isolated bacterial consortia and soil characteristics of the sampled site.

| Consortia | q_{\max} (mmol H_2S g^{-1} SSV) | Pb (mg/kg) | Cr (mg/kg) | Depth (cm) |
|-----------|--|------------|-------------|------------|
| C1 | 196.6 | 1862 ± 513 | 4.41 ± 6.3 | 0–5 |
| C5 | 235.7 | 2792 ± 143 | 3.15 ± 0.5 | 5–10 |
| C6 | 88.8 | 860 ± 8.12 | 2.22 ± 0.85 | 0–5 |
| C8 | 128.5 | 1564 ± 172 | 1.06 ± 0.62 | 0–5 |

$n = 3 \pm$ Standard deviation.

the experimental conditions established in the assay promoted the microbial biomass growth of the sulfate-reducing consortia, the presence of other microbial communities cannot be discarded (Logan et al., 2005).

3.2. Organic substrate

With the aim to facilitate the degradation and assimilation of the peat moss by the bacterial consortium, it was subjected to a hydrolysis process. Table 2 shows that there was no significant relationship between different hydrolysis times and H_2S production, however results indicated an association between the HCl concentrations and H_2S production. Kinetic parameters, including the constant (k) first-order kinetics, the maximum concentration of biogenic sulfide and the maximum specific rate (r_{\max}) were determined by the Gompertz sigmoidal model, while the lag phase was experimentally calculated (Labastida-Núñez et al., 2013). It was observed that higher HCl concentration and exposure time did not elicit a proportional increase in biogenic hydrogen sulfide production. This behavior could be explained by the metabolic diversity and number of specific bacteria within the consortia, which assembled bacteria having a wide metabolic diversity and differing capabilities to use peat moss with the same efficiency.

Different maximum biogenic sulfide production times (t_c) and lag phase times were observed (Table 2). Considering time and cost effectiveness, the work protocol applied included peat moss pre-treated with 20% HCl and 10 min contact, since it presented a typical biogenic H_2S production, lag phase and maximum H_2S production time. An additional advantage is that operating costs could be minimized for a tentative future up-scaled process. To our knowledge, there are no previous studies indicating that pre-treatment of peat moss encourages the microbial activity of a consortium having sulfate-reducing activity.

3.3. Substrate affinity

The maximum specific rate of biogenic sulfide production and substrate affinity constant (K_s) were determined for various TPM concentrations (0.07–0.58 g COD/L). Fig. 1 shows the Monod curve obtained for the experimental setting. The correlation coefficient was 0.984, where r_{\max} was 1.13 mmol H_2S /g VSS-h and the K_s

Table 2

Kinetic parameters of the consortium C5 determined by exposure time and HCl concentration to pre-treat the peat moss.

| % HCl | Contact time (min) | r_{\max} (mmol H_2S g^{-1} SSVh $^{-1}$) | k (h $^{-1}$) | t_c (h) | Lag time (h) | R |
|-------|--------------------|--|------------------|-----------|--------------|-------|
| 20 | 10 | 0.326 | 0.003 | 320.6 | 194 | 0.903 |
| | 30 | 0.157 | 0.003 | 207.7 | 123 | 0.902 |
| | 60 | 0.219 | 0.003 | 318.3 | 223 | 0.908 |
| 60 | 10 | 0.226 | 0.002 | 349.1 | 164 | 0.918 |
| | 30 | 0.326 | 0.003 | 320.6 | 147 | 0.946 |
| | 60 | 0.349 | 0.003 | 426.3 | 233 | 0.933 |
| 80 | 10 | 0.346 | 0.003 | 403.6 | 147 | 0.941 |
| | 30 | 0.337 | 0.003 | 343.1 | 91 | 0.933 |
| | 60 | 0.286 | 0.003 | 326.2 | 147 | 0.939 |

