



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# UNIVERSIDAD DE SONORA

---

---

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA  
Y METALURGIA**

**EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y  
MICROBIOLÓGICA ASOCIADA AL  
TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE UN  
REACTOR ANAEROBIO PARA SU  
APLICACIÓN EN LA REMOCIÓN DE NÍQUEL  
EN AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES**

**Tesis**

**Que para obtener el título de:**

**INGENIERO QUÍMICO**

**Presenta**

**BUSTAMANTE NORIEGA GUADALUPE  
REYES MARTÍNEZ VIVIANA MARISOL**

**Hermosillo, Sonora.**

**Junio 2018.**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## DEDICATORIA

A Dios, por permitirme vivir mis sueños, por siempre ser mi compañero y fiel amigo. Por los triunfos y momentos difíciles que me han enseñado que siempre está conmigo. A mi Morenita, por siempre llevarme de su mano.

A mis padres, mi motor de vida. Gracias mamá y papá por sus consejos, por el amor que siempre me han brindado, por su paciencia y el apoyo en cada uno de mis sueños, por cultivar e inculcar el don de la responsabilidad y enseñarme a poner pasos fijos para alcanzar mis metas. A ustedes, todo mi respeto y cariño.

A mis hermanas, Alondra y Danictza, por formar parte importante de mi vida, por contar siempre con ustedes, por sus sonrisas y palabras de aliento; a la pequeña Miranda, por ser esa chispa de alegría en nuestras vidas. ¡Las quiero!

A ti Judas, por creer siempre en mí, por alentarme cuando las cosas no iban bien, por extenderme siempre tu mano, por contar siempre contigo. Gracias por darme lo mejor de ti.

A la persona que se convirtió en más que una amiga de generación. Gracias por ser cómplice y compartir sueños juntas, gracias Vivi por tu sincera amistad, que Dios cumpla los anhelos de tu corazón.

A mis familiares y amigos que de alguna manera contribuyeron con sus ánimos y consejos para nunca desistir.

***Lupita***

## DEDICATORIA

Doy gracias infinitas a Dios, por haberme dado fuerza y valor para culminar esta etapa de mi vida. Gracias por acompañarme siempre en esos momentos difíciles y también en los triunfos.

A mis padres, que a lo largo de mi vida me guiaron siempre por el buen camino, me brindaron su apoyo y consejos, y en todo momento me alentaron a seguir adelante. Sus anhelos han sido prepararme para enfrentar la vida. Hoy se ven culminados sus esfuerzos y mi sueño. A ti mami, gracias por ser la persona que me ha acompañado durante todo mi trayecto estudiantil y de vida; gracias por todo tu amor, por corregir mis faltas y celebrar mis triunfos. Y a ti papi, que aun estando lejos siempre he contado con tu apoyo incondicional. Mi triunfo y mi cariño para ustedes.

A mi nanita chula, que me ha dado su confianza, su apoyo y su amor eternamente. A mi hermanito, Jaime, por ser lo más bello que Dios ha puesto en mi vida y formar una parte importante de ella.

Gracias a Rubén, a mis primas y tíos por contar con ustedes siempre, por esos ánimos y consejos para que nunca desistiera, y por brindar me su apoyo durante estos años de carrera. Al resto de mi familia y amigos, por estar al pendiente de mí y acompañarme en los momentos más importantes.

Y finalmente, a Lupita, mi amiga y compañera de tesis. Gracias por tu valiosa amistad. Enhorabuena, lo hicimos.

***Vivi***

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad de Sonora, especialmente al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia por haber contribuido en nuestro desarrollo profesional y personal, así mismo agradecemos a cada uno de los maestros que nos brindaron su apoyo durante la estancia en cada una de sus clases.

Un agradecimiento especial a la Dra. María Teresa Certucha Barragán por su valiosa orientación y confianza puesta en nosotras para el desarrollo de este trabajo, gracias por su paciencia y tiempo brindado.

A la Dra. Kadiya del Carmen Calderón Alvarado por compartir sus conocimientos con nosotras y brindarnos su apoyo incondicional; también a la Dra. Ramona Guadalupe Martínez Meza y Dr. Francisco Javier Almendáriz Tapia por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional.

A los Laboratorios de Biorremediación I y II de la Universidad de Sonora, por permitirnos trabajar en las instalaciones y sentirnos en un ambiente de armonía.

Al Dr. Ramírez Vílchez-Vargas y la Clínica Universidad de Magdeburg de Gastroenterología, Hepatología e Infectología por sus valiosa colaboración en la secuenciación de nuestras muestras.

Al departamento de Tecnología en Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) y al Dr. Marcel Martínez-Porchas por su asistencia técnica en la extracción de ADN.

A nuestros amigos de IQ, Adriana Cadena, Fernando Calleja, Jesús Graff y Sarahí Gutiérrez que se convirtieron en familia, compartimos momentos tanto de diversión como de trabajo, a quienes con su amistad, consejos y apoyo hicieron más fácil y amenas las horas de estudio.

A todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido a la realización de este trabajo.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Página

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	xi
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
I.1 Objetivo General.....	4
I.1.2 Objetivos Específicos.....	4
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	5
II.1 Contaminación Ambiental.....	5
II.1.2 Contaminación del Agua .....	6
II.1.3 Contaminación de Agua Causada por Metales Pesados.....	8
II.1.4 Contaminación por Níquel.....	13
II.2 Tratamiento de Aguas Residuales Industriales. ....	15
II.2.1 Métodos Físico-químicos. ....	16
II.2.2 Métodos Biológicos .....	18
II.3 Reactores .....	31
II.4 Análisis de la Microbiota en la Biopelícula.....	34
<b>III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	37
III.1 Diagrama Experimental .....	37
III.2 Operación del Reactor Anaerobio .....	38
III.2.1 Alimentación .....	39

III.3 Análisis Físicoquímico de Influentes y Efluentes .....	40
III.3.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO) .....	40
III.3.2 Producción de Metano .....	40
III.3.3 Alcalinidad.....	41
III.3.4 Potencial Hidrógeno (pH).....	42
III.4 Sólidos.....	42
III.5 Evaluación de la Concentración de Níquel en la Zeolita.....	43
III.5.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopia de Dispersión de Energía (EDS).....	43
III.6 Absorción Atómica (AA).....	44
III.7 Análisis de la Microbiota en la Biopelícula.....	45
III.7.1 Extracción de ADN.....	45
III.7.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	48
III.7.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	51
III.7.4 Secuenciación Masiva Illumina .....	53
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
IV.1 Análisis Físicoquímico de Influentes y Efluentes.....	54
IV.1.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	54
IV.1.2 Producción de Metano.....	55
IV.1.3 Relación de Alcalinidad .....	56
IV.1.5 Sólidos.....	57
IV.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopia de Dispersión de Energía (EDS). .....	58

IV.3 Evaluación de la Concentración de Níquel en los Estudios en Continuo en la Zeolita .....	63
IV.3.1 Absorción Atómica (AA).....	63
IV.4 Análisis de la Microbiota en la Biopelícula .....	64
IV.4.1 Electroforesis en gel de Agarosa y Cuantificación de ADN por Nanodrop .....	64
IV.4.3 Análisis Taxonómico de la Diversidad Microbiana Encontrada en el Biorreactor .....	67
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	<b>72</b>
<b>VI. ANEXO</b> .....	<b>73</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>78</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Tecnologías de biorremediación .....	20
<b>Figura 2.</b> Principios básicos involucrados en la eliminación/recuperación de metales de soluciones acuosas por biomasa microbiana y derivados .....	23
<b>Figura 3.</b> Etapas de la digestión anaerobio .....	30
<b>Figura 4.</b> Clasificación de biorreactores .....	32
<b>Figura 5.</b> Análisis de la microbiota en la biopelícula formada en el reactor de estudio a partir de lodo proveniente de planta de tratamiento de aguas residuales de la industria cervecera mediante secuenciación tipo Sanger. ....	36
<b>Figura 6.</b> Diagrama experimental .....	37
<b>Figura 7.</b> Esquema de instalación de reactor .....	38
<b>Figura 8.</b> Microscopio electrónico de barrido.....	43
<b>Figura 9.</b> Metodología empleada para la extracción de ADN .....	47
<b>Figura 10.</b> Termociclador empleado para la reacción en cadena de la polimerasa .....	49
<b>Figura 11.</b> Metodología de Electroforesis.....	52
<b>Figura 12.</b> Espectrofotometría por Nanodrop .....	53
<b>Figura 13.</b> Remoción de DQO .....	54
<b>Figura 14.</b> Producción de metano .....	55
<b>Figura 15.</b> Relación de alcalinidad ( $\alpha$ ) y pH del efluente .....	56
<b>Figura 16.</b> a) MEB de zeolita b) MEB biomasa más zeolita con 500 ppm $\text{Ni}^{+2}$ . 59	
<b>Figura 17.</b> Análisis de EDS de la zeolita antes del tratamiento. ....	60

<b>Figura 18.</b> Análisis EDS de la zeolita después del tratamiento .....	62
<b>Figura 19.</b> Eficiencia de remoción de níquel .....	63
<b>Figura 20.</b> Gel de agarosa.....	64
<b>Figura 21.</b> Zonas de muestreo en el biorreactor.....	65
<b>Figura 22.</b> Abundancia relativa referente a los filos encontrados en las muestras. .....	68
<b>Figura 23.</b> Abundancia relativa referente a las clases encontradas en las muestras. ....	69
<b>Figura 24.</b> Abundancia relativa referente a los géneros encontrados en las muestras. ....	71

## INDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla I.</b> Metales pesados y su función en el organismo .....	11
<b>Tabla II.</b> Límites máximos permisibles de metales pesados .....	12
<b>Tabla III.</b> Tratamientos físico-químicos .....	16
<b>Tabla IV.</b> Tipo de biomasa utilizada como biosorbentes.....	25
<b>Tabla V.</b> Ventajas y desventajas de los biorreactores .....	33
<b>Tabla VI.</b> Preparación de medio de cultivo .....	39
<b>Tabla VII.</b> Cebadores empleados para la generación de librerías por secuenciación masiva .....	49
<b>Tabla VIII.</b> Determinación de sólidos en el reactor .....	57
<b>Tabla IX.</b> Resultados de cuantificación de ADN por Nanodrop .....	66

## RESUMEN

Las aguas residuales industriales que provienen de las fábricas de galvanizado en el noroeste de México son depositadas al ambiente principalmente sin ningún tratamiento, lo que causa varios efectos inconvenientes para el medio ambiente y la población. En este sentido, la eficiencia de eliminación de materia orgánica e inorgánica contenida en el agua contaminada está completamente relacionada con los procesos de biorremediación que preforma la composición de la comunidad microbiana. El tratamiento anaeróbico de aguas residuales ofrece una excelente opción para eliminar los metales pesados como el níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ), siendo uno de los principales elementos de desecho que se presentan en los efluentes de aguas residuales de las industrias metalúrgicas como la galvanizada. En este trabajo, se montó un biorreactor anaerobio empacado de zeolita de flujo ascendente de 2L y se inoculó con microorganismos heterotróficos como bioadsorbentes para tratar aguas residuales industriales reales, recolectadas de una fábrica de electroplatinado ubicada en Hermosillo, Sonora, México. La eliminación del níquel se realizó de 250 ppm a 500 ppm de dicho metal y se recuperó y evaluó la producción de metano. Se realizaron análisis físico-químicos como demanda química de oxígeno, sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles, pH, producción de metano y concentración de níquel por análisis de absorción atómica (AA), así como microscopía electrónica de barrido acoplada a EDS. Los resultados obtenidos podrían sugerir que la comunidad microbiana desarrollada sobre zeolita, empleada como soporte inorgánico para el tratamiento anaeróbico, desempeña un importante papel bioadherente para la eliminación de metales pesados como  $\text{Ni}^{2+}$ , permitiendo una alta recuperación de metano, referente a la parte del análisis taxonómico permanecieron hasta el final del tratamiento los grupos microbianos *Clostridium*, *Spirochaetae* y *Thermotogae*. En este sentido, este tratamiento propuesto de aguas residuales industriales podría conducir a una mejor conservación del medio ambiente y una estrategia accesible para tratar los efluentes de la galvanoplastia.

## I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la contaminación ambiental causada por el uso desmedido de metales pesados tóxicos en el desarrollo de las diferentes tecnologías ha ido en aumento a nivel mundial. La principal fuente de contaminación por metales pesados en el agua está asociada a la actividad industrial, siendo las de procesamiento de metales, fabricación de baterías, minería, galvanoplastia y electroplatinado las de mayor contribución (Alboghobeish et *al.*, 2014).

Actualmente, los metales pesados como el cobre, cromo, cadmio, arsénico, zinc y níquel son los más utilizados y a su vez, los más peligrosos y tóxicos para el medio ambiente (Alboghobeish et *al.*, 2014; Hase et *al.*, 2017). La presencia de metales pesados en altas concentraciones en el agua, puede causar daños severos e irreversibles tanto a los sistemas acuáticos y terrestres, como a la salud humana, dada su alta solubilidad en compuestos polares, facilitando así su absorción por los organismos vivos. Ingerir productos contaminados con metales pesados presentes en la dieta puede conllevar a la acumulación de concentraciones altas en el cuerpo, provocando desórdenes serios e irreversibles en la salud (Babel y Kurniawan, 2004). Así pues, una de las prioridades en materia ambiental y de salud humana tendría que ser el tratamiento de aguas residuales contaminadas con metales pesados previos a su descarga en el ambiente.

La remoción de los metales pesados contenidos en los efluentes puede ser efectuada por tratamientos convencionales como la precipitación química, intercambio iónico y remoción electroquímica. Sin embargo, estos procesos aún tienen diversas desventajas que resultan significativas dado su remoción incompleta, altos costos energéticos y sobretodo, la producción de lodo contaminado posterior al tratamiento (Barakat, 2011; Zhao et *al.*, 2016). En este sentido, numerosos esfuerzos han sido realizados en los últimos años para desarrollar tecnologías menos costosas y más eficientes. La utilización de compuestos de origen mineral como la zeolita para la adsorción de metales, o

bien, de origen biológico y orgánico como los bioproductos industriales, biomasa y materiales poliméricos ha ido en aumento. Por otra parte, la utilización de membranas de ultra y nanofiltración, así como de ósmosis reversa han sido también utilizadas, sin embargo, sus costos de instalación y operación resultan mucho más elevados, lo que hace menos asequible su implementación (Zhao *et al.*, 2016).

Hasta la fecha existen pocos estudios sobre remoción de metales pesados y el análisis de la diversidad microbiana y su dinámica. Es por esto, que este proyecto propone entender, controlar y optimizar los factores de los procesos de remoción de metales pesados en el agua residual industrial frente al impacto que en materia de ambiente y salud presentan.

## **I.1 Objetivo General**

Evaluar fisicoquímica y microbiológicamente un biorreactor anaerobio de lecho fijo con flujo ascendente a escala laboratorio, para el tratamiento de agua residual industrial contaminada con níquel, proveniente de la industria de platinado de la región de Sonora.

### **I.1.2 Objetivos Específicos**

- Evaluar los parámetros fisicoquímicos del reactor en función de la concentración de níquel tratada.
- Caracterizar la zeolita utilizada como soporte por medio de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) antes y después del tratamiento de biosorción.
- Determinar el porcentaje de remoción de níquel de aguas contaminadas.
- Analizar la comunidad microbiana asociada al lodo del reactor antes y después del tratamiento de biosorción.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Contaminación Ambiental

La contaminación es definida como la presencia de una sustancia en el ambiente que, debido a su cantidad o composición química, prohíbe el funcionamiento de procesos naturales y produce efectos indeseables para la salud y el medio ambiente. Por lo tanto, la contaminación ambiental no solo afecta la salud del ser humano, también altera el equilibrio de los ecosistemas (EPA, 2017).

La creciente preocupación por la contaminación ambiental, ha dado como resultado un aumento en la investigación y el desarrollo de tecnologías sustentables, así como una normatividad cada vez más estricta. Como resultado, la introducción de tecnologías limpias en los procesos industriales ha logrado disminuir las descargas de sustancias contaminantes al ambiente. A pesar de todo, en la mayoría de las empresas todavía se generan aguas residuales con concentraciones de sustancias contaminantes de consideración (Reyes *et al.*, 2006).

La introducción repentina de compuestos químicos xenobióticos o la reubicación masiva de materiales naturales en diferentes compartimientos ambientales, con frecuencia puede abatir la capacidad de autolimpieza de los ecosistemas receptores y por lo tanto dar como resultado la acumulación de contaminantes a niveles problemáticos y hasta perjudiciales (Cañizares, 2000).

Las consecuencias del impacto al ambiente provenientes de las actividades humanas e industriales, están concientizando a la población sobre la necesidad de adoptar medidas para detener y/o reducir el desequilibrio producido al medio ambiente.

El agua potable no solo se contamina de forma natural por microorganismos, sino también por diferentes sustancias o por otras vías que involucran actividades humanas. El agua se contamina naturalmente por algunas sustancias o por elementos libres como el sodio, el potasio, el cobre, el hierro, el calcio y el selenio.



Las sustancias introducidas por las actividades humanas incluyen sales, residuos de hidrocarburos derivados del petróleo, solventes provenientes de la industria y la agricultura, así como lixiviados de depósitos de basura, letrinas y pozos negros (Abarca y Mora, 2007).

### **II.1.2 Contaminación del Agua**

El agua es un elemento fundamental y determinante en la vida humana. La escasez y el uso abusivo del agua dulce plantean una creciente y seria amenaza para el desarrollo sostenible y la protección del medio ambiente. La salud y el bienestar humano, la seguridad alimentaria, el crecimiento industrial y el ecosistema del que dependen se hallan en peligro, a no ser que la gestión de los recursos hídricos se efectúe en el presente de una forma más eficaz que en el pasado (Hernández *et al.*, 2006).

El agua pura es un recurso renovable, sin embargo, puede ser contaminada por sustancias químicas orgánicas e inorgánicas. La incorporación de sustancias químicas catalogadas en la actualidad como tóxicas y no biodegradables dentro de los procesos productivos, ha generado un impacto medioambiental negativo debido a la alta carga contaminante de los desechos que retornan al ecosistema, especialmente a los cuerpos de agua (Carvajal *et al.*, 2013).

De acuerdo con la EPA, la contaminación del agua es la presencia de materiales dañinos o inaceptables en el agua en suficiente cantidad como para arruinar la calidad del agua (2017). Las fuentes principales de contaminación suelen ser de distintos orígenes, pero la más común es la provocada por desechos industriales que debido a su indebida descarga al medio ambiente son incorporados a los efluentes de agua, que suelen ser consumidos por los seres vivos que ahí habitan, provocando alteraciones en la cadena trófica, y por consecuencia riesgos potenciales en el medio ambiente.

De acuerdo al Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (2000), la demanda por agua crece rápidamente con la expansión demográfica, la

actividad industrial, y el riego agrícola continúan en aumento. No obstante, los avances de los últimos diez años, el acceso al agua potable sigue siendo una cuestión importante, y más de una cuarta parte de la población regional aún carece de un suministro adecuado de agua y un sistema de alcantarillado. La cantidad de metales pesados, químicos sintéticos y desechos peligrosos que llega a las aguas subterráneas proveniente de los botaderos de basura y otras fuentes no puntuales (escorrentía, infiltración en zonas agrícolas), parece estarse duplicando cada quince años en América Latina.

Los efluentes de agua han sido desde tiempos inmemorables los receptores, directos o indirectos, de los desechos líquidos que el hombre ha generado debido a su propia actividad. En un principio, eran capaces de soportar las cargas contaminantes que a los ríos se vertían debido a su carácter auto depurador. Posteriormente, al crearse grandes asentamientos urbanos, se incrementó notablemente el número de los desagües. En consecuencia, los cursos fluviales perdieron su capacidad auto depuradora y se produjeron graves alteraciones en la calidad de sus aguas, con los subsiguientes peligros para la salud de las poblaciones situadas aguas abajo. Estos riesgos se debían principalmente a que la carga orgánica transportada podría servir de vehículo para la aparición de enfermedades infecciosas y, por tanto, para la propagación de epidemias (Palacios y Villalobos, 2007).

### **II.1.3 Contaminación de Agua Causada por Metales Pesados.**

En los sistemas acuáticos se disuelven numerosas sales y sustancias de acuerdo a sus solubilidades. La contaminación en fuentes de agua se produce, bien por la presencia de compuestos o elementos que normalmente no estarían sin la acción del hombre, o por un aumento o descenso de la concentración normal de las sustancias ya existentes debido a la acción humana (Palacios y Villalobos, 2007).

La contaminación por metales pesados es un problema que ha ido en aumento debido principalmente a actividades antropogénicas y descarga de efluentes. Siendo las principales fuentes de contaminación el procesamiento de metales, fabricación de baterías, minería, galvanoplastia y electroplatinado (Alboghobeish *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2014). Esto ha ido en aumento debido a la descarga de grandes cantidades de aguas residuales contaminadas con metales pesados.

Dentro de los efluentes líquidos industriales uno de los contaminantes que más afectan al medio ambiente es el de los metales pesados. Estos están considerados como uno de los grupos más peligrosos debido a su no biodegradabilidad, su alta toxicidad a bajas concentraciones y su capacidad para acumularse en diferentes organismos. Aunque en este grupo se incluyen elementos esenciales para el crecimiento, reproducción y/o supervivencia de los organismos vivos, otros muchos pueden causar graves problemas (Cañizares, 2000). Los efectos de los metales sobre el funcionamiento de los ecosistemas varían considerablemente y son de importancia económica y de salud pública.

Los metales pesados son un conjunto de elementos que presentan propiedades metálicas, en el que se incluyen metales de transición, algunos semimetales, lantánidos y actínidos. La norma oficial mexicana considera solamente al arsénico, cobre, cadmio, cobalto, cromo, mercurio, níquel, plomo y zinc, dentro de esta clasificación (NOM-001-ECOL-1996). El criterio más general para su clasificación se basa en la densidad específica, de acuerdo con la cual se

incluyen en este grupo elementos con una densidad mayor a 5 g/cm<sup>3</sup>. Sin embargo, algunos autores consideran esta definición como inapropiada, pues la densidad específica no es una referencia en cuanto a la reactividad o toxicidad de un metal (Duffus 2002, Volke-Sepulveda *et al.*, 2005).

La toxicidad de los metales depende principalmente de tres factores (Kiely, 1999):

1- La concentración en la que se encuentran: aunque algunos metales son necesarios para procesos biológicos, todos ellos son tóxicos en altas concentraciones. Otros metales, no son esenciales y se acumulan en diferentes organismos, siendo tóxicos aún en bajas concentraciones.

2- El tipo de especie que forman en un medio específico: sólo ciertas especies de metales con determinadas cargas son tóxicas, es decir, presentan características físicas o químicas que los hace estar biodisponibles.

3- La persistencia del contaminante: los metales no pueden ser degradados o descompuestos, es decir únicamente se distribuyen en el entorno de distintas maneras.

Debido a su movilidad en los ecosistemas acuáticos naturales y a su toxicidad para las formas superiores de vida, los iones de metales pesados presentes en los abastecimientos de agua superficial y subterráneos, se les ha dado prioridad como los contaminantes inorgánicos más importantes en el ambiente. Aun cuando se encuentren presentes en cantidades bajas e indetectables, la recalcitrancia y consiguiente persistencia de los metales pesados en cuerpos de agua, implica que a través de procesos naturales como la biomagnificación, su concentración puede llegar a ser tan elevada que empiece a ser tóxica (Cañizares, 2000).

Actualmente, los metales pesados como el cobre, cromo, cadmio, arsénico, zinc y níquel son los más utilizados y a su vez, los más peligrosos y tóxicos para el medio ambiente (Alboghobeish *et al.*, 2014; Hase *et al.*, 2017). Estos elementos metálicos tienen gran significado como indicadores de la calidad ecológica de

todo flujo de agua debido a su toxicidad, y muy especialmente al comportamiento bioacumulativo.

En el organismo de los seres vivos, hay pequeñas cantidades de algunos metales pesados que pueden intervenir en reacciones bioquímicas, pero otros metales no representan utilidad biológica. Por esto, la exposición ocupacional y la exposición pasiva a metales pesados presentes en el ambiente o que provienen de la dieta deben ser reguladas, ya que cantidades superiores a las consideradas normales pueden ocasionar ciertas enfermedades (Tirado *et al.*, 2015).

Es importante considerar que elevadas concentraciones de dichos metales en el organismo de los seres vivos alteran los procesos bioquímicos y fisiológicos ocasionando diversas enfermedades o inclusive la muerte. Existen metales pesados que no son esenciales para el funcionamiento del organismo y pueden causar graves daños a la salud como en el caso del plomo, el arsénico, el cadmio y el mercurio (Ferrer, 2003). Es por esto, que lo que determina la toxicidad de los metales es las concentraciones a las cuales pueden encontrarse y el tipo de especie que puede formar en determinado medio (ver Tabla I).

**Tabla I.** Metales pesados y su función en el organismo

<b>Forma</b>	<b>Función en el organismo</b>	<b>Ejemplo</b>
<b>Oligoelementos (Elementos presentes en concentraciones traza)</b>	Requeridos en cantidades traza para el metabolismo de animales y plantas.	Arsénico, boro, cobalto, cromo, cobre, molibdeno, manganeso, níquel, selenio y zinc.
<b>Metales pesados sin función biológica conocida</b>	Su presencia en determinadas cantidades en seres vivos provoca disfunciones en el funcionamiento de sus organismos. Resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos.	Cadmio, mercurio, plomo, cobre, níquel, antimonio, bismuto.

*Gregori, 2006*

A diferencia de metales pesados como el plomo y el cadmio, algunos de ellos como el níquel y zinc, en concentraciones traza (0.1 mmol/L) son esenciales para algunos procesos celulares de los microorganismos. Éstos últimos ejercen funciones catalíticas en determinadas reacciones bioquímicas o en conversiones metabólicas, actúan como micronutrientes o cofactores enzimáticos, o pueden estabilizar estructuras proteicas (Bruins *et al.*, 2000).

En México, existen ciertas condiciones particulares de descarga, que hacen referencia al conjunto de parámetros físicos, químicos y biológicos y a los niveles máximos permisibles en las descargas de agua residual (ver Tabla II).

Estos parámetros son determinados por la Comisión Nacional del Agua, con la finalidad de preservar y controlar la calidad de las aguas conforme a la Ley de aguas Nacionales y su reglamento (NOM-001-ECOL-1996).

**Tabla II.** Límites máximos permisibles de metales pesados

Parámetro (mg/L)	Ríos uso en riego agrícola		Ríos uso público urbano		Riego agrícola (SEDUE 1989)	Fuente de abastecimiento de agua potable (SEDUE 1989)
	Promedio mensual	Promedio diario	Promedio mensual	Promedio diario		
Arsénico	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	-
Cadmio	0.2	0.4	0.1	0.2	0.01	0.001
Cobre	4	6	4	6	0.2	0.1
Cromo	1	1.5	0.5	1	1	0.1
Mercurio	0.001	0.02	0.01	0.01	-	-
Níquel	2	4	2	4	0.2	-
Plomo	0.5	1	0.2	0.4	5	0.1
Zinc	10	20	10	20	2	-

*NOM-001-ECOL-1996*

Dentro de los metales pesados se encuentra el níquel, el cual es un metal esencial en los humanos debido a que, contribuye al funcionamiento óptimo del páncreas. El límite permisible de este es 2 mg/L, como se puede observar en la tabla anterior.

#### **II.1.4 Contaminación por Níquel**

El níquel es un metal duro, blanco-plateado, dúctil, maleable y muy tenaz, con masa atómica de 58.71 y número atómico de 11; tiene cinco isótopos naturales y siete isótopos radiactivos. Es resistente a la corrosión y oxidación. Posee propiedades magnéticas. Es un buen conductor de calor y electricidad.

En el ambiente se encuentra principalmente combinado con oxígeno o azufre en forma de óxidos o sulfuros. Muchos de sus compuestos son solubles en agua y tienen un color verde característico, además, no tienen ni olor ni sabor característico.

El suelo generalmente contiene entre 4 y 80 partes de níquel en un millón de partes de suelo (ppm; 1 ppm = 1,000 ppb). Las concentraciones más altas de níquel en el suelo (hasta de 9,000 ppm) se encuentran cerca de industrias que extraen níquel de minerales. Los alimentos contienen níquel y son la principal fuente de exposición al níquel para la población general. La población humana consume diariamente aproximadamente 170 microgramos ( $\mu\text{g}$ ; 1  $\mu\text{g}$  es la millonésima parte de 1 gramo) de níquel en los alimentos. Entre los alimentos con alto contenido natural de níquel se encuentra el chocolate, habichuelas de soya, nueces y avena.

Las propiedades que posee lo hacen muy deseable para combinarse con otros metales y formar aleaciones. Algunos de los metales con los cuales se combina son el hierro, cobre, cromo y zinc; estas aleaciones se usan para fabricar monedas y joyas, así como válvulas e intercambiadores de calor. Sin embargo, la mayor parte del níquel se usa para fabricar acero inoxidable.

Una gran cantidad de níquel se encuentra en el entorno acuático o en la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) debido a su uso extensivo (Gikas, 2008). La concentración de rastros de níquel es necesaria para el crecimiento de microorganismos (Hausinger, 1987; Henriksson y DaSilva, 1978), mientras que



la cantidad excesiva de níquel causa efectos inhibidores o incluso tóxicos para los seres vivos.

El níquel es liberado a la atmósfera cuando se mina y por industrias que fabrican o usan níquel, aleaciones de níquel o compuestos de níquel. Estas industrias también pueden desechar este elemento en aguas residuales. También es liberado a la atmósfera por plantas de energía que queman petróleo o carbón y por incineradores de basura.

La concentración promedio de níquel en el agua potable es entre 2 y 4.3 ppb. Sin embargo, el ser humano puede estar expuesto a niveles de níquel en el agua potable más altos que el promedio si vive cerca de industrias que procesan o usan níquel. Los niveles de níquel más altos que se han detectado en el agua potable, aproximadamente 72 ppb, se encontraron cerca de áreas con grandes depósitos naturales de níquel, en donde se mina y refina el níquel (ASTDR, 2016).

## **II.2 Tratamiento de Aguas Residuales Industriales.**

La creciente preocupación por la contaminación ambiental, ha dado como resultado un aumento en la investigación y el desarrollo de tecnologías sustentables, así como una normatividad cada vez más estricta. Como resultado, la introducción de tecnologías limpias en los procesos industriales ha logrado disminuir las descargas de sustancias contaminantes al medio ambiente. A pesar de todo, en la mayoría de las empresas todavía se generan aguas residuales con concentraciones bajas de sustancias contaminantes. Los principales contaminantes provenientes de los efluentes líquidos industriales son los metales pesados (Reyes *et al.*, 2006).

Según el principio de la tecnología de remediación, los tratamientos se puede dividir en tratamientos biológicos y tratamientos fisicoquímicos, el primero de estos utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar (destrucción), transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inoocuos y los tratamientos fisicoquímicos utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación (INECC, 2007).

Se hace necesario acelerar la eliminación de los contaminantes para remediar los problemas existentes y disminuir el impacto de incidentes futuros mediante el control del ingreso de contaminantes. (Cañizares, 2000). Para el tratamiento de los efluentes líquidos que contienen metales pesados, existen diferentes métodos físico-químicos, siendo los de mayor auge en la actualidad los siguientes: precipitación, intercambio iónico, ósmosis inversa y adsorción (Reyes *et al.*, 2006).

### II.2.1 Métodos Físico-químicos.

Estos métodos, presentan tanto ventajas como desventajas de acuerdo a su aplicación a efluentes industriales constituidos por soluciones metálicas diluidas (ver Tabla III), las principales desventajas son los costos importantes en términos energéticos y/o consumo de productos químicos.

**Tabla III.** Tratamientos físico-químicos

<b>Método</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Precipitación</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Simplicidad de operación.</li><li>-Alto nivel de eliminación de metales pesados.</li><li>-Bajo costo de operación.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-La presencia de agentes orgánicos disminuye su rendimiento.</li><li>-No es selectivo.</li><li>-Se necesitan agentes coagulantes y floculantes para separar los metales del efluente.</li><li>-Generación de lodos con alto costo de tratamiento.</li></ul>
<b>Intercambio iónico</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Es posible la eliminación de metales a muy bajas concentraciones.</li><li>-Presenta alta selectividad.</li><li>-Es posible la recuperación de los metales por electrólisis.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-La presencia de calcio, sodio y magnesio disminuye su rendimiento debido a que pueden saturar la resina.</li><li>-La posible competencia entre metales pesados y otros cationes.</li><li>-Las resinas no son muy tolerantes al cambio de pH.</li><li>-Los materiales orgánicos pueden envenenar la resina.</li><li>-La solución contaminada debe ser previamente tratada para eliminar los materiales en suspensión.</li></ul>

<p><b>Ósmosis inversa</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Altos niveles de remoción.</li> <li>-Es un proceso fácilmente automatizado.</li> <li>-No hay cambio en la composición química de las aguas residuales.</li> <li>-La recuperación de metales pesados es posible.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Mediana selectividad y tolerancia a cambio de pH.</li> <li>-Bajo tiempo de vida con soluciones corrosivas.</li> <li>-Requiere de presiones muy altas para su funcionamiento.</li> <li>-Requiere de mantenimiento frecuente para evitar saturación de la membrana.</li> <li>-Alto costo por reemplazar la membrana.</li> <li>-Es necesario separar las partículas insolubles o en suspensión para evitar saturación de la membrana.</li> </ul>
<p><b>Adsorción</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Altamente efectivo.</li> <li>-Fácil de operar.</li> <li>-Permite la fijación de metales en presencia de otros cationes.</li> <li>-La recuperación de metales pesados en posible.</li> <li>-El adsorbente puede ser regenerado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-El costo del adsorbente y el regenerador pueden ser muy altos.</li> <li>-La capacidad de adsorción es altamente dependiente del pH.</li> <li>-Es necesario eliminar los materiales en suspensión antes de que el efluente sea tratado.</li> </ul>

*Reyes et al., 2006*

Las nuevas tecnologías para el desarrollo de sistemas de tratamientos de efluentes deberán de considerar dos factores importantes: bajo costo de operación y que sean fáciles de implementar; con el objetivo de que sean atractivas para las pequeñas y medianas empresas, las cuales se ven en la necesidad de tratar sus efluentes para que estos cumplan con la normatividad vigente.

## **II.2.2 Métodos Biológicos**

Esta clasificación se basa en el principio de la tecnología de remediación, en la cual se utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar (destrucción), transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos. (INECC, 2007).

### **II.2.2.1 Biorremediación**

Las prácticas de biorremediación consisten en el uso de organismos como plantas, hongos, bacterias naturales o modificadas genéticamente para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o convirtiéndolas en inocuas para el ambiente y la salud humana (Benavides *et al.*, 2006).

La biorremediación es un proceso de descontaminación que emplea una serie de reacciones bioquímicas por una población o consorcios de microorganismos inoculados en la zona contaminada, para convertir la estructura de los hidrocarburos en componentes menos tóxicos. Una de las ventajas del proceso es que no generan corrientes de residuos y que inclusive después de suspendido el tratamiento, dadas las condiciones en que se efectúa, se espera un proceso de atenuación natural en el que además de la reducción de hidrocarburos, se reducen las poblaciones bacterianas. (Trujillo y Ramírez, 2012).

La utilización de microorganismos como biosorbentes de metales pesados, ofrece una alternativa potencial a los métodos ya existentes para la detoxificación y recuperación de metales tóxicos o valiosos presentes en aguas residuales industriales (Cañizares, 2000).

Los diferentes biotratamientos que pueden emplearse para descontaminar suelos o aguas. Se clasifican en dos categorías: *in situ* y *ex situ*.

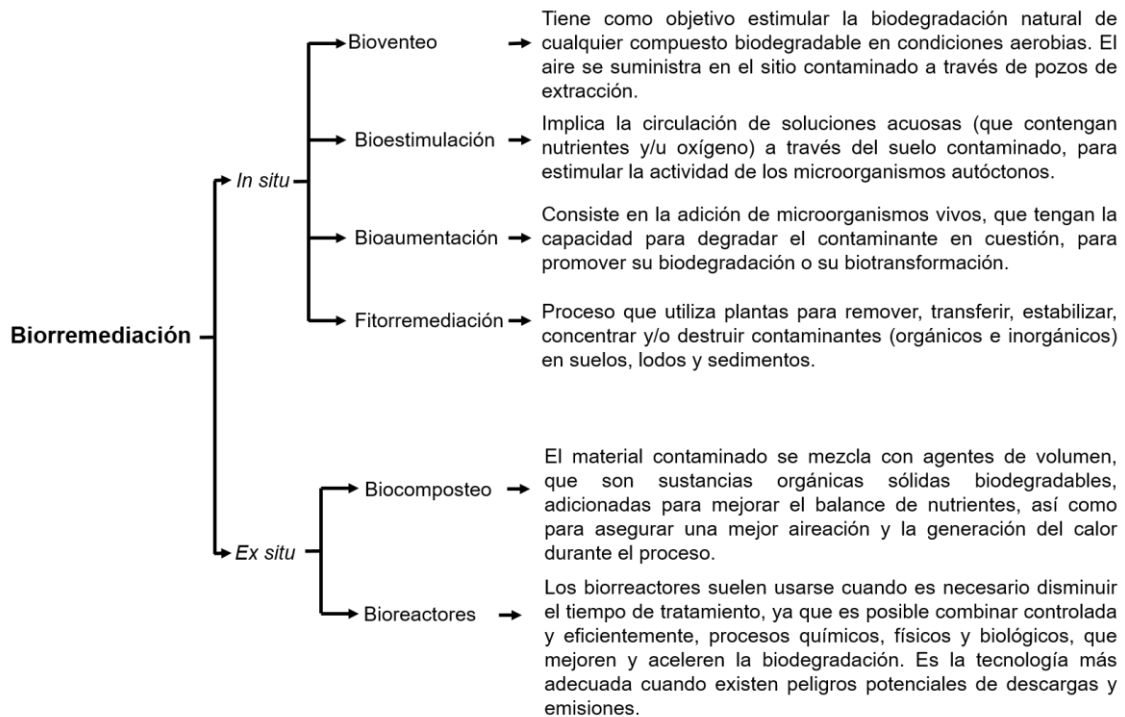
La biorremediación *in situ* se destina al tratamiento de aguas, suelos o arenas contaminadas en el lugar donde se encuentran. En este tipo de metodologías se modifican las condiciones fisicoquímicas (nutrientes, humedad, oxígeno) en la

zona contaminada con el fin de favorecer el incremento y la tasa metabólica de los microorganismos, logrando aumentar la velocidad de degradación de las sustancias tóxicas.

La biorremediación *ex situ* consiste en excavar el suelo contaminado o en extraer el agua subterránea por bombeo para aplicar el tratamiento. Estas técnicas se emplean cuando las sustancias tóxicas no pueden ser eliminadas por métodos *in situ*, si la sustancia no se pueda degradar, por las características del medio o por que se requiera la descontaminación en un menor lapso de tiempo. Estos procedimientos presentan ventajas tales como el poder de optimizar los parámetros microbiológicos y el control del proceso, aunque, tienen un costo mayor (Palacios y Villalobos, 2007).

Las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras, en base a los siguientes principios: estrategia de remediación, lugar en que se realiza el proceso de remediación, y tipo de tratamiento (INECC, 2007).

En la Figura 1 se muestra las tecnologías aplicadas de la biorremediación, según su aplicación *in situ* o *ex situ*, según las características del proceso a aplicar.



INNEC, 2007

**Figura 1.** Tecnologías de biorremediación

Una de las principales tecnologías de biorremediación aplicadas al tratamiento de aguas, es el uso de biorreactores, esto se debe a las características que tienen durante el tratamiento, principalmente a la posibilidad que ofrecen de combinar controlada y eficientemente procesos químicos, físicos y biológicos.

La biorremediación es parte de las tecnologías de remediación consideradas limpias no contaminantes. Los procesos pueden clasificarse según el tipo de material biológico que se utilice, en este caso se definen dos técnicas diferenciadas: la bioacumulación y la biosorción (Flores *et al.*, 2001).

### **II.2.2.2 Biosorción**

La biosorción resulta ser una de las tecnologías más prometedoras, no solamente por su bajo costo, sino porque se trata de un proceso rápido que permite tratar grandes volúmenes de agua con bajas concentraciones de metal en forma eficaz. Además, la posibilidad de emplear biomasa muerta o productos derivados de su metabolismo, supera problemas de toxicidad e incluso permite la regeneración y reutilización del biomaterial por varios ciclos de adsorción/desorción (Plaza, 2012).