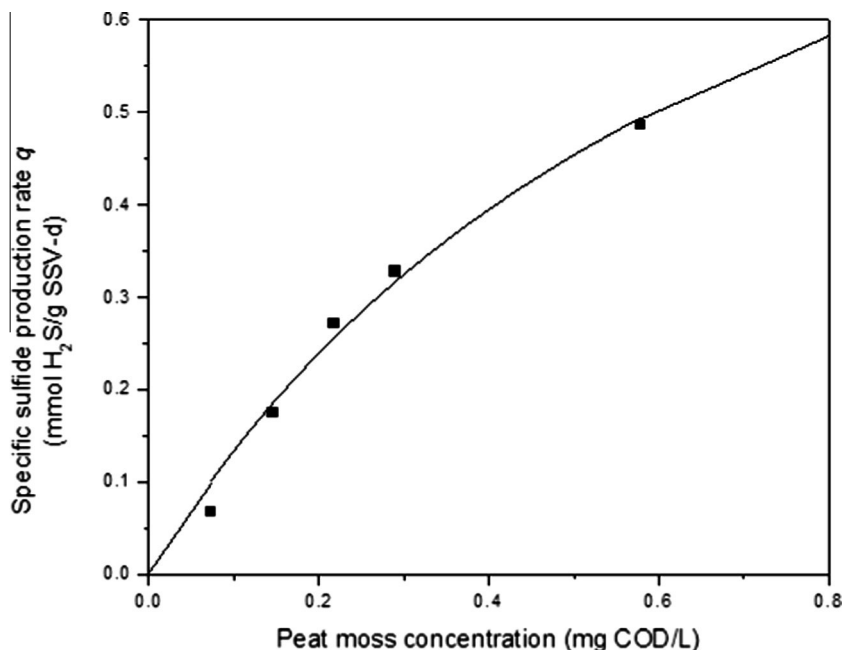


Fig. 1. Determination of the affinity constant to the substrate concentration in the presence of C5 consortia.

was 740 mg COD/L. The calculated COD/SO₄²⁻ ratio was 0.71. According to Sahinkaya and Gungor (2010), COD/sulfate ratios of 0.85 and 1.25 favor the efficiency of the sulfate-reduction process and also prevent competition between methanogenic and sulfate-reducing communities through substrate availability. However, some SRB completely oxidize the substrates to CO₂ while others partially oxidize to acetate (Nagpal et al., 2000). Therefore, it is possible that the consortium C5 contains a large number of incomplete oxidizing SRB, which promote the accumulation of acetate. Acetate is considered a limiting factor in sulfate-reduction, and it might even become an inhibitor (Alper et al., 2009). Also, the production of organic acids in undissociated form, generated by the substrate and the metabolic activity of SRB, are highly toxic for the SRB and it reduces the efficiency of sulfate reduction.

Zagury et al. (2006) employed untreated peat moss as carbon source and as this material contains only 0.12 g/100 g of dissolved organic carbon, they concluded that peat moss is not a good carbon source. This low DOC proportion is explained by its complex molecular structure and low degradation rate to render the carbon available for SRB (Gilbert et al., 2003). Several other carbon sources such as mushroom compost, wood chips, municipal compost and animal manure have the same limitation (Yamashita et al., 2011; Choudhary and Sheoran, 2011).

Nonetheless, Zagury et al. (2006) demonstrated that peat moss contains 43.5 g/100 g of total organic carbon, hence suggesting that in the present study, the pretreatment of peat moss reduced its structural complexity and increased the availability of carbon and other nutrients (e.g. phosphorus, nitrogen, potassium) for the sulfate-reducing consortium. Results presented in Fig. 1 support this observation as SRA (H₂S) increased as a function of TPM concentration. The TPM may be used in sulfate-reduction processes as an inexpensive and accessible carbon source. It must be considered that the peat moss is a natural adsorbent; therefore, it is possible that some unquantified concentration of biogenic hydrogen sulfide is adsorbed in the process.

3.4. pH

It is important to consider the pH for sulfate-reduction as it can be altered by different forms, such as H₂S, HS⁻ and S₂⁻ (Al-Zuhair

et al., 2008). Fig. 2 shows that the C5 consortium had higher hydrogen sulfide production under the following pH values: pH 5 < pH 6 = pH 7 < pH 7.5 < pH 4.5. Greben et al. (2005) indicate that when the pH value is close to neutral, the H₂S may be an inhibitor of SRA as it penetrates the cytoplasm and reacts with disulfide bonds in the cell; therefore, the concentration of unionized sulfur is a variable to be considered when pH is 7 or higher than neutral values as H₂S is present in dissociated form. In the present study, the consortium C5 was more sensitive to H₂S concentrations as it presented lower activity. For pH values of 4.5, this toxicity can be due to the non-dissociated species of sulfur and to the pH value itself. Notably, the peat moss has an acidic pH due to its natural origin; however, the production of biogenic hydrogen sulfide is not affected.