De acuerdo con Tsezos (1980), se propone varias etapas en el mecanismo de adsorción relacionadas con la transferencia de los metales a través de las capas que bordean las células:

- 1.- Transporte del metal desde el seno de la solución a la capa límite alrededor de la pared celular.
- 2.- Transporte desde la capa límite a la pared celular.
- 3.- Transporte del metal desde la pared celular a los puntos activos del enlace.
- 4.- Fases del enlace: complejación, adsorción y precipitación en la intramembrana.

Para el estudio de los mecanismos mencionados anteriormente, es necesario tener información sobre la estructura física y química de la pared celular de la biomasa. La pared celular de los diferentes tipos de biosorbentes (hongos, algas, plantas superiores, bacterias) difiere significativamente una de otras, en cuanto a los grupos funcionales que se encuentran presentes, tipo y tamaño de poros, cadenas de polisacáridos, etc. (Plaza, 2012).

El proceso de biosorción involucra una fase sólida (biosorbente) y una fase líquida (solvente, que es normalmente agua) que contiene las especies disueltas que van a ser sorbidas (sorbato, i.e. iones metálicos). Debido a la gran afinidad del biosorbente por las especies del sorbato, éste último es atraído hacia el sólido y enlazado por diferentes mecanismos. Este proceso continúa hasta que se



establece un equilibrio entre el sorbato disuelto y el sorbato enlazado al sólido (a una concentración final o en el equilibrio). La afinidad del biosorbente por el sorbato determina su distribución entre las fases líquida y sólida. La calidad del biosorbente está dada por la cantidad del sorbato que pueda atraer y retener en forma inmovilizada (Cañizares, 2000).

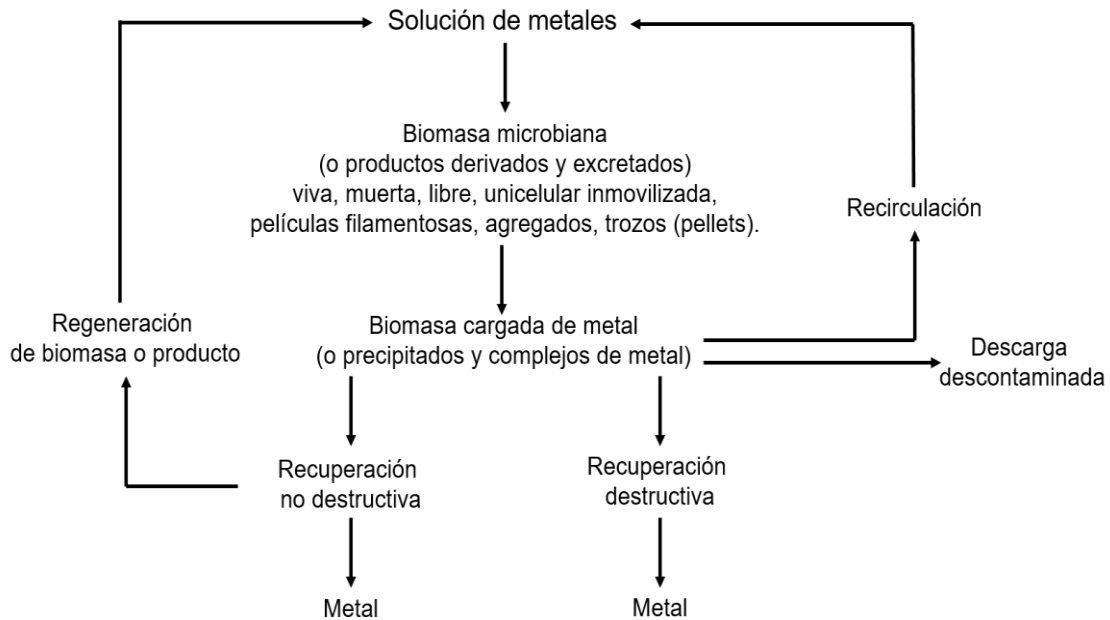
La biosorción se caracteriza por la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica del metal con ligandos presentes en la superficie celular, la cual se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a partes de moléculas componentes de las paredes celulares (Cuizano, 2008).

Los microorganismos son una alternativa potencial sobre los procesos convencionales para la recuperación de metales de soluciones industriales, este fenómeno es conocido como biosorción y se refiere a las interacciones fisicoquímicas entre la biomasa microbiana y el metal pesado (Cañizares, 2000).

Existen diferentes tipos de biomasa utilizados para la biosorción, los biosorbentes pueden clasificarse en sorbentes de bajo o alto costo. El primer grupo está formado por materiales recolectados directamente de la naturaleza (por ejemplo, algas marinas) y por residuos o productos de diferentes industrias (por ejemplo, de plantas de tratamientos de aguas). El otro grupo incluye a los materiales que son cultivados, preparados o sintetizados especialmente para ser usados en los procesos de biosorción. A pesar de la gran cantidad de materiales biológicos que puede adsorber metales de forma natural, solamente unos pocos tienen la suficiente capacidad como para adsorber una gran cantidad de metal de forma eficiente y presentar una alta selectividad, dos características necesarias para ser empleados en un proceso de biosorción a gran escala (Plaza, 2012).

En los últimos años, la tecnología de biosorción, basada en la habilidad de ciertas biomasas de capturar especies metálicas de soluciones acuosas, ha recibido especial atención por su potencialidad para el tratamiento de aguas residuales (ver Figura 2). Varios estudios han demostrado que la biomasa de diferentes

especies de bacterias, hongos y algas son capaces de concentrar en su estructura iones metálicos que se encuentran en ambientes acuáticos (Basso *et al.*, 2002).



**Figura 2.** Principios básicos involucrados en la eliminación/recuperación de metales de soluciones acuosas por biomasa microbiana y derivados

El uso de biomasa en suspensión tiene algunas desventajas, una de las cuales es la separación final del efluente y la biomasa. Como el diseño de reactores para la remoción de metales pesados a partir de efluentes líquidos debe contemplar un contacto óptimo entre éstos y la biomasa, se ha considerado el uso de diferentes tipos de soportes para la inmovilización de la biomasa (ver Tabla IV), con la finalidad de lograr una mayor eficiencia de eliminación de metales pesados. Uno de los materiales que se han estudiado como soporte de biomasa es el carbón activado por su porosidad y su gran superficie específica, además de ser un producto abundante que se obtiene como subproducto de la producción de aceite a partir de coco, oliva y el procesamiento de caña de azúcar (Reyes *et*

*al.*, 2006). Otros materiales que se han utilizado como soporte de biomasa son la sílica, gel de poliacrilamida y poliuretano (Gupta *et al.*, 2000).

Entre los materiales de soporte que se han utilizado en procesos de biosorción se incluyen: espuma de poliuretano (Pakshirajan y Swaminathan, 2009), perlas de vidrio (García-Morales *et al.*, 1999), zeolitas (Fernandez *et al.*, 2008), entre otros. Las zeolitas son un grupo de compuestos minerales cristalinos, cuyas características estructurales permiten que los reactores anaerobios retengan altas concentraciones de biomasa, logrando altas eficiencias y bajos tiempos de retención hidráulica (Montalvo *et al.*, 2012). La clinoptilolita es la zeolita natural más abundante que existe en México, y por lo tanto, es un material muy económico (Halbinger-Flores *et al.*, 2002).

**Tabla IV.** Tipo de biomasa utilizada como biosorbentes

<b>Categoría</b>	<b>Ejemplos</b>
Bacterias	Gram positivas ( <i>Basillus sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> ) Gram negativas ( <i>Escherichia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> ) Cianobacterias
Hongos y levaduras	Hongos ( <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Agaricus sp.</i> , <i>Trichaptum sp.</i> ) Levaduras ( <i>Saccharomyces sp.</i> , <i>Candida sp.</i> )
Algas	Microalgas ( <i>Clorella sp.</i> , <i>Chlamydomonas sp.</i> ) Macroalgas ( <i>Enteromorpha sp.</i> , <i>Codium sp.</i> )
Desechos industriales	Desechos de fermentaciones, alimentos, bebidas, lodos activados, lodos anaerobios.
Desechos agrícolas	Desechos alimenticios (arroz, frutas, trigo)
Residuos naturales	Plantas, cortezas, hierbas.

*Park et al., 2010*

### **II.2.2.3 Uso de Microorganismos en el Tratamiento de Aguas Residuales Contaminadas con Metales Pesados**

Los microorganismos son una alternativa potencial sobre los procesos convencionales para la recuperación de metales de soluciones industriales, este fenómeno es conocido como biosorción y se refiere a las interacciones fisicoquímicas entre la biomasa microbiana y el metal pesado (Cañizares, 2000).

Los microorganismos son los encargados de metabolizar la materia orgánica y aprovecharla como alimento para el crecimiento de más microorganismos y en sustancias sencillas como dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ), amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), nitratos ( $\text{NO}_3$ ) y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Estos microorganismos pueden ser bacterias, arqueas, protozoarios y rotíferos.

Se dice que las bacterias juegan un papel muy importante en la degradación de la materia orgánica, por ello la materia orgánica debe de estar presente en un tamaño tal que pueda ser asimilada por estos microorganismos.

Las bacterias contienen capas compuestas de polisacáridos y proveen de grupos aminos, carboxilos, fosfatos y sulfatos para la biosorción de los metales. Las paredes celulares de las bacterias pueden contener un polisacárido conocido como peptidoglicano que contiene grupos carboxilo, que son los principales sitios de unión para los cationes metálicos. Las paredes celulares de las arqueobacterias son de composiciones muy diversas, pero pueden contener pseudomureína (similar al peptidoglicano), polisacáridos sulfonados y glicoproteínas, lo que provee de grupos carboxilos y grupos sulfatos (Gadd, 2009).

Los microorganismos en su amplia diversidad pueden ser resistentes o tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, constitutivos o inducidos por la presencia del metal en cuestión (Silver y Misra, 1988). En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia del metal. La resistencia o tolerancia

experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos.

Los sistemas desarrollados por las bacterias para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos son diversos (Silver y Phung, 2005; Nies, 1999). Entre ellos, se encuentran principalmente los que involucran:

- 1- Transportadores ubicados en la membrana que expulsan las especies nocivas desde el citoplasma celular.
- 2- Enzimas que modifican el estado redox de los metales o no metales, convirtiéndolos en formas menos tóxicas.
- 3- Componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad (Cervantes *et al.*, 2006)

En general, la propia bacteria presenta mecanismos de incorporación y exportación para un mismo ion metálico esencial. Cuando un microorganismo se enfrenta a grandes concentraciones de algún metal pesado que es acumulado por el sistema inespecífico, el catión del metal pesado es transportado al citoplasma, a pesar de su elevada concentración, porque estos transportadores inespecíficos son expresados constitutivamente. Por consiguiente, no es posible cerrar esta entrada. Esta “puerta abierta” es la primera razón por la cual los iones metálicos pesados son tóxicos (Nies *et al.*, 1995). Cuando el gen que codifica este sistema transportador rápido e inespecífico se muta, las mutantes obtenidas son tolerantes a metales.

Una vez dentro de la bacteria, cuando estos elementos se encuentran en exceso, pueden formar enlaces coordinados con aniones bloqueando grupos funcionales de enzimas, inhibir sistemas de transporte, desplazar metales esenciales desde los sitios nativos de enlace e interrumpir la integridad de la membrana celular (Nies, 2003).

Así, los cationes de los metales pesados foráneos pueden interactuar con iones fisiológicos, inhibiendo sus funciones en la célula. En este sentido, el Cd(II)

puede interactuar con el Zn(II) o el Ca(II), el Ni(II) y el Co(II) con el Fe(II) y el Zn(II) con el Mg(II). Dichos metales foráneos también tienden a unirse a grupos sulfhidrilo, lo cual origina la inhibición de la actividad de enzimas sensibles (Nies, 1999).

Como se mencionó anteriormente, ciertos metales de transición como cobalto, cobre, níquel y cinc a concentraciones trazas del orden  $10^{-1}$  mmol/L son utilizados como bioelementos, micro nutrientes o cofactores enzimáticos; sin embargo, a elevadas concentraciones son tóxicos e inhiben el crecimiento microbiano. Normalmente las bacterias no toleran concentraciones mayores a los 50  $\mu$ mol/L de níquel ni cobalto a excepción de las que habitan ambientes muy contaminados, como tierra, aguas ácidas de mina y residuales de las industrias relacionadas con los metales. Algunas cepas del género alcaligenes crecen en presencia de 50 y 20 mmol/L de níquel y cobalto, las cuales han sido catalogadas como muy resistentes (Gómez *et al.*, 2002).

De acuerdo a su afinidad por el oxígeno, las bacterias pueden ser aerobias, anaerobias o facultativas. Si requieren de oxígeno, son aerobias; sino requieren de oxígeno, son anaerobias; y cuando pueden estar en ambientes aerobios y anaerobios, son facultativas.

El proceso que realizan las bacterias aerobias es la digestión aerobia. La digestión aerobia es un proceso biológico implementado a las aguas residuales que tiene el fin de remover aquellos compuestos orgánicos en suspensión o en solución que se encuentran en el agua, los cuales, al ser degradados por los microorganismos, imponen una demanda de oxígeno sobre el cuerpo de agua receptor (Trillas, 2015).

Las bacterias anaerobias llevan a cabo un proceso complejo llamado digestión anaerobia (ver Figura 3), la cual es una de las tecnologías más adecuadas para el tratamiento de efluentes con alta carga orgánica, y comprende las siguientes etapas (Figueroa, 2013):

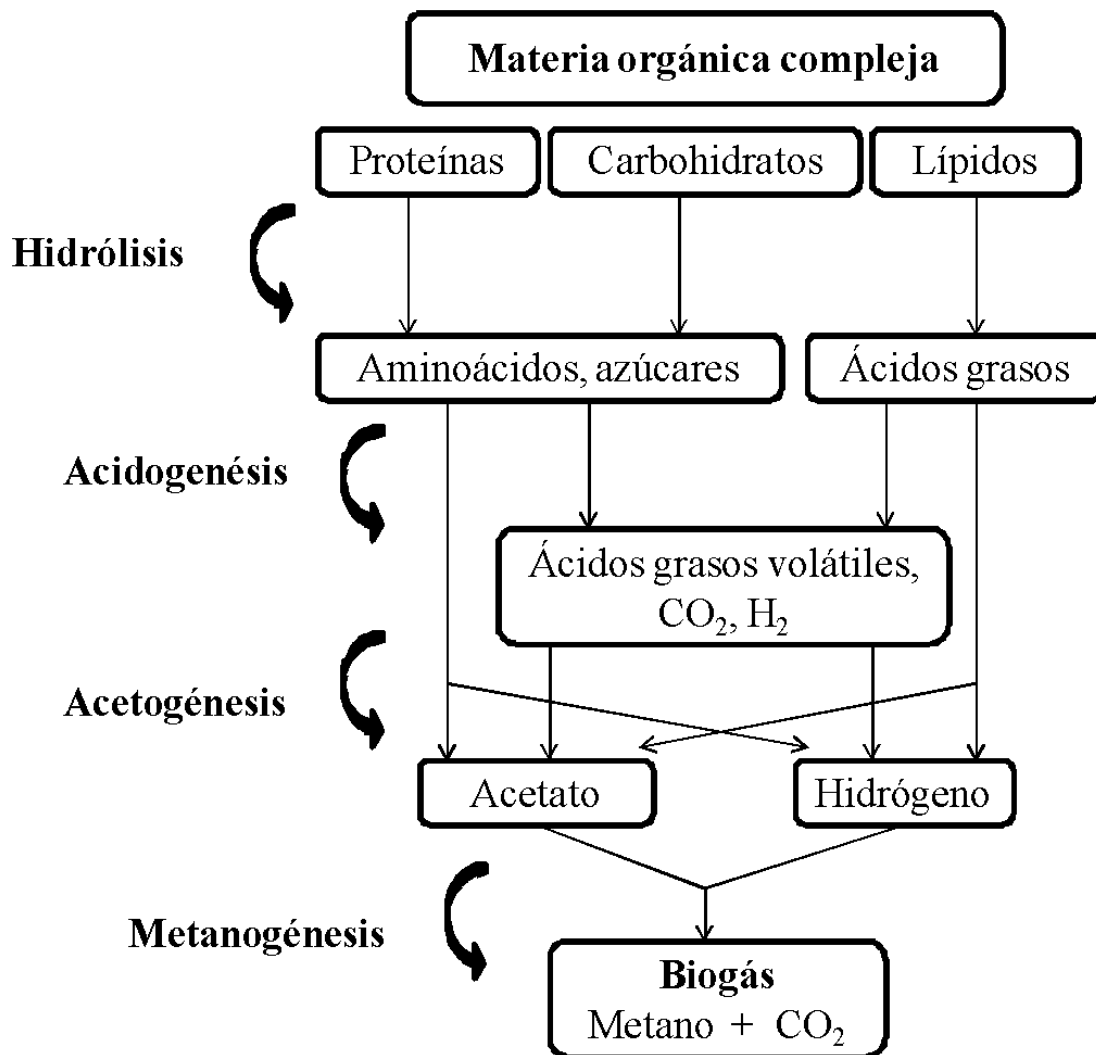
1.- Hidrólisis. Durante la primera etapa, los compuestos orgánicos complejos presentes en las aguas residuales son degradados a compuestos de bajo peso molecular. La degradación de estos compuestos ocurre por la actividad enzimática de las bacterias hidrolíticas, en donde se pueden encontrar celulasas, hemicelulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, proteasas, lipasas y fosfolipasas.

2.- Acidogénesis: Posteriormente, los compuestos de bajo peso molecular, como los azúcares y los aminoácidos, son fermentados y convertidos en bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), hidrógeno ( $\text{H}_2$ ), células y ácidos grasos volátiles (AGV's) como: ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico. La fermentación en esta etapa ocurre por acción de las bacterias acidogénicas. Una etapa paralela a la acidogénesis corresponde a la oxidación anaerobia de los ácidos grasos de cadena larga y alcoholes provenientes de los lípidos (Hutnan, 1999).

3.- Acetogénesis: En esta etapa, los organismos acetogénicos y productores de hidrógeno utilizan los productos de la fermentación de la etapa anterior y los convierten en acetato,  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ .

4.- Metanogénesis: Finalmente, el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{H}_2$  son convertidos a un biogás compuesto principalmente por metano y  $\text{CO}_2$  en menor cantidad. El grupo bacteriano responsable de esta etapa corresponde a las bacterias metanogénicas, que son anaeróbicas estrictas.





Figueroa, 2013

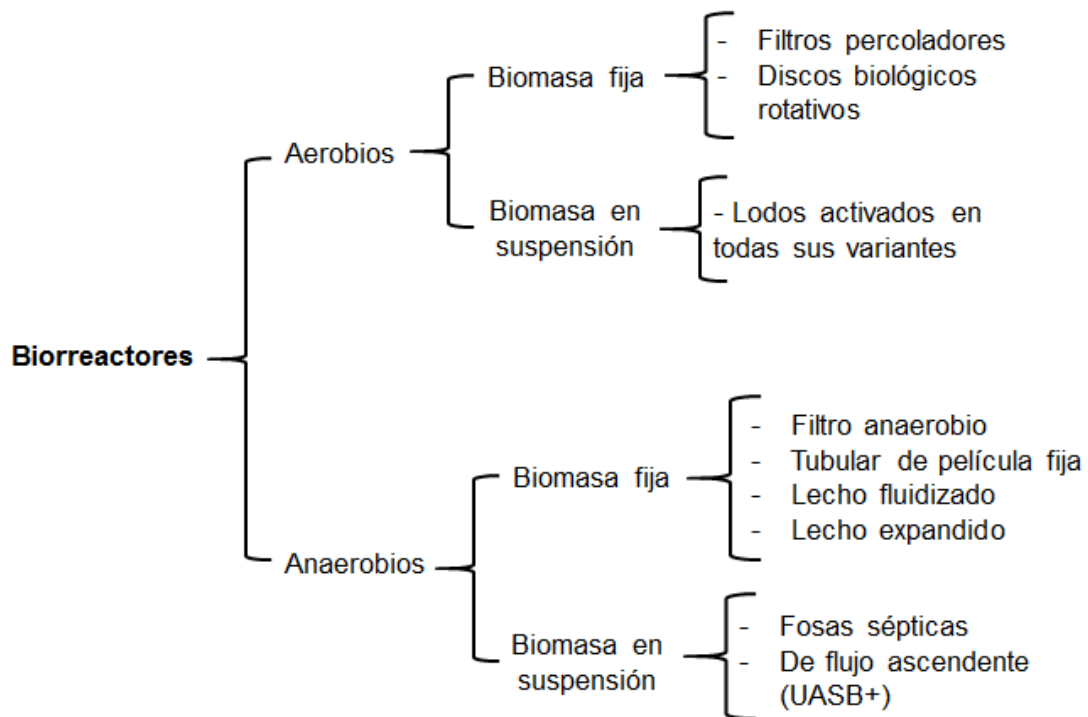
**Figura 3.** Etapas de la digestión anaerobio

El proceso de biosorción se puede llevar a cabo en un bioreactor, en donde se hace pasar el agua contaminada a lo largo de una cama de microorganismos que captan y concentran los metales. El objetivo de la biosorción es lograr que la concentración del metal a la salida del reactor disminuya considerablemente (niveles cercanos a cero, si es posible) con respecto a la concentración de entrada (Figueira *et al.*, 2000; Volesky, 2003).