3.5. Tolerance to lead and chromium (VI)

In the presence of Pb, *r*_{max} values decay exponentially as metal concentration increases (Fig. 3). The same tendency has been reported by Nies (1999) in presence of Pb and BRS. Labastida-Nuñez et al. (2013) reported the interaction of Pb ions with sulfhydryl groups (-SH) which are inhibited by competition with heavy metal ions. Sulfhydryl groups are essential for cellular activity and the formation of a physical barrier caused by the precipitation of lead sulfide on the cell surface. However, Pb at the lowest concentration (200 mg/L) did not affect the production of hydrogen sulfide, presenting a behavior similar to the control. This behavior could be explained by biological models which indicate extracellular precipitation or intracellular accumulation, the latter, caused by the interaction with cysteine, which depends on amino-, carboxyl- and thiol- groups (Labastida-Nuñez et al., 2013). Utgikar et al. (2002) demonstrated that the presence of H₂S at low Pb concentrations may have a beneficial effect by precipitating Pb as a metal sulfide and favoring the production of bacterial biomass; therefore reducing the toxicity of lead. The first order decay equation indicates that 557.5 mg Pb/L is the concentration that maintains 50% of sulfate-reducing activity; this prediction is confirmed by results depicted in Fig. 3, which show a tendency indicating that at higher Pb concentrations (500 mg/L), the SRA drastically decreases.

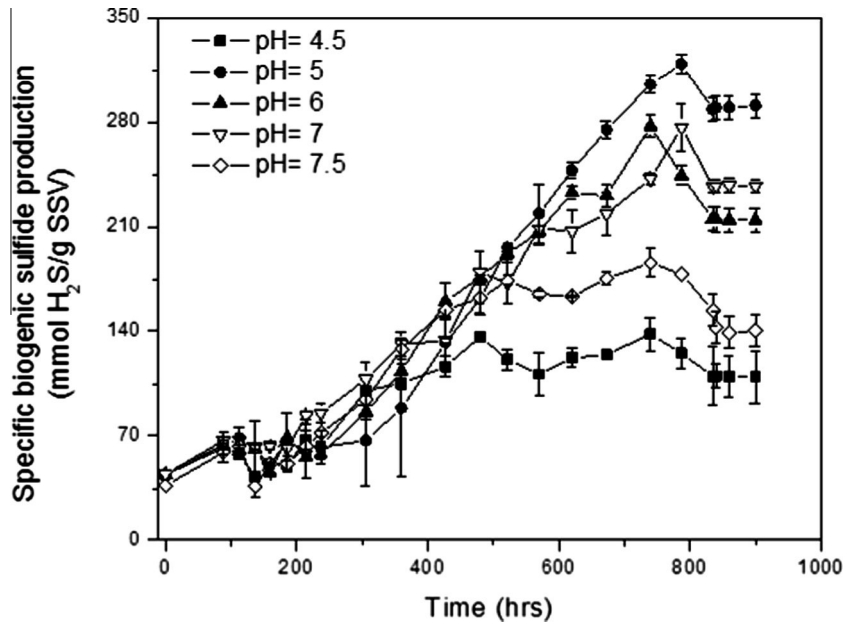


Fig. 2. Specific biogenic sulfide production by the C5 consortia at different pH values.

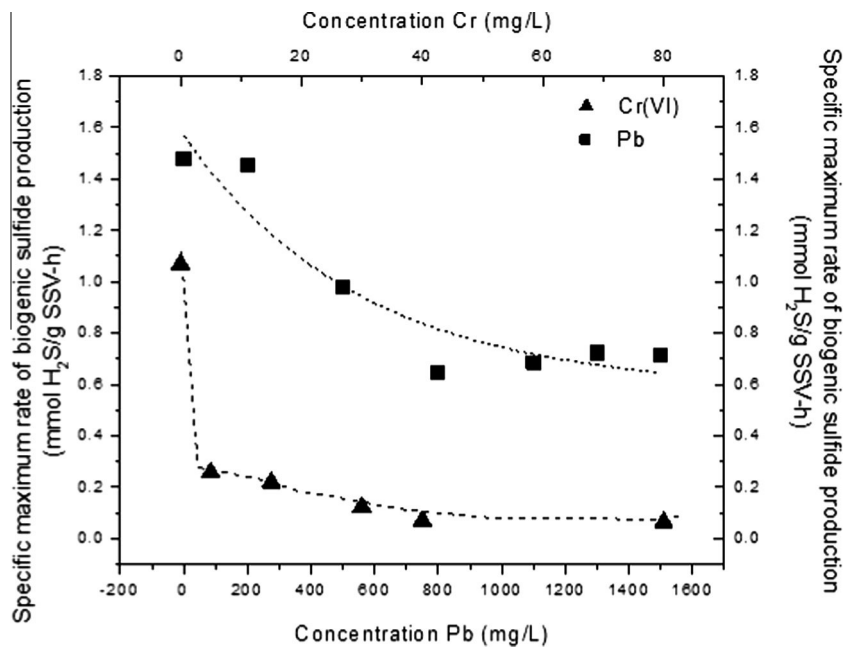


Fig. 3. Specific maximum rate of biogenic sulfide production under varying Cr and Pb concentrations. The data was fitted using a second order decay equation.

The SRA decreased with the increment in concentration of Cr (VI), yielding the equation of first order decay of 2.6 mg/L reducing the SRA by 50%. This tendency is consistent with that observed by Kieu et al. (2011) in semi-continuous stirred tank reactors with Cr (VI), Zn, Ni and Cu.

The difference between the inhibitory concentration of Pb and Cr (VI) can be explained by the toxicity of the metal on the cell itself and the environmental characteristics from which the consortium comes. As seen in Table 1, metal concentrations at the site from which the consortium C5 was isolated were 2972 mg/kg and 3.15 mg/kg for Pb and Cr, respectively. This indicates that the consortium C5 has a high tolerance to Pb, suggesting that microbial communities promote a phenotypic response to toxic exposure as reported by Labastida-Nuñez et al. (2013). It has been

shown that the toxicity of Cr (VI) affects the rate of consumption of the substrate, the microbial metabolism and the synthesis of biomolecules such as adenosine triphosphate (ATP) (Vaiopoulou and Gikas, 2012).

The reduction mechanisms of Cr (VI) can be carried out (1) enzymatically, where the chromate ion of cytochrome C3 and hydrogenase are the possible promoters of the reduction, (2) chemically by reaction of H₂S produced during the dissimilatory reduction of sulfate, and (3) by adsorption of solid material which can be used as support or carbon source (Cetin et al., 2008; Pagnanelli et al., 2012; Sahinkaya et al., 2012).

Although Cr (III) is less toxic than Cr (VI), studies show that both chemical forms have negative effects on microorganisms (Cirik et al., 2013). Cr (III) is not a stable product it can be easily

solubilized and is usually precipitated as $\text{Cr}(\text{OH})_3$ in aqueous medium (Kieu et al., 2011; Pagnanelli et al., 2012).

The type and concentration of the organic substrate plays an important role in the reduction of Cr (VI) by acting as electron donor in the metabolic reduction and may affect the rate of microbial respiration (Kevser et al., 2013). The precipitated metal accumulates on the cell surface and can have an adverse effect on the activity of SRB, as metal sulfides act as barriers preventing the access of nutrients needed for cellular growth and metabolism (Utikar et al., 2002; Herrata et al., 2007; Kieu et al., 2011).

The results obtained in this study indicate that the inhibition by the metal on consortium C5 directly depends on the diversity of the species that comprises it, its origin and the prevailing physico-chemical factors; whereas TPM adsorbed a proportion of metal ions. Tolerable concentrations observed in the consortium C5 provide basic information for scaling up the process. The PMT is a metal ion adsorbent, but will slowly degrade by CRA over time. SRA promote the precipitation of metal sulfides, from the ions returned to the solution by desorption from PMT.

In the present study, it was appropriate to maintain the metal concentration below the tolerance threshold of the sulfate-reducing community employed. It is suggested to take into account the three main removal mechanisms of metal (enzymatic, chemical, adsorption), so as to avoid overestimation of the sulfate-reducing process.

3.6. Removal of lead and chromium in an up-flow packed bed bioreactor

During the conditioning phase, the redox potential (Eh) in two of the sampling ports reached -280 mV, while in the last port, a value of -38 mV was reached. At the end of the conditioning phase, the pH determined at all three sampling ports was 6.3, suggesting that the bacterial activity buffered the acidity of the influent (pH 5) and increased their biomass concentration. Similar behavior was reported by Hoa et al. (2007), when conducting a similar study for lead removal through sulfate reduction process. Bacterial growth was observed on the fill material, which was clearly evidenced by a gradual change in color by the formation

of FeS as a black precipitate. The conditioning phase was maintained for 20 days to promote growth and adaptation of the microbial biomass.