### **II.3 Reactores**

Además de la vía metabólica de los microorganismos, los reactores biológicos se clasifican de acuerdo a la forma que adopta la población microbiana dentro del reactor. Pueden ser de biomasa fija o biomasa en suspensión. Los reactores de biomasa fija son aquellos que cuentan con un soporte para que se desarrollen los microorganismos, mientras que los reactores en suspensión no cuentan con un medio de soporte y los microorganismos forman flóculos.

Los reactores biológicos se clasifican de acuerdo a su requerimiento de oxígeno, en aerobios o anaerobios. Dentro de los aerobios están los lodos activados en todas sus variantes, filtros percoladores y discos biológicos rotativos. Y como parte de los anaerobios, el filtro anaerobio, el tubular de película fija, lecho fluidizado, lecho expandido, fosas sépticas y de flujo ascendente (UASB), como se puede observar en la Figura 4.



**Figura 4.** Clasificación de biorreactores

La Tabla V muestra algunas de las ventajas y desventajas que presentan los biorreactores a la hora de operar. Y según Figueroa (2013), entre los reactores anaerobios comúnmente utilizados e investigados se encuentran el reactor anaerobio de lecho de lodo de flujo ascendente (Upflow Anaerobic Packed Bed reactor, UASB), el reactor anaerobio de lecho fluidizado (Anaerobic Fluidized Bed reactor) y el reactor anaerobio de lecho empacado (Anaerobic Packed Bed reactor, APBR).

**Tabla V.** Ventajas y desventajas de los biorreactores

<b>Biorreactor</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Lodos activados en todas sus variantes	Instalación simple, bastante compacta y fácil de dirigir por su flexibilidad y costos de funcionamiento.	Requieren de mayor operación y existen muchas variantes.
Filtros percoladores	Procesos estables. No existen problemas de ruidos.	Sensibles a la temperatura ambiental y fenómenos atmosféricos. Tarda en alcanzar la estabilidad.
Discos biológicos rotativos	Requieren de una menor área de tratamiento.	
Filtro anaerobio	Destinados principalmente a la remoción de materia disuelta pero también materia suspendida.	No es posible la eliminación de nutrientes. Costos de inversión elevados.
Tubular de película fija		
Lecho fluidizado		
Lecho expandido	Generan efluentes con DBO alta.	
Fosas sépticas	Separadores de sólidos suspendidos.	No hay una interacción real entre biomasa activa y el agua residual, por lo que el porcentaje de remoción es bajo o nulo (Fosas sépticas).
Flujo ascendente (UASB+)	Sirve para la remoción de materia disuelta (UASB+).	

El proceso de la digestión anaerobia también puede ser aplicado de manera continua para el tratamiento de aguas residuales con alto contenido de compuestos orgánicos. Certucha (2009) llevó a cabo un estudio de biosorción de cobre en un reactor anaerobio de lecho de flujo ascendente (Upflow Anaerobic Sludge Bed reactor, UASB), sin medio de soporte, logrando una alta remoción de cobre por medio de lodos metanogénicos.

La principal característica de un reactor UASB, además del flujo ascendente, es la formación de un manto de lodo floculento o granular con buena capacidad de sedimentación, en donde se realiza la actividad biológica. La granulación es un proceso que ha sido citado en pocas oportunidades durante el tratamiento de líquidos cloacales (Lorenzo y Obaya, 2006).

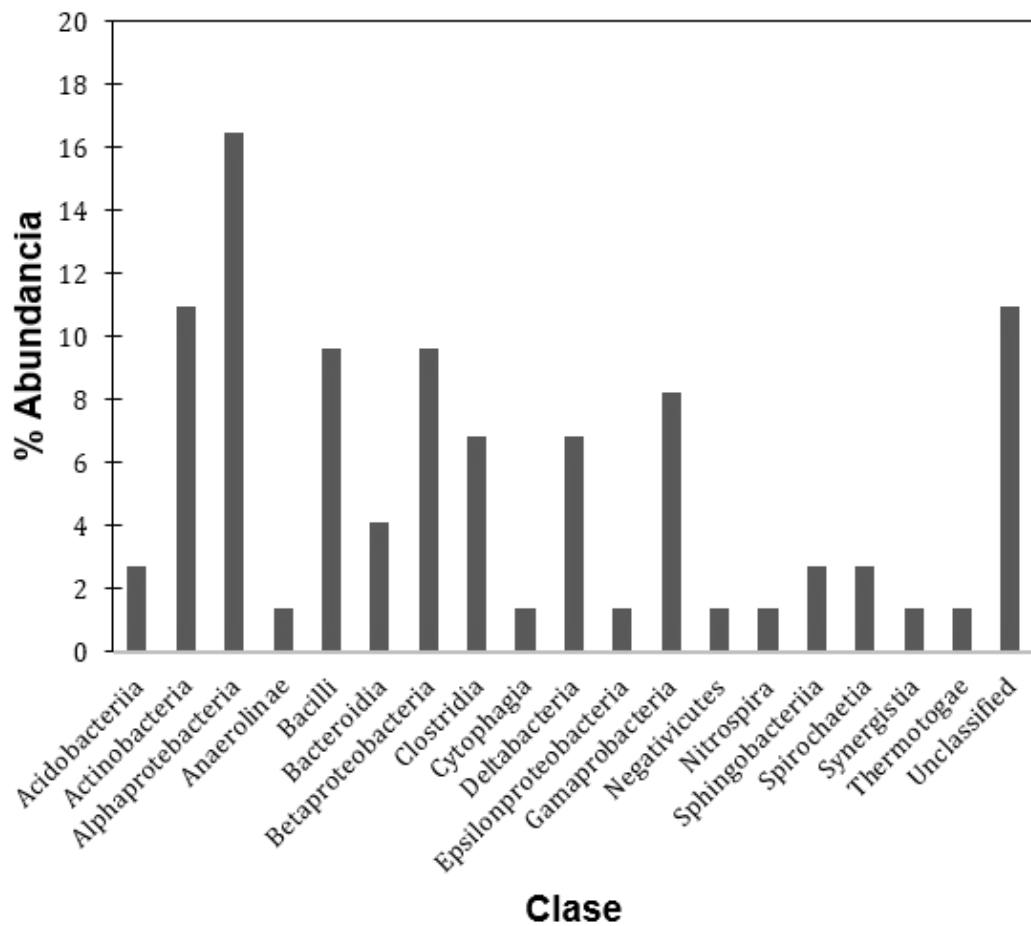
#### **II.4 Análisis de la Microbiota en la Biopelícula**

Estudios anteriores a este proyecto según Trillas *et al* (2017), con modificaciones del método de secuenciación tipo Sanger desarrollado por Rojas *et al.*, (2008), reveló que los grupos microbianos que se encontraron en mayor abundancia en la biopelícula al inicio de la experimentación fueron *Alphaproteobacteria* y *Actinobacteria*, seguido de *Firmicutes*, *Betaproteobacteria* y *Gammaprobacteria* (ver Figura 5).

Las *Alphaproteobacteria* son uno de los principales grupos de bacterias que incluyen una gran variedad de patógenos, tales como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*, *Neisseria gonorrhoeae* y muchos otros. Se clasifican en proteobacterias de tipo alfa, beta, gamma, delta y épsilon. Otras son de vida libre, e incluyen muchas de las bacterias responsables de la fijación del nitrógeno. Todas las proteobacterias son Gram negativas, con una pared celular formada principalmente de lipopolisacáridos, su morfología es muy variable, desde bacilos, hasta cocos simples. Muchas se mueven utilizando flagelos, pero algunas lo pueden hacer por deslizamiento bacteriano. Entre estas se encuentran las *Mixobacterias*, un grupo único de bacterias que pueden agruparse para formar cuerpos fructíferos.

Tienen también una gran variedad de tipos de metabolismo. La mayoría de las proteobacterias son aerobias, pero hay muchas excepciones. Las mitocondrias que permiten respirar a las células eucariotas se derivan de proteobacterias, probablemente similares a las *Rickettsias* (Madigan y Martinko, 2005).

Por otra parte, el filo *Actinobacteria* es un grupo de bacterias de distribución mundial y muy abundantes en suelos, sobre o dentro de los animales, en ambientes acuáticos dulceacuícolas y marinos y en prácticamente cualquier superficie natural. Son bacterias gram-positivas, con un alto contenido de guanina y citosina en su ADN y con algunas especies capaces de producir esporas externas. Juegan un importante papel en el reciclaje de la materia orgánica del suelo, ya que pueden descomponer gran cantidad de moléculas orgánicas, como la quitina y la celulosa, favoreciendo la formación de *humus* y enriquecimiento mineral del suelo. Algunas especies viven en simbiosis con los animales, ya sea en sus intestinos o en su superficie, mientras que otras especies son patógenas, algunas causantes de importantes enfermedades humanas. Mientras que la mayoría de especies forman células más o menos redondeadas, algunas forman células ramificadas que parecen micelios de hongos.



**Figura 5.** Análisis de la microbiota en la biopelícula formada en el reactor de estudio a partir de lodo proveniente de planta de tratamiento de aguas residuales de la industria cervecera mediante secuenciación tipo Sanger.

### III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### III.1 Diagrama Experimental

En la Figura 6 se presenta el diagrama general de la experimentación, la cual se realizó en dos etapas. La primera fue el control y mantenimiento del biorreactor (UASB modificado) durante su operación y la segunda etapa consistió en la evaluación de muestras, determinación de la concentración de níquel en el efluente, análisis de MEB y EDS de la zeolita con la biopelícula.

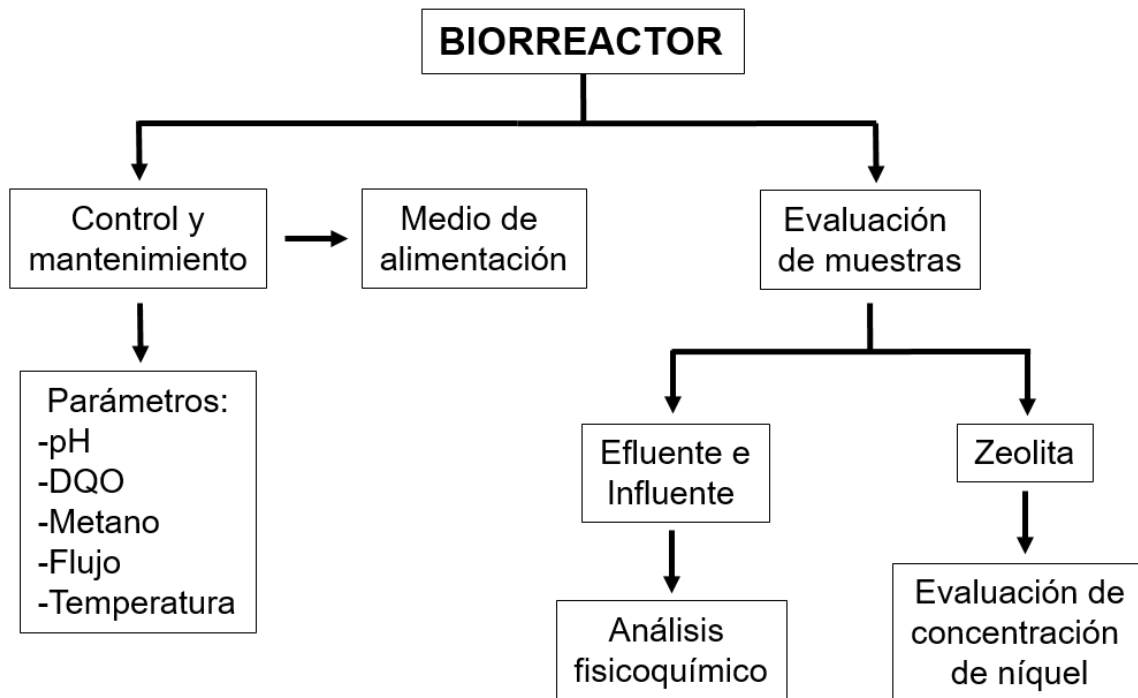


Figura 6. Diagrama experimental



### III.2 Operación del Reactor Anaerobio

Se utilizó un biorreactor anaerobio de flujo ascendente tipo UASB con empaque (ver Figura 7), construido en material acrílico con dimensiones de 50 cm de altura, 7 cm de diámetro y un volumen de operación de 2 L, el cual fue empacado con un 1.05 kg de zeolita. El biorreactor fue inoculado con 300 mL de lodos anaerobios previamente aclimatados y se mantuvo a una temperatura de 30°C con un TRH de 24 horas con volumen de 1.3 L.

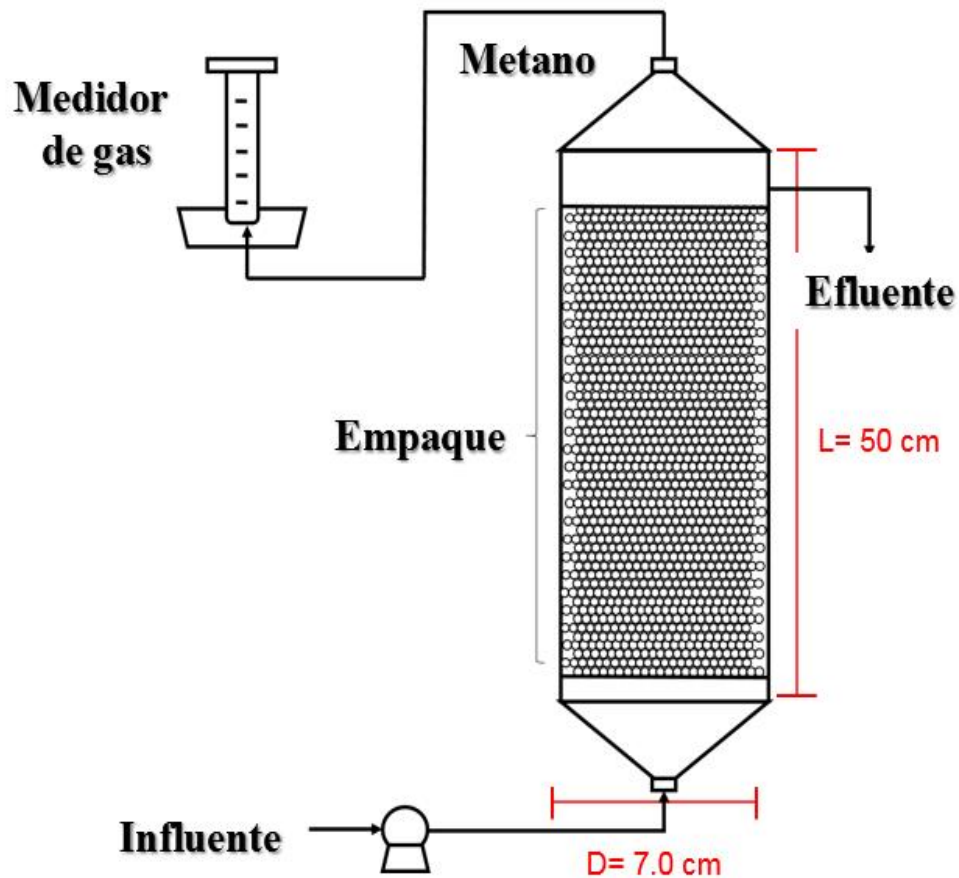


Figura 7. Esquema de instalación de reactor

### III.2.1 Alimentación

El influente utilizado como alimentación fue agua contaminada con níquel proveniente de la industria de platinado, con una concentración de 1700 ppm, se ajustó a una concentración inicial de 250 ppm y posteriormente 500 ppm de níquel empleando medio de cultivo como diluyente. El medio de cultivo se preparó de acuerdo a la Tabla VI (Certucha, 2009).

**Tabla VI.** Preparación de medio de cultivo

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad/L</b>
$NH_4Cl$	1.044 g
HCl	0.544 g
$MgSO_4 * 7H_2O$	0.370 g
$KH_2PO_4$	0.340 g
$CaCl_2 * 2H_2O$	0.02 g
Extracto de levadura	0.10 g
Elementos traza	1 mL
Dextrosa	1.5 g
$NaHCO_3$	2 g

### III.3 Análisis Físicoquímico de Influentes y Efluentes

Se tomaron muestras diarias tanto del influente como del efluente del biorreactor para la determinación de DQO, % de remoción de níquel, mediante la determinación de la concentración de níquel en el efluente por absorción atómica, producción de metano, alcalinidad y pH de las muestras.

#### III.3.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La DQO se determinó de acuerdo al procedimiento establecido en los métodos estándares (APHA, 1995). Para ello se tomaron 2 mL de la muestra de de la salida y entrada del biorreactor y se pusieron en contacto con 1 mL de solución digestora ( $K_2Cr_2O_7$ ) y 2 mL de ácido sulfúrico con sulfato de plata. Los tubos se homogenizaron con ayuda de un Vórtex y finalmente se colocaron en un digestor Hach DRB-200 a 150 °C durante 2 horas. Los tubos se dejaron enfriar y posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm en un colorímetro Hach DR/890.

#### III.3.2 Producción de Metano

La actividad metanogénica específica ( $AME = gDQO_{CH_4}/gSSV \cdot L \cdot d$ ) es una medida indirecta del desempeño de las bacterias que están presentes en la digestión anaerobia y determina la carga orgánica máxima que puede aplicarse en un sistema. Se utilizó hidróxido de sodio (NaOH) al 3% para cuantificar el volumen desplazado por el metano, el cual se midió en una columna de 4.45 cm de diámetro con una altura de 25 cm. La determinación del volumen del gas producido se realizó mediante la Ec. (1) (Trillas *et al.*, 2017):

$$\text{Producción de metano} \left( \frac{mL}{d} \right) = \frac{Ar * h}{t} \quad (1)$$

Donde

$$Ar = \text{área seccional de la columna (cm}^2\text{)} = \frac{\pi \phi^2}{4}$$

$\phi$  = diámetro de la columna (cm)

h = altura desplazada en la columna (cm)

t = tiempo (días)

### III.3.3 Alcalinidad

Para medir la capacidad de amortiguamiento del sistema se utiliza la relación de alcalinidad ( $\alpha$ ). Con el fin de medir indirectamente los ácidos grasos volátiles (AGV's) y bicarbonato, para indicar una alcalinización eficiente, la estimación de la relación debe mantenerse entre 0.5-0.7. Con una solución 0.2 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se titularon 25 mL de muestra del efluente del reactor hasta llegar a un pH de 5.75, en este punto se titulan 80% de los carbonatos. Para conocer el promedio de los AGV's se continúa la titulación a un pH de 4.3. Los volúmenes gastados se registran, calculándose la relación de alcalinidad de acuerdo a la Ec. (2):

$$\alpha = \frac{\text{Alcalinidad } (HCO_3)_{5.74}}{\text{Alcalinidad } (AGV's)_{4.3}} \quad (2)$$

Dónde:

*Alcalinidad* (HCO<sub>3</sub>)<sub>5.74</sub> = mL de ácido consumido para llevar el pH original a 5.75

*Alcalinidad* (AGV's)<sub>4.3</sub> = mL de ácido consumido para llevar el pH original a 4.3.

### III.3.4 Potencial Hidrógeno (pH)

Se registró diariamente el pH del influente y efluente, utilizando un potenciómetro Accumet Excel CL94001428 (Fischer Scientific) con un electrodo Cole Parmer, con la finalidad de controlar la estabilidad y el mantenimiento del reactor.