In the operation phase, the synthetic solution presented a temperature of 35 ± 5 °C since the BR was placed into the incubator, thus avoiding temperature gradients while maintaining the decomposition rate of the substrate and the solubility of hydrogen sulfide to foster the SRA. The operating time was 180 h, maintaining a flow of 8.3 mL/min. Due to hydraulic conditions, the redox potential reached values close to +100 mV in the effluent.

These results confirmed that the Eh behavior was not due to a sulfate deficiency because the sulfate concentration in the effluent was $600 \text{ mg SO}_4^{2-}/\text{L}$ (Fig. 4). It is suggested that this effect is directly related to the lower bacterial activity caused by the toxicity of metals. Results from other studies have shown that a mixture of metals may have synergistic or cumulative toxic effects (Kieu et al., 2011). Another factor that might have promoted such observations was the hydraulic retention time (HRT), which was 1.04 h. This time period can be considered to be very short when compared to similar studies on sulfate-reduction (Gilbert et al., 2003; Sahinkaya and Gungor, 2010; Mayesa et al., 2011; Sahinkaya et al., 2011). This operating condition did not allow bacterial communities to rapidly generate suitable conditions to increase the sulfate-reduction process. Nevertheless, removal of sulfates and organic matter was 73.3% and 76.5%, respectively.

The BR system under the described operating conditions removed 90% of lead and 65% of chromium. Fig. 4 shows that in the first four hours of operation, a physical phenomenon of adsorption and desorption of the metal ions on the TPM was observed. Zagury et al. (2006), observed that in the first 12 days occurred an early metal removal attributed to metal sorption by fresh organic material. This can be explained by the interaction of metal ions with functional groups of the peat moss in combination with formation of metal precipitates. Approximately 40% of lead in the influent precipitated in the first 4 h by reaction with H_2S combined with increasing pH values above 5, and in conjunction with the adsorption process of the TPM. The removal of lead after 180 h of BR operation was 90%. It was estimated that 40% of lead removal was due to the operating conditions that promoted the formation

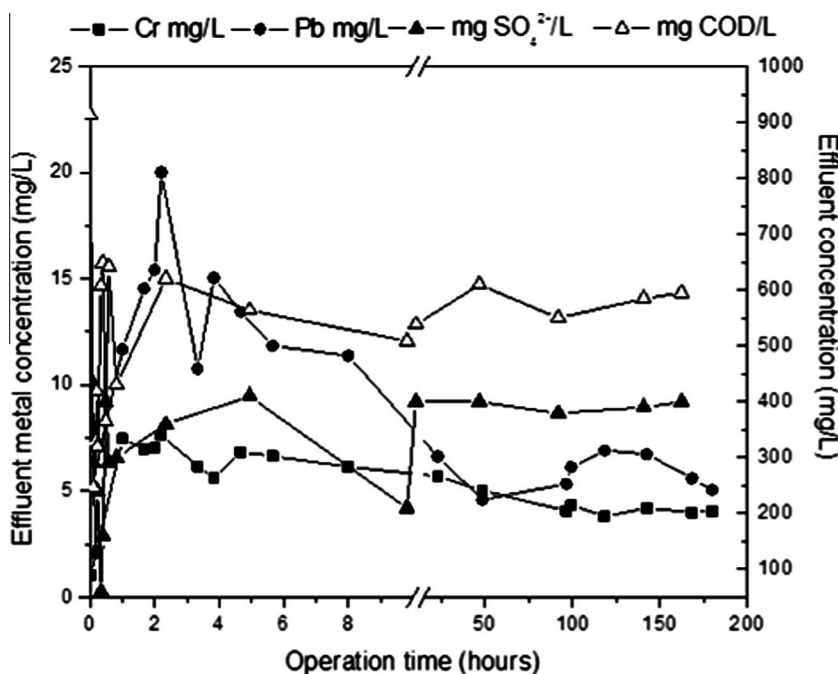


Fig. 4. Bioreactor effluent concentration of Cr, Pb, Sulfate and COD.

of lead sulfide precipitates or associations with Fe or Mn oxyhydroxides (Costa et al., 2008).