### III.4 Sólidos

El análisis de sólidos consistió en la determinación de los sólidos totales (ST), sólidos fijos (SF) y sólidos suspendidos volátiles (SSV), tomando por triplicado muestras de la parte media, baja y alta del biorreactor. El procedimiento se realizó de acuerdo a lo establecido en los métodos estándares (APHA, 1995) y para esto se utilizaron crisoles, los cuales fueron lavados perfectamente para después colocarse en una mufla a una temperatura de 550 °C durante 30 min. Se dejaron enfriar en un desecador y después fueron pesados hasta obtener un peso constante. El peso se registró como “peso del crisol”. Posteriormente, se colocaron 5 g de lodo metanogénico con zeolita (“peso de la muestra”) en los crisoles y se introdujeron en una estufa a una temperatura de 105 °C – 110 °C por 24 horas. Al cabo de este tiempo los crisoles se dejaron enfriar en el desecador y se pesaron nuevamente, registrando este peso como “peso seco a 110° C”. Finalmente, los residuos se calcinaron en la mufla a 550 °C durante 2 horas, se dejaron enfriar antes de pesarlos y el valor se registró como “peso seco a 550°C”. Al finalizar el procedimiento se calcularon los sólidos totales, fijos y volátiles de acuerdo a la Ec. (3), Ec. (4) y Ec. (5).

$$\text{Sólidos Totales } (g/g) = \frac{\text{Peso seco a } 110^{\circ}\text{C} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso de la muestra}} \quad (3)$$

$$\text{Sólidos Fijos } (g/g) = \frac{\text{Peso seco a } 550^{\circ}\text{C} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso de la muestra}} \quad (4)$$

$$\text{Sólidos Suspendidos Volátiles } (g/g) = \text{Sólidos Totales} - \text{Sólidos Fijos} \quad (5)$$

### **III.5 Evaluación de la Concentración de Níquel en la Zeolita**

La zeolita empleada como soporte será caracterizada por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB), para observar la morfología de materiales sólidos de todo tipo y por espectroscopia de dispersión de energía (EDS) para determinar qué tipo de compuestos forman los elementos que contiene la muestra.

#### **III.5.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopia de Dispersión de Energía (EDS).**

Para el análisis por MEB y EDS se tomó una muestra de biomasa metanogénica antes y después del proceso de biosorción. A las muestras se les dio un tratamiento para su análisis de acuerdo a la técnica reportada por Certucha (2009), el cual consistió en la fijación de las muestras por inmersión en glutaraldehído al 5% (v/v) durante 24 horas a 4°C, seguido por una post-fijación en solución de tetróxido de osmio 1% (w/v) durante 2 horas a 4°C. Las muestras se deshidrataron mediante una serie de soluciones de acetona (30, 40, 50, 70, 80, 90 y 100%) cada disolución se añadió por duplicado con un tiempo de reposo de 15 minutos, a excepción de la acetona absoluta, la cual tuvo un tiempo de reposo de 20 minutos. La muestra se recubrió con oro antes de la observación en el microscopio electrónico de barrido PEMTRON SS 300 + EDS BROKER (ver Figura 8).



**Figura 8.** Microscopio electrónico de barrido

### **III.6 Absorción Atómica (AA)**

Por medio de técnicas de absorción atómica se determinó la concentración de níquel en las muestras. Debido a la curva de calibración del equipo para el metal contenido en las muestras, fue necesario hacer diluciones de cada uno de los influentes; en un matraz aforado de 100 mL se agregaron 2 mL de muestra y 2 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), se homogenizo perfectamente y se tomaron 25 mL necesarios para llevar a cabo la lectura en AAnalyst 400.

## **III.7 Análisis de la Microbiota en la Biopelícula**

### **III.7.1 Extracción de ADN**

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la microbiota en la biopelícula se realizó la extracción del material genético (ADN). Para ello una vez finalizado el tratamiento a 500 ppm se procedió a abrir el biorreactor y se tomaron muestras de la biopelícula en diferentes puntos del biorreactor; entrada, base, medio, pared y salida (ver figura 21), cada una por triplicado, para su posterior almacenamiento en tubos falcón de 50 ml los cuales fueron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

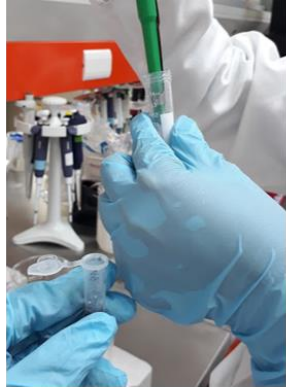
Para realizar la extracción del ADN de la microbiota adherida a la zeolita, se trabajó en el laboratorio de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Para ello, se utilizó un kit comercial de extracción de ADN de la marca FastDNA SPIN Kit for Soil de la casa comercial MPBIO siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Durante la desinstalación del biorreactor se tomaron muestras de la biomasa junto con zeolita en tres puntos, parte baja (entrada), media y alta (salida) del biorreactor, cada una por triplicado. Se utilizaron 250 mg de cada muestra los cuales se colocaron en un tubo Lysing Matrix E, se añadieron 978  $\mu\text{L}$  de buffer de Fosfato de Sodio y 122  $\mu\text{L}$  de buffer MT. Se homogenizó la muestra utilizando el instrumento FastPrep durante 40 segundos a una velocidad de 6.0 por duplicado con el fin de llevar a cabo una lisis mecánica completa (Figura 9).

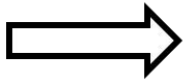
Posteriormente, los tubos del procedimiento anterior fueron centrifugados a  $14000 \times g$  durante 15 minutos para sedimentar los residuos y debris de las muestras y el sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf de 2.0 ml al cual se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de PPS (solución de precipitación de proteínas), mezclando por inversión 10 veces, con ello se provocó la precipitación de las proteínas presentes en la muestra. Seguidamente, se centrifugó a  $14000 \times g$  durante 5 minutos para precipitar los gránulos de proteínas y el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio de 15 ml en el que, previamente resuspendida la



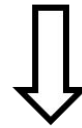
solución de Binding Matrix se añadió 1.0 ml de esta y el sobrenadante del paso anterior. Los tubos fueron colocados en un rotador durante 3 minutos para permitir la unión del ADN de las muestras a la Binding Matrix. Posterior a los 3 minutos, los tubos fueron colocados en una gradilla durante 3 minutos para permitir la sedimentación de la matriz de sílice, se eliminaron y desecharon los primeros 500  $\mu$ L del sobrenadante y suavemente se resuspendió la solución para ser transferida en porciones de aproximadamente 600  $\mu$ L a un Spin Filter provisto por el kit para ser posteriormente centrifugado a 14000 x *g* durante 1 minuto. Se vació el tubo de captura se centrifugó de nuevo. Posteriormente, se añadieron 500  $\mu$ L de la solución SEWS-M que contenía etanol al 96% y se resuspendió suavemente el gránulo utilizando la fuerza del pipeteo para su centrifugación a 14000 x *g* durante 1 minuto. Sin ninguna adición de líquido, se centrifugó una segunda vez a 14000 x *g* durante 2 minutos para "secar" la matriz de solución de lavado residual. Se desechó el tubo de retención y se cambió por un tubo nuevo y limpio. Finalmente, se añadieron 80  $\mu$ L de DES (DNasa /Pyrogen-Free Water) para que, mediante un cambio de pH, el material genético adsorbido en el filtro se desprendiera y se sometió a un baño de 55°C por 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 14000 x *g* durante 1 minuto para llevar el ADN eluido al tubo de captura limpio. El ADN extraído fue evaluado mediante la cuantificación de la concentración obtenida por medio de nanodrop. Para evaluar la integridad del ADN extraído, los productos de extracción se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) (agarosa LE SeakemR Cam Brex Bio), utilizando un fotodocumentador Gel Doc XR+ (BIO RAD, Alemania). Posterior a esto, el material genético fue almacenado a -20° C hasta su procesamiento para secuenciación masiva.



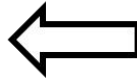
**Muestra de biopelícula**



**Buffer Lysing Matrix E.  
FastPrep.**



**Rotador**

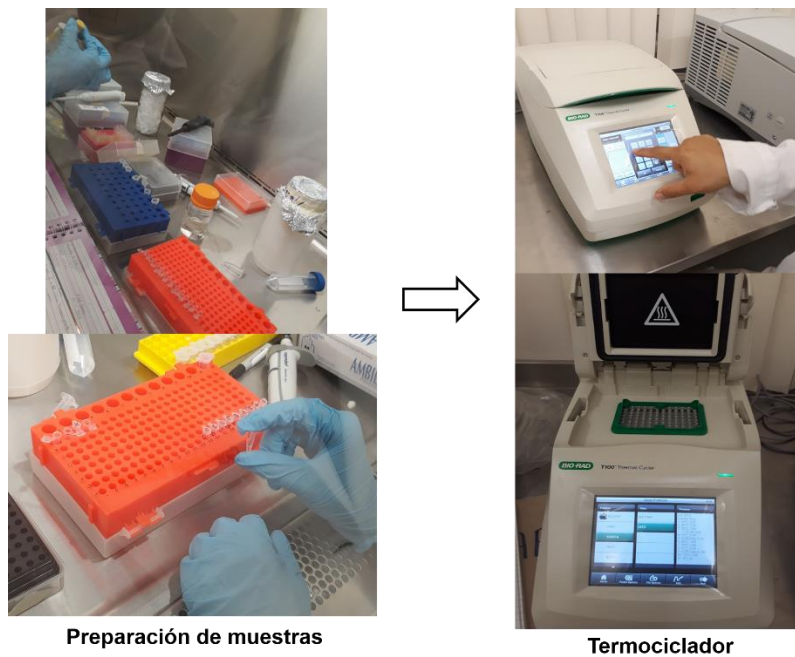


**Centrifuga**

**Figura 9. Metodología empleada para la extracción de ADN**

### **III.7.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

El ADN extraído se amplificó usando los cebadores o “primers” 341F y 534R, cuya secuencia se muestra en la Tabla VII. Un fragmento de aproximadamente 243 pb se obtuvo de la región V1-V3 del gen 16S rRNA. Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50  $\mu$ L conteniendo aproximadamente 2.5 ng de ADN molde, 1  $\mu$ L de la mezcla 10mM de dNTPs, 5  $\mu$ L de tampón de PCR (10x) y 4  $\mu$ L de  $MgCl_2$  25mM (Thermo Scientific, USA). A la mezcla de reacción se añadieron 0.2  $\mu$ L de cada cebador a 100  $\mu$ M y 0.4  $\mu$ L de Maxima Hot StartTaq DNA polimerasa (5u  $\mu$ L-1) (Thermo Scientific, USA). La amplificación mediante PCR se llevó a cabo en un termociclador T100 Thermal Cycler (BIO RAD, Alemania) (ver Figura 10). La amplificación se realizó mediante el siguiente protocolo: 95°C por 5 minutos, 10 ciclos de 94°C por un minuto y 65°C por 1 minuto bajando 1°C cada dos ciclos, hasta llegar a 55°C, después 72°C por 2 minutos y 20 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por un minuto y 72°C por 2 minutos y para finalizar un ciclo adicional a 72°C por 10 minutos y se mantuvo a 4°C hasta infinito.



**Figura 10.** Termociclador empleado para la reacción en cadena de la polimerasa

**Tabla VII.** Cebadores empleados para la generación de librerías por secuenciación masiva

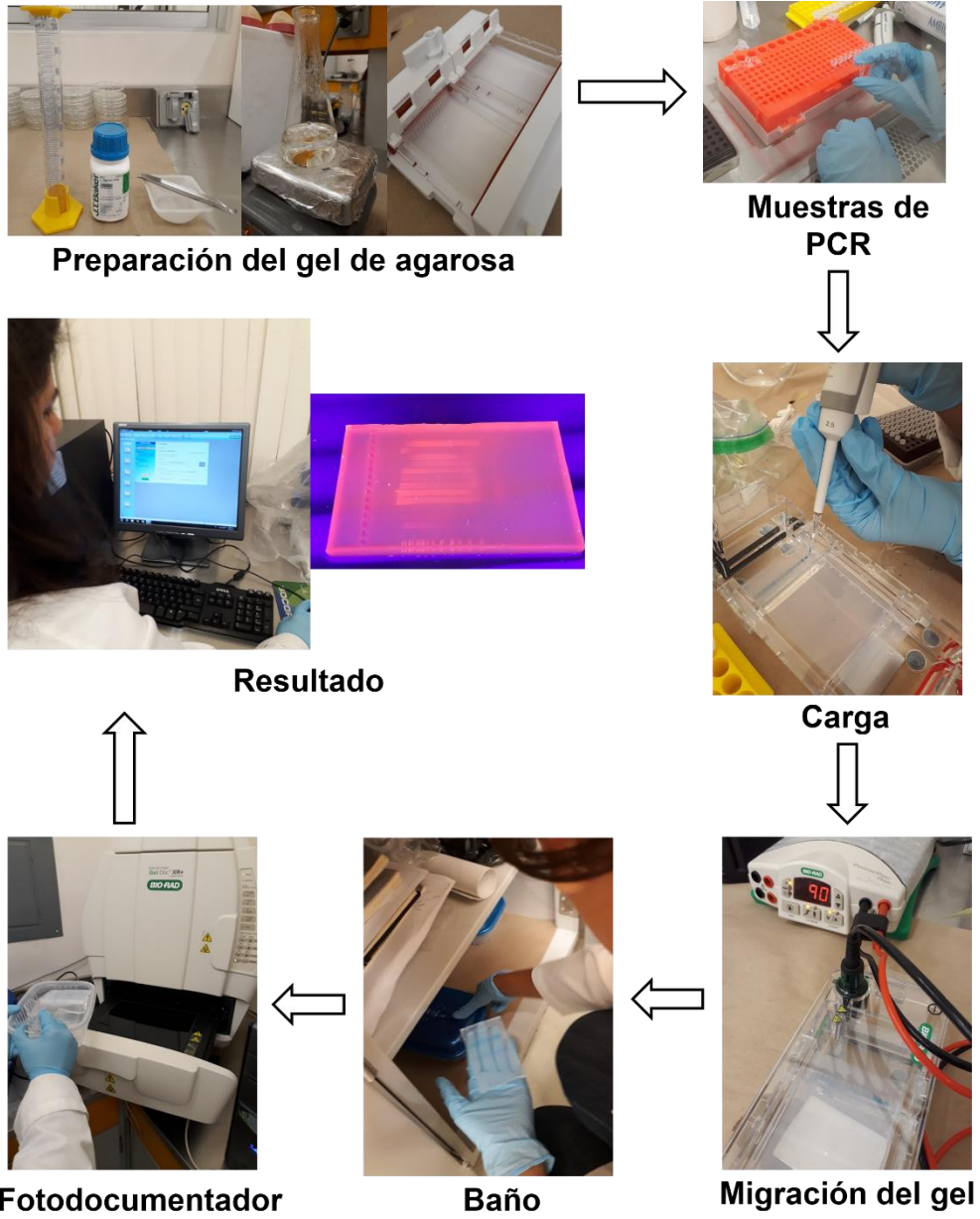
Nombre	Secuencia 5´- 3´	Referencia
341F	5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´	Weisburg, 1991
534R	5´-AAGGAGGTGATCCAGCC-3´	

En la etapa inicial del experimento, al ser inoculado el reactor con lodo proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la industria cervecera Corona, ubicada en Ciudad Obregón, Sonora., se realizaron análisis de secuenciación tipo Sanger. En el método de Sanger (1977), la estrategia es hacer cuatro reacciones diferentes de síntesis de ADN, utilizando un ddNTP distinto en cada tubo. Con la mezcla del nucleótido normal (dNTP) y su 2' terminador (ddNTP), se pueden generar fragmentos complementarios de diferentes tamaños que terminan en el mismo nucleótido. Después, estos fragmentos se pueden separar en un gel de electroforesis con cuatro carriles distintos, para determinar la secuencia del templado.

### **III.7.3 Electroforesis en gel de agarosa**

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) (agarosa LE SeakemR Cam Brex Bio).

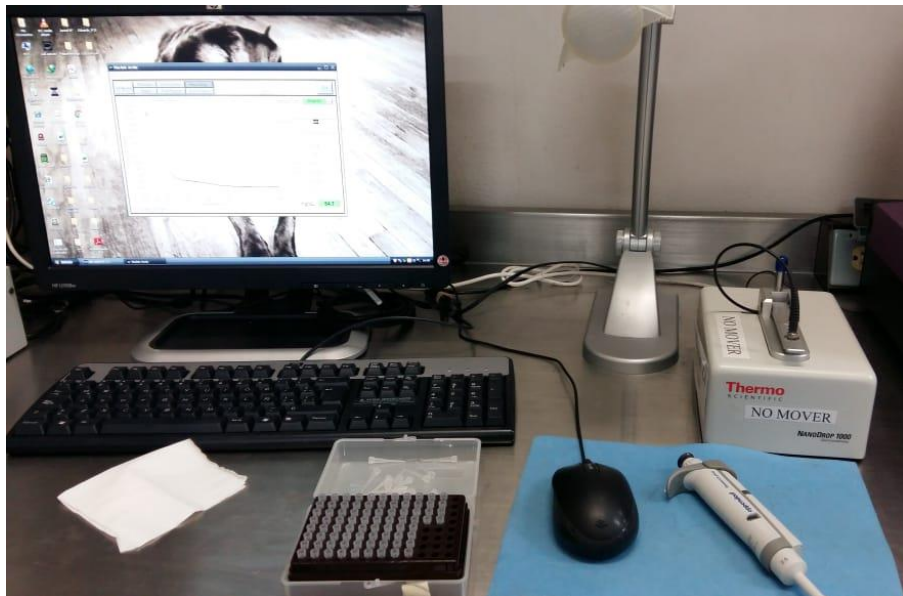
El gel se preparó utilizando agarosa al 2 % (p/v) y TAE 1X. Enseguida se corrió a 90 V durante 60 minutos a temperatura ambiente en amortiguador TAE 1X. Posteriormente, el gel se reveló con bromuro de etidio y luego se observó utilizando un fotodocumentador Gel Doc XR+ (BIO RAD, Alemania) (ver Figura 11). Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Biorremediación II de la Universidad de Sonora, en la Ciudad de Hermosillo, Sonora.



**Figura 11. Metodología de Electroforesis**

### III.7.4 Secuenciación Masiva Ilumina

El material genético extraído (ADN) fue evaluado para su calidad y cantidad mediante espectrofotometría por Nanodrop de la misma manera que reportó Calderón *et al.*, 2012 (Figura 12). Posteriormente las muestras fueron enviadas a la Universidad de Magdeburg, Alemania para su análisis por medio de la plataforma Ilumina MiSeq en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Ramiro Vílchez-Vargas. Siguiendo el protocolo descrito por Szafranski *et al.*, 2015.



**Figura 12.** Espectrofotometría por Nanodrop



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1 Análisis Físicoquímico de Influentes y Efluentes.

#### IV.1.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

En la Figura 13, se presenta la DQO de entrada ( $1.6 \pm 0.22$  gDQO/L) y salida en el biorreactor. Se puede observar que el reactor presentó valores de remoción promedio cercanos al 52% de eficiencia durante el tratamiento que contenían 250 ppm de níquel, mientras que al aumentar a 500 ppm el porcentaje de remoción promedio disminuyó a valores cercanos al 45%. Los bajos porcentajes de remoción muestran que la biomasa no degradaba por completo la materia orgánica, es decir, no permite que exista una producción de metano, por lo tanto, la digestión anaerobia solo se lleva a cabo en una etapa de acidogénesis, donde se produce ácidos grasos volátiles (AGV's). En condiciones óptimas de operación, el ácido acético y el  $H_2$  provenientes de organismos acidogénicos y acetogénicos son utilizados por microorganismos metanogénicos y convertidos a metano. Cuando existe una sobre carga de sustrato o hay presencia de elementos tóxicos, la actividad de las bacterias formadoras de metano disminuye y se presenta una disminución en la eliminación de materia orgánica (Lahav y Morgan, 2004).

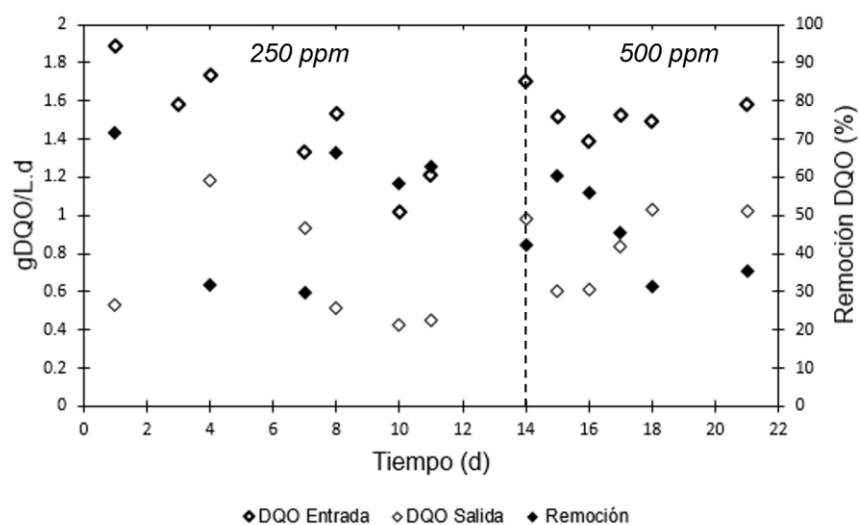


Figura 13. Remoción de DQO

#### IV.1.2 Producción de Metano

Ambos tratamientos (250 ppm y 500 ppm) demostraron una alta producción de metano de 200 mL/d aproximadamente (Figura 14), con una pequeña disminución al final del tratamiento a 500 ppm, lo cual representa una cantidad importante considerando la capacidad del biorreactor a escala de laboratorio. Un aspecto importante fue mantener el pH y la alcalinidad del sustrato en condiciones óptimas para evitar la inhibición del inóculo. Tomando en cuenta el metano teórico a partir de la DQO removida en ambas etapas (etapa I 378 mL/d y etapa II 327 mL/d) se obtuvo un 53% y 62% de recuperación de metano respectivamente.

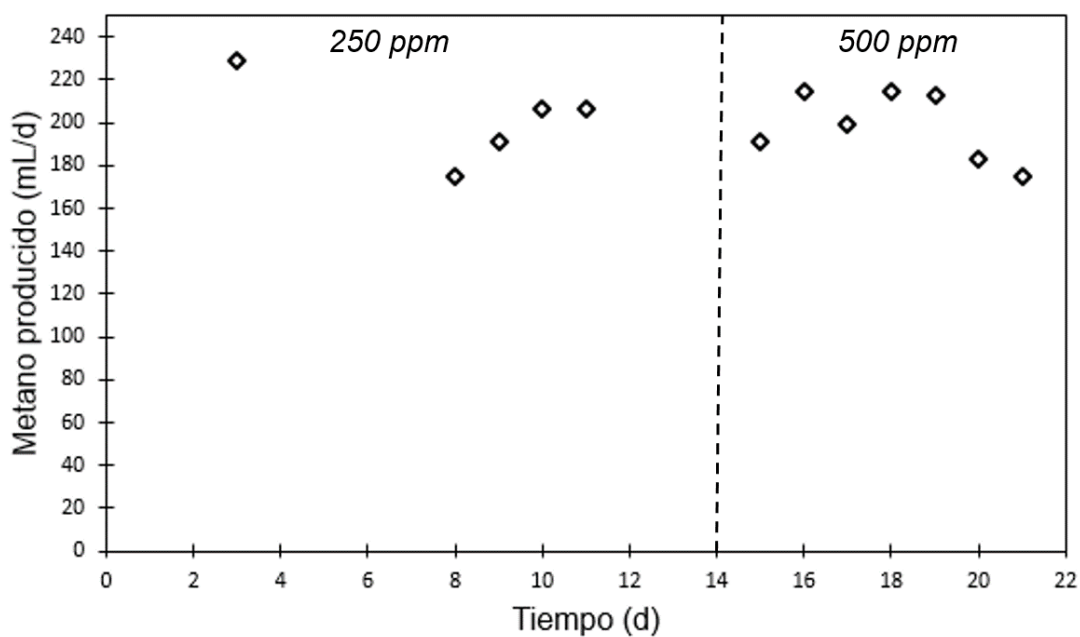
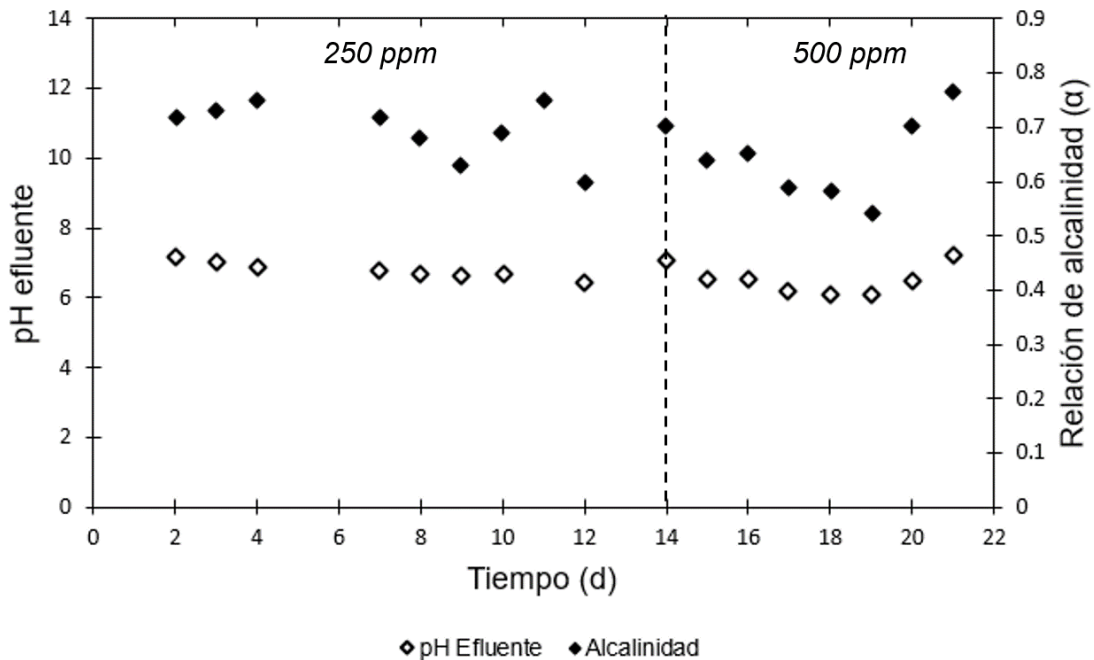


Figura 14. Producción de metano

### IV.1.3 Relación de Alcalinidad

El pH puede influir sobre la utilización de las fuentes de carbono, la asimilación del sustrato, la síntesis de proteínas y la liberación de productos metabólicos. El pH óptimo para el desarrollo de los microorganismos metanogénicos se encuentra dentro del rango 6.8-7.2, y su velocidad de crecimiento se ve afectada severamente a pH's por debajo de 6.6 (Parawira *et al.*, 2004). La relación de alcalinidad ( $\alpha$ ) es un parámetro de estabilidad en el proceso anaerobio. El sistema será más estable conforme al valor de  $\alpha$  sea cercano a uno (Áviles, 2012).

Los microorganismos que colonizaron la zeolita demostraron un rendimiento óptimo en un intervalo de pH de 6.4 a 7.0. Mientras que la alcalinización se mantuvo en un rango de 0.54 a 0.77 (Figura 15).



**Figura 15.** Relación de alcalinidad ( $\alpha$ ) y pH del efluente

#### IV.1.5 Sólidos

Los sólidos suspendidos volátiles son un parámetro importante ya que son una medida indirecta de la cantidad de biomasa presente. Al inicio de los estudios en continuo la cantidad de biomasa era de 0.02 g/g de zeolita (Trillas et al., 2017). Una vez sacrificado el biorreactor se tomaron muestras de la entrada, parte media y salida y se analizó la cantidad de biomasa inmovilizada por gramo de zeolita.

En la Tabla VIII se presentan las fracciones. Los sólidos suspendidos volátiles calculados en el reactor muestran que la cantidad de biomasa dentro del reactor aumentó y fue homogénea, lo que indica que las condiciones de operación utilizadas, en conjunto con el medio de alimentación, propician el desarrollo de los microorganismos.

**Tabla VIII.** Determinación de sólidos en el reactor

	Empaque de Biorreactor		
	Entrada	Medio	Salida
Sólitos totales (ST)*	0.6040 ± 0.0086	0.6906 ± 0.0077	0.7522 ± 0.0071
Sólidos fijos (SF)*	0.5536 ± 0.0092	0.6410 ± 0.0075	0.6988 ± 0.0081
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)*	0.0504 ± 0.0005	0.0496 ± 0.0002	0.0534 ± 0.0009

\*g/g lodo + zeolita

Figuroa (2013) realizó un estudio de biosorción de Cu y Fe, y su efecto sobre biomasa acidogénica inmovilizada en zeolita en sistema continuo y en lote. Para el sistema continuo utilizó un reactor anaerobio de lecho empacado, los resultados indicaron que el lodo inmovilizado en zeolita contenía 0.04375 g de biomasa (SSV) por cada gramo de muestra (lodo + clinoptilolita). También, García *et al.*, (1999) realizó un estudio con biomasa anaerobia en un reactor de lecho fijo con volumen de operación de 2 L ( $T= 55^{\circ}\text{C}$ ) utilizando un material poroso comercial (SIRAN) en forma de perlas de vidrio con un diámetro medio de 1.5-2 mm, obteniendo un valor de 0.0530 gSSV/g, el cual es similar al que se obtuvo en este trabajo.

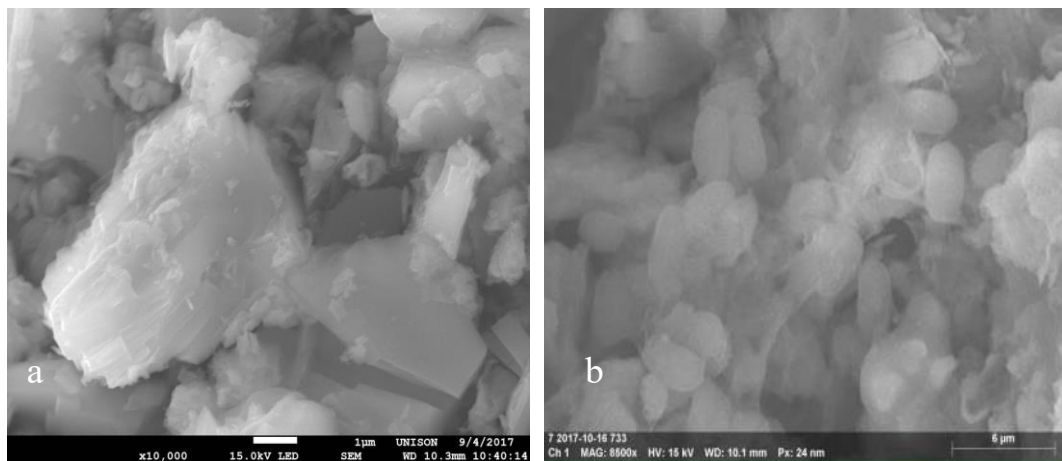
#### **IV.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopia de Dispersión de Energía (EDS).**

Los resultados obtenidos por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se presentan en la Figura 16, donde las micrografías corresponden a muestras de zeolita sin biomasa y zeolita con biomasa. En las muestras de zeolita sin biomasa, correspondientes al inicio de la experimentación, se aprecian estructuras cristalinas en la superficie, las cuales son propias de las zeolitas.

Las zeolitas son materiales porosos cuya estructura consiste en arreglos tridimensionales compuestos de tetraedros de  $\text{SiO}_4$  y  $\text{AlO}_4$ . Las características estructurales permiten que los reactores anaerobios retengan altas concentraciones de biomasa, logrando altas eficiencias y bajos tiempos de retención hidráulica (Malamis *et al.*, 2010; Montalvo *et al.*, 2012).

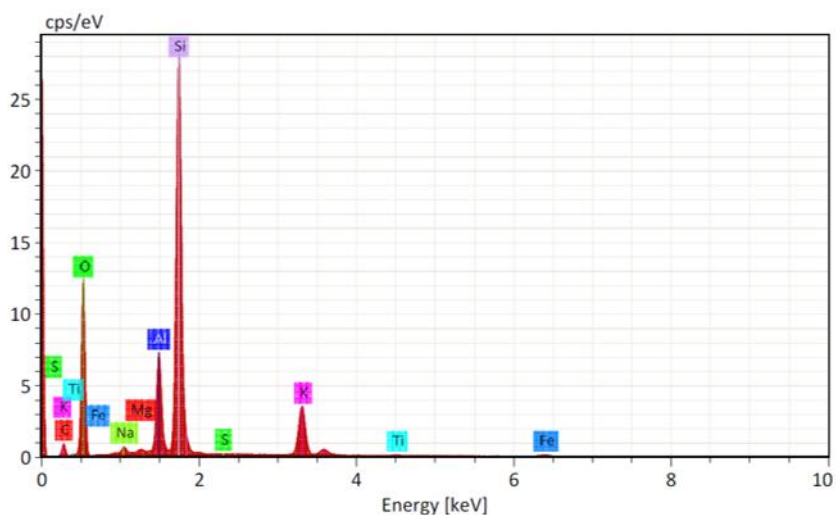
Como consecuencia de la inoculación del reactor con lodos anaerobios y la alimentación del medio, se puede observar el desarrollo de una biopelícula compuesta por bacterias y levaduras, además de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Esta biopelícula recubre la superficie de la zeolita y es en donde ocurre la inmovilización de los microorganismos dentro del biorreactor.

Las EPS son biopolímeros producidos durante el crecimiento de microorganismos eucariotes y procariotes ya sea en ambientes naturales o artificiales. Estos compuestos se localizan en el exterior de la membrana celular y están constituidas por una gran variedad de moléculas orgánicas de alto peso molecular como proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos y polisacáridos como componentes principales, que representan del 40 al 95 % de las EPS. Las EPS juegan un papel importante en la adhesión celular y en la formación de la biopelícula microbiana, pero también se ven involucradas en la captación de solutos disueltos como los metales pesados. La unión de cationes metálicos a estos biopolímeros celulares ocurre generalmente debido a la acción de interacciones electrostáticas con los grupos funcionales aniónicos presentes en las SPE como los ácidos urónicos (ácido glucurónico, galacturónico y manurónico), los grupos fosforilos asociados con la membrana celular y los grupos carboxílicos de los aminoácidos (Paul, 2008).



**Figura 166.** a) MEB de zeolita b) MEB biomasa más zeolita con 500 ppm  $\text{Ni}^{+2}$

El análisis de la composición de la zeolita (antes del tratamiento) se observa en la Figura 17, donde se muestra el EDS. Este indica los elementos que componen al mineral, tales como carbono, oxígeno, aluminio, silicio, potasio, sodio, hierro, magnesio, titanio y azufre, indicando que el elemento en mayor abundancia es el silicio, debido a que este mineral pertenece al grupo de los aluminosilicatos.

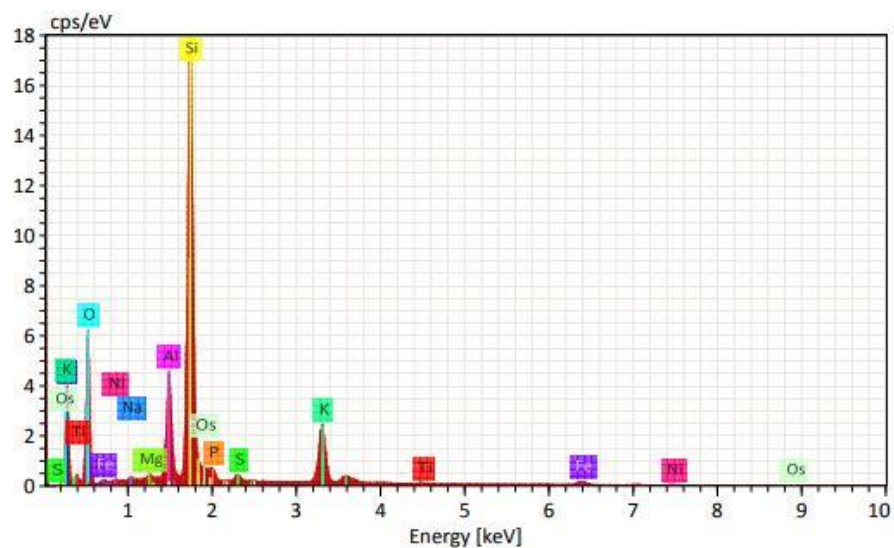


Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [%]	Atom [%]
Carbon	6	14556	10.65	9.99	15.78
Oxygen	8	219098	51.00	47.81	56.72
Aluminium	13	166821	7.85	7.36	5.18
Silicon	14	740854	28.55	26.76	18.08
Potassium	19	121701	6.65	6.23	3.03
Sodium	11	10362	0.91	0.86	0.71
Iron	26	4315	0.51	0.48	0.16
Magnesium	12	6313	0.37	0.34	0.27
Titanium	22	1680	0.14	0.13	0.05
Sulfur	16	690	0.04	0.03	0.02
		<b>Sum</b>	<b>106.67</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>

**Figura 17.** Análisis de EDS de la zeolita antes del tratamiento.

Después del tratamiento se realizó otro análisis de EDS de la zeolita. Este se observa en la Figura 18 e indica la presencia de níquel y otros elementos (fósforo y osmio) en pequeña cantidad. La pequeña cantidad (% masa) de níquel en la zeolita se debe a que el níquel se precipitó y no fue adsorbido por la zeolita, por lo que se puede afirmar que la zeolita es sólo material de soporte para la formación de la biopelícula.





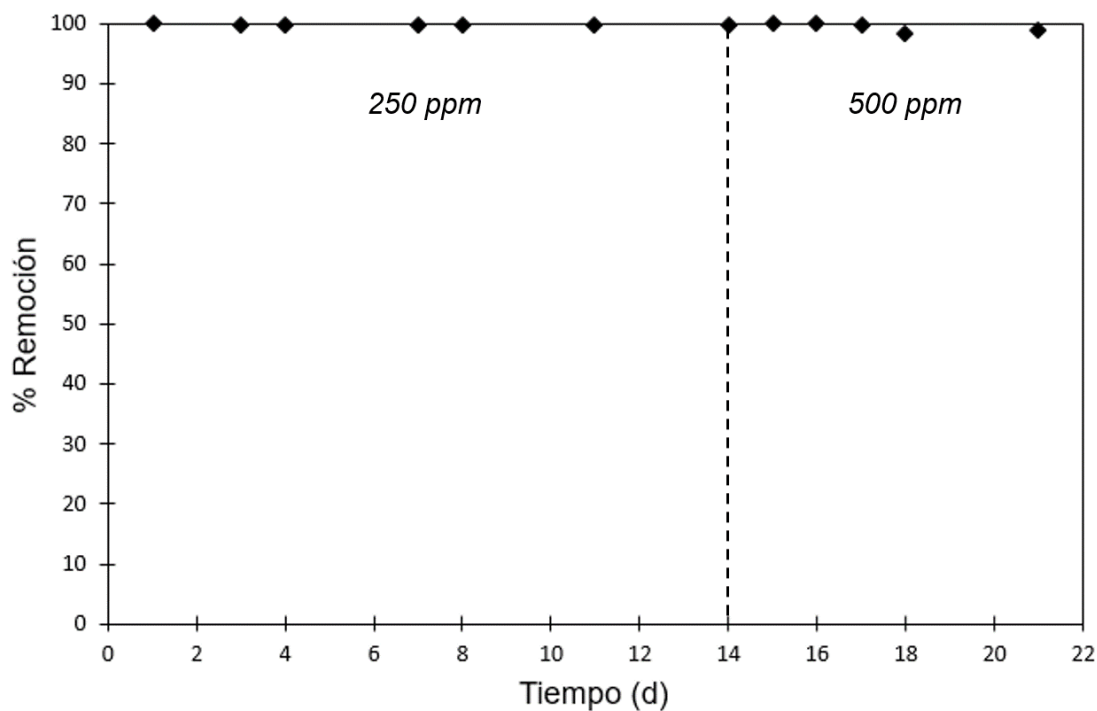
Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [%]	Atom [%]	abs. error [% (1 sigma)]	rel. error [% (1 sigma)]
Carbon	6	122375	30.23	31.38	45.69	3.39	11.23
Oxygen	8	208475	28.39	29.48	32.22	3.11	10.96
Aluminium	13	194776	4.89	5.08	3.29	0.25	5.15
Silicon	14	900962	22.76	23.62	14.71	0.97	4.26
Phosphorus	15	22636	0.72	0.74	0.42	0.05	7.39
Potassium	19	157982	5.63	5.85	2.62	0.20	3.51
Iron	26	11258	1.14	1.19	0.37	0.06	5.31
Magnesium	12	5423	0.15	0.16	0.11	0.03	22.02
Sodium	11	2198	0.08	0.09	0.07	0.03	36.86
Sulfur	16	13053	0.41	0.42	0.23	0.04	9.84
Titanium	22	1576	0.09	0.10	0.04	0.03	31.15
Osmium	76	25630	1.53	1.59	0.15	0.09	5.72
Nickel	28	2015	0.29	0.31	0.09	0.04	12.51
		<b>Sum</b>	<b>96.32</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>		

Figura 18. Análisis EDS de la zeolita después del tratamiento

### IV.3 Evaluación de la Concentración de Níquel en los Estudios en Continuo en la Zeolita

#### IV.3.1 Absorción Atómica (AA)

Por medio del análisis por absorción atómica del influente y efluente del biorreactor se observó el 99% de la eliminación de níquel, tanto en 250 ppm como 500 ppm de tratamiento (Figura 19). En este estudio solo fue alimentado níquel, pero en otro estudio que realizó Figueroa (2013) de biosorción de Cu y Fe con biomasa anaerobia en zeolita se encontró una eficiencia de remoción global del 51% de Cu (II) y Fe (II) durante los 25 días en que el reactor se alimentó con los metales.