The adsorption of metals ions by the peat moss has been reported in other studies (Pagnanelli et al., 2010; Bulgariu et al., 2012). For chromium, a similar effect was observed as 4 h after operation, equilibrium was reached between adsorbed (25%) and dissolved (75%) Cr. This indicated that the adsorption processes reached saturation and stopped acting as the primary mechanism for removal of Cr. Therefore, SRA removed 38% of dissolved Cr, while 37% was not removed over the operation time. However, sulfide precipitation is the dominant mechanism for the removal of heavy metals in the bioreactor. In addition to precipitation with sulfide, heavy metals may also have been removed through sorption to the bacterial biomass or by other mechanisms such as hydroxide and carbonate precipitation (Kieu et al., 2011). Establishing a discrimination between the different removal mechanisms is necessary in order to avoid overestimating results in a up-scaled bioreactor having sulfate-reducing activity.

Pagnanelli et al. (2012) reported 87% removal of Cr in the effluent of a bioreactor where ethanol was used as carbon source under a feeding flow of 0.5 mL/min. In another study, Singh et al. (2011) reported a lead removal of 49.8% at the bioreactor outlet with an output of 3 days THR using glucose, fructose, sucrose and lactate as carbon sources.

4. Conclusions

C5 consortium isolated from a contaminated site was shown to be resistant to concentrations of 550 mg Pb/L and 2.6 mg Cr/L. The TPM (10% HCl, 10 min) is an alternative, sustainable and economic substrate that promotes sulfate-reducing activity. TPM provides the necessary amount of carbon to maintain the production of H₂S. The optimal pH for the present consortium ARS was 5. TPM can be used for passive adsorption treatments of metal ions. To increase the removal of metal ions (90% Pb and 65% Cr), the TRH and influent flow bioreactor should be optimized.

Acknowledgment

We thank the National Council for Science and Technology (CONACYT) for the doctoral scholarship granted (No. 201380) to support this research.

References

- Al-Zuhair, S., El-Naas, M.H., Al-Hassani, H., 2008. Sulfate inhibition effect on sulfate-reducing bacteria. *J. Biochem. Technol.* 1 (2), 39–44.
- APHA-AWWA-WEF, 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st Edition. American Public Health Association, American Water Works Association Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- Barton, L.L., Hamilton, W.A., 2007. *Sulfate-Reducing Bacteria Environmental And Engineered Systems*. Cambridge University Press The Edinburgh Building, Cambridge CB2 8RU, UK.
- Blowes, D.W., Ptacek, C.J., Bain, J.G., Waybrant, K.R., Robertson, W.D., 1995. Treatment of mine drainage using in-situ permeable reactive walls, in: *Proc. of Sudbury '95- Mining and the Environment*, vol. 3, Sudbury, Ontario. CANMET, Canada, Ontario. pp. 979–987.
- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W., 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ.* 45, 198–207.
- Bulgariu, L., Bulgariu, D., Matei Macoveanu, M., 2012. Characteristics of sorption of uncomplexed and complexed Pb(II) from aqueous solutions onto peat. *Chem. Pap.* 66 (4), 239–247.

- Cetin, D., Dönmez, S., Dönmez, G., 2008. The treatment of textile wastewater including chromium(VI) and reactive dye by sulfate-reducing bacterial enrichment. *J. Environ. Manage.* 88, 76–82.
- Champagne, P., Geel, V., Parker, W., 2008. Impact of temperature and loading on the mitigation of AMD in peat biofilter columns. *Mine Water Environ.* 27, 225–240.
- Choudhary, R.P., Sheoran, A.S., 2011. Comparative study of cellulose waste versus organic waste as substrate in a sulfate-reducing bioreactor. *Bioresour. Technol.* 102, 4319–4324.
- Cirik, K., Dursun, N., Şahinkaya, E., Çınar, Ö., 2013. Effect of electron donor source on the treatment of Cr(VI)-containing textile wastewater using sulfate-reducing fluidized bed reactors (FBRs). *Bioresour. Technol.* 133, 414–420.
- Clyde, E.J., Champagne, P., Jamieson, H.E., 2010. The use of passive treatment alternatives for the mitigation of acidic drainage at the Williams brother mine, California: bench-scale study. *Appl. Geochem.* 25, 958–971.
- Cord-Ruwisch, R., 1985. A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 4, 33–36.
- Costa, M.C., Martins, M., Jesus, C., Duarte, J.C., 2008. Treatment of acid mine drainage by sulphate-reducing bacteria using low cost matrices. *Water Air Soil Pollut.* 189, 149–162.
- Gilbert, O., De Pablo, J., Corina, J.L., Ayora, C., 2003. Evaluation of municipal compost/limestone/iron mixtures as filling material for permeable reactive barriers for in-situ acid mine drainage treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78, 489–496.
- Gobat, J.M., Arango, M., Matthey, W., 2004. *The Living Soil: Fundamentals Of Soil Science And Soil Biology*. Science Publishers, Inc., New Hampshire, pp. 305–311.
- Greben, H.A., Maree, J.P., Eloff, E., Murray, K., 2005. Improved sulphate removal rates at increased sulphide concentration in the sulphidogenic bioreactor. *Water SA* 31, 351–358.
- Hoa, T.T.H., Liamleam, W., Annachhatre, A.P., 2007. Lead removal through biological sulfate reduction process. *Bioresour. Technol.* 98, 2538–2548.
- Kieu, H.T.Q., Müller, E., Horn, H., 2011. Heavy metal removal in anaerobic semi-continuous stirred tank reactors by a consortium of sulfate-reducing bacteria. *Water Res.* 45, 3863–3870.
- Labastida-Núñez, I., Lázaro, I., Celis, L.B., Razo-Flores, E., Cruz, R., Briones-Gallardo, R., 2013. Kinetic of biogenic sulfide production for microbial consortia isolated from soils with different bioaccessible concentrations of lead. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 10, 827–836.
- Logan, M.V., Reardon, K.F., Figueroa, L.A., McLain, J.E.T., Ahmann, D.M., 2005. Microbial community activities during establishments, performance, and decline of bench-scale passive treatment systems for mine drainage. *Water Res.* 39, 4537–4551.
- Mayesa, W.M., Davisa, J., Silva, V., Jarvis, A.P., 2011. Treatment of zinc-rich acid mine water in low residence time bioreactors incorporating waste shells and methanol dosing. *J. Hazard. Mater.* 193, 279–287.
- Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Livingston, A., Peeva, L., 2000. Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: an experimental and modeling study. *Biotechnol. Bioeng.* 70 (5), 533–543.
- Nies, D.H., 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 730–750.
- Pagnanelli, F., Cruz Viggi, C., Cibati, A., Uccelletti, D., Toro, L., Palleschi, C., 2012. Biotreatment of Cr(VI)-contaminated waters by sulphate reducing bacteria fed with ethanol. *J. Hazard. Mater.* 199–200, 186–192.
- Pagnanelli, F., Cruz Viggi, C., Toro, L., 2010. Isolation and quantification of cadmium removal mechanisms in batch reactors inoculated by sulphate reducing bacteria: biosorption versus bioprecipitation. *Bioresour. Technol.* 101, 2981–2987.
- Sahinkaya, E., Gunes, F.M., Ucar, D., Kaksonen, A.H., 2011. Sulfidogenic fluidized bed treatment of real acid mine drainage water. *Bioresour. Technol.* 102, 683–689.
- Sahinkaya, E., Altun, M., Bektas, S., Komnitsas, K., 2012. 417 Bioreduction of Cr(VI) from acidic wastewaters in a sulfidogenic ABR. *Miner. Eng.* 32 (38–419), 44.
- Sahinkaya, E., Gungor, M., 2010. Comparison of sulfidogenic up-flow and down-flow fluidized-bed reactors for the biotreatment of acidic metal-containing wastewater. *Bioresour. Technol.* 101, 9508–9514.
- Singh, R., Kumar, A., Kirrolia, A., Kumar, R., Yadav, N., Bishnoi, N.R., Rajesh, Lohchab, R.K., 2011. Removal of sulphate, COD and Cr(VI) in simulated and real wastewater by sulphate reducing bacteria enrichment in small bioreactor and FTIR study. *Bioresour. Technol.* 102, 677–682.
- Utgikar, V.P., Harmon, S.M., Chaudhary, N., Tabak, H.H., Govind, R., Haines, J.R., 2002. Inhibition of sulfate-reducing bacteria through metal sulfide formation in bioremediation from acid mine drainage. *Environ. Toxicol.* 17 (1), 40–48.
- Vaiopoulou, E., Gikas, P., 2012. Effects of chromium on activated sludge and on the performance of wastewater treatment plants: a review. *Water Res.* 46, 549–570.
- Zagury, G.J., Kulnieks, V.I., Neculita, C.M., 2006. Characterization and reactivity assessment of organic substrates for sulfate-reducing bacteria in acid mine drainage treatment. *Chemosphere* 64, 944–954.