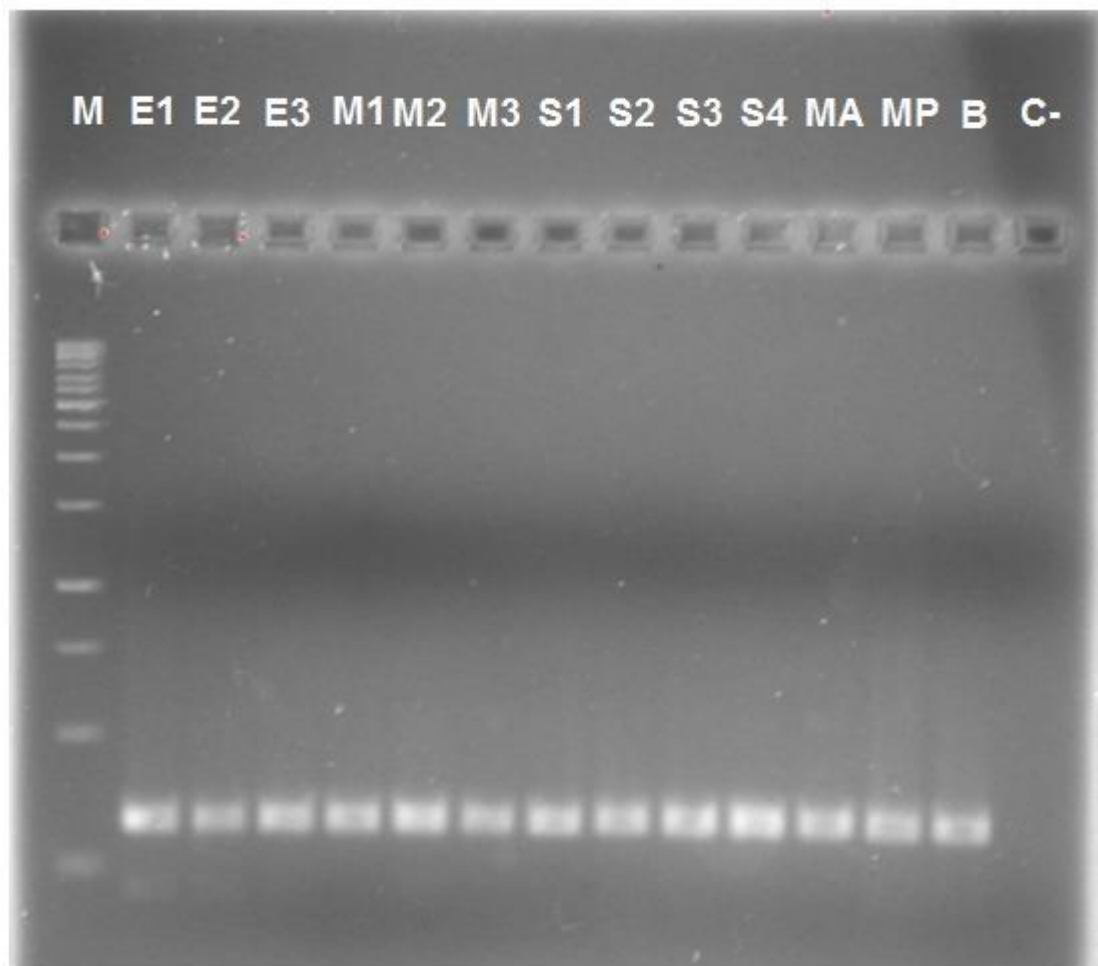


**Figura 19.** Eficiencia de remoción de níquel

#### IV.4 Análisis de la Microbiota en la Biopelícula

##### IV.4.I Electroforesis en gel de Agarosa y Cuantificación de ADN por Nanodrop

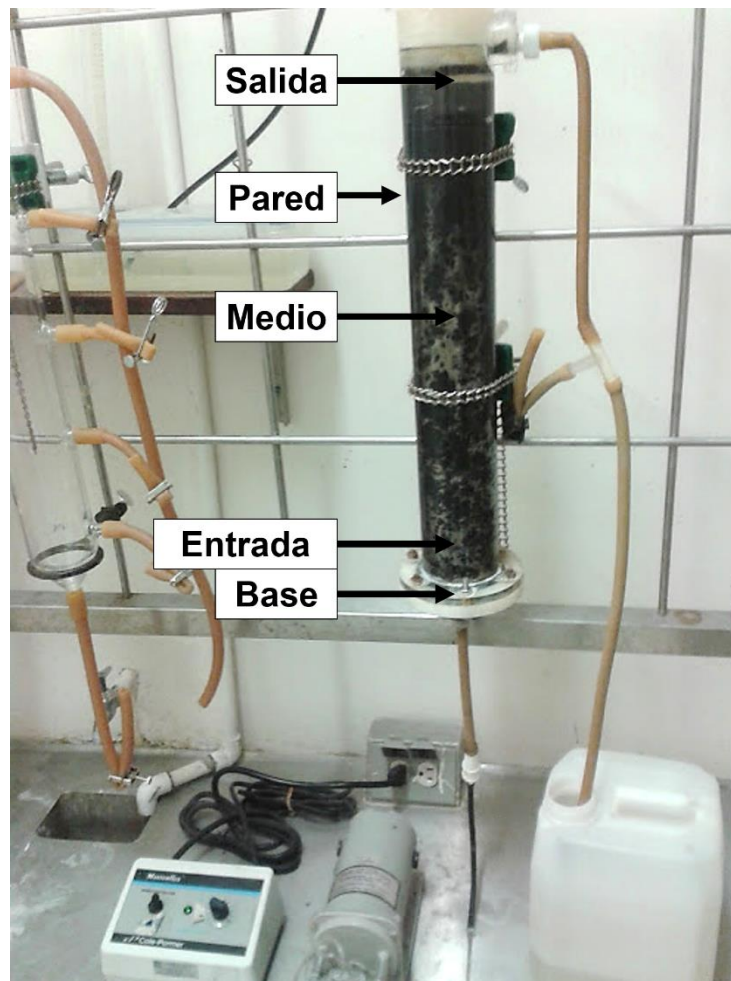
Se comprobó la extracción de ADN con electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 20).



**Figura 20.** Gel de agarosa

En el gel de agarosa se observa un carril con 15 pocillos, los cuales se cargaron en el siguiente orden: marcador (M), muestras de la zona de entrada por triplicado (E1, E2 y E3), muestras de la zona media por triplicado (M1, M2, M3), muestras

de la zona de salida por cuádruple (S1, S2, S3 y S4), muestra de la paredes de la zona media (MA y MP), muestra de la base (B) y control negativo (C-). Las zonas de muestreo del biorreactor se indican en la Figura 21.



**Figura 21.** Zonas de muestreo en el biorreactor

El análisis de espectrofotometría por Nanodrop permitió determinar la concentración y la pureza de las muestras de ADN basándose en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada.

La concentración de ADN se calcula teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm. Mientras que las relaciones de absorbancias A-260/280 y A-260/230 se utilizan para evaluar la pureza de las muestras.

De acuerdo a Pinto (2015), la relación A-260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A-260/280 > 1.6. Un valor A-260/280 < 1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Una relación A260/280 > 2.1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra. Por lo tanto podemos confirmar que nuestras muestras cumplen con los rangos de calidad para ser amplificadas y secuenciadas.

**Tabla IX.** Resultados de cuantificación de ADN por Nanodrop

<b>Muestra</b>	<b>ng/μL</b>	<b>A – 260/280</b>	<b>A – 260/230</b>
E1	352.3	1.88	0.54
E2	381.3	1.86	0.58
E3	115.4	1.83	0.20
M1	57.5	1.71	0.10
M2	156.2	1.81	0.28
M3	123	1.87	0.21
S1	15.5	1.75	0.03
S2	83.3	1.81	0.14
S3	50.2	1.71	0.09
N3.1	220.1	1.88	0.38
N3.2	220	1.85	0.36
B	374.1	1.90	0.90
MA	54.7	1.72	0.09
MP	277.1	1.85	0.49

En la Tabla IX se puede observar que en las muestras analizadas se encontró una buena cantidad y calidad de ADN, el cual se encuentra en los valores establecidos entre 1.8- 2.0 de pureza óptima.

#### **IV.4.3 Análisis Taxonómico de la Diversidad Microbiana Encontrada en el Biorreactor**

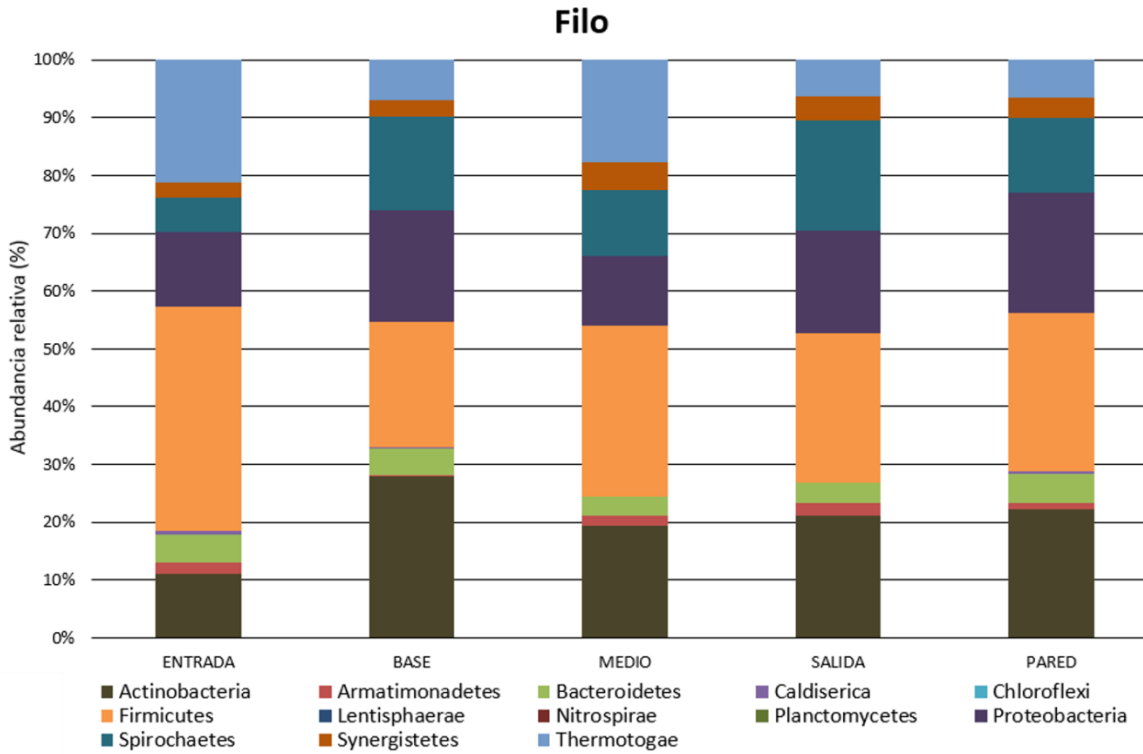
El hecho de que exista una gran variedad de microorganismos y que muchos de ellos hayan sido estudiados con poco detalle, abre la posibilidad de su estudio para su uso y beneficio en algún aspecto de tipo industrial.

Los microorganismos pertenecientes al filo *Actinobacteria* genéricamente conocidos como actinomicetos, destacan por su capacidad para producir importantes compuestos activos y diversas aplicaciones biotecnológicas (Soler, 2012). Según la Figura 22, las *Actinobacterias* en la entrada del reactor presentan una abundancia relativa al 11%, después en la base aumentan hasta el 28% y ese aumento continuo siendo mayor respecto a la entrada, en el medio, salida y pared del reactor pasando a un 19 y 22%.

Las *Firmicutes* son bacterias Gram positivas de bajo GC (contenido de guanina y citosina), característica que la diferencia de las bacterias de filo *Actinobacterias*. Se trata de un grupo muy diverso, ubicuos y especialmente relevantes en suelos y ambientes anaeróbicos (Arroyo, 2010). La abundancia relativa del filo *Firmicutes* es la mayor en todos los puntos del tratamiento, sin embargo, esta abundancia se reduce respecto de lo que entra con lo que sale (39 a 25%).

*Spirochaetes* constituye un filo muy homogéneo desde el punto de vista morfológico y de estructura celular, incluye tanto bacterias de vida libre en sedimentos y ambientes acuáticos como comensales y parásitos de animales (Rosselló y Antón, 2009). En investigaciones realizadas por Arroyo (2010) se identificaron *Spirochaetes* principalmente en sedimentos de laguna de sistemas de tratamiento de aguas urbanas. En el presente estudio se han identificado *Spirochaetes* (Figura 20), observando altos porcentajes de abundancia relativa

en todos los puntos, asociando a que tratamiento anaeróbico favorece el desarrollo de dichas bacterias.

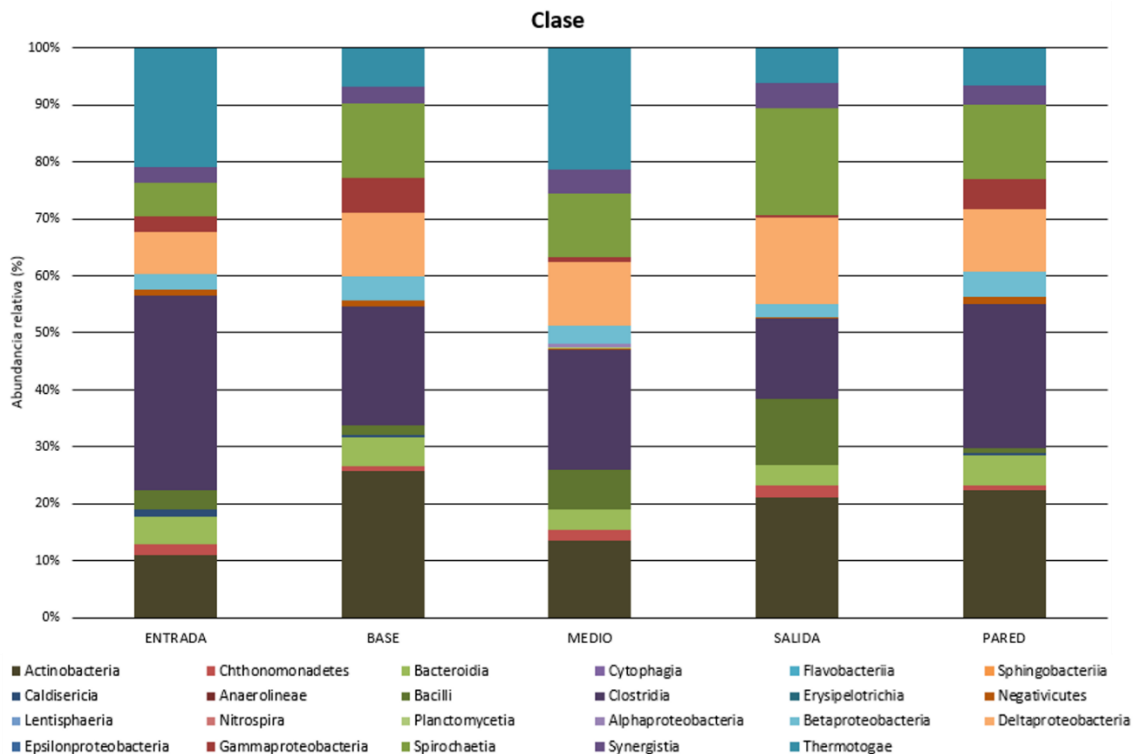


**Figura 222.** Abundancia relativa referente a los filos encontrados en las muestras.

Las clases *Bacilli* y *Clostridia* forman parte del filo *Firmicutes*, en trabajos realizados por Arroyo (2010), se han identificado bacterias únicamente afiliadas a las clases *Bacilli* en el tratamiento a pequeña escala de agua residual industrial, y *Clostridia*, que engloba bacterias anaerobias, las cuales fueron encontradas fundamentalmente en los sedimentos de la laguna a escala real para el tratamiento de agua residual urbana. En el presente estudio se observó una dinámica entre estas dos clases de bacterias, es decir en puntos donde el

porcentaje relativo de abundancia de la clase *Bacilli* aumentó, la presencia de *Clostridia* disminuyó (Figura 23).

Las *Gammaproteobacterias* constituyen la clase que más géneros y especies agrupa dentro del filo *Proteobacteria*. Dentro de esta clase se han identificado individuos quimiorganotrofos, en los que se incluyen principalmente bacterias anaerobias facultativas, implicadas en procesos fermentativos de la materia orgánica (Arroyo, 2010). Según la Figura 23, las *Gammaproteobacterias* aparecen en los puntos de entrada, base y pared, mientras que en la salida y medio son detectadas en mínimas cantidades.



**Figura 23.** Abundancia relativa referente a las clases encontradas en las muestras.



La abundancia mayor en género se refiere a *Clostridium*. Las cuales son bacterias anaerobias y se utilizan como un indicador microbiológico de la contaminación del agua. Son resistentes a la depuración habitual de aguas, por lo que su supervivencia en el agua es mayor (Domenech, 2003).

Por otra parte, *Pseudomonas* fueron detectadas en la salida del biorreactor, estas bacterias han demostrado su capacidad de formar biopelículas, además de metabolizar una variedad de diversos nutrientes y son así, capaces de sobrevivir en lugares inesperados (Borboa *et al.*, 2013).

La presencia de *Desulfovibrio* fue notoria durante todo el tratamiento, abundando en la pared, caso contrario de *Treponema*. Esto puede explicarse debido a que *Desulfovibrio* son bacterias estrictamente anaeróbicas y sulfato reductoras, participando en el tratamiento de aguas residuales debido a su alto poder reductor.

Nuestros resultados fueron comparados con los obtenidos por Trillas (2017), para tener un conocimiento de la variación de los grupos microbianos presentes al inicio y final de la biopelícula responsable de la remoción de níquel en el biorreactor. Al final del tratamiento, los grupos microbianos *Clostridium*, *Spirochaetae* y *Thermotogae* fueron los que prevalecieron, demostrando así su capacidad de subsistencia a la presencia del metal ( $\text{Ni}^{2+}$ ). Por el contrario, los grupos pertenecientes a *Nitrospira*, *Alphaproteobacteria* y *Epsilonproteobacteria* no sobrevivieron hasta una concentración de 500 ppm del metal. Esto refleja la capacidad que tienen ciertos grupos microbianos para su adaptación y metabolismo ante metales pesados como el Níquel.

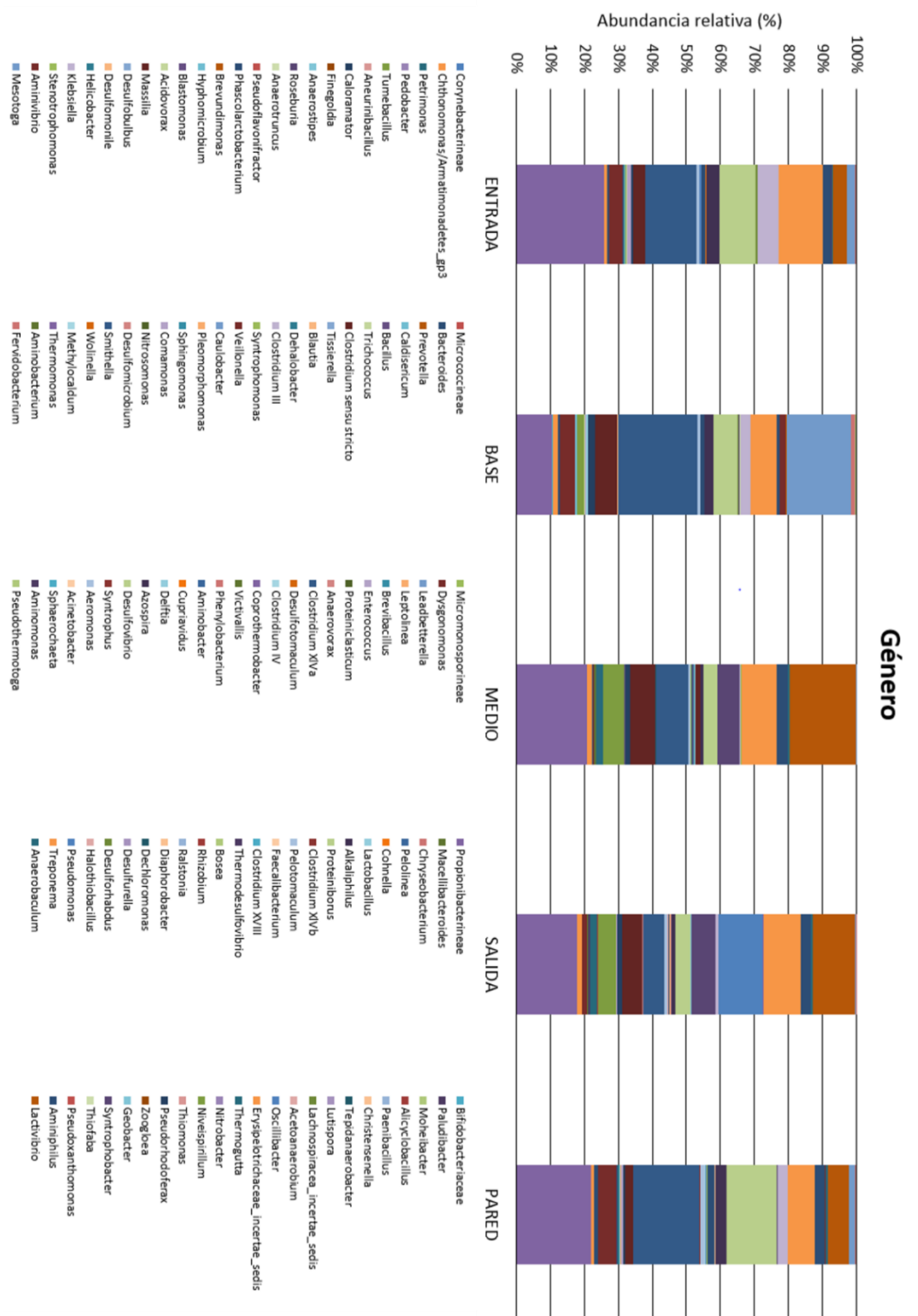


Figura 244. Abundancia relativa referente a los géneros encontrados en las muestras.

## V. CONCLUSIONES

El tratamiento anaeróbico de aguas residuales ofrece una excelente opción para eliminar los metales pesados como el níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ), que es uno de los principales elementos de desecho que se presentan en los efluentes de aguas residuales de las industrias metalúrgicas como la galvanizada.

Los resultados obtenidos en los análisis fisicoquímicos sugieren que la comunidad microbiana desarrollada sobre zeolita, empleada como soporte inorgánico para el tratamiento anaeróbico, juega un importante papel para la eliminación de metales pesados como  $\text{Ni}^{2+}$ , lo que permite una alta recuperación de metano.

Referente a la parte del análisis taxonómico permanecieron hasta el final del tratamiento los grupos microbianos *Clostridium*, *Spirochaetae* y *Thermotogae*, los cuales están asociados a la producción de metano obtenido durante el tratamiento.

En este sentido, este tratamiento propuesto en aguas residuales industriales podría conducir a una mejor conservación del medio ambiente y una estrategia accesible para tratar los efluentes de la industria, principalmente de la galvanoplastia.

Como aspecto futuro se desea comprobar si el níquel pasa de un estado de oxidación +2 a uno 0, esto con la ayuda de luz sincrotrón.

## VI. ANEXO

Datos experimentales correspondientes a la Figura 13.

Día	DQO (abs)		DQO (gr/L)		% Remoción
	Influente	Efluente	Influente	Efluente	
1	0.733	0.207	1.88658202	0.53277282	71.7598909
4	0.673	0.46	1.73215511	1.1839396	31.6493314
7	0.518	0.363	1.33321894	0.93428277	29.9227799
8	0.597	0.2	1.5365477	0.51475635	66.4991625
10	0.397	0.166	1.02179135	0.42724777	58.186398
11	0.471	0.175	1.2122512	0.45041181	62.8450106
14	0.662	0.382	1.70384351	0.98318463	42.2960725
15	0.638	0.254	1.51471985	0.60303894	60.1880878
16	0.584	0.257	1.38651472	0.61016144	55.9931507
17	0.642	0.351	1.52421652	0.83333333	45.3271028
18	0.63	0.433	1.4957265	1.02801519	31.2698413
21	0.665	0.429	1.57882241	1.01851852	35.4887218

Datos experimentales correspondientes a la Figura 14.

Día	Metano	
	Desplazamiento	Volumen
	(cm)	(cm <sup>3</sup> )
3	14.4	229.02264
8	11	174.94785
9	12	190.8522
10	13	206.75655
11	13	206.75655
15	12	190.8522
16	13.5	214.708725
17	12.5	198.804375
18	13.5	214.708725
19	13.4	213.11829
20	11.5	182.900025
21	11	174.94785

Datos experimentales correspondientes a la Figura 15.

Día	pH		Alcalinidad
	Influente	Efluente	Efluente
2	-	7.13	0.72
3	7.14	7.03	0.73
4	7.17	6.86	0.75
7	6.8	6.78	0.72
8	7.32	6.68	0.68
9	-	6.63	0.63
10	6.86	6.73	0.69
11	6.91	-	0.75
12	-	6.43	0.6
14	7.03	7.1	0.703
15	6.88	6.51	0.64
16	7.07	6.53	0.65
17	5.47	6.19	0.59
18	7.14	6.09	0.58
19	6.09	6.06	0.54
20	-	6.5	0.701
21	7.38	7.19	0.765

Datos experimentales correspondientes a la Tabla VIII.

	Entrada		Promedio	Desviación Estándar
<b>Sólidos Totales (ST)*</b>	0.6101	0.5979	0.604	0.0086267
<b>Sólidos Fijos (SF)*</b>	0.5601	0.5471	0.5536	0.00919239
<b>Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)*</b>	0.05	0.0508	0.0504	0.00056569

	Medio		Promedio	Desviación Estándar
<b>Sólidos Totales (ST)*</b>	0.6961	0.6852	0.69065	0.00770746
<b>Sólidos Fijos (SF)*</b>	0.6463	0.6357	0.641	0.00749533
<b>Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)*</b>	0.0498	0.0495	0.04965	0.00021213

	Salida		Promedio	Desviación Estándar
<b>Sólidos Totales (ST)*</b>	0.7572	0.7472	0.7522	0.00707107
<b>Sólidos Fijos (SF)*</b>	0.7045	0.6931	0.6988	0.00806102
<b>Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)*</b>	0.0527	0.0541	0.0534	0.00098995

\*g/g lodo + zeolita

Datos experimentales correspondientes a la Figura 19.

Día	Absorción Atómica			% de Remoción
	Efluente	Influente		
	Concentración (Ppm)	Lectura	Concentración (Ppm)	
1	0	5.419	270.95	100
3	0.348	3.476	173.8	99.79976985
4	0.254	3.363	168.15	99.84894439
7	0.24	3.4005	170.025	99.85884429
8	0.223	3.2225	161.125	99.86159814
11	0.374	3.0005	150.025	99.75070822
14	0.206	3.532	176.6	99.88335221
15	0.217	9.1455	457.275	99.95254497
16	0.3255	8.5515	427.575	99.923873
17	0.661	11.14	557	99.88132855
18	8.478	11.07	553.5	98.46829268
21	4.9575	9.622	481.1	98.96954895



## VII. BIBLIOGRAFÍA

Abarca, S., Mora, B. 2007. Contaminación del agua. *Rev. Biocenosis*. Vol. 20: 1-2.

Alboghobeish H, Tahmourespour A and Douidi M. 2014. The study of Nickel Resistant Bacteria (NiRB) isolated from wastewaters polluted with different industrial sources. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*. 12:44

APHA, 1995. Standard Methods: Washington, DC., American Public Health Association.

Arroyo, P., 2010. Los humedales construidos como sistemas para el tratamiento de agua residual industrial y urbana. Caracterización de las comunidades de bacterias presentes en estos ecosistemas. Tesis Doctoral. Universidad de León.

ASTDR. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2016. Recuperado de: [https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs15.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs15.html), el día 06 de Abril de 2018.

Áviles, G.L. 2012. Estudio de metanogénesis y desnitrificación simultánea en un reactor de lecho expandido de lodos anerobios granulados (EGSB). Hermosillo, Sonora.

Babel, S., Kurniawan, T.A. 2004. Cr(VI) removal from synthetic wastewater using coconut shell charcoal and commercial activated carbon modified with oxidizing agents and/or chitosan. *Rev. Chemosphere*. 54: 951–967.

Barakat M.A. 2011. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*. 4:361-377.

Basso, M.C., Cerrella, E.G., Cukierman, A.L., 2002. Empleo de algas marinas para la biosorción de metales pesados de aguas contaminadas. *Rev. ASADES*. 6(1).

Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, C., Gutierrez, S., Miranda, J., 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Rev. NOVA*. 4, (5).

Borboa, L., Balderrama, L., Moreno, A., Pacheco, D., Paniagua, T., Rivera, A. 2013. Pseudomonas. Universidad Autónoma de Durango. Recuperado de <https://es.scribd.com/presentation/174983603/Pseudomonas>

Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 45: 198-207.

Cañizares, V.R., 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Rev. Latinoamericana de Microbiología* 42:131-143

Carvajal, Á., Jiménez, L., Arias V., Valencia, H. 2013. Evaluación de la degradación por fotocatalisis heterogénea del Ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Scientia Et Technica*. Recuperado de [:http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84927487030](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84927487030)> ISSN 0122-1701

Certucha, M.T. 2009. Biosorción de cobre en un reactor de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB). Tesis Doctoral. UABC- Instituto de Ingeniería en Mexicali, Baja California.

Cervantes, C., Espino-Saldaña, A.E., Acevedo-Aguilar, F., León. I.L., Rivera-Cano, M.E., Avila-Rodríguez, M., WróbelKaczmarczyk, K., Wróbel-Zasada, K., Gutiérrez-Corona, J.F., Rodríguez-Zavala, J.S. and Moreno-Sánchez, R. 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48: 203-210.

Cuizano, N.A., Navarro, A.E., 2008. Biosorción de metales pesados por algas marinas: posible solución a la contaminación de bajas concentraciones. *Rev. RSEQ*. 104(2).

Domenech, J. 2003. Cryptosporidium y Giardia, problemas emergentes en el agua de consumo humano. *Rev. Sanidad Ambiental*. 22 (11)

Duffus J.H. 2002. Heavy metals - A meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Rev. Pure Appl. Chem.* 74, 793- 807. DOI: 10.1351/pac200274050793

EPA, Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos. 2017. Recuperado de: <https://espanol.epa.gov/espanol/terminos-c>

Fernandez, N., S. Montalvo, R. Borja, L. Guerrero, E. Sanchez, I. Cortes, M. F. Colmenarejo, L. Travieso, y F. Raposo. 2008. Performance evaluation of an anaerobic fluidized bed reactor with natural zeolite as support material when treating high-strength distillery wastewater: *Renewable Energy*, v. 33, p. 2458-2466.

Ferrer, A. 2003. Pesticide poisoning. *Annales Sis. San Navarra.* 26: 155- 171.

Figueira, M. M., B. Volesky, K. Azarian, y S. T. Ciminelli, 2000, Biosorption column performance with a metal mixture: *Environmental Science & Technology*, v. 34, p. 4320-4326.

Figuroa, G.M., 2013. Biosorción de Cu y Fe con biomasa anaerobia acidogénica inmovilizada en clinoptilolita. Posgrado en ciencias de la Ingeniería, Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.

Flores, A., Ly, M., Tapia N., Maldonado, H., 2001. Biorremediación de metales tóxicos en efluentes mineros aplicando Biosorción. *Rev. del Instituto de Investigación de la Facultad de Geología, Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas.* 4(67).

Gadd, G. M., 2009, Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 84, p. 13-28.

García-Morales, J., L. Romero-García, y D. Sales-Márquez, 1999, Influencia de las paradas estacionales sobre la biomasa inmovilizada en reactores anaerobios: *Ingeniería del Agua*, v. 6, p. 249-256.

Gikas P. 2008. Single and combined effects of nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms: A review. *J Hazard Mater* 159:187–203.

Gómez, Y., Coto, O., Abín, L., Hernández, Carmen. 2002. Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. Vol. 33, No. 1.

Gregori P. 2006 Química del medio ambiente. Actualizado: octubre de 2006. Disponible en: [mural.uv.es/osgrepei/TREBALL%20QUIMICA%20DEL%20MEDI%20AMBIENT](http://mural.uv.es/osgrepei/TREBALL%20QUIMICA%20DEL%20MEDI%20AMBIENT)

Gupta, R., Prerna A., Seema, R.K., Saxena., Mohapatra, H., 2000. Microbial biosorbents: meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Rev. Curr. Sci.* 78(8).

Halbinger-Flores, C., R. M. Ramírez Zamora, y A. Durán Moreno, 2002, Eliminación de amoníaco en aguas residuales clarificadas por el proceso de intercambio iónico con zeolitas, Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales, Guanajuato, Gto, FEMISCA, p. 1-7.

Hase, H., Nishiuchi, T., Sato, T., Otake, T., Yaita, T., Kobayashi, T., Yoneda, T. 2017. A novel method for remediation of nickel containing wastewater at neutral conditions. *Rev. Journal of Hazardous Materials*. 329 (49-56). Doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.01.019

Hausinger, R.P., 1987. Nickel utilization by microorganisms. *Rev. Microbiol.* 51, 22– 42.

Henriksson, L.E., DaSilva, F.J., 1978. Effects of some inorganic elements on nitrogenfixation in blue–green algae and some ecological aspects of pollution. *Zeitschrift fur Allgemeine Microbiol.* 18 (7), 487–494.

Hernández, A., Alonso, D., Jiménez, O., Santiago, M., Miguel, B. 2006. Estudio de los niveles de plomo, cadmio, zinc y arsénico, en aguas de la provincia de salamanca. *Rev. Esp. Salud Publica* vol.72 no.1.

Hutnan, M., L. Mrafkova, M. Drtil, y J. Derco, 1999, Methanogenic and nonmethanogenic activity of granulated sludge in anaerobic baffled reactor: Chemical Papers, v. 53.

INECC, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, 2007. Recuperado de: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/372/tecnolog.html>

Kiely, G. 1999. Ingeniería ambiental, fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión. Mc Graw Hill, España.

Lahav, O., y B. E. Morgan, 2004, Titration methodologies for monitoring of anaerobic digestion in developing countries - a review: Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 79, p. 1331-1341.

Li, J., Liu, Y., Zhang, T., Wang, L., Liu, X., Dai, R., 2011. The effect of Ni(II) on properties of bulking activated sludge and microbial analysis of sludge using 16S rDNA gene. *Rev. Bioresource Technology*. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.12.022

Lorenzo, Y., Obaya, M. 2006. La digestión anaerobia y los reactores UASB. Generalidades ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. XL, núm. 1, pp. 13-21 Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Ciudad de La Habana, Cuba

Madigan M. Martinko J. 2005. Brock Biology of Microorganisms, 11th ed. edición, Prentice Hall. ISBN0-13-144329-1.

Malamis, S., E. Katsou, M. Stylianou, K. J. Haralambous, y M. Loizidou, 2010, Copper removal from sludge permeate with ultrafiltration membranes using zeolite, bentonite and vermiculite as adsorbents: Water Science and Technology, v. 61.

Montalvo, S., Guerrero, R., Borja, E., Sanchez, Z., Milan, I., Cortes, y M. A. de la Rubia, 2012, Application of natural zeolites in anaerobic digestion processes: A review: Applied Clay Science, v. 58, p. 125-133.

Nies, D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 730-750.

Nies, D.H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiological Reviews*. 27: 313-339.

Nies, D.H., Silver, S. 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 14: 186- 99.

Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1997.

Pakshirajan, K., y T. Swaminathan, 2009, Biosorption of Copper and Cadmium in Packed Bed Columns with Live Immobilized Fungal Biomass of *Phanerochaete chrysosporium*: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 157, p. 159-173.

Palacios, E., Villalobos, L.A. 2007. Biosorción de Metales Pesados en Solución Acuosa Mediante Biomasa de *Saccharomyces Cerevisiae*. Tesis Licenciatura. Ciencias Farmacéuticas. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Universidad de las Américas Puebla.

Parawira, W., M. Murto, J. S. Read, y B. Mattiasson, 2004, Volatile fatty acid production during anaerobic mesophilic digestion of solid potato waste: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 79.

Park, D., Y.-S. Yun, y J. M. Park, 2010, The Past, Present, and Future Trends of Biosorption: *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 15, p. 86-102.

Paul, A.K. 2008. Microbial extracelular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Rev. Indian J. Microbiol.* 48:49-64.

Pinto, R. 2015. Controles de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III. Universidad de Salamanca. Recuperado de:

[http://www.fundacio.udl.cat/biobancos/doc/talleres/Controles\\_de\\_calidad\\_de\\_acidos\\_nucleicos\\_congreso\\_Rosa\\_Pinto.pdf](http://www.fundacio.udl.cat/biobancos/doc/talleres/Controles_de_calidad_de_acidos_nucleicos_congreso_Rosa_Pinto.pdf)

Plaza, J., 2012. Remoción de metales pesados empleando algas marinas. Trabajo de Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Planta. Buenos Aires, Argentina.

Reyes, T.E., Cerino, C.F., Suárez, H.M., 2006. Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Químicas, UANL. Recuperado de: [http://www.ingenierias.uanl.mx/31/31\\_remocion.pdf](http://www.ingenierias.uanl.mx/31/31_remocion.pdf)

Rojas, R., Narváez, J. 2008. A simple silica-based Method for Metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Rev. Mol Biotechnol.* 40(1):13-7

Rosselló, M. R., Antón, J., 2009. Procariotas: Arqueas y Bacterias. En: Vargas P. y Zardoya R. (editores). El árbol de la vida. Editorial Reverté. In press.

Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74(12): 5463-5467

Silver, S. and Phung, L.T. 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 32: 587-605.

Silver, S., Misra, T. 1988. Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Annual Reviews on Microbiology* 42: 717-43.

Soler, A. 2012. Biodiversidad de actinomicetos aislados de plantas depuradoras de aguas residuales. Estudio de la capacidad de biodegradación de compuestos tóxicos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia Departamento de Biotecnología. Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/14982/tesisUPV3760.pdf?sequence=6>

- Tirado, L. R., González, F. D., Martínez, L. J., Wilches, L. A., Celedón, J. N. 2015. Niveles de metales pesados en muestras biológicas y su importancia en salud. *Rev. Nac. Odontol.* 11(21):83-99. doi: <http://dx.doi.org/10.16925/od.v11i21.89>
- Trillas, M. C. 2015. Análisis de la viabilidad en una biomasa anaerobia acidogénica por citometría de flujo durante la biosorción de zinc. Tesis Licenciatura. Universidad de Sonora.
- Trillas, M. C., Olguin, V., Gómez, A., De la Cruz, M.C., Monge, O., Ochoa, V., Martínez, R.G., Certucha, M. T. 2017. Acondicionamiento de un reactor metanogénico empacado con zeolita para el tratamiento de aguas contaminadas con níquel. XXVI CIME, “Avances en Metalurgia, Materiales y Medio Ambiente”.
- Trujillo, M.A., Ramírez J.F., 2012. Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia. *Rev. Investigación Agraria y Ambiental.* 3, (2).
- Tsezos, M. 1980. Biosorción de uranio y torio. Ph. D. Tesis. Departamento de Ingeniería Química, McGill Universidad, Quebec.
- Volesky, B., 2003, Sorption and Biosorption, BV Sorbex, Inc., 316 p.
- Volke-Sepulveda T., Velasco-Trejo J.A. y de la Rosa Pérez D.A. (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Ciudad de México, México, 144 pp.
- Weisburg, W.G., Dobson, M.E., Samuel, J.E., Dasch, G.A., Mallavia, L.P., Baca, O., Mandelco, L., Sechrest, J.E., Weiss, E., Woese, C.R. 1991. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J Bacteriol.* 171(8):4202–4206.
- Zhao M, Xu Y, Zhang C, Rong H, Zeng G. 2016. New trends in removing heavy metals from wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100:6509-18.



Zou, B., Jiang, X., Duan, X., Zhao, X., Zhang, J., Tang, J., & Sun, G. (2017). An Integrated H-G Scheme Identifying Areas for Soil Remediation and Primary Heavy Metal Contributors: A Risk Perspective. *Scientific Reports*, 7(1).